

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：84404  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18H02786  
研究課題名(和文) 鰓弓・側板中胚葉内の心臓前駆細胞発生を制御するエピジェネティック分子機構の解明  
研究課題名(英文) Epigenetic regulation of cardiac progenitor cells development in lateral plate mesoderm/pharyngeal region.  
研究代表者  
白井 学 (Shirai, Manabu)  
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・オープンイノベーションセンター・室長  
研究者番号：70294121  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：多分化能を持つ心臓前駆細胞の増殖・分化・遊走に対するエピジェネティック制御機構を解明するために、心臓前駆細胞を含むマウス胎仔鰓弓・側板中胚葉を用いて、1細胞RNA-seq (scRNA-seq) 解析、抗Phc1抗体による共免疫沈降と詳細なプロテオーム解析を行った。その結果、Phc1と協働する転写因子候補を選抜するとともに、心臓前駆細胞における詳細な遺伝子発現解析プロファイリングにより、ポリコーム群(PcG)複合体と転写調節機構間に複雑なクロストークが存在する可能性を見出した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

DiGeorge症候群を含む染色体22q11.2欠損症候群(22q11.2DS)は、心臓流出路の先天性疾患を伴った胸部組織(甲状腺、胸腺等)の形成異常を生じる。これらの症状は胎仔鰓弓・側板中胚葉中の心臓前駆細胞の増殖・分化・遊走障害により説明される。本研究においてscRNA-seq解析とプロテオーム解析を組み合わせることにより、心臓前駆細胞の発生を制御する転写因子とエピジェネティック因子間のクロストーク解明への道が開けたばかりでなく、ヒト先天性心疾患の原因及び重症化機構の解明に向けた新たな分子基盤を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：In the lateral plate mesoderm (LPM) and pharyngeal mesoderm (PM), a part of multipotent mesenchymal cells divides into the cardiac progenitor cells (CPCs). CPCs proliferate, differentiate, and migrate to contribute to the right ventricle and cardiac outflow tract formation. To elucidate the epigenetic regulatory mechanisms for CPCs differentiation, we performed single cell RNA-seq (scRNA-seq) analysis and the proteome analysis. We defined Phc1 positive/Is11 negative specific cell cluster which is also same with Tbx1 or Tbx2 expressing cell cluster and Phc1 negative/Is11 positive cell cluster. We also identified many candidate proteins binding with Phc1 in LPM and PM. From these results, we hypothesis a specific crosstalk between the transcriptional network and Polycomb group complex might regulates CPCs differentiation.

研究分野：心臓発生

キーワード：心臓前駆細胞 エピジェネティック因子 先天性心疾患

### 1. 研究開始当初の背景

新生児の約 100 人に 1 人の頻度で生まれてくる先天性心疾患の多くは、心臓流出路の形成不全を伴う。DiGeorge 症候群に代表される染色体 22q11.2 欠失症候群 (22q11.2DS) は、心臓流出路の先天性心疾患を伴った胸部組織の形成異常を生じるが、これらの症状は主に Tbx1 のハプロ不全による胎児鰓弓・側板中胚葉における間葉系細胞の増殖・分化・遊走障害により説明される。先天性心疾患はこれまで遺伝子変異が原因と考えられ、探索研究がなされてきたが、最近ではむしろ、母体を含む周囲環境からのエピジェネティックな影響が重要視されている。染色体の構造変化、ヒストン修飾の変動に関与し、エピジェネティック因子として働くポリコム (PcG) タンパク質の心臓形態形成に対する働きは、申請者らが Phc1KO マウスの解析を通して初めて明らかにしたが、心臓流出路に入る以前の鰓弓・側板中胚葉における心臓前駆細胞の増殖・分化・遊走をどのような分子機構で制御しているかはまだはっきりしていない。近年、次世代シーケンサーの発達に伴って網羅的な解析が可能となり、急速に遺伝子発現制御機構の解明が行われている。染色体の構造変化やヒストン修飾の変動を通してエピジェネティック因子として働く PcG がどのように組織特異的、時期特異的に遺伝子発現を制御するかこれまで疑問であったが、PcG と協働する lncRNA や新たな PRC 結合タンパク質の発見により、答えが見いだされつつある。心臓前駆細胞の発生に対する PRC1 複合体の機能を明確化し、ヒト先天性心疾患原因解明へと発展させる。

