

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253049

研究課題名(和文)心筋細胞の分化と破綻におけるエピゲノム機構の解析

研究課題名(英文)Epigenome analysis in cardiomyocyte differentiation and failure

研究代表者

小室 一成 (Komuro, Issei)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30260483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、未分化幹細胞が心筋細胞へと分化する過程、心筋細胞の機能が破綻する心不全発症の過程の両者におけるエピゲノム制御機構を解析した。まず分化に伴って活性化するWntシグナルの転写制御因子 β -cateninが複数のエピゲノム制御因子と複合体を形成して中胚葉エンハンサーを活性化し下流の遺伝子プログラムを誘導することを明らかにした。さらに1細胞トランスクリプトーム解析とエピゲノム解析を統合することで、心臓への圧負荷によって活性化する転写因子群が心不全遺伝子プログラムを制御するエンハンサーを活性化することを見出した。本研究によりエピゲノムが心筋細胞の分化と破綻の両者を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We analyzed epigenomic regulation of cardiomyocyte differentiation and heart failure. Genome-wide enhancer analysis revealed that β -catenin, which is activated by Wnt signaling upon differentiation, forms a complex with epigenomic regulators to activate mesodermal enhancers and provokes the down-stream gene program. Through integrative analysis of single-cell transcriptomes and epigenomes, we also unveiled that transcription factors which are induced upon pressure overload activates enhancers regulating the heart failure gene program. These results indicate that the epigenome regulates cardiomyocyte differentiation and failure.

研究分野：循環器内科

キーワード：分子心臓学 エピゲノム 遺伝子制御

1. 研究開始当初の背景

細胞の分化や破綻のプロセスは、細胞の個性が変化する重要な生命現象である。我々は、未分化幹細胞から心筋細胞へいかに分化するか(心筋細胞分化)をテーマに研究し、心筋特異的に発現する転写因子 Nkx2-5 (Komuro et al. PNAS 1993)をはじめ、心筋細胞分化を制御する Wnt シグナル (Naito, Komuro et al. PNAS 2006) およびその制御因子 IGFBP4 (Zhu, Komuro et al. Nature 2008) を発見してきた。一方で、心筋細胞が破綻して不全心筋となる過程(心筋細胞破綻)において、転写因子 HIF1A による代償を転写因子 p53 が破綻させること (Sano, Komuro et al. Nature 2007)、心筋破綻により生ずる補体 C1q が Wnt シグナル活性化を介して全身の組織老化を誘導すること (Naito, Nomura, Komuro et al. Cell 2012) などを明らかにしてきた。これらの研究は、細胞の分化および破綻の過程で生ずる分子機構を世界に先駆けて明らかにしたものの、細胞レベルでどのように個性の転換が起こっているか、本質的に理解することができなかった。

しかし近年、細胞の個性はエピゲノムという形でクロマチンに書き込まれていることが分かってきた。個々の細胞は、自らのゲノムを変えることなく、そのゲノム DNA およびそれに巻き付くヒストンに様々な化学的、物理的修飾をつけて遺伝子を制御することにより、自らの個性を決定し、それを保っている。エピゲノムは、その頑強性により個性を維持することができる一方、その可塑性により個性を変化させることもできる。すなわち、エピゲノムが心筋細胞の分化や破綻の過程における細胞レベルの個性の転換を制御している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、心筋細胞の個性が大きく変化する「分化」(心筋細胞分化)と「破綻」(心不全発症)のプロセスに焦点を当て、エピゲノムを同定・解析することにより、それらの生命現象においてどのような分子機構が個性の転換に本質的に働いているかを明らかにすることを目的としたものである。

3. 研究の方法

(1) 心筋細胞分化の過程においては、マウス P19CL6 細胞およびマウス ES 細胞の心筋分化系を用いて解析した。それぞれの過程において経時的に 1 細胞トランスクリプトーム解析、エピゲノム解析を行い、そのダイナミクスを解析した。特にエピゲノムの変化に関わる分子を同定し、その機能を詳細に解析した。

(2) 心不全の過程においては、横行大動脈縮窄術を施した圧負荷心不全モデルマウスを用いた。術後の心機能はエコーにて評価し、適切に負荷がかかっているマウスを解析に用いた。圧負荷後経時的に心臓からランゲンドル

フ灌流心法により心筋細胞を単離し、1 細胞トランスクリプトーム解析を行った。また心臓の肥大期、心不全期の心筋細胞を用いてエピゲノム解析 (H3K27ac ChIP-seq) を行い、遺伝子発現データと統合して解析した。

