

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2013

課題番号：24689037

研究課題名(和文) 心筋細胞特異的発現遺伝子群の統合的調節機構および慢性的疾患発生機序の解明

研究課題名(英文) Coordinated epigenetic regulation of cell type-specific genes and chronic disease development in cardiomyocytes.

研究代表者

小田 真由美(Oda, Mayumi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80567511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,200,000円、(間接経費) 2,760,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では各発生段階からの均一な心筋細胞集団からDNAメチル化エピゲノムデータから、細胞種特異的なDNAメチル化エピゲノムの成り立ちについての理解を深めた。結果として、細胞特異的発現遺伝子の一部に、gene body領域での顕著なDNAメチル化変動を経る遺伝子があることを見出した。これら成熟細胞におけるgene body領域の低メチル化状態は転写マシナリーおよびp300の蓄積を伴い、さらに成熟過程における細胞種および発生段階特異的な一過性なDNA脱メチル化中間産物の蓄積と関連している。gene body領域でのDNA脱メチル化プロセスが細胞特異的発現遺伝子発現に関与している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I made several cell type-specific DNA methylation epigenome data of isolated cardiomyocyte populations from several developmental stages and pushed forward understanding of the epigenome in matured cells. I compared the cardiomyocyte epigenome with those of embryonic stem cells and liver, and also with the heart failure cardiac muscle cells. As the result, small subpopulation of genes with remarkable DNA methylation changes in their gene body regions were included in the cell type-specific gene trait. These gene body regions accumulated the transcription machinery and histone acetylation enzyme in the matured cells, and transiently accumulate the derivatives of methyl cytosine demethylation, which implicates the active demethylation process. Our study showed the involvement of the active DNA demethylation process in gene body regions and indicates the possibility that the gene body DNA hypomethylation may stabilize the cell type-specific gene transcription.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：エピゲノム DNAメチル化 細胞特異的発現遺伝子 成熟細胞 DNA脱メチル化機構 病態発生 エピジェネティック制御 gene body領域

1. 研究開始当初の背景

我が国における心不全患者は160万人とも言われおり、人口増加とともに患者数は増加の一途をたどっている。心不全の前段階である病的な心肥大はストレスや圧負荷などによって引き起こされ、一過性に心機能を代償する機能を果たすが、慢性的な心肥大は心不全を引き起こす不可逆的变化の原因となる。心機能を司る心筋細胞は発生過程では増殖が可能であるが、成熟後は細胞分裂を停止し、ほとんど増殖しない細胞へと変化する。機能恒常性への細胞能力の変化が明確に観察される細胞種であるといえる。

心筋細胞は他の臓器の形成に先立って心臓の拍動に重要な細胞特異的機能である収縮能を獲得する。いわば最も早期に分化する細胞である。胎仔心筋細胞は、心臓の原基である心円筒の段階から、収縮能を維持したまま、胚性期中期から後期への複雑な臓器形成を経過し、その可塑性は出生後もしばらく保持される。体循環は胚性中期以降の胚の成長に不可欠なため、心筋細胞に一旦成立した収縮力は発生の早い時期から体全体への循環を全うするのに十分強くなければならないし、発生および成長期の急激な成長にあわせて予備能力を急激に増大させていく必要がある。一方で、出生後の一定期間を経過すると、胎仔心筋細胞は可塑性とひきかえに体循環を担う強い収縮力を獲得し、堅牢な心臓の構成に寄与する成熟心筋細胞への変化を遂げる。心筋細胞の成熟過程では、細胞分裂が停止し、ひとつひとつが巨大な細胞に成長して核あたりの細胞体積は劇的に増加する。つまり、成熟過程において核ゲノム情報の利用戦略は劇的に変化するはずである。また、成熟した心筋細胞は過剰な負荷に対して、細胞分裂を経ることなく細胞の肥大化により可逆的な心筋細胞機能の補償を行う。しかし、病的なストレスによって心肥大が起こる際には、肥大化と同時に胎仔期心筋細胞特異的な遺伝子の発現が繰り返される "fetal program" の再活性化が起こる (Feldman et al. *Circ Res.* 1993.)。このような肥大化が慢性的に起こると細胞は不可逆的な病的状態に陥り、心不全を発症する。"fetal program" の再活性化は、心不全には繋がりにくい生理的な心肥大 (運動による負荷に伴う) では起こらないことから (Abel and Doenst. *Cardiovasc Res.* 2011.)、病的な心肥大では、異所的な胎仔期心筋細胞特異的な遺伝子の発現が、定められた成熟心筋細胞のエピジェネティック状態に体系的な変化を起こしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究計画では、慢性的な負荷によって細胞機能の恒常性が破られる際のエピジェネ

