

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02889

研究課題名(和文) 心臓前駆細胞の発生を制御するエピジェネティック因子と転写因子のクロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between transcriptional factors and epigenetic factors in cardiac progenitor cell development.

研究代表者

白井 学 (Shirai, Manabu)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・オープンイノベーションセンター・室長

研究者番号：70294121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：発生中の鰓弓・側板中胚葉に存在する心臓前駆細胞の増殖、分化、遊走を制御する転写因子とエピジェネティック因子のクロストーク解明を行った。本研究では特に、DiGeorge症候群の原因遺伝子の一つであるTbx1とPhc1との関係についてより詳細な解析を行い、Tbx1発現変動が確認された細胞群とPhc1高発現細胞群が異なることを発見した。本研究の成果により、Phc1発現細胞群とTbx1を発現する心臓前駆細胞群の間に複雑なCell-cell communicationが存在することが仮説され、これを紐解くことが先天性心疾患発症の複雑なメカニズム解明の一助となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DiGeorge症候群を含む染色体22q11.2欠損症候群は、心臓流出路の先天性疾患を伴った胸部組織の形成異常、特徴的顔貌を呈する。これらの症状は、胎仔鰓弓・側板中胚葉における多能性間葉系細胞の増殖・分化・遊走障害により発生する。本研究において、エピジェネティック因子であるPhc1の高発現細胞群と転写因子Tbx1を発現する心臓前駆細胞間に複雑なCell-cell communicationが存在する可能性が示唆されたことにより、ヒト先天性心疾患発症及び重症化機構の解明に向けた心臓前駆細胞とその周辺細胞とのcommunication解明が新たな分子基盤構築の一助となることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Cardiac progenitor cells (CPCs) in the lateral plate mesoderm (LPM) and pharyngeal mesoderm (PM) proliferate, differentiate and migrate to contribute to the right ventricular and cardiac outflow tract formation. We hypothesize a specific crosstalk between the transcriptional network and epigenetic factors to regulate CPCs development. In transcriptional analysis at single-cell resolution, we defined large expression changes of Tbx1 in Phc1 negative cell clusters. From our results, Tbx1 express cells and Phc1 express cells may have the cell-cell communications to regulate CPCs development.

研究分野：心臓発生

キーワード：心臓前駆細胞 エピジェネティック因子 先天性心疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新生児の約 100 人に 1 人の頻度で生まれてくる先天性心疾患の多くは、心臓流出路の形成不全を伴う。DiGeorge 症候群に代表される染色体 22q11.2 欠失症候群 (22q11.2DS) は、心臓流出路の先天性心疾患を伴った胸部組織の形成異常を生じるが、これらの症状は主に転写因子 Tbx1 のハプロ不全による胎児鰓弓・側板中胚葉における間葉系細胞の増殖・分化・遊走障害により説明される。先天性心疾患はこれまで遺伝子変異が原因と考えられ、探索研究がなされてきたが、最近ではむしろ、母体を含む周囲環境からのエピジェネティックな影響が重要視されている。これまでの研究により申請者は、鰓弓・側板中胚葉から心臓流出路に遊走している心臓前駆細胞においてエピジェネティック因子である Phc1 の発現が低下し、逆に転写因子である Isl1 の発現が上昇する特異な細胞集団が存在することを確認した。Isl1 が転写因子として心臓流出路から右心室の形成に必須であることから、これら二つの遺伝子発現の入れ替わりが心臓前駆細胞の発生において、極めて重要な位置にあると考えられた。このように、転写因子とエピジェネティック因子の間でクロストークがなされることにより、心臓前駆細胞の発生が制御されることが示唆されたため、詳細な 1 細胞解析およびプロテオーム解析を行うことで、Phc1 と協働して心臓前駆細胞の分化を制御する因子及びその分子機構の解明、Isl1 による Phc1 発現制御機構の解明を試みた。これにより、心臓前駆細胞の発生制御における転写因子とエピジェネティック因子の複雑なクロストークを解きほぐし、最終的には新たなヒト先天性心疾患の原因及び重症化機構の解明に向けた基盤構築を目標とした。

