

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06803

研究課題名（和文）PDZRN3による核内のパラスペックルを介した新たな心筋分化制御機構の解明

研究課題名（英文）The role of PDZRN3 in the regulation of cardiomyocyte differentiation

研究代表者

本田 健（Honda, Takeshi）

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：30457311

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）：本研究では、ヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）やマウス心筋細胞を用いて、心筋細胞の分化におけるPDZRN3の役割を解析した。PDZRN3は多能性幹細胞から心筋細胞へと分化する過程で誘導され、その分化・成熟化において重要な役割を持つことを明らかとした。さらに、PDZRN3のPDZドメインを介して相互作用するタンパク質を発見した。このタンパク質は核内にも局在し、PDZRN3と同様に心筋細胞分化の過程で発現が誘導される。これらの結果から、PDZRN3が心筋細胞の分化過程において核内で新たな機能を持つ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

本邦における心疾患は超高齢社会を背景に増加の一途を辿っている。生体内における本来の生理機能を有する心筋細胞の作製が可能となれば、培養心筋自体を用いた細胞医療をはじめ、心筋を標的とする創薬や、様々な薬物開発における心臓への副作用予測解析などにおいて非常に有用である。そのため、心筋細胞分化における制御機構を分子レベルで詳細に理解することは学術的に重要であり、その基盤情報は先端医療の開発に必須であるため結果的に社会に向けた大きな貢献をもたらす。本研究ではこれまで機能解析をおこなってきたPDZRN3を軸として、心筋分化の新たな制御機構を明らかにする。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the role of PDZRN3 in cardiomyocyte differentiation using human induced pluripotent stem (iPS) cells and mouse cardiomyocytes. We observed that PDZRN3 is induced during the differentiation process from iPS cells to cardiomyocytes, playing a crucial role in their differentiation and maturation. We additionally discovered a protein that interacts with PDZRN3 through its PDZ domain. This protein is also localized in the nucleus, and its expression is induced in a manner similar to PDZRN3 during cardiomyocyte differentiation. These results suggest that PDZRN3 may possess a novel function within the nucleus during the process of cardiomyocyte differentiation.

研究分野：薬理学

キーワード：細胞分化 心筋細胞 PDZRN3

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞などの幹細胞から完全な成熟心筋細胞への分化が実用化されれば、再生医療や心疾患創薬研究に大きく貢献しうる。しかしながら、iPS心筋細胞では胎児期心筋相当の未熟さととどまっており、その利用価値は限定的である。そのため分化の効率化や正確な成熟度判定が必要とされており、そのためには分化制御における詳細な分子機構の理解が重要である。我々は、心筋より新規にクローニングしてきたPDZRN3タンパク質が[J. Cell Sci., 119, p5106, 2006]、特に心筋や骨格筋の分化時に強く誘導されることに着目して研究を展開してきた。これまでPDZRN3が間葉系前駆細胞では骨や脂肪への分化を抑え、骨格筋分化を促進する分化制御因子であることを明らかにしてきた[J. Cell. Physiol., 234, p2963, 2019, Am. J. Physiol. Cell Physiol., 304, p1091, 2013, Mol. Biol. Cell, 21, p3269, 2010]。マウス心臓においては、PDZRN3の発現量は胎児期から増加し、成獣において高い発現レベルを維持することを見出しており、PDZRN3は心筋細胞の発達や機能に何らかの役割を持つことが推測された。一方、それらの解析過程において、細胞分画した核画分にPDZRN3が検出されることや、PDZRN3が核内で顆粒状の免疫染色像を示すこと、PDZRN3が不溶性画分へ移行しうることなどの基礎データを得ており、またPDZRN3の構造予測からは核移行シグナルを持つ可能性が示され、これらの結果からPDZRN3が核内で何らかの機能を持つ可能性を推測するに至った。また顆粒状染色や不溶性画分への移行は、RNAやその結合タンパク質などが高度に会合して相分離(liquid-liquid phase separation: LLPS)する現象を想起させた。核内におけるLLPSでは長鎖非コードRNAとその結合タンパク質群の会合体であるパラスペックルが代表的なものの一つである。興味深いことに、ヒト多能性幹細胞において、パラスペックル形成の阻害は多能性を維持させることや[Mol Cell, 74, p951, 2019]、多能性幹細胞の分化初期に形成されるパラスペックルが転写調節を介して分化を促す、という報告がなされている[BMC Biol, 18, p42, 2020]。これらの背景から着想を得て、本研究では「LLPSとの関与も含めて、PDZRN3は心筋分化をどのように制御するのか?」について明らかにすることを目標とした。それにより、心筋分化の新たな制御機構を拓き、心筋再生医療や心疾患創薬研究の開発に資する情報を提供する。

