

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04327

研究課題名(和文)力覚/遺伝子発現関連の分子基盤解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of force-sensing system and gene expression.

研究代表者

小椋 利彦(Ogura, Toshihiko)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60273851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：力感受性転写調節因子 MKL2 について、せん断応力への応答が極めて早い反応であること、Ca シグナルによって調節されていることなどが明らかとなり、MKL2の挙動に関して、新たな知見が得られた。また、MKL2 KO マウスの作製を行った。MKL2 KO マウスは胎生致死と報告されてきたが、我々は null マウスを生存させることができた。この結果、これまでの報告にない表現型を確認した。また、エネルギー代謝の関係から推測できる表現型を認めた。加えて、眼の異常もあり、生後すぐから白濁している。以上、これまでの報告にない、新しい知見が得られ、現在、論文としてまとめている。

研究成果の概要(英文)：We have found that force-sensitive transcriptional co-activator MKL2 shuttles from cytoplasm into nucleus in very rapid response to shear stress, which completes within 10 minutes. We also found that this response is mediated by purinergic receptor activation and subsequent Ca signaling. To explore further the roles played by MKL2, we successfully made Mkl2 KO mice, which shows interesting phenotypes in circulatory system, such as heart and vasculatures. These phenotypes can be explained by a loss of response to mechanical stress in circulation. In addition, we found other unexpected interesting phenotypes in eyes and energy metabolism. We are preparing a manuscript, in which all data found in this project will be included.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写 遺伝子発現 力刺激

1. 研究開始当初の背景

生物は、常に力の刺激を受けて生活している。これは、無重力下の宇宙飛行士に見られる顕著な骨や筋肉の萎縮を見れば明らかであり、長期病臥患者にも同様の萎縮現象（ロコモチブ症候群）が見られる。これとは逆に、運動による力学刺激を筋肉や骨は感知し、肥大や骨組織の強化によって適応している。また、循環器系においても、長期血圧負荷、循環血液量の増大などは心肥大を起こすし、力学刺激の受容系、反応系の破綻が拡張性/肥大型心筋症を発症することが示されている。

このような機構は、胎児発生にも見られる。例えば、心拍/血流の異常は心奇形の原因となり、遺伝子異常をもたない先天性心疾患の原因になると考えられている（*Nature* 421, 172, 2003）。また、幹細胞は、その外部環境（細胞外基質）の硬さを感知し（Active Touch）、反応することで分化の方向を基質の硬さに応じて変える（*Cell* 126, 677, 2006）。以上の事実は、細胞が種々の力学刺激を感知し、生化学的、遺伝的反応で応える能力を持つことを意味する。

力学的刺激を受容して遺伝子発現を変化させたり、生化学的反応で応えるメカニズムを mechanotransduction と呼ぶが、その分子実体はほとんど解明されていない。しかしながら、力を感知する分子の探索を始め、物理的刺激を生化学的反応に変換する仕組み、その生物学的意義は、ここ数年、大きな関心事となってきている。例えば、National University of Singapore (NUS) は Mechano-biology の一大拠点を作り、この問題に取り組もうとしている（<http://mbi.nus.edu.sg/>）。また、*Nature Reviews Molecular Cell Biology* 誌は2009年1月号を Mechanotransduction 特集として、この問題の最新の潮流を概説している。また、申請者は、細胞工学9月号で『新メカノトランスダクション』という特集号を監修した。

これは、mechanotransduction の解明が、加齢や長期病臥による筋肉/骨萎縮、心肥大や心不全、拡張性/肥大型心筋症などの新しい治療法の発見、先天性心疾患発症メカニズムの理解と予防、幹細胞の分化制御や組織構築技術など、きわめて多くの応用的研究に発展する可能性を秘めているからである。しかも、これらの問題は、従来の分子生物学的な視点とは異なり、工学、物理、数理などの複合的、学際的な着眼点と手法を内包しており、

