

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291049

研究課題名(和文) 心臓再生・心機能向上を司るエピ因子群の統合理解

研究課題名(英文) Functional analysis of epigenetic intreating factors during heart regeneration

## 研究代表者

竹内 純 (Takeuchi, Jun)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：10451999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究期間を通して、哺乳類心臓再生を向上させる機構について、2つの研究結果をまとめることが出来た。一つは、心筋再生に関わる際に心臓前駆細胞遺伝子マーカーSal11が発現しエピ因子の機能を制御することを見出した(Morita et al., submitted 2016b)。Sal11は初期心臓発生において、心筋心臓前駆細胞遺伝子である(Morita et al., JMCC 2016; 3月号雑誌表紙：特願2015-187363)。二つめは、クロマチン因子Baf60cは心臓再生において重要な働きをしていることを見出した(Nakamura et al., DGD 2016)。

研究成果の概要(英文)：For mammalian heart regeneration or repair, we have reported about two factors during heart regeneration to JMCC (Morita et al., 2016a) and DGD (Nakamura et al., 2016). Sal11 which plays as a key factor for cardiac induction (Morita et al., JMCC 2016a) is also re-activated during heart regeneration (Morita et al., submitted 2016b). Baf60c has been identified as a key factor for cardiac formation (Koshiba-Takeuchi et al., Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease 2016; Takeuchi & Bruneau. Nature 2009) and also functions for heart regeneration (Nakamura et al., DGD 2016). These results will open the regenerative mechanisms in several organs for the basic science and will give us supportive idea for the heart repair in human.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：心臓再生 エピジェネティック因子 運命決定 特定因子

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の心臓は再生不可能と考えられてきたが、出生後のマウス数日以内であれば心尖部切除後も心筋のみならず、心機能も回復することが報告された (Porrello et al., *Science* 2011)。この過程において、心筋が再び増殖活性を持ち分化することによって心臓再生が行われるとされており、心筋を中心とした研究が多くなされている。

しかしながら、少なくとも二つの疑問が考えられる。なぜ心筋が再び増殖活性をもつのであろうか？これについては、明確な記載が無い。本研究ではゲノム構造に変化が生じることによって、心臓遺伝子の発現調節を行い、心筋増殖強いては心臓再生へと至ると考えられる。その可能性としてクロマチン構造変換因子群の一つである Baf60c に着目して、心筋再生との関連を調べてきた。興味深いことに、心臓発生に重要な役割を担っているエピ因子 Baf60c (Takeuchi & Bruneau *Nature* 2009) が心臓再生過程においても一過的に心筋に発現してくることを発見した。複数種類存在する心臓細胞の中で、再生に寄与するのは果たして心筋のみなのであろうか？しかしながら、心臓再生現象をより深く理解するには、心臓の約 50% の細胞数を占める心臓線維芽細胞の性質理解および線維芽細胞からの影響を理解することは非常に重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

心臓再生研究は心筋や未分化な心臓幹細胞の性質理解に特化した研究が中心であった (Sadek, Martin, Takeuchi et al., *Stem Cell Reports* 2014)。心臓再生を理解する上において、心筋性質の理解は重要なテーマであると考えられる。よって、本研究では、心筋の可塑性を理解する上で、先行研究において見出されたクロマチン因子 Baf60c に着目して、心筋の可塑的機構とゲノム構造との関連について明らかにすることを目的とする。二つめとして、様々な視点からの研究アプローチが必要であると考えられる。つまり、心筋・心臓幹細胞のみならず、心臓の約 50% の細胞数を占める線維芽細胞の性質を理解することも重要である。広く線維芽細胞を標識する Thy1 をマーカーとして、心臓再生時における線維芽細胞の寄与を明らかにすることを目的とする。

心臓再生機構を包括的に理解するためには、心筋以外の心臓構成細胞に特化した研究アプローチも必要となってくる。本研究では、

3年間の研究期間で、心臓再生時における心筋の性質変化をエピ因子の機能から明らかにする。包括的研究を遂行する上で、心筋より細胞数の多い、線維芽細胞の性質理解も重要であると考えられる。よって、本研究では、以下の2つのテーマ(心筋と線維芽細胞)に着目して研究を行っていく。