4. 研究成果

(1) 心筋細胞分化におけるエピゲノム制御

① 心筋細胞分化における細胞系譜解析

我々はまず、心筋細胞分化の過程において経時的に細胞を回収し、フリーダイン C1 システムを用いて 1 細胞ごとに cDNA ライブラリを作成して 1 細胞トランスクリプトーム解析を行った。その結果、心筋細胞分化の過程における細胞系譜の変遷を詳細に解析することができるようになった。

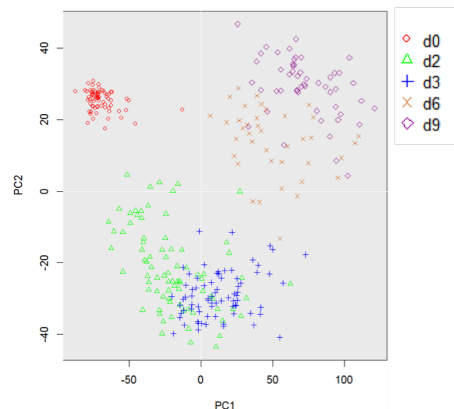


図 1. 1 細胞トランスクリプトーム解析による心筋細胞分化における細胞系譜

② 心筋細胞分化におけるエピゲノム解析

その細胞系譜においてどのようにエピゲノムが変化しているかを明らかにするために、心筋細胞分化過程において 4 つのタイムポイントでエピゲノム解析を行った。具体的には、ChIP-seq を用いてゲノムワイドな H3K27ac、H3K27me3、H3K4me3、H3K4me1 の修飾を同定するとともに、オープンクロマチン領域を FAIRE-seq により同定した。

これにより分化段階において特異的に活性化するエンハンサー領域を同定することができ、その領域に濃縮する遺伝子配列を解析することにより(モチーフ解析)、時期特異的に活性化する転写因子を抽出することに成功した。未分化幹細胞から中胚葉細胞へと分化する過程で活性化するエンハンサー領域において、Wnt シグナルの下流の転写制御因子 β -catenin と中胚葉制御因子 Brachyury が結合する配列が濃縮していたことから、Wnt シグナルによるエピゲノム制御機構に注目した。

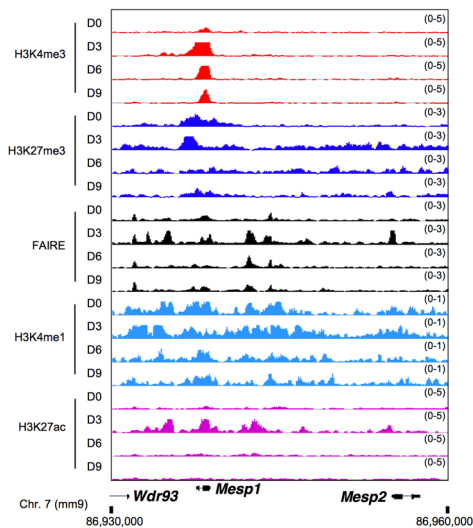


図2. 心筋分化過程におけるエピゲノム解析

③ Wnt シグナルによるエピゲノム制御機構
 まず β -catenin と Brachyury の ChIP-seq を行うことにより、これらの因子が中胚葉エンハンサー領域に結合すること、そしてこれらの転写因子が結合する部位は、未分化幹細胞から中胚葉細胞へと分化する過程でエピゲノムの活性化が生じることを明らかにした。このことは、 β -catenin および Brachyury によってリクルートされる何らかのエピゲノム制御因子がエピゲノムの活性化に関わることを示唆している。エピゲノムの活性化はヌクレオソーム除去とヒストンアセチル化によって誘導されることに着目し、中胚葉発生において重要であることが知られているクロマチンリモデリング因子 Aridla に注目した。

中胚葉細胞における Aridla の局在を調べるために Aridla に対する抗体を用いて ChIP-seq を行ったところ、この因子は中胚葉エンハンサーに β -catenin や Brachyury と共局在して結合していることがわかった。そして心筋分化過程において Wnt シグナル抑制、 β -catenin のノックダウンをすることにより、Aridla は中胚葉エンハンサーにリクルートされなくなった。さらに分化過程において Aridla をノックダウンすると、中胚葉エンハンサーのヌクレオソームは除去されずエンハンサーは不活化状態を維持した。すなわち、クロマチンリモデリング因子である Aridla は Wnt シグナルおよび β -catenin 依存性の中胚葉エンハンサーにリクルートされ、その部位のヌクレオソーム除去を介してエピゲノムをゲノムワイドに書き換え、中胚葉遺伝子プログラムを一気に活性化させていることを明らかにした。