生命現象を新しい視点で再解釈する糸口となる。そして、細胞工学9月号特集号でも、工学系研究者に執筆頂き、融合的研究を自ら推進して来た。また、申請者らは、基盤研究(B)「細胞力覚が遺伝子発現を制御する分子機構とその生物学的意義」（平成24~26年度）を通して、心臓発生に必須な転写因子 Tbx5 の co-activator を探し、MKL2 を見いだした。MKL2 は Tbx5 に対し強力な転写活性化可能をもつが、その詳細な解析によって、拍動による心筋細胞の伸展刺激が引き金となって核内に速やかに移行することを見いだした。ゼブラフィッシュをモデルに用いると、MKL2 は心拍を止めると細胞質に、心拍を再開させると核に局在する。また、細胞を伸展することで核内移行を起こすことができるし、マウスの心臓では大動脈を結紮する左室圧負荷（TAC）によっても核内移行が起こる。このことは、MKL2 が細胞への力学刺激に反応して核内に入り、Tbx5 などの転写を調節していることを意味し、力学刺激の遺伝子発現への影響は、予想以上に大きく、直接的であることを物語っている。また同時に、MKL2/Tbx5 を介した力による遺伝子発現制御には、未知の因子の関与がわかり、Hippo/Yap 系シグナル伝達機構との関連も明らかになりつつある。

2. 研究の目的

心臓は心拍、血流が無いと正常発生しない。また、心臓内の血流が乱れると、先天性心疾患のような奇形が生じる（*Nature* 421, 172, 2003）。このことは、心臓を構成する細胞への力学刺激が、分化、増殖、形態形成に必須であることを意味する。しかし、力学刺激と形態形成を結びつけるシグナル伝達機構は、ほとんど解析されていない。申請者は、容易に心拍動態を制御できるゼブラフィッシュ心モデルに、心拍/血流によって発現が維持され、弁形成に必須の働きをもつ複数の遺伝子を単離した。そして、血流に起因するせん断応力が弁形成に必須であることを報告した（*Nature Communications* 4, Article number 1978, 2013）。本研究では、これらの遺伝子を糸口に、血流、心拍に起因する力学的刺激から遺伝子発現、ひいては弁形成に至る未踏のシグナル伝達機構（Physico-Physiology loop）を解明することを目的とする。また、マウスを用いて、ヒトの循環器疾患を念頭においた研究を展開すると同時に、物理的な力が成体の恒常性維持にどのように影響するか、そのメカニズム

を解明する。

3. 研究の方法

平成 27 年度

1) Tbx5/MKL2 転写活性化複合体 Tbx5/MKL2 による転写活性化には、A/T-rich 配列に結合する未知の転写因子が関与することがわかった。この因子が YAP/TAZ 経路の構成因子である可能性も考慮して、その分子実体を明らかにする。

2) MKL2-PPAR/ERR 代謝調節経路 Tbx5/MKL5 が核内受容体を活性化して力刺激依存的に脂質代謝を調節することがわかったので、この経路を明らかにする。

3) miR-21 ノックアウト (KO) マウス miR-21KO マウスは、皮膚損傷に対するユニークな応答を示すことから、miR-21 標的を含めてメカニズムを明らかにする。

平成 28 年度以降

1) Tbx5/MKL2 転写活性化複合体 Tbx5/MKL2 複合体構成因子の全貌を、細胞骨格や接着因子との関連を含めて詳細な検証を行う。

2) MKL2-PPAR/ERR 代謝調節経路 MKL2/核内受容体の相互作用様式の詳細を明らかにし、標的遺伝子の網羅的同定も行う。

3) miR-21 の発現制御機構 KO マウスを用いて、血管狭窄部位での機能、血流動態による制御機構を解析する。

4. 研究成果

1) MKL2 を中心とした研究成果

これまでの実験から、Tbx5 の標的遺伝子 ANF (Atrial Natriuretic Factor) プロモーター上に、Tbx5 結合部位が複数、タンデムに並び、ここに Tbx5 が結合することが明らかとなっている。MKL2 は、細胞に力が加わってアクチンリモデリングが起こると細胞質から核内にシャトルし、Tbx5 と複合体を形成して ANF 遺伝子を強力に活性化する。