2. 研究の目的

22q11.2DS において形成不全を生じる、鰓弓・側板中胚葉の細胞増殖・分化・遊走は、主な原因遺伝子である Tbx1 を始めとして、多くの転写因子による制御を受けるが、レチノイン酸投与等によるエピジェネティックな影響も強く受ける。Phc1KO マウスでも 22q11.2DS 同様の心臓流出路、胸部組織の形成不全を生じること、転写因子の Isl1 を発現する心臓前駆細胞で一時的に Phc1 の発現が減少する事から、鰓弓・側板中胚葉の発生には転写因子、エピジェネティック因子を含めた複雑な分子ネットワークが存在すると考えられた。本研究では、鰓弓・側板中胚葉に存在する心臓前駆細胞及びその周辺細胞の遺伝子発現を 1 細胞レベルで詳細に明らかにし、心臓前駆細胞の発生を制御する転写因子とエピジェネティック制御機構のクロストークの解明、DiGeorge 症候群を始めとする心臓および胸部組織のヒト先天性心疾患原因解明の分子基盤構築を目的とした。

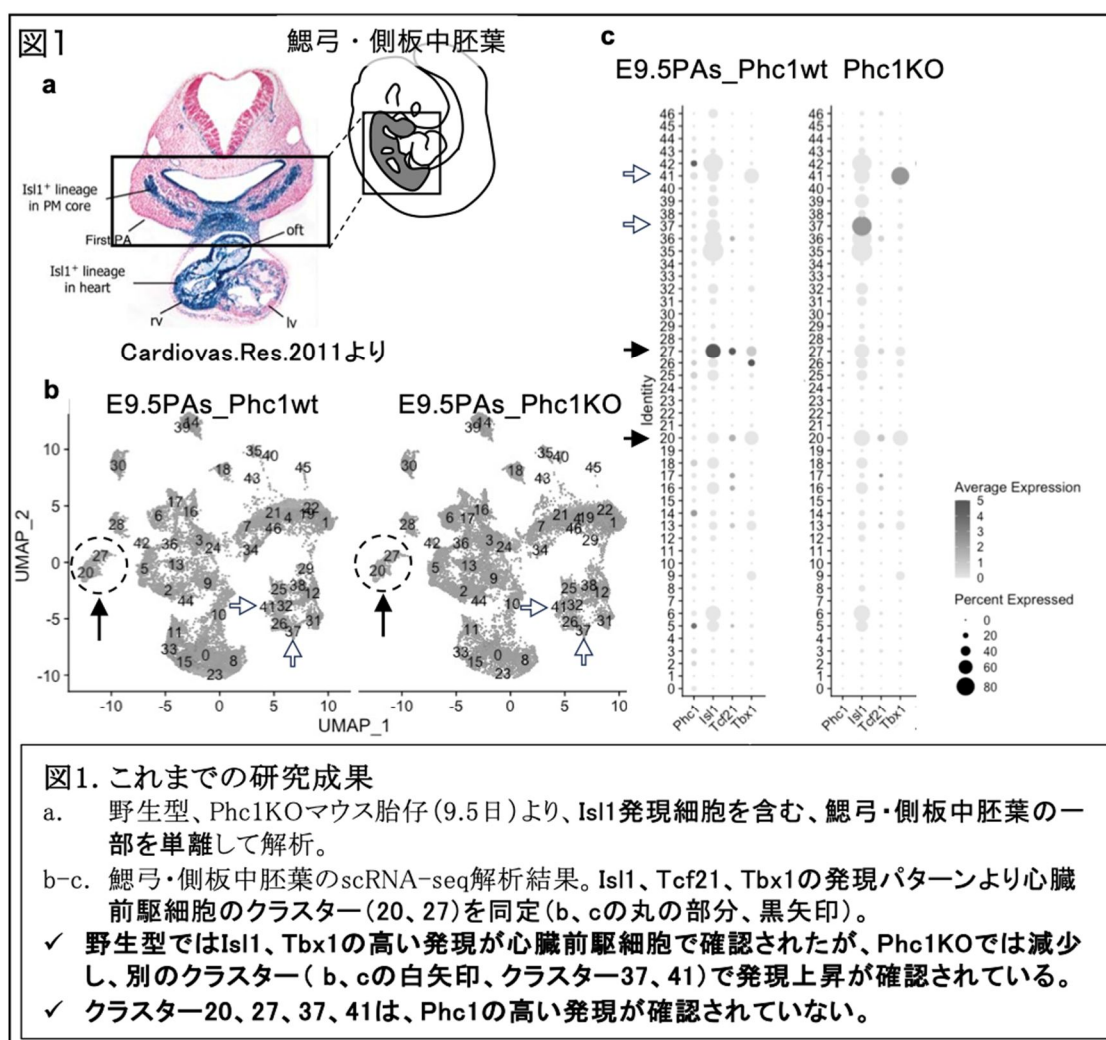
3. 研究の方法

- (1) マウス胎仔鰓弓・側板中胚葉の特定細胞群のみを用いた詳細な 1 細胞解析。胎生 8.5 日、9.5 日のマウス胎仔より鰓弓・側板中胚葉の一部 (図 1a) を摘出し、TrypLE EXPRESS (ThermoFisher) 中で 1 細胞化を行った。その後、シングルセル解析プラットフォーム、Chromium (10X) を用いて 1 細胞ごとに 3' mRNA-seq 解析ライブラリーを調整し、NextSeq 500 を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。得られたデータは品質を検証後、Seurat を用いてクラスタリング解析を行い、各細胞クラスターにおける詳細な遺伝子発現解析を行った。
