

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17070

研究課題名（和文）心筋細胞分裂を促進するヒストン修飾の操作で心筋再生治療を目指す

研究課題名（英文）Manipulating histone modification to induce cardiac proliferation and heart regeneration

研究代表者

広藤 愛菜（Hirofujii, Aina）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：70847516

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）：哺乳動物の心筋細胞は十分な分裂能力を持っていないため、心臓の再生が起こらないと考えられている。本研究では、メチル化ヒストン修飾H3K9me3が、心筋細胞の分裂阻害に関わるかどうかを検討するために、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて成体マウスの心筋細胞からH3K9me3を消去する実験を行った。成熟心筋細胞でH3K9me3を取り除くと、一部の細胞周期遺伝子の発現が上昇し、H3K9me3が心筋細胞の分裂制御に関与することが示唆される。本研究では、心筋細胞分裂を制御するメカニズムの一部として、H3K9me3の関与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓は再生しない臓器であるため、心不全の治療は機能の維持を目的とした保存的治療のみである。心筋細胞の分裂は心筋を再生する可能性を秘めており、心筋細胞分裂がどのように制御されているかを解明していくことで、心不全の根本的治療法の開発に繋がる。

研究成果の概要（英文）：Mammalian hearts are unable to regenerate because their cardiomyocytes do not have sufficient capacity to divide. In this study, to investigate whether histone modification H3K9me3 is involved in the inhibition of cardiomyocyte division, we depleted H3K9me3 from adult mouse cardiomyocytes using an adeno-associated virus vector. Deletion of H3K9me3 in mature cardiomyocytes increased the expression of some cell cycle genes, suggesting that H3K9me3 is involved in the control of cardiomyocyte division. In this study, we revealed the involvement of H3K9me3 as part of the mechanism controlling cardiomyocyte division.

研究分野：心筋再生

キーワード：心筋再生 ヒストン修飾 H3K9me3

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患は、日本を含む多くの先進国で主要な死亡原因となっている。狭心症のように冠動脈狭窄で心筋虚血が生じている場合は、冠動脈再建術により心臓機能は回復する。しかし、心筋の壊死が生じる心筋梗塞では、血行再建を行っても失った心筋は再生しないため、心臓機能の回復は限定的なものとなる。現在のところ、残存した心筋の維持を目的とする保存的な治療法しか存在せず、心臓機能を向上させるためには、根本的な治療法の確立が必要である。

心臓は再生しない臓器と考えられてきたが、イモリやゼブラフィッシュは高い心臓の再生能力を持っている。最近では、哺乳動物も出生直後の限られた期間のみ、心臓の再生能力を維持していることが明らかとなった (Science 2011)。マウスの場合、出生後1日目の心臓は再生できるが、この能力は1週間以内に失われ、心筋細胞が分裂を停止し終末分化するタイミングと一致している。また、ゼブラフィッシュや新生児マウスで心臓が再生する時に活発な心筋細胞の分裂が起こるように、心臓の再生において心筋細胞分裂が必要であることは想像に難くない (Dev Cell. 2016)。心筋細胞分裂を誘導・制御することができれば、心筋の再生に応用できる可能性があり、心筋細胞が何故分裂しないのか？その背景にあるメカニズムを理解することが、心筋の再生治療を確立する糸口になると考えられる。

細胞の分裂には、細胞周期を制御する遺伝子の発現が必要である。出生直後の分裂能力を維持している心筋細胞 (NCM) では、すべての細胞周期遺伝子が発現しているのに対し、成熟心筋細胞 (ACM) ではその発現が顕著に低下している。特に細胞分裂に必須な細胞周期の後期に関与する遺伝子 (G2/M 遺伝子: Ccnb1, Cdk1, Plk1 等) はほとんど発現していない。この結果は、ACM では遺伝子発現のレベルで分裂が抑制されていることを示唆する。