2. 研究の目的

本研究では、心筋発達におけるPDZRN3の役割を解明し、心筋細胞の分化制御における詳細な分子基盤の確立に資する情報を提供し、機能的な心筋細胞の効率的な作製技術の開発に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒトiPS細胞を用いた心筋細胞分化モデルにおいて、幹細胞マーカー、心筋細胞分化マーカーと共にPDZRN3の発現挙動をリアルタイムPCRにより解析した。また、心筋細胞におけるPDZRN3およびパラスペックル構成因子の免疫染色を行い、それらの局在を解析した。

マウス胎児から幼若心筋細胞を単離、培養し、RNA干渉法によりPDZRN3をノックダウンし、その心筋細胞成熟化を評価した。PDZRN3欠損マウスを用い、その死亡率や心臓のサイズ等を野生型マウスと比較した。また、その新生児マウスの心臓について、網羅的遺伝子解析を行い、野生型マウスの心臓との発現量の比較から、PDZRN3欠損と関連する遺伝子群を抽出した。

心筋細胞ライセートから免疫沈降法にてPDZRN3を抽出し、共沈してきたタンパク質群を質量分析法で網羅的に解析した。免疫沈降で用いた抗PDZRN3抗体には、PDZRN3のN末端領域、中間領域、C末端領域をそれぞれ認識する複数の抗体を揃え、網羅的解析で問題となることの多い偽陽性検出を可能な限り排除した系を構築した。また、細胞溶解時の高次構造崩壊など相互作用が不安定な場合も想定し、架橋試薬によって化学架橋反応を組み合わせた免疫沈降も同時に実施した。免疫沈降後の共沈タンパク質群について、網羅的質量分析にて検出し、上述の抗PDZRN3抗体や候補タンパク質に対する抗体を用いて、免疫沈降およびイムノブロットにて相互作用を確認した。PDZRN3およびPDZRN3相互作用相手候補タンパク質について、それらのドメイン/モチーフ欠損体のコンストラクトを作製して強制発現系を構築し、これらを発現させた細胞を用いて、PDZRN3および相互作用相手の免疫沈降を実施し、相互作用部位の解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 心筋細胞分化におけるPDZRN3の挙動

心筋細胞の分化過程におけるPDZRN3の発現がどのように変動するのかを確認するため、ヒトiPS細胞を用いた心筋細胞分化モデルを用いて発現量解析を実施した。図1は分化誘導後の各種mRNA発現レベルの経時変化を示す。図1上には代表例を示すが、幹細胞マーカー(NANOG, OCT4)が減少する一方、心筋前駆細胞マーカー(ISL1, MEF2C, NKX2-5, TBX5)や心筋細胞マーカー(TNNT2, PLN)が有意に増加し、分化が進んでいることを確認した。この分化過程において、PDZRN3も明確に誘導されることが分かった(図1下)。PDZRN3の発現を上流で制御する因子に関する情報は乏しいが、神経細胞においてはPRDM16がリプレッサーとしてPDZRN3の発現制御に関わる

ことが明らかになっている [Neuron, 98, p1, 2018]。しかしながら、心筋分化においては、PDZRN3 の発現増加とともに PRDM16 も誘導されており、PDZRN3 のリプレッサーとしての機能は一見矛盾するような結果となり、心筋では神経と異なる発現制御機構が存在する可能性が示された (図 1 下)。この分化過程において、パラスペックル構成因子の一つである SFPQ に対する抗体を用いて免疫染色を実施し、核内 LLPS 様の染色像が得られた。また PDZRN3 との共染色も示され、PDZRN3 の核内機能、また核内 LLPS に関与する可能性が示された。