ティック状態の変化を、最も安定と考えられる DNA メチル化を指標にして解析し、機能解析実験を行うことにより心不全発生の疾患エピゲノムおよび DNA メチル化の機能の理解を目標とする。具体的には、心筋細胞のエピジェネティック状態を、DNA メチル化状態を指標にして、ゲノム DNA 上を偏りなく比較する。材料として、

- (1) 幼若心筋細胞
- (2) 成熟し可塑性を失った成熟心筋細胞、
- (3) 成熟した心筋細胞に加わるストレスによって異所的な遺伝子発現の起こる病的な心筋細胞

を用いてそれぞれ比較し、成熟心筋細胞との相似点と相違点を中心に心不全発症の疾患エピゲノムの本態を解明し、診断・治療の緒を探索することを目的とする。

従って本研究計画において明らかにすることは以下の3点である。

健常および病態心筋細胞の DNA メチル化エピゲノム、gene body 領域の心筋細胞特異的な DNA 脱メチル化機構、gene body メチル化の生物学的意義の解明。

3. 研究の方法

本研究計画では、次世代シーケンサーを用いて人為的疾患モデルマウス的心筋細胞の DNA メチル化エピゲノム解析を行い、成熟心筋細胞を軸に発生段階および病的状態の心筋細胞と比較することで、心筋細胞の発生および病態発生における機能的変化の違いをエピジェネティック分子機構の動態の違いによって説明する。また、心筋細胞特異的な DNA メチル化の変化として心筋細胞特異的な遺伝子の gene body 領域の DNA 脱メチル化に着目し、脱メチル化中間産物の観察およびレトロウイルスベクターによる脱メチル化分子機構関連遺伝子の遺伝子操作を用いて心筋細胞における脱メチル化分子機構の解明を目指す。

本研究計画は、心筋細胞のエピゲノム解析を発端とし、vivo から取り出した心筋細胞を対照として、心筋細胞の発生と主に gene body DNA メチル化に関する分子機構の解明を中心として実験を進めていく。実験計画の主な柱として、(1) 成熟細胞および疾患細胞エピゲノム解析、(2) gene body DNA メチル化機能解析、(3) gene body DNA 脱メチル化分子機構の解明の3項目について研究を進める。

- (1) 成熟細胞および疾患細胞エピゲノム解析

純系マウスから作製した心不全モデル動物の心臓から精製した心筋細胞を用いて DNA メチル化エピゲノムを解析する。解析方法としては、次世代シーケンサー用に申請者ら

が開発した HELP tagging 法を用いる。これはプロモーターおよび非プロモーター領域を含むすべてのゲノム領域の CCGG 配列 (HpaII/MspI 制限酵素認識配列) を対象とした網羅的解析法であり、比較的 low コストで網羅的・ゲノムワイドな解析が可能である。我々は既に異なる発生段階における心筋細胞の DNA メチル化エピゲノムデータを取得しており、同様にして疾患モデルから採取した心筋細胞のエピゲノムを解析して比較を行う。疾患モデル動物として、純系 C57BL/6 系統マウスに大動脈縮窄術 (TAC) を施して 10-20 週経過した心不全モデル動物を作製し、エコーで不全の可否を確認したのち開腹し、心重量・体重量比 (HW/BW 比) を計測して肥大型および不全期疾患モデル組織として用いる。採取した心臓より、Langendorff 灌流を用いた酵素的処理により心筋細胞のみを単離し、解析に用いる。また、非心筋細胞の対照として、心臓線維芽細胞を採取し、それぞれを HELP tagging 法による DNA メチル化解析に供する。健常動物については同じ C57BL/6 系統マウスによる胎仔期・新生仔期・成体の心筋細胞および心臓線維芽細胞の DNA メチル化データを得て、心筋細胞に特徴的な DNA メチル化動態を示す領域を中心に注意深く疾患モデル心筋細胞との差異を探索する。