- (2) Phc1KO マウス胎仔の鰓弓・側板中胚葉の特定細胞群を用いた、詳細な 1 細胞解析。胎生 9.5 日の Phc1KO マウス胎仔野生型及びホモ接合型の鰓弓・側板中胚葉の一部を摘出し、研究方法(1)同様の方法で 1 細胞化を行った。その後、Chromium を用いて 1 細胞ごとに Multiome-seq 解析ライブラリーを調整し、NextSeq 500 を用いて網羅的な遺伝子発現解析、エピジェネティック解析を行った。得られたデータは品質を検証後、Seurat を用いてクラスタリング解析を行い、各細胞クラスターにおける詳細な遺伝子発現解析を行った。
- (3) プロテオーム解析による Phc1 結合タンパク質の同定。
胎生 9.5 日の Phc1KO マウス胎仔野生型及びホモ接合型の鰓弓・側板中胚葉の核抽出物から抗 Phc1 抗体及び抗 Isl1 交替を用いて Phc1、Isl1 結合タンパク質を単離、プロテオーム法を用いて網羅的に解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 1 細胞解析による、マウス胎仔鰓弓・側板中胚葉に存在する心臓前駆細胞及びその周辺細胞の遺伝子発現プロファイリング
発生中の鰓弓・側板中胚葉の細胞のほとんどは多能性を維持し、発生の段階とともに大きく遺伝子発現を変化させる。胎生 8.5 日、9.5 日のマウス胎仔より摘出した鰓弓・側