(1) 心筋の可塑性理解のためのエピ因子研究

(2) 心臓再生時における Thy1 陽性線維芽細胞の機能機序の理解

## 3. 研究の方法

(1) エピ因子と心臓再生

二つの方法を用いて、実験を遂行する。A: 発現様式と発現変化について、Baf60 ファミリーに着目して研究を行う。B: siRNA を用いた Baf60c 機能阻害実験からの心筋再生時における機能機序の理解。

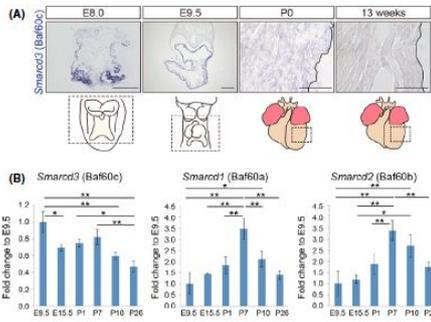
(2) 線維芽細胞の寄与と性質理解

線維芽細胞マーカーである Thy1/PDGFRα を指標として *in vitro* 系において培養を行い、分化状況・遺伝子発現変化を明らかにする。特異的な発現変化をする遺伝子・因子が存在すれば、遺伝子改変マウスを作製して心臓再生を明らかにするためのモデルとして利用し、研究を進める。

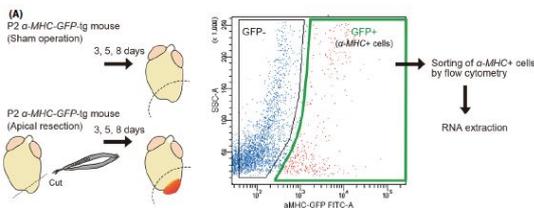
## 4. 研究成果

(1) エピ因子と心臓再生

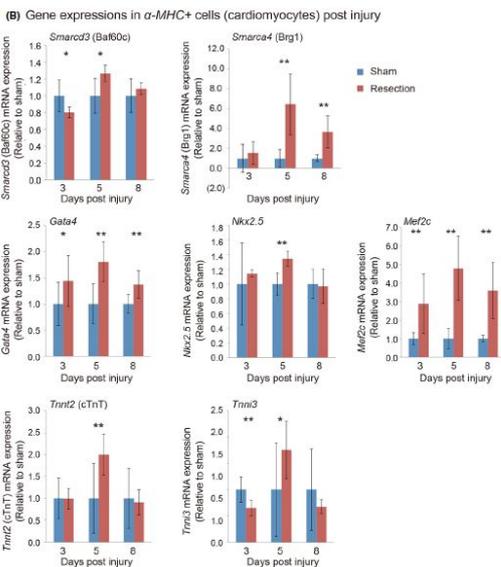
A: 心臓発生時・発育時における Baf60 ファミリー mRNA の発現変化: 出生後の心臓発育段階における Baf60 ファミリー (*Samcd1/Smarcd2/Smardc3*) の発現変化を調べたところ、心臓成熟に伴って *Smardc3* (Baf60c をコードする遺伝子) のみが顕著に減少していることが分かった。*Smardc1* および *Smardc2* に関しては出生後も発現亢進が認められ、3 遺伝子において *Smardc3* が最も心筋可塑性と関連がある結果が得られた(次項図(B))。また、*Smardc3* mRNA の発現局在を *in situ hybridization* 法を用いて確認したところ、心臓形成初期では発現が強く、発生が進むに連れて発現が減少していき、成体(生後 13 週齢)では発現が認められなくなった(下図(A))濃青色は *Smardc3* mRNA のシグナル)。



次に、心臓再生時における Baf60c および心臓遺伝子群の発現変化：下図のように aMHC-GFP トランスジェニック (TG) マウスを用いて心尖部切除を行い、心臓再生時における心筋内での Baf60c の発現変化と心臓関連遺伝子の発現変化を調べた (下図(A))