(2) 心筋細胞における PDZRN3 の役割

心筋細胞分化における PDZRN3 の役割を解析するため、RNA 干渉法による PDZRN3 の発現抑制の影響を調べた。ヒト iPS 細胞を用いた心筋分化時のノックダウンを検討したが、siRNA の導入試薬やウイルスベクターが心筋分化に影響を与えたため、代替として胎児期マウスから単離した幼若心筋細胞を用いる手法へ切り替えた。RNA 干渉法で PDZRN3 をノックダウンして、自律拍動が観測される細胞集団の数を成熟化の指標として評価した。PDZRN3 の発現抑制は siRNA で実施し、免疫プロットで発現レベルの低下を確認した系において、数日培養し、自律拍動を示す細胞を計測したところ、PDZRN3 発現抑制によって成熟化が阻害されることが分かった (図 2)。また、幼若心筋細胞において先述と同様にパラスペックル構成因子の染色を試みたが、本細胞では良好な染色像を得られず、PDZRN3 の発現抑制がパラスペックル形成にどのような影響を与えるのか、現在アプローチを変えて検討中である。

マウス心臓における PDZRN3 の発現量は胎児期から増加するため、PDZRN3 ノックアウトマウスを用いて、その心臓の発育を解析したところ、PDZRN3 欠損マウスでは心臓が矮小化することが分かった。さらに、PDZRN3 欠損マウスの新生仔心筋における網羅的遺伝子発現解析を実施したところ、BMP10 など心筋成長の必須因子群が著減することが分かり、心臓の発達において PDZRN3 が重要な役割を持つ可能性を見出した。マウス心筋は生後 1 週間で好気呼吸代謝に移行し、DNA 損傷が増加して分裂能を失うが [Science, 331, p1078, 2011]、興味深いことに、その期間の死亡率が PDZRN3 欠損マウスでは野生型に比べて有意に上昇することが分かった。以前、我々は筋芽細胞において、PDZRN3 は過剰な DNA 損傷を抑えてゲノム安定性に寄与することを発見している [Sci. Rep., 10, p1140, 2020]。これらを鑑み、心筋細胞における DNA 損傷が増加する生後一週間において、PDZRN3 の欠損が心筋細胞の過剰な DNA 損傷を促し、細胞死ひいては死亡率を増加させたのではないかと仮説を立て、別途検討を進めている。

(3) PDZRN3 の作用機序の解析

心筋細胞において PDZRN3 がどのように機能するのかを明らかにするため、PDZRN3 の相互作用相手の同定を試みた。抗 PDZRN3 抗体を用いて筋細胞ライセートから PDZRN3 の共沈タンパク質群を抽出し、網羅的質量分析にて解析したところ、SFPQ, PSC1, NONO などのパラスペックル構成因子をはじめ、複数の核タンパク質や RNA 結合タンパク質が、陰性対照抗体における共沈検体と比べて有意に高く検出された。当初、SFPQ, PSC1, NONO との相互作用を期待し、それらの抗体を用いて免疫沈降を実施したが、明確な PDZRN3 との共沈は確認されなかった。抗体エピトープの部位が相互作用に影響する場合もあるが、間接的な制御因子や LLPS 形成に関わる未知因子との相互作用もありうることを考慮して、パラスペックル構成因子以外のタンパク質にも視野を広げた解析に切り替えた。PDZRN3 はタンパク質相互作用に関わるドメインやモチーフを複数持つため、相互作用相手タンパク質には、それらに対応するような構造要因を持つ可能性が高い。そのような構造情報も加味して、結合可能性の高さをスコア化し、それらの候補タンパク質について、相当する抗体が入手可能な標的から順次、免疫沈降法によって相互作用を確認し、最終的にタンパク質 X を同定するに至った (論文投稿を控えるため、ここでは X と表記)。

