

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17537

研究課題名（和文）心臓発生における転写因子ZNF281の心筋分化調節機構の解明

研究課題名（英文）Dissecting the cardiogenic network of ZNF281

研究代表者

橋本 寿之（Hashimoto, Hisayuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：90528390

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々は線維芽細胞を心筋様細胞に直接誘導する分化転換法を用いた新たなアプローチにより、強い心筋分化転換誘導作用がある転写因子ZNF281に着目した。心臓発生におけるZNF281の機能は不明である。

本研究で作製したZNF281を欠損した多能性幹細胞は心筋分化能が欠如しており、ZNF281を欠損したマウスも胎生致死であり、ZNF281が心臓形成に必須の因子である事が確認できた。次にZNF281を発生時期特異的に欠損できるZNF281floxedマウス系統を樹立し、解析した結果、ZNF281は中胚葉に分化した以降の心臓発生に必須であることを明らかにし、心臓形成の新たな分子機序解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心血管疾患は世界において死亡原因の第一位であり、その要因の一つは心臓に十分な自己再生能がない事である。また、心臓発生の転写制御ネットワークに関しては未だ不明な点が多く、現存する医療技術では未だに心臓を創り出し、有効に再生して修復する事ができていない。現在、心臓形成の分子機構を研究するにはヒトと同じ哺乳類であるマウスを用いることが主流であるが、多くの費用と時間を要する。このような中、我々は線維芽細胞から心筋細胞を直接誘導する分化転換法に着目し、細胞のみを用いるこの系が心臓発生の分子機構を研究する新たなツールとなりうることを科学的に立証した。

研究成果の概要（英文）：During direct cardiac reprogramming, cardiogenic TFs cooperatively reshape the epigenomic landscape by activating cardiac enhancers, which describe a common epigenetic signature between in vitro cardiac reprogramming and in vivo heart development. We thus hypothesized that direct reprogramming could be a useful tool to study novel transcriptional regulators in heart development. To test this hypothesis, we focused on ZNF281, which showed up as an unexpected strong cardiac reprogramming inducer from our previous unbiased screen.

By using multiple genetic mouse models, we discovered that cardiac reprogramming inducer ZNF281 plays a pivotal role in heart development. We generated different stage-specific ZNF281KO mouse lines and found that mesodermal ZNF281KO mice were embryonic lethal as early as E9.5, associated with various cardiac anomalies. Our study demonstrates and highlights the impact and possibility of direct reprogramming as a novel approach to study cardiovascular biology.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 心臓発生 心筋分化 リプログラミング 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人の心臓には最小限の再生能力しかなく、自己修復できない事が心疾患の難治性を規定する大きな要因である。現行の薬物療法や手術の治療効果には限界があるため、心疾患に対する、より効果的な治療法の確立が望まれており、近年再生医療が注目されている。しかし、心臓発生の転写制御機構は未だ不明な点が多く、現存する科学技術では未だに心臓を再生し、有効に修復する事ができていない。

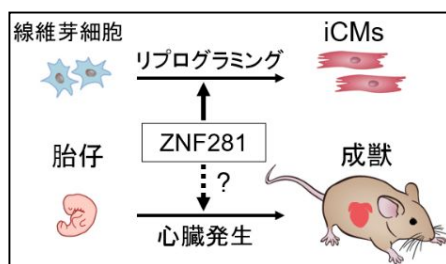
2010年に、心臓発生に重要な複数の転写因子を強制発現させることにより線維芽細胞を心筋様細胞(induced cardiomyocyte: iCM)に直接分化転換できることが報告された(Ieda et al. *Cell* 2010)。ダイレクトリプログラミングと呼ばれるこの方法は、幹細胞由来の心筋細胞を用いる場合に懸念される移植細胞の腫瘍化や生着率の低さ等の問題点を回避でき、心疾患の新たな治療法の候補として注目を集めている。

このような流れの中、申請者は iCM への転換効率の低さが治療法の確立において重要な問題点であると考え、転換効率を改善する方法の研究を行ってきた。その結果、現在までに iCM への転換効率を改善する因子として microRNA(miR)-1 および-133、Notch 阻害剤、そして転写因子 ZNF281/Zfp281 を報告してきた(Muraoka et al. *EMBO J* 2014, Abad et al. *Stem Cell Reports* 2017, Zhou et al. *Genes Dev* 2017)。これらのうち miR-1 および-133 と Notch 経路は心臓発生における重要性が報告されている。しかし、ZNF281 に関しては多能性幹細胞の多能性と分化能を調節する働きが報告されているのみで、心臓発生における役割は不明である。また、ZNF281 は体細胞に偏在的に発現しているが、その中でも特に心臓において発現量が高い。よって、申請者は今度は逆に分化転換の研究成果を参考にして、心臓発生を司る新たな転写制御機構を解明できるのではないかと考え、この ZNF281 に着目した。