MKL2 は、別の転写因子 SRF (Serum Response Factor) とも複合体を形成することがわかっており、ANF プロモーター上には Tbx5 結合部位の近傍に SRF 結合配列が存在している。また、SRF 結合配列に酷似した A/T-rich motif も存在している。MKL2 が SRF を活性化して ANF 遺伝子の発現誘導を起す可能性を確かめるため、SRF 結合配列を *in vitro* mutagenesis で壊したが、Tbx5/MKL2 による転写活性化には変化がなかった。このことは、Tbx5 による ANF の力刺激依存的な発現には、SRF の関与が無いことを示している。

しかしながら、SRF 結合配列様 A/T-rich motif を壊すと、Tbx5/MKL2 による転写活性化は消失した。このことは、Tbx5/MKL2 による転写活性化には、A/T-rich motif に結合する転写因子が必須であることを意味している。

そこで、この A/T-rich-motif に結合する転写因子の探索を行った。まず、SRF、MEF の関与を確認したが、これらの因子の影響は皆無であった。転写因子データベースから、A/T-rich-motif に結合し得るものを抽出し、発現ベクターに組み込んで半網羅的に解析した。このスクリーニングを継続してきたが、その結果、A/T-rich-motif に結合する転写因子の候補を同定した。この因子は、ANF 遺伝子発現のスイッチにもあり得るもので、解析を継続している。

力感受性因子 MKL2 に関する新たな事象を見いだすことができた。従来、MKL2 が活性化できる転写因子は SRF のみと考えられて来たが、我々の研究はこれに Tbx5 を加えることになった。さらに、我々は、核内にシャトルした MKL2 が、核内受容体を活性化し、脂質代謝の活性化と通じてエネルギー代謝 (ATP 産生) を制御していることを見いだした。血圧が上昇したり、頻脈などで心筋にエネルギー需要が高まると、心筋は ATP 産生を上昇させて適応する。また、心不全などによって心筋の収縮動態に病的な変化が起こると、正常時には脂質を燃焼して ATP を産生していた心筋が、脂質を利用できなくなり糖質を使って ATP 産生を行うようになる。これは ATP 産生効率が悪く、エネルギー代謝の観点から不利である。また、代謝されない脂質が心筋組織に蓄積すると Fatty heart を呼ばれる極めて危険な状態に陥る。従って、エネルギー源を糖質から脂質に戻してやる必要が末期心不全の治療にはある。しかし、この治療法が現時点で知られていない。

我々の見いだした力依存性代謝調節機構は、この病態を理解する手だてとなる。血圧上昇や頻脈によって心筋への力学負荷が増大すると、MKL2 が核内に移行して複数の核内受容体を活性化する。この結果、脂質代謝が亢進して ATP 産生を促進する。これは今まで報告されたことの無い新しいシグナル経路で、力刺激とエネルギー代謝を結びつける重要な知見となった。

