

平成 30 年 4 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07076

研究課題名(和文) Arp5による心筋分化制御機構の解明と直接リプログラミングへの応用

研究課題名(英文) Investigation into an inhibitory role of Arp5 in cardiac differentiation and reprogramming

研究代表者

森田 強 (Morita, Tsuyoshi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80403195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、心疾患に対する再生医療のアプローチの一つとして、もともと心筋ではない細胞に特定の遺伝子を導入することで心筋細胞へと分化させるいわゆるリプログラミングが注目を集めている。しかし、本手法は心筋への分化効率の低さという欠点が存在した。私は、心臓では発現が抑えられている心筋分化を抑制する因子としてactin-related protein 5 (Arp5)を見出し、その機能を明らかにした。Arp5は心筋分化に重要な転写因子であるmyocardinやMEF2Cの機能を抑制しており、Arp5の発現を抑制することで本来心筋細胞ではないP19CL6細胞が心筋へと分化する効率を上昇させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Recently, reprogramming cellular identity is receiving increased attention in cardiovascular regenerative medicine. However, the reprogramming efficiency from non-cardiac cells to cardiac cells is not sufficiently high. In this study, I identified actin-related protein 5 (Arp5) as an inhibitory factor for cardiac differentiation. The expression level of Arp5 is significantly low in the heart tissue. Arp5 interacted with cardiovascular transcription factors myocardin and MEF2C, and it inhibited their functions. Importantly, Arp5 knockdown increased the differentiation efficiency of mouse embryonic carcinoma P19CL6 cells to cardiac cells. Thus, suppression of Arp5 expression level is probably effective measure for improvement of the cardiac reprogramming efficiency.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：心筋分化 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

心疾患は日本における死因の上位に挙げられ、再生医療などによる新しい治療法の開発が盛んに行われている。これまで ES 細胞や iPS 細胞を用いた心筋細胞への分化誘導法が多数報告されているが、最近これらの多能性幹細胞を用いずに本来分化多能性を有しない繊維芽細胞などに複数の遺伝子を導入することにより直接心筋細胞への分化を誘導する直接リプログラミング法が注目を集めている。この方法では、心臓の繊維芽細胞に直接遺伝子を導入することで *in vivo* での心筋分化誘導が可能である一方、分化効率の低さが大きな問題点となっている。これは、本来心筋細胞では発現していない分化抑制因子の存在が深く関与しているものと思われる。これまで私は、平滑筋分化を抑制する因子として *actin-related protein 5 (Arp5)* に注目してきた。興味深いことに、*Arp5* の発現は心臓においても非常に低く抑えられており、心筋分化に対しても抑制的な役割を果たしている可能性が高いと考えられた。

## 2. 研究の目的

上述のように、心筋細胞へのリプログラミング効率を改善するには、心筋への分化に抑制的な因子を取り除く必要があると考えられる。最近私は、平滑筋分化を抑制的に制御する因子として *Arp5* を見出した。平滑筋細胞において *Arp5* は転写因子 *myocardin (Myocd)* の機能を抑制することで分化を阻害するが、*Myocd* は心筋分化においても重要な役割を担っていることが最近明らかになっている。そこで、本研究では心筋分化における *Arp5* の機能を詳細に解析するとともに、心筋分化に阻害的に働くであろう *Arp5* の発現を抑制することにより直接リプログラミングによる心筋細胞への分化誘導の効率化を目指す。

## 3. 研究の方法

### Arp5 による心筋型 Myocd の機能制御

これまで私は、*Arp5* が平滑筋型 *Myocd* と結合し、その機能を抑制することを報告してきた。本研究では、心筋型 *Myocd* と *Arp5* の結合様式や機能抑制機構を免疫沈降法やプロモーター解析法を用いて検証した。