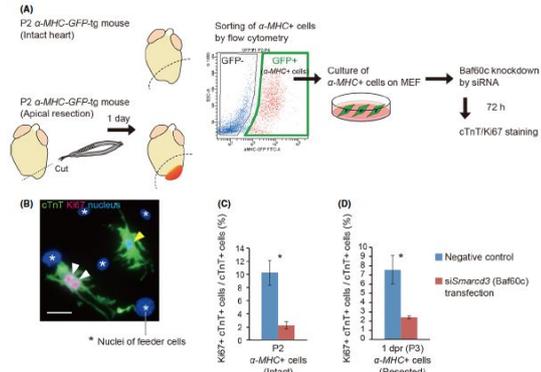
興味深いことに、Smarcd3 の発現は亢進し、関連して Gata4/Mef2c などの心臓転写因子群の発現が顕著に亢進し、引き続き Tnnt2/Tnni3 などの心筋収縮因子群の発現亢進が見受けられた (下図(B))



B : siRNA を用いた Baf60c の期の阻害と心筋増殖との関連

右図(A)の様に、aMHC-GFP TG マウスから GFP 陽性の心筋のみを選別し培養する。その後、Smarcd3siRNA を投与し3日間培養後に心筋の増殖活性を調べたところ、ki67 陽性心筋が顕著に減少していた (右図(D))

このことから、クロマチン因子 Baf60c は心筋増殖を制御していることが明らかとなった。



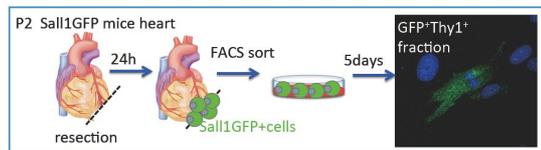
以上の研究は 2016 年に国際科学論文として報告した (Nakamura et al., DGD 2016)。また、同様に、直接 *in vivo* 心臓に Smarcd3siRNA を投与し、その効果を追跡したところ、遺伝子導入が正確に行われているかトレースする為にマーカーとして GFP 発現プラスミドを利用した。GFP の発現が認められ、遺伝子導入は可能であることが明らかとなった。さらに、Smarcd3siRNA KD マウス心臓では心臓再生が抑制され、線維芽細胞が多く見受けられた。心トロポニンプロモーターで ChIP 解析をおこなったところ、抑制型ヒストンが亢進しており、ゲノム構造変換がされ難くしていた (Nakamura et al., *in preparation* 2016b)

以上の結果は、Smarcd3/Baf60c が積極的に心臓再生時に関わっていることを示した研究結果であり、このクロマチン因子の発現を誘導するようなサイトカインシグナルの存在同定が次の課題となってくる。

## (2) 線維芽細胞の寄与と性質理解

A: 心筋へと分化する非心筋細胞集団の同定

下図のように非心筋細胞の中で Thy1 陽性細胞集団から心筋へと分化する細胞が見出された。



これらは、セルソーターを用いて、aMHC- ; Sirpa-かつ Thy1+細胞群を選別されてきた細胞集団である。後、再度5日間培養後心トロポニン抗体で免疫染色すると、心トロポニン陽性 (緑) の心筋細胞が得られる。さらに、この陽性細胞の様々な心臓関連遺伝子の発現状況を調べると、Sall1 の発現が亢進していることが見出された。Sall1 は Zn フィンガータイプの転写因子で心臓発生において、新規心臓前駆細胞特異的遺伝子であることを報告した (Morita et al., *JMCC* 2016a : 特

願 2015-187363)。この遺伝子が再び心臓再生時に発現してくることは興味深い。

B: Sa111 陽性線維芽細胞の心筋への分化能  
Sa111 遺伝子座に GFP が挿入された TG マウス (Sa111-GFP) を利用して、実際に先芯部切除した際における Sa111 遺伝子の局在を調べたところ、切除部位に局所的に GFP シグナルが見受けられた。つまり、切除部位に特異的に Sa111 が誘導されていることを意味しており、興味深いことにこの GFP 陽性細胞は心トロポニン陰性であった。さらに、既知の細胞表面抗原を利用してセルソーターで GFP 陽性細胞の性質の同定を試みた。GFP 陽性細胞の 80% 以上は Thy1+ であった。さらに GFP+;Thy1+ 細胞は 99% 以上が PDGFR $\alpha$  陽性であり、かつ、Vimentin で染まった。このことから、心臓再生時に誘導されてくる GFP+;Thy1+ 陽性の細胞は線維芽細胞である可能性があると考えられる。次に、Sa111 陽性細胞が実際に心筋へと分化するのか、GFP 陽性細胞を選別後、再培養を行った。GFP 陽性細胞は cTnT 陽性の心筋へと分化していることが *in vitro* の系で明らかとなった。生体において実際に分化するのか、Sa111creERT2;ROSA-YFP マウスを用いて検証をおこなったところ、YFP 陽性細胞は cTnT 陽性の心筋細胞へと分化していることが明らかとなった。この結果は、Sa111 陽性の線維芽細胞が心筋へと分化することを意味する、新しい知見である。