PDZRN3 の N 末端領域、中間領域、C 末端領域を認識する複数の抗体いずれによっても、タンパク質 X の共沈が観察された。また、抗タンパク質 X 抗体を用いた免疫沈降によっても PDZRN3 が共沈することを確認することができた (図 3)。タンパク質 X は、Wnt シグナル経路の調節因子と

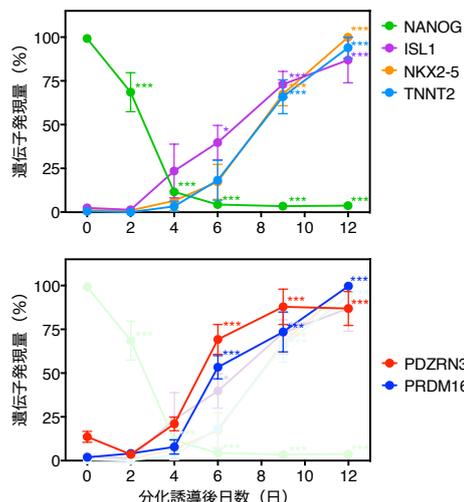


図1. ヒトiPS細胞心筋分化におけるPDZRN3 mRNAの発現変動

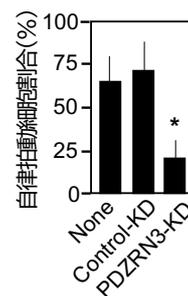


図2. PDZRN3発現抑制による心筋成熟化の阻害

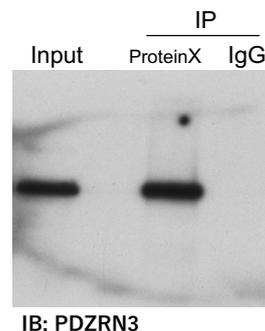


図3. PDZRN3とタンパク質Xの相互作用

して働くことや、細胞質あるいは核内で機能することが知られている。パラスペックル形成にどのような影響を持つのか現時点で報告はないが、LLPS を形成するタンパク質にしばしば観察される構造である disordered region を有している。PDZRN3 およびタンパク質 X について、いくつかのドメイン欠損体における強制発現系を構築し、免疫沈降によって構造活性相関解析を行った。その結果、両者の相互作用は PDZ ドメインを介した様式であることを確認した。ヒト iPS 細胞による心筋細胞分化過程におけるタンパク質 X の発現挙動をリアルタイム PCR で解析したところ、PDZRN3 が発現していない未分化な状態では、タンパク質 X の mRNA は検出されず、分化に伴い PDZRN3 の誘導と同様のタイミングで増加してくることが分かった (図 4)。また、RNA 干渉法により PDZRN3 の発現を抑制するとタンパク質 X の mRNA 発現量には影響がなかったが、タンパク質レベルでの発現量は増加したことから (図 5)、PDZRN3 はタンパク質 X のタンパク質発現量を制御する可能性が見出された。PDZRN3 は E3 ユビキチンリガーゼに属するが、タンパク質 X のタンパク質発現量の変動が PDZRN3 のユビキチンリガーゼ活性によるものかは現在検討中である。これらの結果から、PDZRN3 がタンパク質 X に対して何らかの作用をしていることが推定された。

最終年度に研究代表者の異動があったために想定より進捗が遅延したが、今後、PDZRN3 とタンパク質 X の関係性、またそれらの相互作用が心筋分化にどのような意義を持つのか、またその仕組みが LLPS とどのような関係を持つのか、詳細に検討していく予定である。

