

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08854

研究課題名（和文）心筋再生治療を目的としたガン原遺伝子Mycに対する分裂抵抗性メカニズムの解明

研究課題名（英文）Understanding the mechanism why cardiac myocytes resist Myc-induced proliferation

研究代表者

小山 恭平（Kyohei, Oyama）

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：00818479

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）：Trim28はヒストンH3K9のメチル化を介して、発生や代謝の制御、遺伝子発現など様々な現象に関与するクロマチン制御因子である。以前我々は、H3K9me3が心筋細胞の分裂抑制に関わることを発見したため、本研究ではTrim28が心筋細胞の分裂制御に関わるかどうか、心筋細胞特異的なKOマウスを作成し検討を行った。仮説とは異なり、Trim28はH3K9のメチル化状態と心筋細胞の分裂にほとんど影響を与えなかった。そこで、Trim28のKOが心筋細胞の遺伝子発現や表現型に与える影響を詳細に解析し、Trim28は脂肪酸代謝遺伝子の発現を促進的に制御している知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋細胞は高度の分化した細胞で、分裂や代謝の制御が特殊化している。正常な心臓は脂肪酸を主要なエネルギー源と利用しているが、病態下では脂肪酸代謝の異常が生じ心不全の進行に関与することが知られている。本研究では、これまで知られていなかった脂肪酸代謝の遺伝子発現を制御するメカニズムの一端を明らかにした。また、遺伝子発現において抑制的な機能を持つと考えられていたクロマチン制御因子が、促進的な作用を示す新たな知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Trim28 is a chromatin regulatory factor involved in various processes, including development, metabolism, and gene expression, through deposition of histone H3K9 methylation. Previously, we have discovered that H3K9me3 is associated with the inhibition of cardiac myocyte proliferation. This study investigated if Trim28 was involved in the regulation of cardiac myocyte proliferation using cardiac specific Trim28 knockout mice. Contrary to the hypothesis, Trim28 had minimal impact on cardiac myocyte proliferation and H3K9 methylation status. However, detailed analysis revealed that Trim28 plays a promotive role in the expression of fatty acid metabolism genes in cardiac myocytes.

研究分野：心筋細胞のエピジェネティック制御

キーワード：Trim28 エピジェネティクス 転写調節 脂質代謝 H3K9メチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) イモリや出生直後のマウスは、心筋細胞を分裂させ心臓を再生することができる。しかし、ヒトを含む哺乳動物の成体では、心筋細胞はほとんど分裂せず再生能力をもたない。よって、心筋壊死を伴う心筋梗塞や進行した心不全患者では、心機能を回復させるための根本的な介入ができず、保存治療に限定される。一方で、心筋細胞の分裂抵抗性は、心臓がガン化しない臓器たる理由ともなる。実際、心筋細胞はガン原遺伝子が活性化しても分裂しない。これらの事実から、分裂のアクセルに対し心臓は特別な「ブレーキ機構」を持っていると考えられる。心臓再生を可能にするための重要なヒントが、このメカニズムに隠されているはずである。

(2) 心筋細胞は、分裂に必要な細胞周期遺伝子(Ccnb1、Plk1 など)を発現していない。そこで我々は、様々な細胞種に分裂を誘導するガン原遺伝子の Myc を使い、心筋細胞に分裂を誘導できるかどうか、遺伝子改変マウス(cMycER マウス)を作成して検討した。しかし、Myc の活性化は心筋細胞に細胞周期遺伝子の発現や分裂を誘導しなかった。このことは、心筋細胞において Myc に抵抗する分裂阻害機構が存在することを示唆する。

(3) メチル化ヒストン修飾 H3K9me3 は、遺伝子発現の抑制に関わる。そこで、H3K9me3 を消去できる遺伝子改変マウス(cKDM4D マウス)を作成し、細胞周期遺伝子の発現抑制に H3K9me3 が関与しているかどうか検討した。cKDM4D マウスの心筋細胞で Myc を活性化させると、細胞周期遺伝子の発現上昇と著しい細胞分裂が誘導され、心筋細胞の分裂に対する抵抗性は、H3K9me3 を介したメカニズムであることが示唆された。