C: 心筋再生を亢進するサイトカイン

Sa111-GFP を指標として、心臓再生能を亢進するサイトカインシグナルの探索を行った。その結果、4つの分泌性因子が Sa111 の発現を亢進させる能力を持ち合わせていることが分かった(特許申請準備中のため)。現在、このサイトカイン投与により心筋分化能が亢進するのか、線維化が抑制されるのか、調べている。

以上の結果は、これまで心臓再生研究に関しては、心筋以外に焦点を当てた研究はあまりされておらず、さらに線維芽細胞はリプログラム研究のツールと考えられてきた知見を大きく発展させるものである。申請者によって生体では少なからず自ら分化転換させる能力を有する細胞が存在することが明らかになりつつある(特許申請準備中)。この発見は、個々の細胞のみならず組織・臓器自体が有する可塑性に関して新たな知見をもたらすことができると考える。さらには、細胞は同一の性質を有するのではなく、環境ストレスや加齢、炎症などの環境変化に反応する細胞には特徴の異なる性質が存在する可

能性を提唱し、本研究は性質の相違と起源を関連づけた新たな生物学分野を開拓できると考える。さらに、発生/再生学にとどまらず、心臓や肝臓・腎臓など線維化によって悪化する病気を抑制する創薬研究、つまり、臓器再生に寄与する線維芽様細胞をターゲットとした研究へと発展が期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

(1) Koshiba-Takeuchi K., Morita Y., Nakamura R., Takeuchi JK., Combinatorial functions of transcription factors and epigenetic factors in heart development and disease., *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease*, 2016, 査読有り、in press

(2) Nakamura R., Koshiba-Takeuchi K., Tsuchiya M., Ito K., Miyazawa A., Kojima M., Ogawa H. and Takeuchi JK., Expression analysis of Baf60c during heart regeneration in axolotl and neonatal mice., *Development, Growth and Differentiation* 58(4):367-382, May 2016, 査読有り、DOI: 10.1111/dgd.12281

(3) Morita Y., Andersen P., Hotta A., Tsukahara Y., Sasagawa N., Hayashida N., Koga C., Nishikawa M., Saga Y., Evans SM., Koshiba-Takeuchi K., Nishinakamura R., Yoshida Y., Kwon C. and Takeuchi JK., Sa111 transiently marks undifferentiated heart precursor and regulates their fate., *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 92:158-162, 2016, 査読有り、DOI:10.1016/j.yjmcc.2016.02.008

(4) Takeuchi K., Hori Y., Akagi K., Makino H., Umezawa A., Koshiba-Takeuchi K., Takeuchi JK. and Takeuchi M., Transcriptional dynamics of immortalized human mesenchymal stem cells during transformation., *PLoS ONE* 10(5): e0126562, May 2015, 査読有り、DOI: 10.1371/journal.pone.0126562

(5) Sadek HA, Martin JF, Takeuchi JK, Leor J, Nei Y, Giacca M, Lee RT. Multi-Investigator Letter on Reproducibility of Neonatal Heart Regeneration following Apical Resection., *Stem Cell Reports*. 3(1):1, Jul 2014, 査読有り、DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.06.009

(6) Kondoh S, Inoue K, Igarashi K, Sugizaki H, Shirode-Fukuda Y, Inoue E, Yu T,

Takeuchi JK, Kanno J, Bonewald LF, Imai Y. , Estrogen receptor in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice.、 *Bone*. 60: 68-77, Mar 2014、 査読有り、DOI: 10.1016/j.bone.2013.12.005 (7) Xu B, Hrycaj SM, McIntyre DC, Baker NC, Takeuchi JK, Jeannotte L, Gaber ZB, Novitch BG, Wellik DM.、 Hox5 interacts with Plzf to restrict Shh expression in the developing forelimb.、 *Proc Natl Acad Sci U S A.*、 110(48):19438-43, Nov 2013、 査読有り、DOI: 10.1073/pnas.1315075110

