

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：21102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560399

研究課題名(和文)胎仔創傷治癒機構における心臓線維芽細胞のエピジェネティクスと心筋梗塞治療への適用

研究課題名(英文)Elucidation of fetal wound healing mechanisms in cardiac fibroblasts and its therapeutic implications of myocardial infarction.

研究代表者

今 淳(KON, ATSUSHI)

青森県立保健大学・健康科学部・教授

研究者番号：60271798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：胎仔創傷治癒機構(FWH)から成獣創傷治癒機構へ移行して発現が著明に低下する心臓線維芽細胞の遺伝子を網羅的に解析した。その結果Has2, Tm, Mmpの癒痕を抑制する遺伝子, Pax, Foxo, Hoxの形態形成に関わる遺伝子が検出された。Pax遺伝子はヒストンH3のメチル化を認め、他はプロモーター領域のDNAメチル化により発現が低下した。各遺伝子を心筋壊死組織に導入すると当初Hoxのみが抗線維化を認めた。しかし最終的にはHoxを含めた全遺伝子が癒痕を形成した。従ってFWHには更なる遺伝子がマスター遺伝子として制御する可能性、複数の遺伝子の相互作用による制御機構等が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the specific gene expressed in fetal wound healing (FWH) in mouse cardiac fibroblast cells characterized by without scar formation. By using DNA microarray analysis, anti-fibrosis related genes including Has2, Tm, and Mmp genes, and morphogenesis related genes (Foxo, Hox, and Pax) highly expressed in FWH, whereas the expression of these genes down-regulated in adult wound healing (AWH) with scar formation. Down regulation of Pax gene expression are down regulated by methylation on histone H3 domain, whereas downregulation of other genes were induced by DNA methylation of each promoter region, respectively. Finally, we injected each gene into myocardial infarction tissue of adult mice. As the result, each gene did not induce FWH characterized perfect scarless reaction, suggesting alone administration of each gene was not effective, and cocktail therapy, the combination of multiple genes, are necessary of inducing of FWH.

研究分野：アンチエイジング医学

キーワード：胎仔創傷治癒機構 心臓線維芽細胞 心筋梗塞 遺伝子発現 発生

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞の致死率は高く、救命し得てもその予後は悪い。患者の心筋組織は堅く伸展性の無い膠原線維を主成分とする結合組織、即ち癒痕へと置き換わる。そのため、心機能は完全に失われ、患者のQOLは著しく低下する。しかも、癒痕部には裂隙も生じ易くなり、心臓破裂を起こし、突然死にも至る。従ってこの癒痕形成を如何にして阻止し、正常な心筋組織を再生させるかは、心筋梗塞の治療上の目標の一つとなる。しかしそのための有効な方法は現時点で確立されていない。

哺乳類の胎生期には、強い損傷を受けても、癒痕を全く形成せずに完全に器官が再生できる機構が存在する。これを胎仔創傷治癒機構という。主に皮膚の胎仔創傷治癒機構に関する研究が行われており、ラットでは胎生16日までに、マウスは胎生13日までに、羊は胎生60日までに皮膚の胎仔創傷治癒機構は認められる。そしてこの時期を過ぎると、通常我々が経験する、癒痕が形成されて治癒する成獣創傷治癒機構へと移行する。

皮膚の胎仔創傷治癒機構から成獣創傷治癒機構へ移行する際に、発現が著明に変動する遺伝子が報告されている。事実、ヒアルロン酸やホメオボックス遺伝子(MSX-1, MSX-2, PRX-2)の発現は促進し、fibromodulin, TGF- β 及びHOXB13遺伝子の発現は抑制している。これらの発現変動は確かに癒痕形成を軽減はする。しかし、先行研究並びに我々の研究から、これらの変動は、癒痕を消失させ且つ完全に再生させる、いわゆる胎仔創傷治癒機構のマスター遺伝子では無く、依然として同定されていないのが現状である。

一方、心臓の胎仔創傷治癒機構に関しては殆ど何も解明されていない。他施設及び申請者を含む二施設では、心臓の胎仔創傷治癒機構は、マウスでは胎生16日まで認め、18日以降は消失(17日が転換期)して成獣創傷治癒機構へと移行することを確認している。しかも申請者は胎仔創傷治癒機構と成獣創傷治癒機構における心筋細胞で発現している遺伝子をマイクロアレイにより解析したが、この中からマスター遺伝子は見出されなかった。以上から、究極の心筋梗塞の治療を目指すためには、心臓における胎仔創傷治癒機構のマスター遺伝子を同定することが必須ではあるが、単に心筋細胞を研究対象とするのでは無く、心筋細胞以外に向けた必要性を考えている。

