

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591595

研究課題名(和文) 心臓形態形成時の細胞増殖・分化転換機構に対するポリコム遺伝子群の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Polycomb-group genes in regulating mechanisms for self-renewal and differentiation of cardiac progenitor cells.

研究代表者

白井 学 (Shirai, Manabu)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：70294121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：心臓前駆細胞の細胞増殖・分化の転換機構にポリコム遺伝子群が関与するか明らかにするために、Pcgf5ノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析した。その結果、ホモ個体は野生型よりも小さいものの正常に成長し、生殖能力も維持していた。しかし、生後1年付近でホモ個体のみが死亡し、その多くが心拡張、線維化を伴った心不全症状を示していた。生後12ヶ月のホモ個体において左室駆出率の減少、心拡張、胎仔期及び心不全時に特有な遺伝子群、Nppa/ANP、Acta1/ SK、Myh7/ MHCの発現上昇が確認された。以上の結果から、Pcgf5は成熟心筋細胞の機能維持に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To understand whether the Polycomb group (PcG) protein, Pcgf5, is implicated in maintaining balance between self-renewal and differentiation of cardiac progenitor cells, we generated Pcgf5 deficient mice. Homozygous mice were smaller than wild type. They were, however, fertile, and did not show any obvious developmental abnormalities. At around 1 year old, only homozygotes died with cardiac dysfunction. Pcgf5 deficient cardiomyocytes were hypertrophic and disorganized, however, no significant difference of cell proliferation and death between controls and homozygotes. Since 6 months old, Pcgf5 deficient males showed decrease of left ventricular ejection fraction, enlargement of the heart and upregulation of expression of Nppa/ANP, Acta1/ SK and Myh7/ Mhc, known to be upregulated by cardiac overloading. These findings indicate that Pcgf5 plays a pivotal role in maintaining the cardiac function in aged mice.

研究分野：循環器発生学

キーワード：ポリコム遺伝子群 心臓発生 心不全

1. 研究開始当初の背景

ポリコム遺伝子群は、血球細胞を始めとする様々な組織幹細胞の自己複製を制御することから、多能性を持つ幹細胞の維持に重要である。最近の研究により、複雑な構造変化を伴って形成される心臓にも、多分化能を持つ心臓前駆細胞の存在が示唆されている。心臓前駆細胞は自己複製能を維持し、未熟な心筋細胞や心内膜に分化、移動し将来の心室、心房を形成する。未熟な心筋細胞も増殖能を維持し、心室では緻密層と肉柱層を形成する成熟過程でその能力を失う。心臓前駆細胞の自己増殖、分化への転換を制御する分子機構について、様々な転写調節因子の関与が示唆されているが、未だ不明な点が多く残されている。ポリコム遺伝子 *Pcgf5* は、心臓形態形成期に胎仔心臓で強く発現することから、心臓前駆細胞の自己増殖、分化への転換に対して、ポリコム遺伝子群が関与すると仮定し、*Pcgf5* 遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作成、解析を行った。

2. 研究の目的

心臓前駆細胞の分化・成熟過程に重要な、細胞増殖・分化の転換機構の一端を解明し、更に、この転換機構の破綻が、ヒト先天性心疾患を生じさせる可能性を探索する研究基盤を確立するために、*Pcgf5* KOマウスの表現型解析を詳細に行った。発現解析に基づく当初の予想では、*Pcgf5*の心筋前駆細胞分化・増殖への関与が強く示唆されたが、*Pcgf5* KOマウスが正常に生まれ、生殖能力も維持していたため、成熟心筋細胞の維持機構に対する*Pcgf5*の関与についても視野に入れた上で、様々な週令のマウスにおいて、心臓超音波診断、遺伝子発現解析、組織学的解析を行った。

3. 研究の方法

(1) *Pcgf5* KO マウスの作製及び、ホモ個体の作出。

Pcgf5 KO マウスは組織特異的に遺伝子を欠損できるように Cre-lox システムを用いて作製した (基盤 (C)、平成 21-23 年度)。まず全身で *Pcgf5* 遺伝子の欠損を生じさせるために生殖細胞で Cre 遺伝子を発現する CMV-Cre マウスと交配し、ホモ個体を得るために、ヘテロ個体同士を交配した (図 1)。