### 2. 研究の目的

22q11.2DS において形成不全を生じる、鰓弓・側板中胚葉の細胞増殖・分化・遊走は、主な原因遺伝子である Tbx1 を始めとして、多くの転写因子による制御を受けるが、レチノイン酸投与等によるエピジェネティックな影響も強く受ける。Phc1KO マウスでも 22q11.2DS 同様の心臓流出路、胸部組織の形成不全を生じること、転写因子の Isl1 を発現する心臓前駆細胞で一時的に Phc1 の発現が減少する事から、鰓弓・側板中胚葉の発生には転写因子、エピジェネティック因子を含めた複雑な分子ネットワークが存在すると考えられる。本研究では、鰓弓・側板中胚葉に存在する心臓前駆細胞の発生を制御する転写因子、エピジェネティック因子を含む複雑なネットワークを解きほぐし、新たなヒト先天性心疾患の原因解明の分子基盤を構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス胎仔鰓弓・側板中胚葉中の間葉系細胞の scRNA-seq 解析。

胎生 8.5 日、9.5 日のマウス胎仔より鰓弓・側板中胚葉の一部 (図 1a) を摘出し、TrypLE EXPRESS (ThermoFisher) 中で 1 細胞化を行った。その後、ICELL8 ver1 (TAKARA) を用いて 1 細胞ごとに 3' mRNA-seq 解析ライブラリーを調製し、Hiseq3000、NovaSeq (Illumina) を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。得られたデータは品質を検証後、scanpy を用いてクラスタリング解析を行い、目的とする心臓前駆細胞群を単離、遺伝子発現解析を行った。

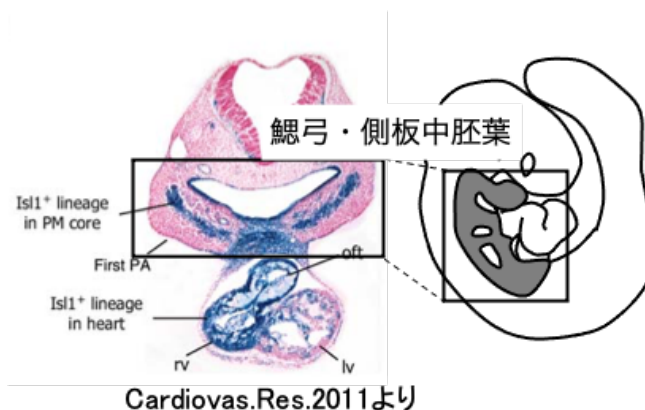


図1. 胎令8.5、9.5日のマウス胎仔より、Isl1発現細胞を含む、鰓弓・側板中胚葉の一部を単離

#### (2) Phc1 結合タンパク質の探索。

胎生 9.5 日のマウス胎仔より scRNA-seq 解析と同様に鰓弓・側板中胚葉の一部を摘出し、核内タンパク質を抽出した。抗 Phc1/Rae28 抗体を用いて共免疫沈降法を行い、鰓弓・側板中胚葉において Phc1 と結合しているタンパク質を単離した。プロテオーム解析を用いて Phc1 結合タンパク質候補を絞り込んだ。

### 4. 研究成果

#### (1) scRNA-seq 解析による、マウス胎仔鰓弓・側板中胚葉に存在する心臓前駆細胞の遺伝子発現プロファイリング

鰓弓・側板中胚葉の細胞のほとんどは多能性を維持し、発生の段階とともに大きく遺伝子発現を変化させる。これまでの研究でこの領域に心臓前駆細胞が存在し、scRNA-seq 解析をはじめとする詳細な遺伝子発現プロファイリングが行われてきたが、転写因子とエピジェネティック因子との関連性については解析されてこなかった。申請者のこれまでの研究で、転

写因子である Is11 とエピジェネティック因子である Phc1 が心臓前駆細胞の一部で排他的に発現していることが示唆されたため、詳細な scRNA-seq 解析により心臓前駆細胞の遺伝子発現プロファイリングを行った。