(4) 通常、発現しない遺伝子のプロモーターは H3K9me3 を利用して凝集したクロマチン構造をとり(ヘテロクロマチン)、転写因子の結合を妨げる。しかし、オープンクロマチンを検出する DNaseI-seq 解析を行うと、予想に反して心筋細胞の細胞周期遺伝子プロモーターは転写因子が結合可能なオープンクロマチンの状態であることが分かった。これは、心筋細胞において Myc が細胞周期遺伝子のプロモーターに結合できることを報告する、Bywater らの知見と一致する(Nat Commun. 2020)。

(5) 遺伝子が発現するためには、転写因子に呼び寄せられた(リクルートされた) RNA 合成酵素 (PolII) が効果的な転写伸長反応へ進むことが必要であり、これは促進因子と阻害因子により制御されている。心筋細胞において、Myc は細胞周期遺伝子のプロモーターに結合しながらも遺伝子発現を誘導できないことから、PolII の伸長反応が阻害され、この過程に H3K9me3 が関与すると考えられる。Trim28 は H3K9me3 と共役して PolII の伸長反応を阻害することが証明されているため (Bunch et al. BMC Mol Biol. 2015)、Trim28 は細胞周期遺伝子の転写伸長反応を阻害することで、心筋細胞の分裂を阻害している可能性がある。

2. 研究の目的

上記の仮説を基に、Trim28 が心筋細胞の分裂制御に関与するかどうか、またそのメカニズムは何かを明らかにすることを目的として本研究を行った。

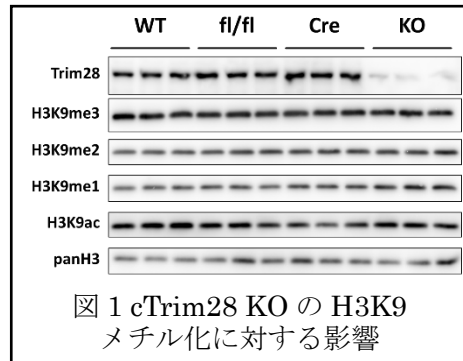
3. 研究の方法

Trim28 の心筋細胞特異的な役割を解析するために、 α MHC-Cre と Trim28 flox マウスを用いて、心筋細胞特異的に Trim28 の機能を欠損させたマウス (cTrim28 KO マウス) を作成した。cTrim28 KO マウスから心臓または単離心筋細胞を採取して、種々の実験に用いた。遺伝子発現は RT-qPCR または RNA-seq で、たんぱく質発現はウエスタンブロットで測定した。細胞周期の活性化は、チミジンアナログの BrdU 取り込みを指標に免疫染色で測定した。ヒストン修飾や Trim28 のゲノム上の結合部位など、エピゲノムの特徴は CUT&TAG 解析で行った。

4. 研究成果

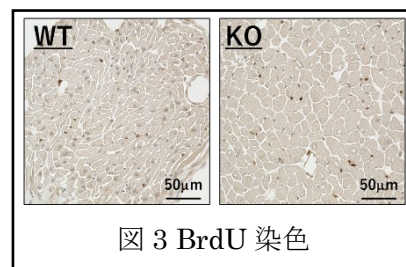
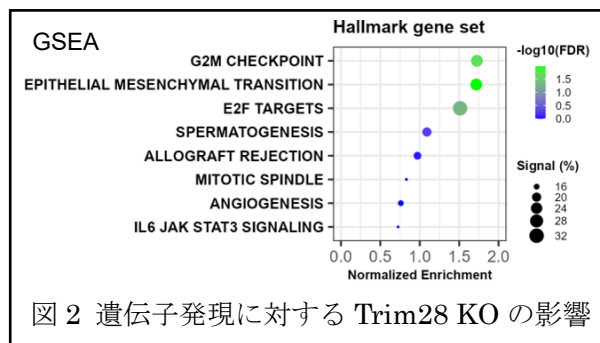
(1) cTrim28 KO マウスの作成

cTrim28 KO (α MHC-Cre; Trim28^{f1/f1}) の心筋細胞では、コントロールの野生型 (WT)、 α MHC-Cre (Cre)、Trim28^{f1/f1} (f1/f1) と比較し、Trim28 のタンパク発現は 80%以上低下していた。これまでの報告から Trim28、ヒストンメチル基転移酵素をリクルートし H3K9 メチル化に関与することが知られていたが、予想に反して cTrim28 KO マウスの心筋細胞では、H3K9 メチル化レベルに顕著な変化は認められなかった (図 1)。