また、血管内皮細胞にせん断応力を印可した時の MKL2 の挙動を蛍光顕微鏡下で観察する目的で、せん断応力印可装置を透明化した。これによって、せん断応力印可前後の

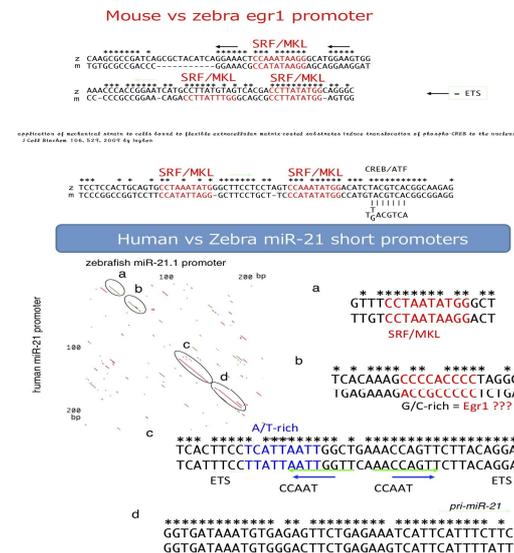
MKL2 の挙動を動画として取得することが可能となった。そして、MKL2 が、せん断応力に反応して分単位で進行する極めて早い核内移行を示すことが明らかとなった。せん断応力印可直後に MKL2 は細胞質から核内に移行し、約 8 分で細胞質のほぼすべての MKL2 タンパク質は核内にシャトルする。その後、せん断応力を加え続けても、MKL2 はゆっくりと細胞質に排出されるが、せん断応力を切ると細胞質への排出速度は著しく早くなる。その後、もう一度、せん断応力を加えると、MKL2 は同様に速やかに核内に移行する。このことから、MKL2 は、せん断応力の変化に即応していると考えられる。

次に、せん断応力と MKL2 の核移行をつなぐシグナルが何かを検討した。その結果、Ca があることがわかった。Ca ionophore で刺激しても MKL2 の速やかな核移行は再現できる。また、せん断応力を印可した直後に、細胞質の Ca 濃度が一過性に著増することも確認できた。また、Ca をキレートすると、せん断応力に MKL2 は反応しなくなる。また、一過性の Ca 増加によって、一過性のアクチン骨格リモデリングが起こることがわかった。このリモデリングは、核の形を変えるほどの強いリモデリングである。加えて、Purinergic receptor をブロックすることによっても MKL2 の、核移行を阻害することもわかった。これらの知見を総合すると、せん断応力 ATP 放 Purinergic receptor 活性化 Ca 流入 一過性アクチンリモデリング 一過性 F-actin/G-actin 比の増加 MKL2 の核移行、という一連のシグナル伝達が速やかに起こることがわかった。以上のデータは、現在、論文にまとめている。

これまでの知見をマウスで詳細に検証する目的で、MKL2 KO マウスの作製を行った。MKL2 KO マウスは、胎生致死と報告されてきたが、我々の研究室で null マウスを生存させることができた。この結果、これまでの報告にない表現系を確認できた。Null マウスは、循環器系に大きな異常を示しており、左心房は著名に肥大する。また、静脈瘤が多発する。また、MKL2 とエネルギー代謝の関係から推測できるように、lipodystrophy 様の表現系があり、脂肪組織の萎縮が見られた。加えて、眼の異常があり、生後すぐから白濁している。現在、このような表現系の異常を、詳細に解析しており、異常の原因を突き止めようとしている。加えて、microarray、メタボロミクス解析を行い、網羅的に表現系の検索を行っている。

2) miR-21 に関する研究成果

miRNA のひとつ miR-21 は、力刺激依存的に発現誘導される遺伝子 (特に、血流に起因するずり応力によって血管内皮細胞に誘導される遺伝子) を検索して同定した。また、Egr1 も同様の手法で見だし、しかもその発現が miR-21 と酷似し、ゼブラフィッシュ心臓の弁形成心内膜細胞に心拍依存的に発現する。すなわち、拍動する心臓では弁形成細胞に発現し、心拍を止めると発現が消失する。心拍が止まって発現を失った心臓の拍動を再開させると、egr1 遺伝子の発現はすみやかに回復する。この力依存性発現制御は、培養



ヒト血管内皮細胞 HUVEC を用いても確認できた。そこで、ヒトとゼブラフィッシュ egr1 遺伝子のプロモーター配列を解析、比較した。その結果、5 つの SRF 結合配列が直列の配置されていることが明らかとなった (上図)。

次に、miR-21 の力刺激依存的な発現がどのように制御されているかを知る目的で、miR-21 プロモーターを同定して解析した。驚くべきことに、転写開始点の上流 200bp の短い領域は、ヒトとゼブラフィッシュで高度に保存されており、重要なモチーフが同定可能であった。そして、これらのモチーフには、前述した SRF 結合サイトが高度に保存された状態で見つかった。すなわち、弁形成前、心内膜細胞には、強い逆流刺激が加わっていて、これによって MKL2 が細胞質から核内にシャトルする。その結果、SRF/MKL22 複合体が形成されて miR-21 プロモーターを活性化する。さらに、miR-21 プロモーター上には、Egr1 結合モチーフとなる GC-rich な配列も見つかった。