胎生 8.5 日、9.5 日のマウス胎仔より鰓弓・側板中胚葉の一部を摘出し (図 1)、scRNA-seq 解析を行った結果、これまでの免疫染色で得られた結果同様、Is11+/Phc1-細胞、Is11-/Phc1+細胞の存在が明らかとなった (図 2a)。Is11+/Phc1-の細胞群の多くは、Bmi1-であり、Is11-/Phc1+の細胞群の多くは Bmi1+であったことから、Is11 と Phc1 を含むポリコーン複合体 (PRC1.1) が排他的に発現していることが明らかとなった。さらに心臓流出路の発生に重要な働きをする Tbx1、Tbx2 の発現パターンと比較したところ、それぞれの遺伝子を強く発言する細胞群は、Is11-/Phc1+の細胞群と重なることが明らかになった (図 2b)。以上の結果より、Phc1 を含む PRC1.1 は Is11 を発現する以前の心臓前駆細胞で発現し、その発生を制御している可能性が示唆された。

次に、今回単離された細胞群を de Soysa (2019) らの研究により得られた遺伝子発現プロファイリングと融合して解析を行った。その結果、申請者が単離に成功した細胞群は、de Soya らが多能性間葉系細胞として大きく分類している細胞の一部であり、申請者らの方法により、この細胞群がより詳細に分類可能であることが示唆された (図 2c)。

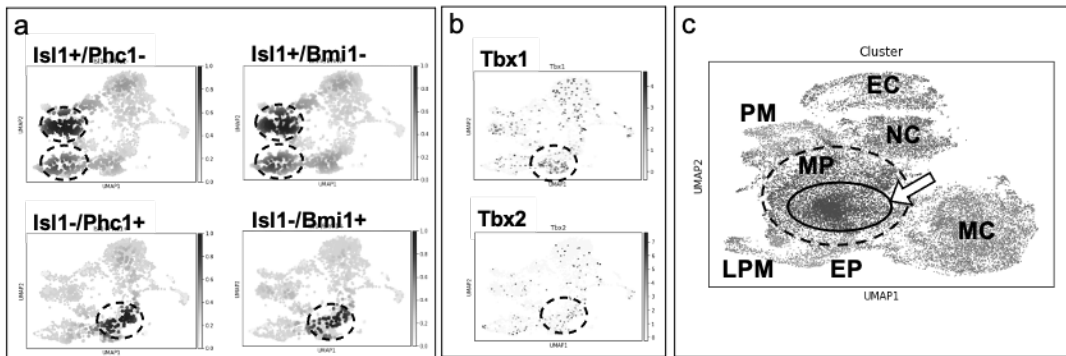


図2. scRNA-seq解析結果

- Is11+/Phc1-細胞群とIs11-/Phc1+細胞群はクラスターが異なり、Is11-/Bmi1+細胞群はIs11-Bmi1+細胞群と重なる。
- Tbx1、Tbx2の発現は、Is11-/Phc1+クラスターでより多く発現する。
- 鰓弓・側板中胚葉のscRNA-seq解析結果。de Soysa(2019)らの結果(2c全体)に、申請者の解析結果(丸の部分)を結合。de Soysaらがクラスタリングした、多能性間葉系細胞(点線の丸、MP)の一部だった。
- Is11+/Phc1-細胞とIs11-/Phc1+細胞はクラスターが異なり、Tbx1、Tbx2の発現は、Is11-/Phc1+クラスターでより多く発現する。

(2) Phc1 結合タンパク質の探索。

マウス胎仔鰓弓・側板中胚葉中の心臓前駆細胞において、Is11+/Phc1-細胞、Is11-/Phc1+細胞の存在し、それぞれが発現を制御している可能性が示唆された。Is11 は転写因子、Phc1 はエピジェネティック因子であることから、Is11-/Phc1+細胞では Is11 の発現抑制に Phc1 と共同で働く因子が存在する可能性がある。そこで、胎生 9.5 日のマウス胎仔より鰓弓・側板中胚葉の一部を摘出、核抽出物を調整し、抗 Phc1 抗体を用いて共免疫沈降を行った。詳細なプロテオーム解析を行った結果、Phc1 と結合しているタンパク質候補を単離することに成功した (図 3)。