<引用文献>

本文中に記載した。

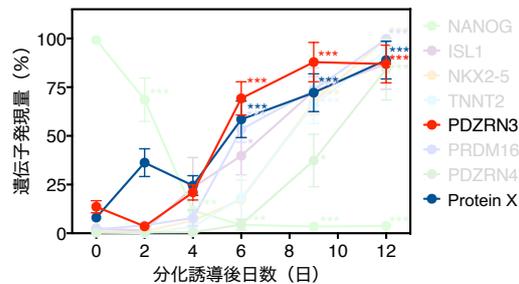


図4. ヒトiPS細胞心筋分化におけるタンパク質X mRNAの発現変動

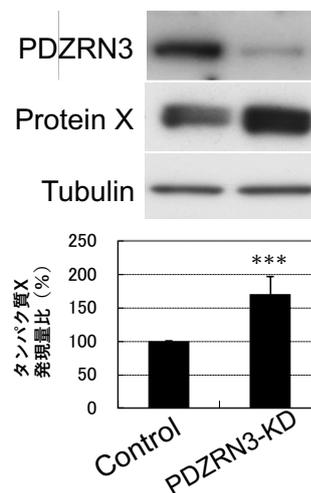


図5. PDZRN3発現抑制によるタンパク質X発現レベルの増加

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nawata T, Sakai H, Honda T, Otsuka M, Fujita H, Uchinoumi H, Kobayashi S, Yamamoto T, Asagiri M, Yano M.	4. 巻 624
2. 論文標題 Dantrolene, a stabilizer of the ryanodine receptor, prevents collagen-induced arthritis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 141-145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.07.111.	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 Kamimura A, Umemoto H, Kawamoto T, Honda T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Development of Water Solubility of 2-Phenylsulfanyhydroquinone Dimer Dye.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 9254-9262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.1c00703.	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 Honda T, Nishio Y, Sakai H, Asagiri M, Yoshimura K, Inui M, Kuramasu A.	4. 巻 83
2. 論文標題 Calcium/calmodulin-dependent regulation of Rac GTPases and Akt in histamine-induced chemotaxis of mast cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CELLULAR SIGNALLING	6. 最初と最後の頁 109973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellsig.2021.109973.	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 Kawai-Takaishi M, Miyagawa Y, Honda T, Inui M, Hosoyama T	4. 巻 696
2. 論文標題 Postnatal Pdzn3 deficiency causes acute muscle atrophy without alterations in endplate morphology	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 149542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2024.149542	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hina Takegami, Hiyori Nakamura, Ayano Takeda, Mayu Matsuo, Hiroki Sakai, Takeshi Honda, Masataka Asagiri
2. 発表標題 Synthetic retinoid bexarotene inhibits differentiation of inflammatory osteoclasts.
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Seiya Tanaka, Asuka Okamoto, Honoka Tsubaki, Tetsuya Seto, Hiroki Sakai, Takeshi Honda, Masataka Asagiri
2. 発表標題 Inhibitory effect of spermidine on differentiation of inflammatory osteoclasts
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chika Ishida, Miren Suzuki, Tetsuya Seto, Marina Otsuka, Hiroki Sakai, Masatoshi Takeiri, Yukino Tsunekage, Keiko Arai, Takeshi Honda, Yoshihide Kimura, Masataka Asagiri
2. 発表標題 Suppression of M1 macrophage activation and osteoclast differentiation by Apocynaceae plant extract
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉増敦朗、本田健、酒井大樹、朝霧成拳、乾誠、吉村清
2. 発表標題 マスト細胞のヒスタミンに対する走化性におけるトランスグルタミナーゼの関与
3. 学会等名 第23回日本ヒスタミン学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本田健
2. 発表標題 骨格筋の新たな分化制御機構 -高齢化社会における運動器障害の克服を目指して-
3. 学会等名 第127回山口大学医学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 自己免疫疾患の抑制用医薬組成物、自己抗体の産生抑制剤、及び異常免疫の調節剤	発明者 名和田隆司,他8名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2023-178240	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 2型リアノジン受容体を標的とする抗原性抗体の産生調節薬の評価方法	発明者 名和田隆司,他8名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-209822	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

山口大学大学院医学系研究科薬理学講座ホームページ https://ds0n.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~yakuri/ 山口大学大学院医学系研究科 薬理学講座 https://ds0n.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~yakuri/

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	朝霧 成孝 (Asagiri Masataka) (20372435)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	酒井 大樹 (Sakai Hiroki) (40464367)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (15501)	

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