### 心臓形成における Arp5 の役割

*Arp5* の発現は筋組織を多く含む臓器において特に低く抑えられており、心臓も例外ではない。そこで、生後間もないマウスの心臓においてアデノ随伴ウイルスを用いて *Arp5* を過剰発現させ、その後の心臓形成を観察することで、*Arp5* の心筋分化における役割を

詳細に解析した。具体的には、病理学的解析により *Arp5* 過剰発現による心臓形成の形態的变化を観察するとともに、心臓から RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行うことで遺伝子発現にどのような影響を与えているのかを検証した。

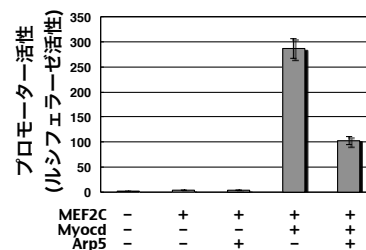
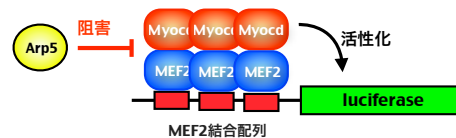
### P19CL6 細胞による心筋分化系を用いた解析

マウスの胚性がん腫細胞である P19CL6 細胞は、DMSO の添加により容易に心筋への分化を誘導できる。また、この細胞は元は心筋細胞ではないため、*Arp5* の発現量が比較的高いことが確かめられている。そこで、この細胞を用いて DOX 誘導性 *Arp5* shRNA 安定発現株を樹立し、DOX の有無すなわち *Arp5* 発現抑制の有無により心筋分化にどのような影響がもたらされるのかを RT-PCR 法により検討した。

## 4. 研究成果

### Arp5 による心筋型 myocardin の機能制御

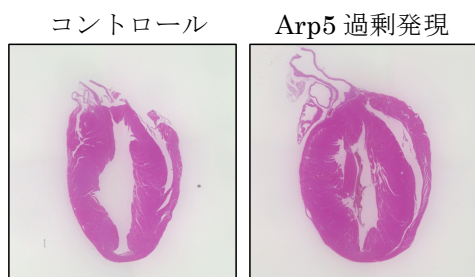
これまでの私の解析から、*Arp5* は *Myocd* の N 末端に存在する RPEL モチーフと強く結合することが知られていた。平滑筋型 *Myocd* と比べ、心筋型 *Myocd* には RPEL モチーフが一つ多く存在し、さらにその近傍には転写因子 MEF2 と結合するモチーフが存在する。*Arp5* はこの心筋型 *Myocd* にのみ存在する RPEL モチーフに強く結合し、おそらく立体障害的に *Myocd* と MEF2 との結合を阻害することが示された。*Myocd* は DNA との結合能を持たず、DNA 結合配列を持つ MEF2 もしくは SRF を介して間接的に DNA 上にリクルートされる。*Arp5* はこのような MEF2 を介した *Myocd* の機能を特に強く抑制し (下図)、心筋マーカー遺伝子の中でもプロモーター領域に MEF2 結合配列を持つ *Myl1* 遺伝子や *TNNT2* 遺伝子のプロモーター活性を特に強く抑制した。



### 心臓形成における Arp5 の役割

3 週齢のマウスの心臓において *Arp5* 遺伝

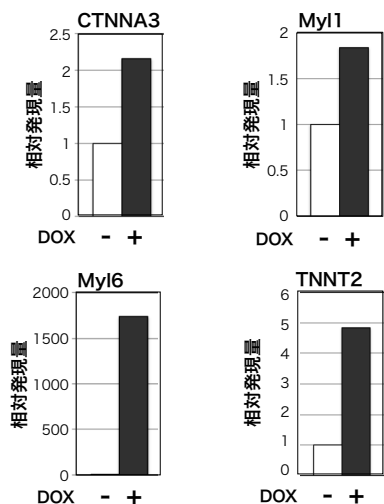
子を過剰発現させ、3週後に心臓の形態を観察したところ、顕著な心臓の肥大が観察された（下図）。