2. 研究の目的

本研究の目的は ZNF281 と心筋分化転換の予想外な関連性に着目し、様々な遺伝子改変細胞やマウスを用いて、ZNF281 が心筋分化及び心臓発生に必須な因子であるかを検証することである(図)。そして、ZNF281 が寄与する心臓形成の転写制御機構を明らかにし、最終的には研究成果を心疾患の新たな分子機序解明や心臓再生技術の開発へと発展させることを目指す。

図 本研究の仮説モデル



3. 研究の方法

まず、CRISPR/Cas9 システムを用いて ZNF281 を欠損(KO)したマウス多能性幹(ES)細胞ラインを樹立した。この ZNF281KO_ES 細胞を心筋分化誘導し、免疫染色や遺伝子発現解析により心筋分化効率を評価した。次に、同様に CRISPR/Cas9 システムを用いて ZNF281 を欠損したマウスラインを樹立し、各発達段階での心臓の表現型を解析した。また、ZNF281KO マウスが胎生致死である可能性を想定し、並行して CRISPR/Cas9 システムを用いて ZNF281 flox マウスラインを樹立した。このマウスと組織特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを交配することによ

り、発生時期特異的な ZNF281 欠損マウスを作製し、各発達段階での心臓の表現型を解析した。

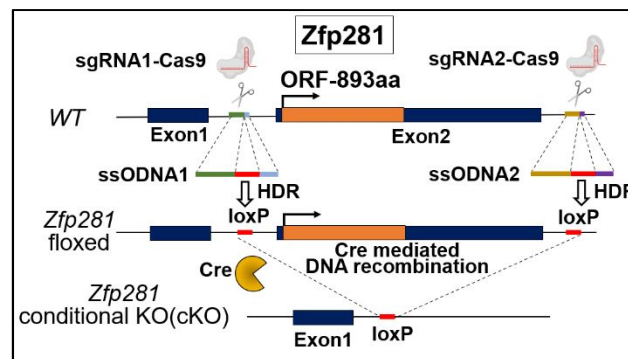
4. 研究成果

申請者はまず CRISPR/Cas9 システムを用いて ZNF281KO_ES 細胞ラインを樹立し、サイトカインを用いた標準的な心筋分化誘導を行った。その結果、野生型の ES 細胞では自律拍動する心筋細胞を誘導できたが、ZNF281KO_ES 細胞では自律拍動は全く見られなかった。また、定量的 PCR 法で遺伝子発現を解析したところ、ZNF281KO_ES 細胞では心筋細胞マーカーのみならず、心筋前駆細胞及び心臓中胚葉の遺伝子マーカーの発現も見られず、ZNF281 は多能性幹細胞から中胚葉に分化する段階で必須の遺伝子であることが示唆された。

次に、同様の手法で ZNF281KO マウスラインを作成したところ、ヘテロ欠損 (+/-) マウスは特に粗大な表現型もなく成獣まで発達が観られたが、ホモ欠損 (-/-) マウスは産仔が 1 匹も確認できず、胎生致死であった。しかし、器官形成期の胎仔シングルセル解析データベースを用いて申請者が再解析した結果、ZNF281 は胎仔においても普遍的に発現しており、ZNF281KO_ES 細胞の結果を考慮しても、ZNF281 欠損が心臓の発生開始より早い原腸形成期等に影響を及ぼしている可能性が否定できなかった。

よって、申請者は次に組織特異的な ZNF281 欠損マウスを作製するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて ZNF281 flox マウスを作製した(図)。

図 ZNF281 組織特異的欠損マウス作製フロー



そして心臓中胚葉特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Mesp1-Cre マウスと ZNF281flox マウスを交配することにより心臓中胚葉特異的 ZNF281cKO マウスを作製し、中胚葉分化後から心臓形成の段階で ZNF281 が必須の因子であるかを検討した。その結果、心臓中胚葉特異的 ZNF281cKO マウスでは胎生 9-11 日目頃より胎仔の発達異常を認め、胎生 14 日目頃には死亡した胎仔が確認された。胎生致死の原因を探るために胎仔の表現型を観察したところ、免疫染色等の組織学的な解析で心筋細胞のサルコメア形成等は確認できたが、興味深いことに胎児に様々な心奇形を認めた(図)。以上より、ZNF281 は中胚葉に運命が決定したのち、中胚葉から心臓が発生する段階に必須の遺伝子である事が示唆された。