2. 研究の目的

心臓線維芽細胞は心筋細胞に分化転換できることは報告されている。そこで本研究では、心臓線維芽細胞が胎仔創傷治癒機構から成獣創傷治癒機構へ転換(心筋の完全再生から心筋の癒痕形成への転換)でどの様に変化する

のか、遺伝子発現変動網羅的に解析、変動する遺伝子のエピジェネティクスの機構の解析を行い、この結果から心臓の胎仔創傷治癒機構のマスター遺伝子を発掘する。

3. 研究の方法

胎仔創傷治癒機構を認める胎生14日目と成獣創傷治癒機構を認める18日目の心筋線維芽細胞で発現している遺伝子をマイクロアレイに掛け、各機構で発現する遺伝子の発現量を網羅的に定量化する。そして、胎仔創傷治癒機構から成獣創傷治癒機構に変換する時に著明に発現が変動した遺伝子を胎仔創傷治癒機構のマスター遺伝子の候補として同定する。次に、この結果を基にして、発現変動の著明な遺伝子の発現制御機構の詳細をリアルタイムPCR法で解析する他、この発現変動にエピジェネティックな修飾を受けているのか否か、DNAのメチル化やヒストン修飾の機構を解析する。最後に、マスター遺伝子の候補の発現ベクターを構築し、心筋壊死を人工的に作製した成獣マウスの心筋組織内に導入。どの遺伝子を導入すると癒痕の形成が阻止され、癒痕部が正常な心筋組織へと再生されているのかの解析し、マウスの心臓における胎仔創傷治癒機構のマスター遺伝子の発掘を試みる。

4. 研究成果

マウスの胎仔創傷治癒機構から成獣創傷治癒機構へと転換する際に、心筋線維芽細胞で発現する遺伝子がどの様に変動するか、マイクロアレイ法によって網羅的解析を行った。その結果、胎仔創傷治癒機構から成獣創傷治癒機構へ移行する際には、約63000種の発現している全遺伝子のうち、約1300種類の遺伝子の発現が増加し、約1100種類の遺伝子の発現は低下していた。特に注目するものとしては以下の通りであった。まず、胎仔創傷治癒機構を認める組織では、高分子多糖のヒアルロン酸が著明に沈着するが、このヒアルロン酸の合成酵素であるHas2の遺伝子の発現が著明に増強していた。その他、癒痕形成を抑制するthrombomodulin遺伝子や老化に関わるFoxoの遺伝子発現も増強した。一方、発現が減少数ものとしては、ヒアルロン酸の分解酵素であるHyal1, RegやFos遺伝子などの再生や腫瘍発生に関わる各種遺伝子であった。

次に、Has2, トロンボモジュリン, Foxoの各遺伝子のDNAメチル化を解析した結果、成獣創傷治癒機構に移行するとDNAメチル化は著明に増強しており、このことによって、各遺伝子の発現が成獣創傷治癒機構で抑制されている可能性が見出された。そこで、各遺伝子の転写調節領域であるプロモーター領域も解析し、Has2遺伝子のプロモーター領域では成獣創傷治癒機構において著明にメチル化を

生じる領域が同定され、転写レベルで成獣創傷治癒機構における Has2 遺伝子の発現低下が生じている機構を明らかにした。その一方で、ヒアルロン酸分解酵素の Hyal1 遺伝子では成獣創傷治癒機構に移行するとヒストン修飾のアセチル化を受けていることが明らかになった。その他、注目すべきものとしては、胎仔創傷治癒機構では、ホメオボックス遺伝子に属する多数遺伝子の発現が胎仔創傷治癒機構では促進していた。形態形成を司る Hox, Pax の各遺伝子の結果では、Hox 遺伝子は、胎仔創傷治癒機構から成獣創傷治癒機構に移行する際に、プロモーター領域の DNA メチル化を受け、抑制されていた。一方、Pax 遺伝子はヒストン H3 のリジン残基 K9 のメチル化を移行の際に認め、発現が抑制する可能性が考えられた。