板中胚葉を用いて 1 細胞解析を行った結果、転写因子である *Isl1* とエピジェネティック因子である *Phc1* が心臓前駆細胞の一部で排他的に発現していることが明らかになっていた。*Tbx1*KO マウスと *Phc1*KO マウスの両方が 22q11.2DS 様の表現型を呈することから、*Phc1* と *Tbx1* は特定の心臓前駆細胞で同時に発現すると仮説していたが、本研究において *Phc1*KO マウス胎仔鰓弓・側板中胚葉を用いて、より詳細な 1 細胞解析を行った結果、胎生 9.5 日の *Phc1* 発現細胞と *Tbx1* 発現細胞は、ほとんど一致しないことが確認された(図 1b, C)。野生型マウス胎仔において心臓前駆細胞と同定された細胞において、*Isl1* は発現低下していたが、異なった細胞クラスターにおいて発現上昇が確認された。*Phc1*KO マウス胎仔における *Tbx1* の発現は一樣に低下せず、細胞クラスターごとに発現変動の方向性が大きく異なっていたことから、発生中の心臓前駆細胞及びその周辺細胞における転写因子とエピジェネティック因子のクロストークは当初想定されていた以上に複雑で、心臓前駆細胞の発生には cell-cell communication が深く関与する可能性が示唆された。本解析により、1 細胞レベルで詳細な遺伝子発現変動は確認できたが、それらの細胞が胎仔鰓弓・側板中胚葉のどの位置に存在するか確認できず、今後、詳細な時間的、空間的遺伝子発現解析が必要とされる。