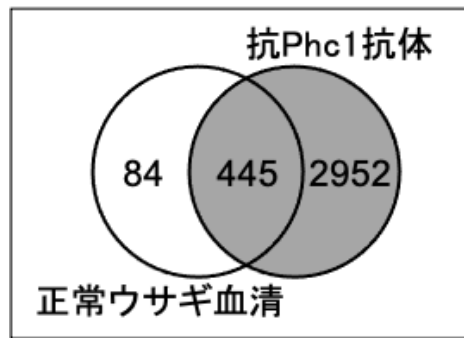


図3. Phc1結合タンパク質候補。

(3) 心臓前駆細胞の発生における転写因子とエピジェネティック因子のクロストーク (仮説)  
上記の研究により、Phc1 と協働して心臓前駆細胞の分化を抑制する因子 X 及びその分子機構、さらに、Is11 による Phc1 発現抑制、分化促進機構が存在する可能性が示唆された (図 4)。

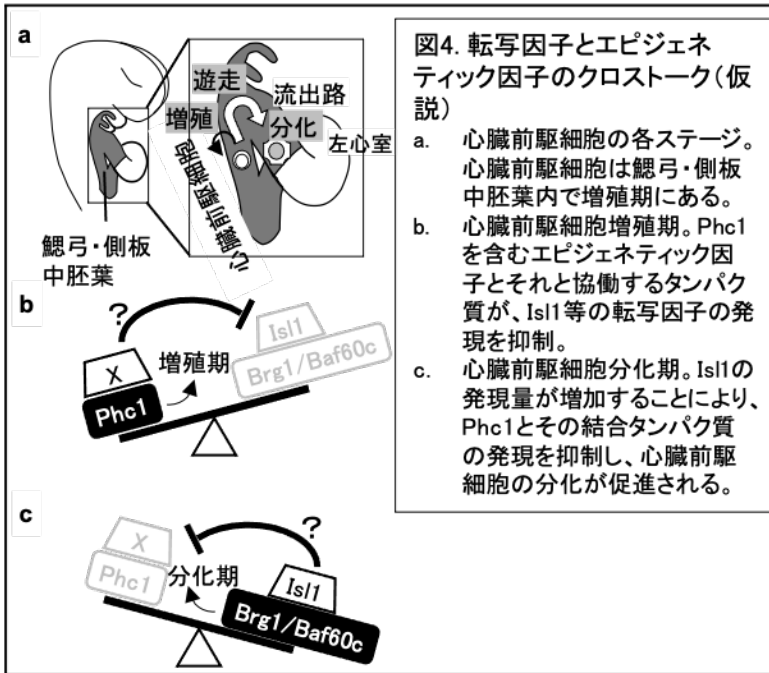


図4. 転写因子とエピジェネティック因子のクロストーク(仮説)

- 心臓前駆細胞の各ステージ。心臓前駆細胞は鰓弓・側板中胚葉内で増殖期にある。
- 心臓前駆細胞増殖期。Phc1を含むエピジェネティック因子とそれと協働するタンパク質が、Isl1等の転写因子の発現を抑制。
- 心臓前駆細胞分化期。Isl1の発現量が増加することにより、Phc1とその結合タンパク質の発現を抑制し、心臓前駆細胞の分化が促進される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Agnes Ong Lee Chen, Manabu Shirai, Noriaki Sasai
2. 発表標題 Polyhomeotic homolog 1 regulates the formation of optic cup-like organoids.
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝山大暉、白井学、吉鷹玲奈、笹井紀明
2. 発表標題 種特異的な神経管サイズを制御する分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Agnes Ong Lee Chen, Manabu Shirai, Noriaki Sasai
2. 発表標題 Essential Roles of Polyhomeotic Homolog 1 (Phc1) in Early Retinal Development
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	若林 真樹 (Wakabayashi Masaki) (70552024)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・オープンイノベーションセンター・室長  (84404)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	笹井 紀明  (Sasai Noriaki)  (80391960)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授    (14603)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連 携 研 究 者	白石 公  (Shiraishi Isao)  (80295659)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・部長    (84404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関