この可能性を確かめるため、約 200bp の短いプロモーター断片を EGFP 遺伝子に繋ぎ、

トランスジェニックフィッシュを作製してEGFP 蛍光を確認した。その結果、EGFP は心内膜、心筋を含む心臓全体で発現することがわかった。そして、BDM を用いて心拍を止めるとEGFP の蛍光も消失した。BDM の除去による心拍再開では、EGFP の発現は速やかに回復した。以上の事実は、200bp の小さな領域に力反応性部位があり、その部位にはSRF/MKL2 が結合すること、SRF/ MKL2 は独立に転写因子Egr1 を誘導し、Egr1 もmiR-21 の発現誘導に寄与すること、弁特異的なmiR-21 の発現調節は200bp 以外の部分になることを結論できる。実際、miR-21 を含む大きなBAC クローンを用いると、EGFP はきれいに弁形成部位に限局し、血流依存性も再現できた。

miR-21 の発現が力によること、miR-21 の発現によって細胞増殖は正に制御されることから、例えば、組織が外力によって損傷した場合、miR-21 の発現が誘導されて細胞増殖が促進されて創傷が治癒し、動物種によっては再生が起こることも考えられる。

ゼブラフィッシュでは、尾びれ先端の切除、心臓先端（心尖部）の外科的切除によって再生が起こる。この再生過程でmiR-21 の関与があるかを検証した。その結果、尾びれ切除、心臓先端切除の療法で、miR-21 の強い発現誘導が確認できた。このことは、ゼブラフィッシュの組織再生の過程でmiR-21 の関与があることを示唆している。

miR-21 の機能を、ゼブラフィッシュ以外の生物種で解析する目的でノックアウトマウスを作製した。残念ながら、miR-21 KO マウスは、正常に発生し、心臓形態、循環動態も正常であった。これは、miR-21 の機能には種による違いがあることを意味している。しかし、培養細胞への力学刺激印加では、miR-21 の発現誘導が速やかに起こることを確認していたので、マウスでも力学刺激への反応過程でmiR-21 が何らかの意義をもっていることは予想された。

そこで、マウスの創傷治癒過程でのmiR-21 の機能解析を行った。まず、マウス背部を剃毛して一定の大きさで皮膚をパンチアウトして欠損を作製した。そして、予想通り、皮膚欠損部位にはmiR-21 の発現が強く誘導されることを確認した。miR-21 KO マウスではmiR-21 の発現誘導は全く起こらない。

皮膚損傷後の治癒過程を観察した結果、驚くべきことに、miR-21 KO マウスでは、皮膚損傷が極めて速やかに治癒することが確認できた。しかも、治癒した皮膚では繊維化が抑制され、皮膚は癒痕を形成せずにきれい

に治癒した。創傷治癒過程で、miR-21 がどのような標的遺伝子を制御しているか、詳細な探索を行おうとしたが、皮膚損傷部位からのmRNA の精製が充分に行えず、網羅的に検索するに至っていない。

また、マウス Egr1 に関しては、発生過程の腱でその発現が顕著であり、筋肉の収縮によって腱に力学的な負荷が加わることから、腱の力刺激依存できた形成にEgr1 は関与していることが示唆される。Egr1 のノックアウトマウスの作製は、購入したES 細胞の質が悪く、germ line への導入が起これず、本研究期間内にKO マウスを作製することが出来なかった。Egr1 遺伝子の機能は、代謝、腱/筋発生と維持、心筋恒常性の維持など、多様であることを考え、今後もCRISPR/Cas9 を用いてKO マウスを作製することを目指したいと考えている。