(2) gene body DNA メチル化機能解析

我々は既に健常心筋細胞および心臓線維芽細胞の遺伝子発現解析から、心筋細胞で特異的に発現の高い遺伝子群を心筋細胞特異的発現遺伝子として抽出した。興味深いことに、この一部に特にエクソン数の多い遺伝子 (高エクソン数遺伝子) が含まれている。元来、心筋細胞の収縮能のためには、筋繊維を構成する巨大な筋繊維タンパクやエネルギーおよび収縮刺激を生み出す各種膜タンパクなどが大量に必要であり、これらの一部は多くのエクソンを持つ複雑な構造の遺伝子にコードされている。幹細胞の 20 倍以上の径を持つ巨大な細胞となる成熟心筋細胞にはこれら高エクソン数遺伝子の産物が大量に蓄積されていることから、gene body 領域の脱メチル化は心筋細胞特異的な遺伝子発現の効率化に寄与すると予想し、gene body DNA メチル化の機能に焦点を当てて研究を進める。

(3) gene body DNA 脱メチル化分子機構の解明

gene body DNA 脱メチル化の操作による心筋細胞特異的遺伝子の発現効率化が可能かどうかを検討するために、脱メチル化分子機構に関わると考えられる遺伝子の機能解析を行う。近年明らかにされつつある DNA 脱メチル化分子機構には二種類あり、DNA 複

製による受動的脱メチル化に対し能動的脱メチル化の分子機構が明らかになりつつある。能動的脱メチル化では 5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) 化 (3-1) が脱メチル化の前段階として起こっている (Wu and Zhang, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010)。そこで、心筋細胞の脱メチル化領域の 5hmC 量を抗体法を用いて定量的に計測し、能動的脱メチル化機構の寄与を検討する。

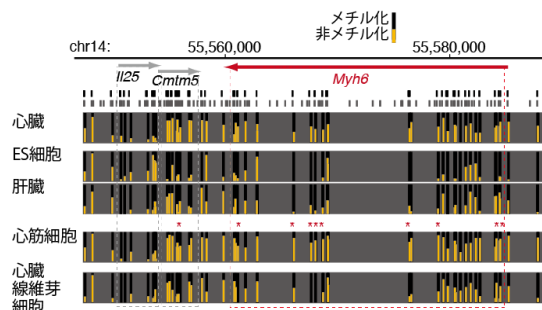
4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

健常および病態心筋細胞の DNA メチル化エピゲノム

本研究計画において、私は HELP tagging 法を用い、マウスの胎仔期・新生仔期・成体期の心臓から単離・精製された心筋細胞集団の DNA メチル化解析を行った。このことにより、約 100 万箇所以上の CpG 配列における定量的な DNA メチル化プロファイルを作製することが出来た。対照として同様に肝臓と ES 細胞からも DNA メチル化プロファイルデータを取得した。

その結果、gene body 領域において DNA メチル化状態の変化が見られる遺伝子集団には細胞特異的な発現パターンを示す遺伝子が含まれることが明らかになった。成体心筋細胞においては、極めて高い発現を示すミオシン重鎖遺伝子 *Myh6* を含む複数の遺伝子の gene body 領域は細胞種特異的に低メチル化状態にあった (図 1)。このことは活発な遺伝子の gene body 領域がメチル化されるという以前の報告に対し、少数の例外が存在することを示した。このように低メチル化 gene body 領域を持つ細胞特異的発現遺伝子は成体肝細胞にも存在しており、成体における成熟した細胞集団におけるエピゲノムの特徴のひとつであるといえる。