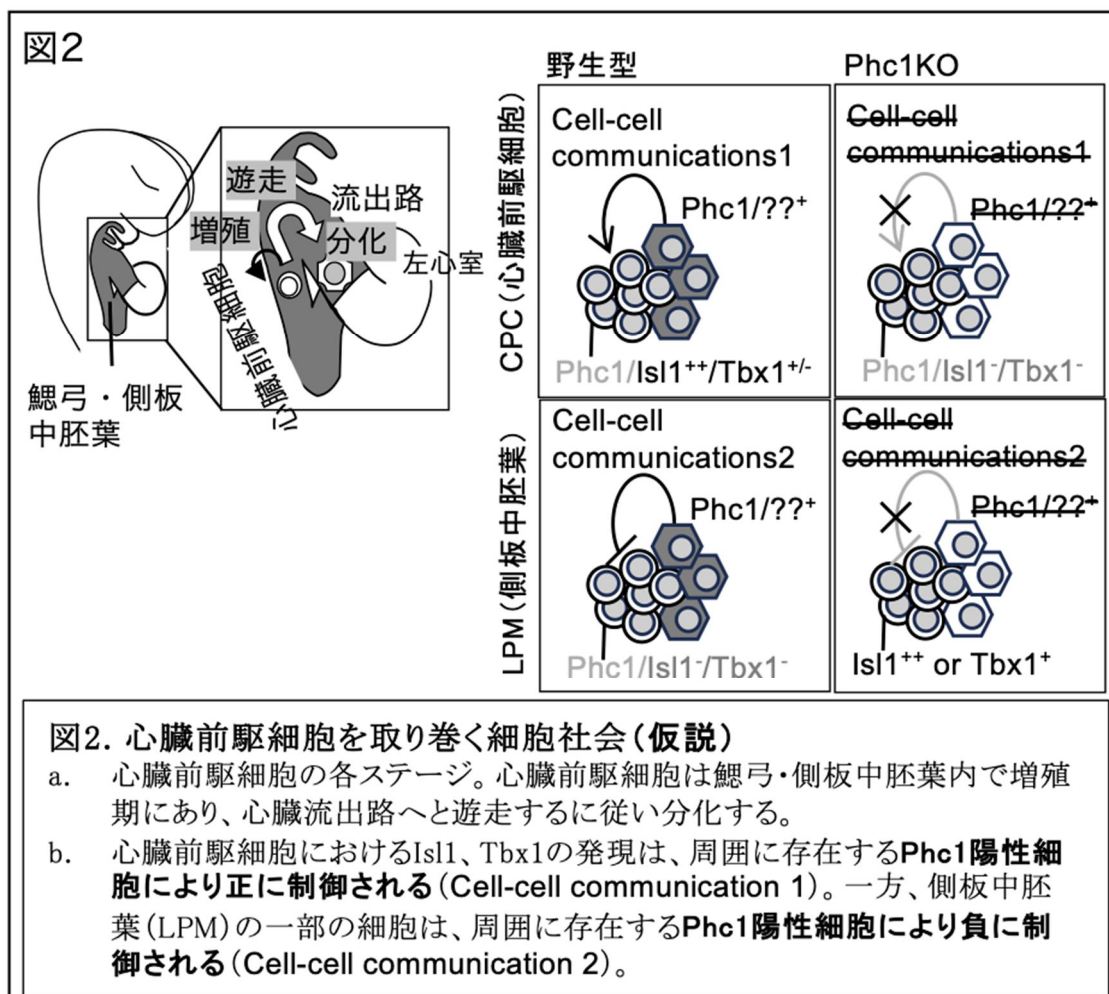
(2) *Phc1* 結合タンパク質の探索。

胎生 9.5 日のマウス胎仔野生型及びホモ接合型の鰓弓・側板中胚葉の核抽出物を用いて *Phc1* 結合タンパク質、*Isl1* 結合タンパク質の道程を試みた。詳細なプロテオーム解析を行った結果、*Phc1* と結合しているタンパク質候補を単離することに成功したが、現在のところ、*Phc1* と協働して心臓前駆細胞の発生を制御するタンパク質の同定には成功していない。

(3) 心臓前駆細胞の発生における転写因子とエピジェネティック因子のクロストーク

上記研究により、当初の仮説の一つであった、エピジェネティック因子 *Phc1* と転写因子 *Tbx1* 間にクロストークは確認されず、胎生 9.5 日の鰓弓・側板中胚葉ではむしろ排他的な発現が確認された。しかし、*Phc1*KO マウス胎仔において、*Tbx1*、*Isl1* など転写因子の発現変動が確認されたことから、*Phc1* 発現細胞と *Tbx1*、*Isl1* 発現細胞間に何らかの cell-cell communication が存在することが示唆された(図 2)。通常の 1 細胞解析では同定された細胞クラスターの位置が詳細な解析が困難なことから、時間的、空間的な

遺伝子発現解析を行う必要がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katsuyama Taiki, Kadoya Minori, Shirai Manabu, Sasai Noriaki	4. 巻 251
2. 論文標題 Sox14 is essential for initiation of neuronal differentiation in the chick spinal cord	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 350 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.392	査読の有無 無
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 Ong Agnes Lee Chen, Kokaji Toshiya, Kishi Arisa, Takihara Yoshihiro, Shinozuka Takuma, Shimamoto Ren, Isotani Ayako, Shirai Manabu, Sasai Noriaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Acquisition of neural fate by combination of BMP blockade and chromatin modification	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 107887 ~ 107887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.107887	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Noriaki Sasai, Manabu Shirai, Takuma Shinozuka
2. 発表標題 Species-specific developmental rate determining the size of the vertebrate neural tube
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田恭弘、王韻策、岩瀬晃康、白井学、荒井勇二、植山萌恵、渡邊裕介、栗原裕基、中川修、川村晃久
2. 発表標題 発生期の心臓内領域特異的な遺伝子発現を制御するエンハンサーの探索
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Agnes Lee Chen Ong、小鍛冶俊也、篠塚琢磨、白井学、笹井紀明
2. 発表標題 BMPシグナル抑制とクロマチン修飾の協働による神経分化制御
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会
4. 発表年 2023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
研究分担者	奥崎 大介 (Okuzaki Daisuke) (00346131)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授 (常勤) (14401)	
研究分担者	劉 祐誠 (Liu Yu-Chen) (50894698)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員 (14401)	
研究分担者	若林 真樹 (Wakabayashi Masaki) (70552024)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・オープンイノベーションセンター・室長 (84404)	
研究分担者	笹井 紀明 (Sasai Noriaki) (80391960)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授 (14603)	

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
---------	---------