〔学会発表〕(計 32 件)

(1) 森田唯加、他 11 名、「ヒト心筋-血管運命プログラムと分化転換機構」、2015.12.12、第 37 回心筋生検研究会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

(2) 竹内純、「心臓をつくり護る因子」、2015.12.11、第 32 回国際心臓研究学会 ISHR シンポジウム、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

(3) 竹内純、「心臓再生環境と心筋分化能力」、2015.12.4、第 38 回日本分子生物学会、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

(4) 森田唯加、堀田秋津、Andersen P、小川英知、吉田善紀、塚原由布子、黒川洵子、相賀裕美子、Evans S、西中村隆一、小柴和子、Kwon C、竹内純、「心臓運命をプログラムする因子とその発展性」、2015.12.4、第 38 回日本分子生物学会、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

(5) 竹内純、「心臓をつくる遺伝子と護る遺伝子」、2015.9.9、慶應大学医学部セミナー、慶應大学医学部(東京都新宿区)

(6) 竹内純、「心臓発生・再生とエピジェネティクス」、2015.8.9、第 2 回 iHF カンファレンス、都市センターホテル(東京都千代田区)

(7) Morita Y, Andersen P., Tsukahara Y., Kwon C., Koshiba-Takeuchi K & Takeuchi JK, 「Cardiac cell induction and regeneration by Sall1+Mesp1-derived cells」、2015.5.1、International Weinstein Cardiovascular Development Conference、ボストン(USA)

(8) 竹内純、「Epigenetic Regulation in Heart Regeneration」、2015.4.24、第 79 回日本循環器学会、大阪府立国際会議場(大阪府大阪市)

(9) 竹内純、「発生学からの展開 エピジェネティクスと心疾患。そして再生医学研究」、2015.4.23、滋賀医科大シンポジウム、滋賀医科大学(滋賀県大津市)

(10) 竹内純、「特定因子による心筋タイプ誘

導とその発展性」、2015.3.21、第 14 回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(11) 竹内純、「心臓をつくり、護る遺伝子」、2014.11.7、第 10 回平成の会学術講演会(MSD 東京) 山の上ホテル(東京都千代田区)

(12) 守山裕太、竹内純、小柴和子、「心筋が平滑筋か：真骨魚類の進化から明らかとなった心筋細胞運命決定メカニズム」、2014.10.17、第 13 回日本心臓血管発生研究会、磐梯熱海温泉ホテル(福島県郡山市)

(13) 伊藤航平、竹内純、「心臓損傷時におけるゼブラフィッシュとメダカの異なる修復表現型」、2014.10.17、第 13 回日本心臓血管発生研究会、磐梯熱海温泉ホテル(福島県郡山市)

(14) 竹内純、「心臓発生とエピジェネティクス」、2015.7.3、第 50 回日本小児循環器学会シンポジウム、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

(15) 竹内純、「Partial Reprogramming for Heart Cell Survival」、2014.5.28、第 47 回発生生物学会大会、WINC AICHI(愛知県名古屋市)

(16) 森田唯加、他 5 名、竹内純、「新規心臓転写因子による直接心臓運命決定と心臓再生」、2014.5.28、第 47 回日本発生生物学会大会、WINC AICHI(愛知県名古屋市)

(17) 竹内純、「心臓再生とエピジェネティクス研究」、2014.5.25、第 8 回日本エピジェネティクス研究会、伊藤国際学術研究センター(東京都文京区)

(18) 竹内純、「Epigenetic Regulation and Heart Regeneration」、2014.5.21、AHA Asia Pacific Conference、東京慈恵医大(東京)

(19) Morita Y, Andersen P., Tsukahara Y., Kwon C., Koshiba-Takeuchi K & Takeuchi JK, 「Non-Mesp1 progenitors by a defined factor contribute to cardiac lineages from pluripotent stem cells」、2014.5.9、Weinstein Cardiovascular Conference、マドリード(スペイン)

(20) Nakamura R, 他 6 名, Takeuchi JK, 「Functional roles of the Epigenetic factors in mammalian heart regeneration」、2014.5.9、Weinstein Cardiovascular Conference、マドリード(スペイン)