そこで最後に胎仔創傷治癒機構のマスター遺伝子の候補として見出した各種遺伝子を人工的に作製したマウスの心筋梗塞部に導入し、心筋が完全に再生できるか否かを解析した。我々は、Has-2, MMP2, MMP9 などの matrix metalloproteinase, fibromodulin の各遺伝子を導入しても癒痕が消失して心筋が再生されないことを既に確認している。そこで本研究では thrombospondin, Foxo, 各種 Hox 及び Pax の各遺伝子のどれがマスター遺伝子であるかを解析した。最初に各遺伝子の発現ベクターを構築し、精製したリコンビナントタンパク質を naked DNA 法、或いは成獣創傷治癒機構を認める心筋線維芽細胞へと各ベクター導入し、この線維芽細胞を実験的に作成して器官培養した心筋壊死部に注入する、以上の方法を行い、胎仔創傷治癒機構が再現されて心筋が再生できるかを解析した。その結果、何れの方法によっても、壊死組織を除去できた遺伝子はなく、心筋組織の再生は認めなかった。一方、壊死部を除去した後に注入して創傷治癒が生じるかを解析したところ、Hox 遺伝子で欠損部の軽度ではあるが創傷治癒促進効果が観察され、naked DNA 法よりも心筋線維芽細胞を注入した場合に比較的強い効果を認めた。また同時に Hox 遺伝子を導入した心臓線維芽細胞の培養系で、細胞の増殖能、接着能、遊走能の解析したところ、何れも促進効果を認め、生体心臓に導入する結果を反映していた。しかし、継時的に創傷治癒促進部を観察したところ、導入部の心筋組織は、最終的には癒痕組織へ変化してしまい、Hox 遺伝子でも胎仔創傷治癒機構が再現されなかった。理由としては、解析が器官培養系であり、生体内の環境を反映していない可能性、一種類のマスター遺伝子が胎仔創傷治癒機構を制御しているのではなく、複数の遺伝子の相互作用によって制御している可能性等が考えられた。

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 2 件)

1)小川 靖, 清水由隆, 杉浦一充, 武田淳一, 澤田香織, 柳 輝希, 今 淳, 澤村大輔, 清水宏, 秋山真志: ヒト表皮ケラチノサイトにおける ABCA12 プロモーター解析: プロモーター活性に必要なパリンドローム配列の同定. 第 30 回角化症研究会記録集 30 18-21 2016 年.

2)Shimizu Y, Ogawa Y, Sugiura K, Takeda J, Sakai-Sawada K, Yanagi T, Kon A, Sawamura D, Shimizu H, Akiyama M: A palindromic motif in the -2084 to -2078 upstream region is essential for ABCA12 promoter function in cultured human keratinocytes. Sci Rep. 4 6737 2014.

〔学会発表〕(計 8 件)

1)佐藤沙紀, 今 淳: ヒアルロン酸合成酵素-2 (Has-2) 遺伝子の転写制御機構の解析. 2016 年度青森県保健医療福祉研究発表会, 日本ヒューマンケア科学学会第 9 回学術集会, 2016 年 12 月.

2)今 淳, 田中 翠, 柴田歩美, 明戸瑞季, 佐藤沙紀: 胎仔創傷治癒機構におけるヒアルロン酸関連遺伝子の発現について. 第 89 回日本生化学会総会, 仙台, 2016 年 9 月.

3)近藤愛美, 木村直子, 今 淳: 胎仔創傷治癒機構の発現を制御する遺伝子の網羅的解析. 2015 年度青森県保健医療福祉研究発表会, 青森市, 2015 年 12 月.

4)木村直子, 近藤愛美, 今 淳: 成獣創傷治癒機構の発現を制御する遺伝子の網羅的解析. 2015 年度青森県保健医療福祉研究発表会, 青森市, 2015 年 12 月.

5)福田千春, 今 淳: ヒアルロン酸合成酵素-2 (Has-2) 遺伝子の胎仔創傷治癒機構特異的発現制御機構. 2015 年度青森県保健医療福祉研究発表会, 青森, 2015 年 12 月.

6)Shimizu Yoshitaka, Ogawa Yasushi, Sugiura Kazumitsu, Takeda Jun-ichi, Sakai-Sawada Kaori, Yanagi Teruki, Kon Atsushi, Sawamura Daisuke, Shimizu Hiroshi, Akiyama Masashi: Identification of an Palindromic Motif in the Upstream Region of ABCA12 required for Promoter Activity in Cultured Human Keratinocytes. 第 40 回日本

研究皮膚科学会年次学術大会，岡山 2015 年 11 月。

()

7)大橋智美，三浦果歩，今 淳：マウスヒアルロン酸合成酵素-2(Has-2)遺伝子の転写制御機構 - . コアプロモーター領域の解析 - 2014 年度青森県保健医療福祉研究発表会，青森，2014 年 12 月。

8)三浦果歩，大橋智美，今 淳：マウスヒアルロン酸合成酵素-2(Has-2)遺伝子の転写制御機構 - . 上流制御領域(エンハンサー)の解析 - 2014 年度青森県保健医療福祉研究発表会，青森，2014 年 12 月。

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

今 淳 (KON ATSUSHI)
青森県立保健大学・健康科学部・教授
研究者番号：60271798

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

澤村 大輔 (SAWAMURA DAISUKE)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60196334

(4)研究協力者