(2) 解剖学的・組織学的手法による、*Pcgf5* KO マウスの解析。

Pcgf5 KO マウス個体の体長、体重、各臓器の重さを計測し、野生型、ホモ個体間で比較した。また、取り出した心臓を 4% PFA を用いて 4°C、一晚固定後、パラフィン切片、凍結切片を作成し、ヘマトキシリンエオシン染色、マツソントリクローム染色を行った。更に、心筋細胞の増殖を抗リン酸化ヒストン H3 抗体を用いた免疫染色、細胞死を、TUNEL 染

色を行って比較した。

(3) 心臓超音波診断。

小動物用超音波画像診断装置を用いて、*Pcgf5* KO マウスの心機能を様々な週令 (生後 10 週令、6、8、10、12 ヶ月令) において経時的に計測した。

(4) 遺伝子発現解析。

Pcgf5 KO マウスの左心室組織片を一部切り出し、液体窒素を用いて凍結保存した。total RNA を抽出、cDNA 合成後、qPCR 法を用いて、*Pcgf5* KO マウス心臓において野生型、ホモ個体間で遺伝子発現量を比較した。

4. 研究成果

(1) *Pcgf5* KO マウスの作製及び、ホモ個体の作出。

Pcgf5 が個体発生時に重要なかどうかを明らかにするために、生殖細胞で Cre 遺伝子を発現する CMV-Cre マウスと交配し、全身で *Pcgf5* の欠損を生じさせた (図 1a)。得られたヘテロ個体同士を交配したところ、当初、*Pcgf5* が発生中の心臓で重要な働きを持つと、*Pcgf5* の発現パターンから推察されたが、ホモ個体は野生型に比べて小さいものの (図 1b)、正常に生まれ (表 1)、生殖能力も維持していた。

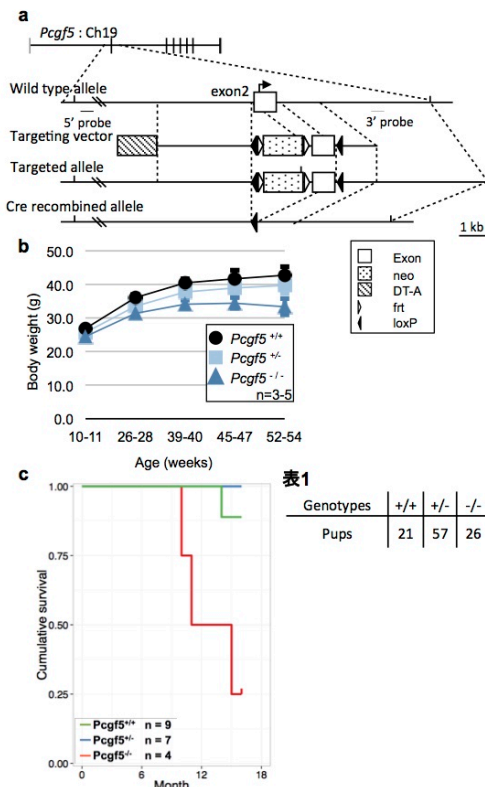


図 1 *Pcgf5* KO マウスの作製

- a. *Pcgf5* KO マウス作成法
- b. 体重の変化
- c. 生存曲線

表 1 各 genotype の出生数。

(2) 解剖学的、組織学的解析。

Pcgf5 KO マウスは正常に生まれるものの、長期飼育の過程で生後 12 ヶ月を過ぎるとホモ個体のみ死亡し (図 1c)、その多くが心拡張、線維化を伴った心不全症状を示していた (図 2a)。生後 12 ヶ月の個体を組織学的に詳細に解析したところ、細胞増殖、細胞死については野生型とホモ個体の間で大きな差がなかったが、ホモ個体の心筋線維の一部が構造変化を起こしていた (図 2b)。また、心筋細胞の肥大も確認された (図 2c)。

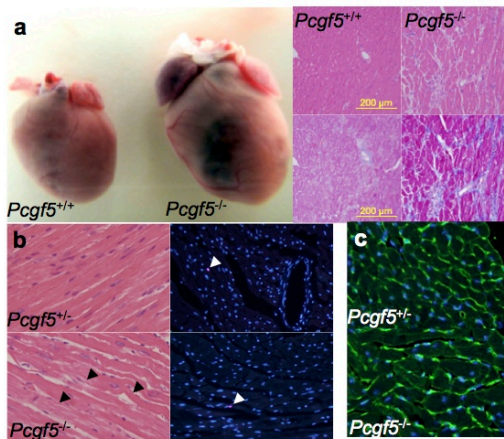


図 2 *Pcgf5* KO マウスの心臓は拡張し、心不全症状を示す。

- 15 ヶ月令の *Pcgf5* KO マウス心臓。ホモ個体で心臓は拡張し (左写真)、線維化が起きている (右写真)。
- ホモ個体で心筋繊維が崩れている (左写真)。細胞増殖に変化はない (右写真)。
- WGA 染色による、心筋線維の比較。ホモ個体のほうが、心筋繊維が太い。