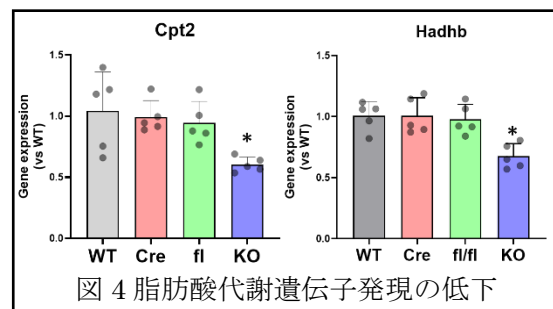
(2) 細胞周期活性に対する影響

Trim28 KO が心筋細胞の分裂に与える影響を検討するために、8 週齢に cTrim28 KO マウスから心筋細胞を単離し、遺伝子発現を qPCR と RNA-seq により測定した。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) の結果、発現上昇した遺伝子で G2/M チェックポイントや E2F ターゲットなどの遺伝子セットのエンリッチメントが観察された (図 2)。また、qPCR において cTrim28 KO の心筋細胞で F2f1 や Ccnd2 など細胞周期遺伝子の優位な発現上昇が認められた (data not shown)。しかしながら、BrdU 取り込みを指標に細胞周期へのリエントリを観察したところ、6-8 週齢の間 BrdU 陽生となる心筋細胞は観察されなかった (図 3)。この結果は、心筋細胞の分裂抑制において、Trim28 は必須ではないことが示唆された。



(3) 遺伝子発現に対する影響

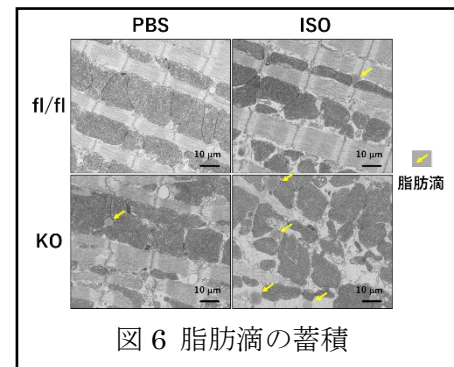
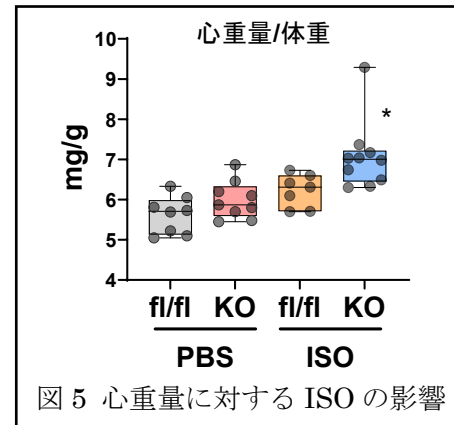
RNA-seq の結果、 $FDR < 0.05$ 、 $|FC| \geq 2$ を優位に発現変動した遺伝子と定義すると、165 遺伝子が発現上昇し、85 遺伝子が発現低下しており、発現変動の小さい遺伝子も考慮した GSEA の結果から、発現が低下している遺伝子で脂肪酸代謝に関連する遺伝子のエンリッチメントが観察された (Data now shown)。この変化は qPCR (Cpt2 や Hadhb) でも確認でき、Trim28 の KO は脂肪酸代謝遺伝子の発現制御に関与することが示



唆された(図4)。

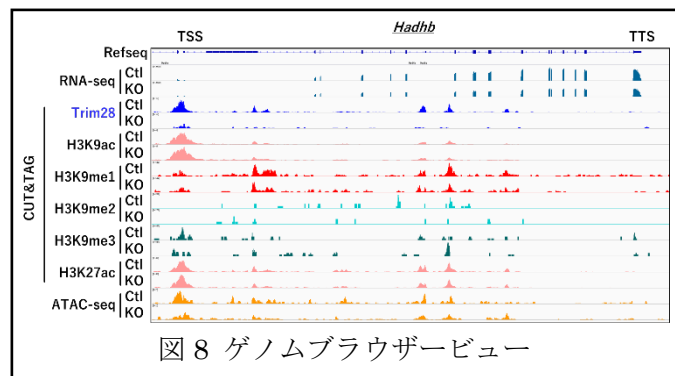
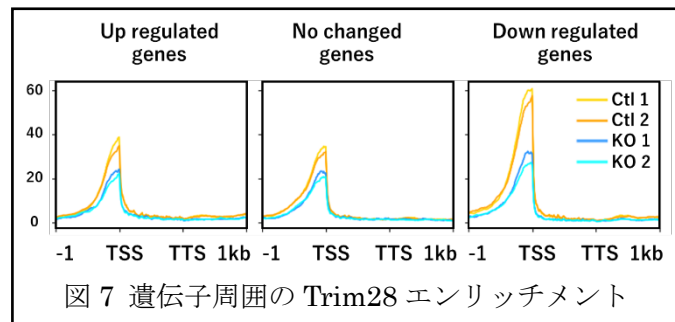
(4) β 受容体刺激に対する応答性の変化