(21) 竹内純、「心臓再生能維持とゲノム構造変換」、2014.4.11、第 51 回日本臨床分子医学会学術集会、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

(22) Morita Y, Andersen P., Tsukahara Y.,

Kwon C., Koshiba-Takeuchi K & Takeuchi JK, 「Heart developmental programming and regeneration by a novel defined factor」, 2014.4.8, Keystone Symposia on molecular and cellular biology, ボストン (USA)

(23) 竹内純, 「哺乳類心臓再生能力が維持されるには?」, 2014.3.17, 第 91 回日本生理学会大会, 鹿児島大学郡元キャンパス

(24) 竹内純, 「ヒト心疾患発症に関わるエピジェネティック因子群と心不全予防を目指して」(招待講演), 2013.11.22, 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)

(25) 竹内純, 「哺乳類心臓再生能力が維持されるには?」, 2013.11.3, 第 35 回日本心筋生検研究会シンポジウム, 東京女子医科大学弥生記念講堂 (東京都新宿区)

(26) Takeuchi JK, 「Heart cell survival by defined factors」, 2013.9.27, European Society of Cardiology Berlin Cardiovascular Development Meeting 2013, ベルリン (ドイツ)

(27) Morita Y, 他 6 名, Koshiba-Takeuchi Kazuko, Takeuchi JK, 「A novel defined factor directly specifies cardiac lineages from pluripotent stem cells and promotes heart regeneration」, 2013.9.27, European Society of Cardiology Berlin Cardiovascular Development Meeting 2013, ベルリン (ドイツ)

(28) 竹内純, 「心臓再生はどのようにして可能になるのか?」, 2013.9.26, 日本動物学会第 84 回岡山大会 2013, 岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)

(29) Moriyama Y, Takeuchi JK, Koshiba-Takeuchi K, 「Elastin gene sub/neo-functionalization and formation of teleost-specific outflow tract, “bulbus arteriosus”, in fish development and evolution」, 2013.9.20, 第 19 回小型魚類研究会, 仙台市情報・産業プラザ(宮城県仙台市)

(30) 竹内純, 「エピゲノムからみた心筋生存と心臓再生 - どうすれば強い心筋が生まれるのか - 」, 2013.9.10, Merk Millipore Bioscience Forum 2013, 東京国際フォーラム (東京都千代田区)

(31) Takeuchi JK, 「Heart cells survival by defined factors」, 2013.7.15, the 7<sup>th</sup> TAKAO International Symposium 2013, 国立オリンピック記念青少年総合センター (東京都渋谷区)

(32) Nakamura R., Takeuchi JK, 「Epigenetic regulation promotes mammalian heart regeneration.」, 2013.6.29, ISHR(国際心臓研究学会), サンディエゴ (USA)

〔図書〕(計 4 件)

(1) 森田唯加、藤川大地、堀田秋津、吉田善紀、竹内純, 「心機能再生を目指した特定因子による細胞変換技術開発」, 日本臨牀社, 2015.6, 日本臨牀, 73巻, 増刊号5, pp.303-310

(2) 伊藤航平、守山裕太、竹内純、小柴和子 「脊椎動物心臓の発生・再生と進化」, 医学書院、生体の科学、2015、vol.66, No.3, pp.212-216

(3) 辻真人、竹内純, 「心臓発生・疾患とエピジェネティック因子」, 秀潤社、細胞工学、2014, Vol.33, No.11, pp.1143-1151

(4) 堀優太郎、森下環、中村遼、小柴和子、竹内純, 「エピジェネティック因子と心臓発生・心疾患」, イラストで徹底理解する エピジェネティクス キーワード事典 実験医学 (羊土社)、pp.92-200, 2013

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称: 成熟した心筋細胞を分化誘導させる方法

発明者: 竹内純、森田唯加

権利者: 東京大学

種類: 特許 国内外の別: 国内

番号: 特願2015-187363

出願年月日: 2015.9.24

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/junktakeuchi-lab/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 純 (TAKEUCHI JUN)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授  
研究者番号: 10451999

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

小柴 和子 (KOSHIBA KAZUKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・講師  
研究者番号: 30467005

白髭 克彦 (SHIRAHIGE KATSUHIKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授  
研究者番号: 9027385