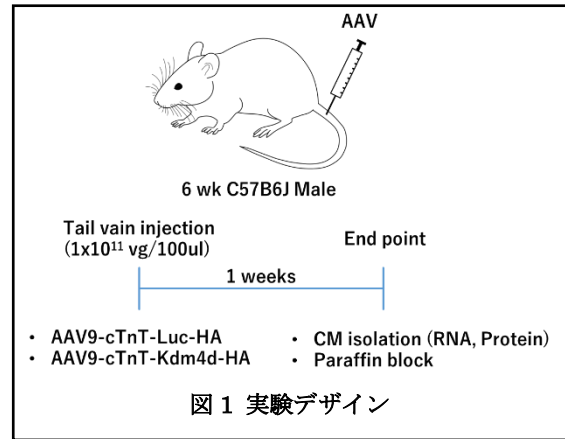
遺伝子の発現制御において、ヒストン修飾の重要性が明らかになってきている。抑制性のメチル化ヒストン修飾 H3K9me3 は、遺伝子を安定的に不活性化する機能を持ち、細胞の分化や細胞記憶の維持に重要な機能を果たす (Trends Genet. 2016)。我々は、心筋細胞の終末分化における H3K9me3 の役割について研究を行い、これまでに以下の知見を得てきた。H3K9me3 はヒストンメチル基転移酵素の Suv39h1 による形成される。初代培養心筋細胞で siRNA を使い Suv39h1 を阻害したところ、H3K9me3 は低下し G2/M 遺伝子 (Cdk1) の発現が上昇した。一方、H3K9me3 はヒストン脱メチル化酵素の KDM4D で除去できる。KDM4D を心筋細胞で発現するマウス (KDM4D マウス) を作成し、その影響を *in vivo* で検討した。KDM4D の発現により H3K9me3 を除去した心筋細胞では、通常は発現していない G2/M 遺伝子 (Ccnb1, Cdk1) の発現が顕著に上昇していた。この結果に一致して、KDM4D マウスの心臓では、心筋細胞の分裂が著しく増加していた。これらの結果より、H3K9me3 依存的なメカニズムが心筋細胞の分裂を抑制していることが示唆された。

2. 研究の目的

心臓の再生を妨げる原因となっているのは、著しく低い心筋細胞の分裂能力である。上記のように、培養心筋細胞や遺伝子組換えマウスにおいて、H3K9me3 を低下させることにより心筋細胞の分裂が促進されることから、H3K9me3 の成立や除去を操作すれば心筋再生を誘導できる可能性がある。しかし、これまでの実験では、未熟な培養心筋細胞や発生初期段階の心筋細胞で H3K9me3 を低下させていたため、一度細胞分裂を停止した成熟心筋細胞においても H3K9me3 が同様に細胞分裂の制御に関与しているかどうかは不明である。治療への応用を想定した場合、成熟した心筋細胞に分裂を誘導することが必要である。本研究では、心臓の再生治療法を確立することを目的として、成体マウスで H3K9me3 が心筋再生の治療ターゲットになり得るかどうかの検討を行った。

3. 研究の方法

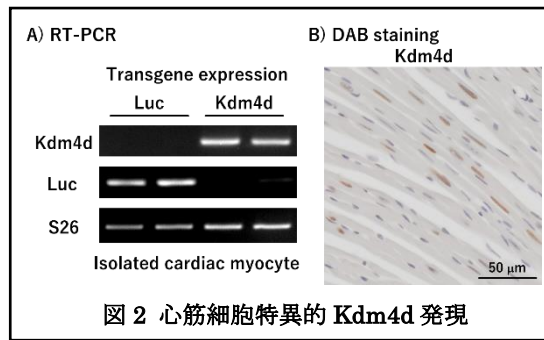
成体マウスの心筋細胞で H3K9me3 を消去するために、H3K9me3 の脱メチル化酵素である Kdm4d を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV-Kdm4d) を作成した。6 週齢の野生型 C57BL6 に、AAV-Kdm4d を尾静脈投与し (1×10^{11} vg/マウス) 心筋細胞に Kdm4d 発現を誘導した。1 週間後に心筋細胞を単離し、遺伝子発現、ヒストン修飾の変化を観察した。また、心臓を還流固定して病理切片を作成し、免疫染色により心筋細胞分裂の有無を観察した。