心筋細胞では脂肪酸代謝がエネルギー産生の主要な代謝経路であるが、病態下では脂肪酸代謝の低下が観察される。そこで、心肥大を誘導する β 受容体刺激薬のイソプロテレノール(ISO)で心臓に負荷を与え、その応答性の違いを比較した。本研究では、ISOを5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (body weight)を皮下投与で1日1回、1週間投与した。この低用量では、コントロールマウスに対し、心重量の増加を誘導しなかったが、cTrim28 KOマウスでは優位な心重量の増加が観察された(図5)。ヘマトキシリン・エオシン染色で心筋細胞のアライメントを観察したところ、f1/f1+PBS群、KO群、f1/f1+ISO群では顕著な変化は認められなかったが、KO+ISO群はアライメントの異常を示し、肥大型心筋症の様な病理所見が観察された(Data not shown)。遺伝子発現では、コントロールマウスに対し ISO は脂肪酸代謝遺伝子の発現を低下させるが、cTrim28 KOマウスでは更なる発現の低下が観察された(Data now shown)。遺伝子発現変化と一致して、心臓組織を電子顕微鏡で観察すると KO+ISO群では明らかな脂肪滴の蓄積が観察され(図6)、脂肪酸の利用が低下していることを示唆した。



(5) Trim28 のゲノム結合部位

Trim28 の結合部位と KO による遺伝子発現変化の相関関係を明らかにするために、CUT&TAG 解析を行った。検出された Trim28 の結合部位の約 80%は遺伝子領域にあり、特にプロモーター領域で強いエンリッチメントが観察された。Trim28 の KO により発現が上昇した遺伝子(FDR>0.05、FC>=1)、変化しない遺伝子(FDR>0.05、ランダムに 400 を抽出)、低下した遺伝子(FDR<0.05、FC<-1)の 3 群に分け、遺伝子周囲の Trim28 エンリッチメントを比較すると、KO により発現低下する遺伝子のプロモーターで他の遺伝子よりもエンリッチメントが高かった。また、Trim28 の結合部位の約 75%が、活性化マーカーである H3K9ac と共局在していた。



本研究より、Trim28 は心筋細胞で H3K9 メチル化の維持や分裂制御において必須ではないが、脂肪酸代謝遺伝子の発現と β 受容体刺激に対する応答において重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、抑制性のクロマチン制御因子と考えられていた Trim28 が遺伝子発現に対して促進的に働いている可能性を示す新規の知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 小山恭平	4. 巻 100
2. 論文標題 再生する心臓	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34565/seibutsukogaku.100.3_1	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 広藤愛菜、小山恭平、河村あさみ、田中彩乃、辻田悠希、潮田亮平、神田恵、紙谷寛之
2. 発表標題 心筋細胞の細胞周期に対するMycの特性評価
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

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

1. 発表者名 広藤愛菜、小山恭平、宮谷和樹、伊佐秀貴、瀬戸川友紀、鈴木文隆、大久保諒、潮田亮平、國岡信吾、筒井真博、石川成津矢、紙谷寛之
2. 発表標題 Mycによる心筋細胞分裂誘導と心筋梗塞後の心機能保護
3. 学会等名 第54回 日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kyohei Oyama, Aina Hirofuji, W. Robb MacLellan, Hiroyuki Kamiya
2. 発表標題 Trim28 knockout accelerates isoproterenol-induced heart mass increase
3. 学会等名 KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology, Heart Failure: All Cells Considered (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Aina Hirofuji, Kyohei Oyama, Hiroaki Tanaka, Megumi Kanda, Hiroyuki Kamiya
2. 発表標題 Mycn induces cardiomyocyte mitosis in adult mice
3. 学会等名 KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology, Heart Failure: All Cells Considered (国際学会)
4. 発表年 2024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	紙谷 寛之 (Kamiya Hiroyuki) (30436836)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	

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