3) その他の成果

Hippo 経路に属するYAP は、細胞が基質の硬さに反応したり、細胞密度を検知して反応を起す際に、転写因子 Tead にシグナルを伝達するものとして注目されている。我々は、このYAP の転写活性化に深く関与する因子を同定した。

マウスの初期胚発生時、コンパクションを起してタイトな細胞集団を形成するが、この細胞集団の外側はtrophectoderm 細胞として分化する。内側の細胞は未分化性を保持してICM となるが、タイトな細胞集団の外側、内側には、それぞれ引張りと圧縮という正反対の力が加わる。

我々が以前からノックアウトマウスを作製して、マウス初期胚の発生を解析して来たが、Sbno1 遺伝子のKO マウスでは、trophectoderm 細胞の分化が選択的に失われる。trophectoderm 細胞の分化にはYAP が重要であることが知られており、Sbno1 とYAP の機能的な関連を見た所、Sbno1 はYAP/Tead の転写活性化能を正に制御する因子であった。そして、YAP/Tead/Sbno1 転写活性化複合体は、Trophectoderm 細胞の分化に必須なCdx2 遺伝子プロモーターの一部に結合し、その転写を制御していた。

Sbno1 は、YAP/Tead 以外にもNotch のシグナルと協調的に働くなど、これまでに無い新しい知見が得られ、これを論文に投稿した。

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 6 件)

1. 遺伝子医学 MOOK 32 難病研究 up-to-date (臨床病態解析と新たな診断、治療法開発をめざして)(監修 松原洋一) 第2章 難病の病態モデル作製 1、ゼブラフィッシュ 久保純、宮坂恒太、松本健、小椋利彦 2017 (査読なし)
2. 運動と代謝の関係～運動模倣薬 (Exercise pill) は可能か?～ 宮坂恒太、久保純、松本健、小椋利彦、医薬ジャーナル (6月号、特集・新しい医療を拓くメカノバイオロジー) vol. 53、No. 6、p89-93、2017 (査読なし)
3. エクササイズピル、エクササイズミメティクスの可能性～運動療法の新たな展開へ～ 宮坂恒太、久保純、小椋利彦、別冊 医学の歩み メカノバイオロジーからメカノメディシンへ (編集 曾我部正博) 85～91 頁、2017 年 5 月 15 日発行 医歯薬出版株式会社 (査読なし)
4. 生体システムにおけるメカノトランスダクションー特に、遺伝子発現に注目してー 宮坂恒太、久保純、小椋利彦 Clinical Calcium 23, 79, 2016 (特集 メカノバイオサイエンスー力の科学と医療の最前線)(査読なし)
5. メカノバイオロジーからメカノメディシンへ (企画 曾我部正博) エクササイズピル、エクササイズミメティクスの可能性 宮坂恒太、久保純、小椋利彦 医学のあゆみ vol. 257, No. 10, 1051-1057, 2016 (査読なし)
6. Notch and Hippo signaling converge on Strawberry Notch 1 (Sbno1) to synergistically activate Cdx2 during specification of the trophectoderm. Yusuke Watanabe, Miyasaka Y. Kota, Atsushi Kubo, Yasuyuki S. Kida, Osamu Nakagawa, Yoshikazu Hirate, Hiroshi Sasaki, Toshihiko Ogura, **Scientific Reports**, 2017 (April, 12), 7:46135. DOI: 10.1038/srep46135 (査読あり)

[学会発表](計 3 件)

1. The M project: Mechanical control of Metabolism, Mitochondria and Muscle. 口頭、Toshihiko Ogura, 3rd International Symposium on Mechanobiology (2017, 12,11-12, 14), NUS Singapore、国外
2. 代謝を調節する力学場としてのアクチン骨格、口頭、宮坂恒太、久保純、松本健、小椋利彦、日本分子生物学会 (2017, 12, 6) 国内
3. 力学刺激から考える生命現象と工学技術による革新、口頭、小椋利彦、日本細

胞生物学会 (2017, 6, 13 - 6, 15) 国内

[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

小椋 利彦 (OGURA TOSHIHIKO)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：60273851

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()