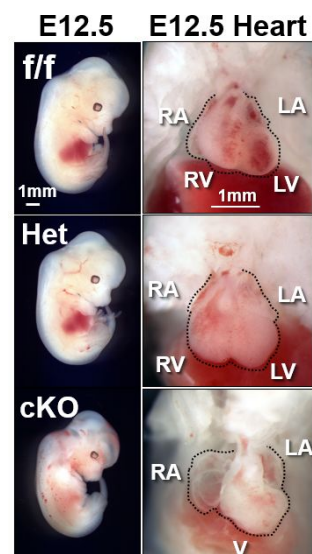


図 ZNF281 組織特異的欠損マウスで観察された心奇形

細胞の運命決定及び分化における転写因子の重要性は周知の事実である。今まで心臓発生における転写制御の研究においては、心臓で顕著に発現している転写因子(Mef2c, Gata4 等)に着目して解析する研究手法が主流であった。しかし、このような心臓マスター因子の遺伝子異常を原因とする先天性心疾患の表現形は多種多様である事から、心臓形成を司る転写制御機構の解明には全く新たなアプローチが必要であると申請者は考えていた。

本研究で着目した ZNF281 は個体において遍在的に発現する遺伝子であるため、申請者の先行研究成果がない限り、その発現パターンから心臓形成に必須な因子であることを予測するのは困難である。よって、*in vitro assay*である分化転換法で見出した ZNF281 が *in vivo*で心臓形成に寄与する事を示した本研究成果は、臓器発生の転写制御機構を研究するためのツールという分化転換法の新たな利用価値を提示する事となり、発生学における重要な知見である。今後はマルチオミクス解析法等を用いて ZNF281 欠損が心奇形を発症する分子機序を解析し、心臓発生に寄与する新たな転写ネットワークを解明していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hashimoto Hisayuki, Wang Zhaoning, Garry Glynnis A., Malladi Venkat S., Botten Giovanni A., Ye Wenduo, Zhou Huanyu, Osterwalder Marco, Dickel Diane E., Visel Axel, Liu Ning, Bassel-Duby Rhonda, Olson Eric N.	4. 巻 25
2. 論文標題 Cardiac Reprogramming Factors Synergistically Activate Genome-wide Cardiogenic Stage-Specific Enhancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 69 ~ 86.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2019.03.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamakawa Hiroyuki, Kusumoto Dai, Hashimoto Hisayuki, Yuasa Shinsuke	4. 巻 21
2. 論文標題 Stem Cell Aging in Skeletal Muscle Regeneration and Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1830 ~ 1830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21051830	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toyosaki Mitsunobu, Homma Koichiro, Suzuki Sayuri, Muraoka Naoto, Hashimoto Hisayuki, Goshima Naoki, Ieda Masaki, Sasaki Junichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Dermal fibroblast-like cells reprogrammed directly from adipocytes in mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78523-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kusumoto Dai, Seki Tomohisa, Sawada Hiromune, Kunitomi Akira, Katsuki Toshiomi, Kimura Mai, Ito Shogo, Komuro Jin, Hashimoto Hisayuki, Fukuda Keiichi, Yuasa Shinsuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Anti-senescent drug screening by deep learning-based morphology senescence scoring	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20213-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Garry Glynnis A., Bezprozvannaya Svetlana, Chen Kenian, Zhou Huanyu, Hashimoto Hisayuki, Morales Maria Gabriela, Liu Ning, Bassel-Duby Rhonda, Olson Eric N.	4. 巻 23
2. 論文標題 The histone reader PHF7 cooperates with the SWI/SNF complex at cardiac super enhancers to promote direct reprogramming	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 467 ~ 475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-021-00668-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 橋本 寿之
2. 発表標題 エピジェネティクス解析を用いた心筋リプログラミングの分子機構の解明
3. 学会等名 日本循環制御医学会学術集会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Hisayuki Hashimoto
2. 発表標題 Cell fate conversion by epigenome editing
3. 学会等名 Basic Cardiovascular Research Scientific Session
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hisayuki Hashimoto
2. 発表標題 Dissecting the molecular mechanism of cardiac reprogramming by epigenetic analysis
3. 学会等名 The Japanese Society of Regenerative Medicine Scientific Session (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hisayuki Hashimoto
2. 発表標題 Synergistic activation of the cardiac enhancer landscape during reprogramming
3. 学会等名 European Society of Cardiology Congress (国際学会)
4. 発表年 2019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

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		
米国	テキサス大学サウスウェスタン メディカルセンター		