(2) 心不全におけるエピゲノム制御

① 心不全における1細胞トランスクリプトーム解析

マウスに横行大動脈縮窄術を施し、経時的に心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流心法にて

心筋細胞を単離し、1細胞ごとに cDNA ライブラリを作成し、合計 396 細胞の1細胞トランスクリプトーム情報を抽出した。まずこの情報を基に重み付け共発現ネットワーク解析を行い、55 の遺伝子モジュールを同定した。その後、機械学習解析 (ランダムフォレスト) を用いて、全 55 モジュールのうち細胞の分類に大きく関わる 9 モジュールを同定し、階層的クラスタリングにより心不全過程における 396 心筋細胞を 7 つのグループに分類した。そして tSNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) 解析を行うことで、心筋細胞が圧負荷を受けてから心不全細胞へと変化するまでの詳細な過程を明らかにした。

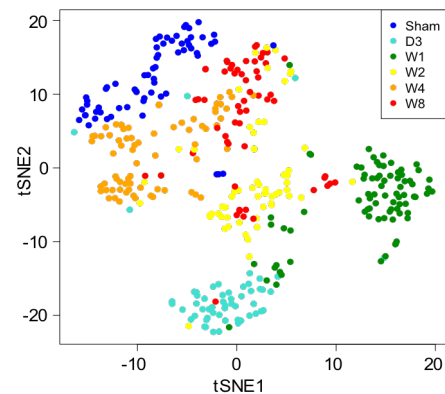


図3. 心不全における1細胞トランスクリプトーム解析 (Sham は偽手術、他は圧負荷手術後の期間)

② 心肥大・心不全におけるエピゲノム制御
 続いてこれらの共発現遺伝子モジュールがいかに制御されているかを明らかにするために、心肥大および心不全期の心筋細胞の H3K27ac ChIP-seq を行い、各モジュールの制御領域におけるモチーフ解析を行った。すると、肥大型には心肥大に関わるシグナルの下流の転写因子の認識配列がミトコンドリア関係の遺伝子座周辺の制御領域に濃縮していた。さらに心不全期には心不全との関連が示唆される転写因子の認識配列が心不全モジュール遺伝子の遺伝子座周辺の制御領域に濃縮していた。これは、これらの転写因子がエピゲノムを調節して、心肥大および心不全を制御していることを示唆している。

以上の詳細な解析により、エピゲノムが心筋細胞の分化と破綻の過程における細胞個性の転換を制御していることを明らかにしている。今後これらの結果を基にした再生医療への応用、心不全治療の開発へと発展することが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

① Fujiu K, Shibata M, Nakayama Y, Ogata F, Matsumoto S, Noshita K, Iwami S, Nakae S, Komuro I, Nagai R, Manabe I. A heart-brain-kidney network controls adaptation

to cardiac stress through tissue macrophage activation. *Nature Medicine*. 2017 May;23(5):611-622 (査読有).

doi: 10.1038/nm.4326.

② Higo T, Naito AT, Sumida T, Shibamoto M, Okada K, Nomura S, Nakagawa A, Yamaguchi T, Sakai T, Hashimoto A, Kuramoto Y, Ito M, Hikoso S, Akazawa H, Lee JK, Shiojima I, McKinnon PJ, Sakata Y, Komuro I. DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure. *Nature Communications*. 2017 Apr 24;8:15104 (査読有).

doi: 10.1038/ncomms15104.

③ Kamo T, Akazawa H, Suda W, Saga-Kamo A, Shimizu Y, Yagi H, Liu Q, Nomura S, Naito AT, Takeda N, Harada M, Toko H, Kumagai H, Ikeda Y, Takimoto E, Suzuki JI, Honda K, Morita H, Hattori M, Komuro I. Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. *PLoS One*. 2017 Mar 22;12(3):e0174099 (査読有).

④ Woo AY, Komuro I, Xiao RP. Biased Agonism at the Angiotensin Receptor: Blocker and Calcium Sensitizer at the Same Time. *Circulation*. 2017 Mar 14;135(11):1071-1074 (査読有).

doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.

⑤ Amiya E, Morita H, Hatano M, Nitta D, Hosoya Y, Maki H, Motozawa Y, Sato N, Ishiura H, Numakura S, Shintani Y, Kinugawa K, Takeda N, Shimizu J, Tsuji S, Komuro I. Fukutin gene mutations that cause left ventricular noncompaction. *International Journal of Cardiology*. 2016 Nov 1;222:727-9 (査読有).

doi: 10.1016/j.ijcard.2016.08.011.