(3) 心臓超音波診断。

Pcgf5 KO マウスにおける心不全がいつの時期から生じるのかを明らかにするために、小動物用超音波画像診断を用いて、生後 10 週令、6、8、10 ヶ月の時期に、同じ個体群の心機能を経時的に計測した。その結果、生後 6 ヶ月令以降、野生型に比べてホモ個体の左心室駆出率の減少が確認された (図 3)。

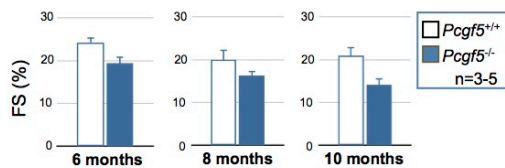


図 3 *Pcgf5* KO マウスにおける、心機能は経時的に悪化する。

(4) 遺伝子発現解析。

生後 12 ヶ月の *Pcgf5* KO マウス左心室における遺伝子発現量を野生型、ホモ個体間で比較したところ、*Nppa/ANP*、*Nppb/BNP*、*Acta1/α Skeletal actin*、*Myh7/β MHC* といった、胎仔心臓及び心不全時に特徴的な遺伝子の発現上昇が確認された (図 4)。

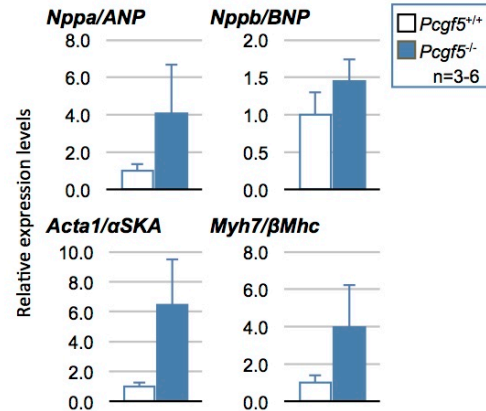


図 4 *Pcgf5* KO マウスの心臓における、遺伝子発現変化。

Nppa/ANP、*Nppb/BNP*、*Acta1/α Skeletal actin*、*Myh7/β MHC* といった、胎仔心臓及び心不全時に特徴的な遺伝子の発現上昇が確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- 白井 学、瀧原 義宏、森崎 隆幸、「心臓発生における、ポリコム遺伝子群の発現及び機能解析」第11回 心臓血管発生研究会、2012年10月20日、福島
- Manabu Shirai, Yoshihiro Takihara, Takayuki Morisaki、「Functional analysis of *Pcgf5* (*Polycomb ring finger 5*)」、第35回 日本分子生物学会、2012年12月11日、福岡
- Manabu Shirai, Yoshihiro Takihara, Takayuki Morisaki、「*Pcgf5* contribute to PRC1 (*Polycomb repressive complex 1*) in the developing cardiac cells」、

第7回 TAKAO International Symposium
on Ethiology and Morphogenesis of
Congenital Heart Disease、2013年7月15
日、東京

(4) Manabu Shirai, Yoshihiro Takihara,
Takayuki Morisaki、「Pcgf5 contributes
to PRC1 (Polycomb repressive complex
1) in the developing heart」、第36回
日本分子生物学会、2013年12月3日、兵庫

(5) Manabu Shirai, Kentaro Otani,
Hirotugu Tsuchimochi, Yoshihiro
Takahara, Takayuki Morisaki、
「Functional roles of Polycomb ring
finger 5 (Pcgf5) in the heart of adult
mice」、第37回 日本分子生物学会、2014
年11月26日、神奈川

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 学 (SHIRAI MANABU)
国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：70294121

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者

森崎 隆幸 (MORISKI TAKAYUKI)
国立循環器病研究センター・研究所・部長
研究者番号：30174410

森崎 裕子 (MORISKI HIROKO)
国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号：40311451

本多 賢彦 (HONDA TAKEHIKO)
国立循環器病研究センター・研究所・室員
研究者番号：10455545