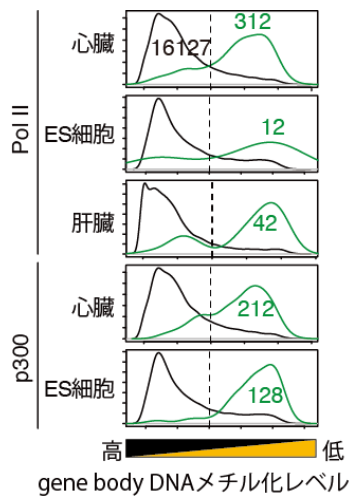


(図 1) 細胞特異的な gene body 領域の低メチル化。Myh6 gene body 領域では、心臓、特に心筋細胞において非メチル化度 (黄色) が高かった。

また、病態心筋細胞モデルとして大動脈縮窄術 (TAC) を行った 26 週齢のマウス心臓からも心筋細胞を単離し、同様に DNA メチル化プロファイルを作製することに成功した。対照として作製した 26 週齢の非侵襲的な心筋細胞との比較により、HELP tagging 法による DNA メチル化プロファイルにおいては、多くの領域での低メチル化傾向が明らかになった。これらの領域は、心筋細胞の成熟にともなって高メチル化になる遺伝子領域とは別の領域グループであった。

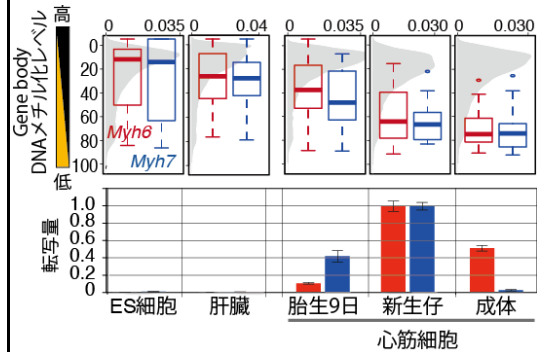
Gene body 領域の心筋細胞特異的 DNA メチル化機構

ENCODE プロジェクトにおける ChIP データによれば、心筋細胞で低メチル化状態にある複数の遺伝子の gene body 領域には Pol II, p300 および CTCF の蓄積が認められた。成熟細胞 (心筋細胞、肝細胞) では、Pol II および p300 の gene body 領域への共局在は低メチル化 gene body 領域と相関しており (図 2) 多くの遺伝子が高発現していることから、active な転写マシナリーとの強い関連が予想される。一方で、ES 細胞では gene body 領域における顕著な Pol II/p300 の共局在は観察されず、p300 の蓄積が低メチル gene body 領域を持つ遺伝子に多く観察された。



(図 2) Pol II/p300 の蓄積と gene body 領域の低メチル化状態。Gene body 領域に Pol II または p300 を蓄積する遺伝子の gene body DNA メチル化レベル (緑色) は低かった。

心筋細胞における Myh6 遺伝子のメチル化状態を発生段階で比較してみると、gene body 領域の脱メチル化度は発生・成熟に伴って増大していた。また、発生段階特異的に発現の変化する Myh6 と Myh7 の発現と比較すると、この発生にともなって増大する低メチル化傾向は、遺伝子発現の強さが低メチル化状態の直近の決定因子でないことを示していた。



(図 3) 発生に伴う Myh6 gene body 領域の低メチル化。Myh6 および Myh7 の転写量との直接の相関はないが、Myh6-Myh7 領域のメチル化レベルは発生に伴いより低くなった。

Gene body 領域の低メチル化の原因を調べるために、メチルシトシン脱メチル化の中間産物である 5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) の分布を調べたところ、ES 細胞と比較して、成熟心筋細胞の gene body における 5hmC は、成熟肝細胞と同程度に減少していた。このことから、未分化細胞に存在する 5hmC が発生のいずれかの段階で脱メチル化に寄与した可能性が考えられる。一方で、肝細胞においては、成熟肝細胞で低メチル化である gene body 領域のうちいくつかは 5hmC を多く蓄積しており、これらは成熟細胞においてもなお active なメチルシトシンの代謝が存在することを示している。心筋細胞がほとんど分裂を行わないことから、gene body 領域における脱メチル化は成熟過程において、様々な発生段階でメチルシトシン中間産物を経て行われている可能性が示唆された。