⑥ Morita H, Komuro I. A Strategy for Genomic Research on Common Cardiovascular Diseases Aiming at the Realization of Precision Medicine: Personal Insights and Perspectives. *Circulation Research*. 2016 Sep 30;119(8):900-3 (査読有).

doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309802

⑦ Semba H, Takeda N, Isagawa T, Sugiura Y, Honda K, Wake M, Miyazawa H, Yamaguchi Y, Miura M, Jenkins DM, Choi H, Kim JW, Asagiri M, Cowburn AS, Abe H, Soma K, Koyama K, Katoh M, Sayama K, Goda N, Johnson RS, Manabe I, Nagai R, Komuro I. HIF-1 α -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nature Communications*. 2016 May 18;7:11635 (査読有).

doi: 10.1038/ncomms11635.

⑧ Oka T, Morita H, Komuro I. Novel molecular mechanisms and regeneration therapy for heart failure. *Journal of*

Molecular Cell Cardiology. 2016 Mar;92:46-51 (査読有).

doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.01.028.

⑨ Sumida T, Naito AT, Nomura S, Higo T, Hashimoto A, Okada K, Sakai T, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Minamino T, Offermanns S, Noda T, Botto M, Kobayashi Y, Morita H, Manabe I, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q-induced activation of β -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling. *Nature Communications*. 2015 Feb 26;6:6241 (査読有).

doi: 10.1038/ncomms7241.

[学会発表] (計 9 件)

① 野村征太郎、Genetics of Cardiomyopathy、第 81 回 日本循環器学会学術集会、2017 年 3 月 19 日、ホテル金沢 (石川県金沢市)

② 小室一成、臨床・基礎研究の強化、第 81 回 日本循環器学会学術集会 (招待講演)、2017 年 3 月 18 日、ヴィサージュ (石川県金沢市)

③ 小室一成、若者を心血管病から守る: 金沢宣言への提言 Introduction、第 81 回 日本循環器学会学術集会 (招待講演)、2017 年 3 月 17 日、石川県立音楽堂 (石川県金沢市)

③ 野村征太郎、佐藤真洋、候聡志、藤田隆教、油谷浩幸、小室一成、システム生物学的アプローチによる心不全 1 細胞モデリング、第 20 回日本心不全学会学術集会、2016 年 10 月 7 日 ~ 2016 年 10 月 9 日、ロイトン札幌 (北海道札幌市)

④ 野村征太郎、飛田尚重、藤田隆教、油谷浩幸、小室一成、心筋症のハイスループットな遺伝子解析技術の構築とその応用、2016 年 10 月 7 日 ~ 2016 年 10 月 9 日、ロイトン札幌 (北海道札幌市)

④ Issei Komuro、Angiogenesis has two merits heart failure、The 60th Annual Scientific Meeting of The Korean Society of Cardiology 2016、2016 年 9 月 26 日 ~ 2016 年 9 月 27 日、Seoul、Korea

⑤ Issei Komuro、Inflammation, ageing and heart failure、ESC Congress 2016、2016 年 8 月 27 日 ~ 2016 年 8 月 31 日、Rome、Italy

⑥ Issei Komuro、Mechanisms for heart failure、World Congress of Cardiology and Cardiovascular Health、2016 年 6 月 4 日 ~ 2016 年 6 月 6 日、Mexico City、Mexico

⑦ Issei Komuro、Mechanisms of Heart Failure - crosstalks among ischemia, inflammation and senescence-、The 11th IHA International Elite Forum、2016 年 5 月 26 日、Shanghai、China

⑧ Issei Komuro、Cardiac DNA damage causes heart failure、ISHR XXII World Congress、2016 年 4 月 18 日 ~ 2016 年 4 月 21 日、Buenos Aires、Argentina

⑨ Issei Komuro、Plenary Lecture :

Molecular Mechanism of Heart Failure、The
4th Wuhan International Conference on
Cardiometabolic Science、2016年5月12日
～ 2016年5月14日、Wuhan、China

〔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

[https://cardiovasc.m.u-
tokyo.ac.jp/circulation](https://cardiovasc.m.u-tokyo.ac.jp/circulation)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小室一成 (KOMURO, Issei)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：30260483

(2) 研究分担者

内藤篤彦 (NAITO, Atsuhiko)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：10588891

(3) 連携研究者

野村征太郎 (NOMURA, Seitaro)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：10722118