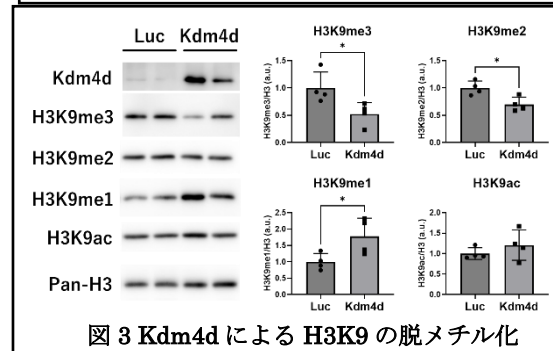
4. 研究成果

本研究では、成熟心筋細胞において H3K9me3 が細胞分裂制御に関与するかどうかを検討するために、H3K9me3 を消去する方法として AAV-Kdm4d の他、H3K9 に対するヒストンメチル基転移酵素 Suv39h1 の阻害剤 Chaetocin の利用を計画した。マウスでの実験を始める前に、ラット初代培養心筋細胞 (NRVM) を用いて、Chaetocin の効果を検討した。Suv39h1 に対する Chaetocin の IC50 は $0.8 \mu\text{M}$ である。NRVM を $0.8 \mu\text{M}$ の Chaetocin 存在下で 24 時間培養すると、著しく生存率が低下した。そのため、生存率に影響しない濃度まで Chaetocin を減らし H3K9 のメチル化状態をウェスタンブロット (WB) で確認したところ、H3K9me3 レベルに変化は認められなかった。その為、AAV-Kdm4d を利用したモデルに絞り本研究を行った。

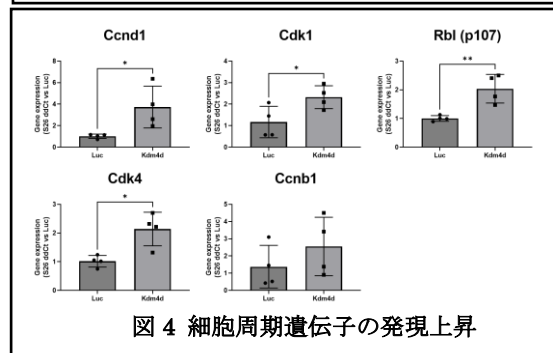
まず初めに、AAV-Kdm4d の投与により心筋細胞特異的に Kdm4d 発現を誘導されるかどうかを確認した。AAV-Kdm4d 投与後 1 週間で心筋細胞を単離し、RT-PCR により Kdm4d またはコントロールのルシフェラーゼ (Luc) の発現を確認した (図 2A)。また、免疫化学染色により、AAV-Kdm4d を投与したマウスの心臓において、心筋細胞の核特異的に Kdm4d が発現していることを確認した (図 2B)。



次に Kdm4d の発現により H3K9 の脱メチル化が誘導されるかどうかを WB で確認した (図 3)。Kdm4d を発現した心筋細胞では、H3K9me3 と H3K9me2 のレベルが有意に低下し、H3K9me1 レベルの上昇が確認された。Cell free の実験系では、Kdm4d は H3K9me1 も脱メチル化すると報告されていたが、本研究結果から考えると細胞内に置いて Kdm4d は H3K9me1 に対して高い脱メチル化活性を示さない可能性が考えられる。



H3K9me3 の脱メチル化が心筋細胞の分裂に影響を与えるかどうか検討した (図 4)。RT-qPCR により、H3K9me3 を脱メチル化した心筋細胞では、一部の細胞周期遺伝子 (Ccnb1, Cdk4, Cdk1) と p107 遺伝子の発現が上昇していた。しかしながら、心臓組織の免疫化学染色では心筋細胞の分裂を示唆する結果は得られなかった。



以上の結果から、成熟心筋細胞において H3K9me3 は、細胞分裂制御において部分的に関与していることが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻田悠希、小山恭平、広藤愛菜、潮田亮平、紙谷寛之
2. 発表標題 H3K9me3の脱メチル化によるトランスポゾンの活性化は心筋細胞の遺伝子発現に影響を与える
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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
研究協力者	小山 恭平 (Oyama Kyohei)		

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	ワシントン大学		