Gene body メチル化の生物学的意義の解明

本研究内容より、成熟分化細胞における gene body 領域の低メチル化は遺伝子および細胞種ごとに異なる発生段階において行われており、その後低メチル化状態が維持されていると考えられる。この維持された低メチル化領域が極めて大量の Pol II/p300 を蓄積することにより、これらの因子のゲノム上の大きなパイアスを形成している事実は、エピゲノムと転写マシナリー分布の持続的な相互作用を表しており、DNA メチル化がシスの因子としてゲノム機能の安定化に寄与している可能性を示している。

(2) 得られた成果の国内外でのインパクト

近年、ヒドロキシル化酵素である Tet ファミリーの発見を始めとして、能動的 DNA 脱メチル化の分子機構が明らかになってきており、新たな知見が続々と報告されている (Wu and Zhang, *Cell*, 2014)。Tet 酵素の働きにより、メチルシトシンはヒドロキシメチルシトシン (5hmC) に変換され、選択的に脱メチル化が起こると考えられている。本研究成

果は、定量的なゲノムワイド DNA メチル化解析により広い範囲で低メチル化状態となっている gene body 領域を発見し、その領域での能動的 DNA 脱メチル化の可能性を示した。このことにより、成熟細胞におけるエピゲノムの成り立ちとその影響を理解するための興味深い知見を示したといえる。

(3) 今後の展望

本研究計画では、細胞種および遺伝子ごとに異なる発生段階において gene body 領域における 5hmC を介した脱メチル化が起こる可能性が示された。こうして形成された低メチル化状態の生物学的役割についてさらに明らかにするために、様々な発生段階における脱メチル化関連酵素群の干渉を行うことによって、選択的な脱メチル化の阻害が実際に遺伝子発現バランスに影響するのかどうかを明らかにしていきたい。

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1件)

1. Kodo K, Nishizawa T, Furutani M, Arai S, Ishihara K, Oda M, Makino S, Fukuda K, Takahashi T, Matsuoka R, Nakanishi T, Yamagishi H

Genetic analysis of essential cardiac transcription factors in 256 patients with non-syndromic congenital heart defects. Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society

[査読あり] 76 2012 1703-1711

<http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-11-1389>

[学会発表](計5件)

1. 小田 真由美 (ポスター発表)

成熟細胞の細胞特異的遺伝子 gene body 領域における能動的 DNA 脱メチル化分子機構の関与

第8回エピジェネティクス研究会年会

2014年5月25日～2014年5月27日

伊藤国際学術研究センター(東京都)

2. 小田 真由美 (ポスター発表)

DNA メチル化エピゲノム解析による哺乳類 gene body DNA メチル化の成り立ちと転写の関係

NGS 現場の会第三回研究会

2013年9月4日～2013年9月5日

神戸国際会議場(兵庫県)

3. 小田 真由美 (ポスター発表)

DNA メチル化エピゲノムによるアクセシビリティ調節と細胞特異的遺伝子発現の効率化

第7回エピジェネティクス研究会年会

2013年5月30日～2013年5月31日

奈良県新公会堂(奈良県)

4. Mayumi Oda (ポスター発表)

Cell Type-specific Gene body DNA Hypomethylation Contributes to Transcriptional Efficiency in Cardiomyocyte Maturation.

第6回エピジェネティクス研究会年会

2012年5月14日～2012年5月15日

一橋学術総合センター(東京都)

5. Mayumi Oda (口頭発表)

Escape of Gene Body DNA Methylation in Cardiac Genes is Cooperative With the Cell Type-specific Expression Patterns.

Weinstein meeting 2012

2012年5月2日～2012年5月15日

Sheraton Chicago Hotel and Towers (シカゴ・イリノイ州・米国)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

坂口講座テニユアトラック・プログラム

http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/sakaguchi/scholar/m_oda/

慶應義塾大学医学部・システム医学講座

<http://systemsmedicine.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 真由美 (ODA, Mayumi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 80567511

(2) 研究協力者

迫田 実希 (SAKOTA, Miki)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号: なし