また、部分的に軽度な線維化が引き起されていることも観察された。このような心臓から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析により遺伝子発現プロファイルと比較したところ、Myocd/MEF2 により制御されていることが知られている多くの心筋特異的遺伝子の発現が軒並み低下している一方、線維化に関連する collagen や galactin3、NPPA の発現上昇が確認された。このような表現系は Myocd の心臓特異的ノックアウトマウスでも観察されることが既に報告されている。

#### P19CL6 細胞による心筋分化系を用いた解析

P19CL6 細胞は DMSO 添加により容易に心筋細胞への分化を誘導可能な細胞株である。しかし、分化効率が低く不安定であることが報告されていた。そこで、P19CL6 細胞を用いて DOX 誘導型 Arp5 shRNA 安定発現株を作製し、DOX の有無により心筋細胞への分化効率がどのように変化するかを検討した。樹立した細胞株は、いずれも DOX の有無にかかわらず拍動を示すような心筋細胞への分化が殆ど見られなかったが、DMSO による心筋特異的遺伝子の発現誘導は顕著に観察され、特に CTNNA3 や Myl1, Myl6, TNNT2 等、Myocd/MEF2 により制御されている多くの心筋マーカー遺伝子の発現が DOX 存在下すなわち Arp5 発現抑制下において有為に高いことが示された（下図）。



以上の結果より、Arp5 は Myocd に直接結合し MEF2 との複合体形成を阻害することで Myocd/MEF2 の機能を抑制することが確認された。Myocd/MEF2 は心筋分化において非常に重要な役割を担っており、Arp5 はこれらの機能を阻害することで心筋分化を抑制する一方、心筋では他の非筋肉細胞と比べて Arp5 の発現が低く抑えられているために心筋の分化形質が安定的に維持されているものと考えられる。この事実から、Arp5 の発現が比較的高い非筋肉細胞を心筋へと効率よくリプログラミングするためには Arp5 の発現を抑制する必要があると推察される。実際、P19CL6 を用いた心筋細胞分化誘導系では、Arp5 の発現抑制により心筋特異的遺伝子の発現が有為に上昇することが確認された。このように、本研究結果により心筋分化における Arp5 の機能が明らかになったことに加え、Arp5 の発現抑制が心筋への分化誘導効率を上昇させることを示したという意味で、非常に意義深いものであると言える。

#### 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 3 件）

① 林謙一郎、村井稔幸、及川浩樹、増田友之、木村和博、Susanne Muehlich、Ron Prywes、森田強、A novel inhibitory mechanism of MRTF-A/B on the ICAM-1 gene expression in vascular endothelial cells. *Sci. Rep.* 5, 10627 (2015)  
DOI:10.1038/srep10627

② 渡邊文太、南沙紀、石田秀明、吉岡隆三、中川好秋、森田強、林謙一郎、Stereospecific inhibitory effects of CCG-1423 on the cellular events mediated by myocardin-related transcription factor A. *PLOS ONE* 10, e0136242 (2015)  
DOI:10.1371/journal.pone.0136242

③ 森田強、林謙一郎、Tumor progression is mediated by thymosin-β4 through a TGFβ/MRTF signaling axis. *Mol Cancer Res.* 16, in press (2018)  
DOI:10.1158/1541-7786.MCR-17-0715

〔学会発表〕（計 3 件）

① 森田強、林謙一郎 筋分化制御因子としての actin-related protein 5 の役割 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会

② 森田強、林謙一郎  
thymosin-β4/MRTFs による細胞骨格遺伝子の転写制御 第 89 回日本生化学会大会

③ 森田強 actin-related protein 5 による筋分化制御機構 2017 年度生命科学系学会合同年次会 ConBio2017

〔図書〕(計 1 件)

林謙一郎、森田強 細胞骨格による転写制御 -アクチンダイナミクスによる転写調節と細胞機能 実験医学 (羊土社) 2018 年 4 月号

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/rna/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森田強 (MORITA, Tsuyoshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80403195