

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20939

研究課題名（和文）心筋再生を可能にする心筋細胞の分裂促進因子の同定と機能解析

研究課題名（英文）Screening and functional analysis of cardiac mitogenic factor for heart regeneration

研究代表者

潮田 亮平（Ushioda, Ryohei）

旭川医科大学・大学病院・助教

研究者番号：50910270

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：終末分化した心筋細胞は分裂能力が著しく低いため、心臓は再生能力を持っていないがその原因は十分に理解されていない。本研究では、RNA結合タンパク質Csd2が、細胞分化や分裂停止に関わるかどうかについて、マウスの組織や培養細胞モデルを用いて検討を行った。成体マウスにおいて、心臓や脳など細胞が分裂しない組織でCsd2の遺伝子発現が高かった。心筋細胞では、分裂活性が高い胎児期と比較して分裂を停止した成熟心筋細胞でCsd2の発現が上昇していた。C2C12細胞において、Csd2は骨格筋分化に伴い発現が上昇した。これらの結果から、Csd2は分化や細胞周期の逸脱に関与していることが示唆される。

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。心筋細胞の分裂や終末分化は複雑な遺伝子ネットワークにより制御されているため、未知な遺伝子の機能を1つずつ解明していくことで、最終的に心不全の根本的治療法の開発に繋がる。本研究では初めて、分化や分裂制御に対するCsd2の機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Since terminally differentiated cardiomyocytes have a limited ability to divide, the heart does not have regenerative capacity, but the reason for this is not fully understood. In this study, we investigated whether the RNA-binding protein Csd2 is involved in cell differentiation and mitotic arrest using mouse tissue and cell culture models. In adult mice, Csd2 gene expression was high in non-dividing tissues such as the heart and brain. In cardiomyocytes, expression of Csd2 was increased in non-mitotic mature cardiomyocytes compared to fetal cardiomyocytes where mitotic activity was high. In C2C12 cells, Csd2 was upregulated according to skeletal muscle differentiation. These results suggest that Csd2 is involved in differentiation and cell cycle exit.

研究分野：心筋再生

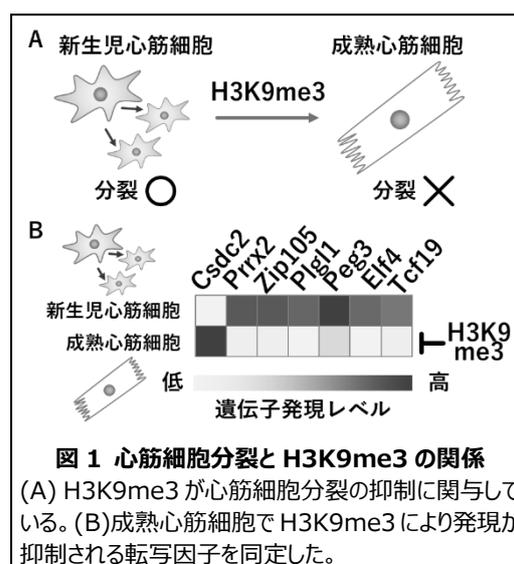
キーワード：心筋細胞 RNA結合タンパク質 Csd2 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳動物において、大人(成体)の心筋細胞は分裂能力が著しく低い。それ故、障害を受けた心筋組織は再生することが出来ず、瘢痕組織に置き換えられてしまう。心筋梗塞に対する治療効果が限定的で、心不全が不可逆的な病態である根本的な理由はここにある。しかし、出生直後の限られた期間だけは(マウスでは1週間以内)、哺乳動物もイモリやゼブラフィッシュのように心筋細胞の分裂能力が維持されており、障害を受けた心臓を自己再生することができる。これらの事実は、心筋細胞の分裂能力が、心臓の再生能力を決定していることを示唆しており、心筋細胞の分裂制御メカニズムを理解することで、心臓の再生能力が失われる原因の解明と、従来の治療に抵抗性を示す心不全に対する新たな治療法を開発することが可能になると考えられる。

心筋細胞のように高度に分化した細胞は、その状態を維持するための細胞記憶のメカニズムを持っている。この役割を担うのが、ヒストンのメチル化修飾 H3K9me3 である。心筋細胞は出生後に終末分化を迎え分裂能力を失うが、この過程における H3K9me3 の関与を検討するため、我々は心筋細胞で H3K9me3 を消去する遺伝子改変マウス(KDM4D マウス)を作成した。その結果、KDM4D マウスの心筋細胞は分裂能力を維持しており、心筋細胞が分裂能力を失うことに H3K9me3 が関与していることを明らかにした(図 1A)

H3K9me3 は、遺伝子を不活性化するヒストン修飾である。つまり、H3K9me3 によって発現が抑制される標的遺伝子の中に、心筋細胞の分裂能力低下に関わる因子があると考えられる。そこで我々は、KDM4D マウスの心筋細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、H3K9me3 によって発現が抑制されている標的遺伝子の探索を行った。候補遺伝子の中から、心臓の再生能力を維持した新生仔期の心筋細胞で特に発現が高い転写因子(FDR<0.01、FC>4)に注目し、心筋細胞の分裂に関わる H3K9me3 の標的遺伝子として 6 つの候補遺伝子 (Prrx2、Zip105、Plagl1、Peg3、Elf4、Tcf19) を同定した(図 1B)。さらに、同様のアプローチにより、成熟し心筋細胞では発現が高い転写調節因子 Csd2c2 を同定した。



2. 研究の目的

著しく低い心筋細胞の分裂能力は心臓再生を妨げる原因となっているが、このメカニズムは未だ明らかとされていない。我々はこれまでに、KDM4D マウスを用いて H3K9me3 が心筋細胞の分裂制御に重要な役割を果たしていることを明らかにし、H3K9me3 によって制御されている転写調節因子(Csd2c2、Prrx2、Zip105、Plagl1、Peg3、Elf4、Tcf19)を同定した。本研究では、これらの転写調節因子が細胞分裂制御や細胞分化に関与するかどうかを、培養心筋細胞やモデル細胞株を用いて検討する。

3. 研究の方法

- ・ 上記の転写調節因子の発現を誘導できるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを作成し、ラット初代培養心筋細胞(NRVM)に投与した。導入した遺伝子の発現と、細胞分裂に与え

る影響を RT-qPCR および免疫染色で検討した。

- ドキシサイクリン(DOX)依存性に、上記の転写調節因子の発現を誘導できるレンチウイルスベクターを作成した。このレンチウイルスベクターをラット由来心筋芽細胞株 H9c2 またはマウス筋芽細胞株 C2C12 に感染させ、転写調節因子の発現を誘導できる細胞株を樹立した。これらの細胞株を用いて、上記の転写調節因子が分裂や分化に影響するかどうかを、RT-qPCR や免疫染色法で検討した。

4. 研究成果

KDM4D マウスの心筋細胞で発現が上昇している転写調節因子の中で、技術的な理由から Peg3、Elf4、Tcf19 に絞り強制発現を誘導できる AAV9 ベクターを作成した。RNVM に AAV9 ベクターを投与したが、高い遺伝子導入効率が得られなかったため、H9c2 や C2C12 を用いた実験に移行した。Peg3、Elf4、Tcf19 を DOX 依存的に発現誘導できる H9c2 細胞株を用いて、DOX 処理が細胞周期遺伝子の発現に影響を与えるかどうか検討したが、Ccnd1、Cdk4、Ccnb1 の遺伝子発現には影響を与えなかった。

次に、Peg3 や Elf4 とは異なり KDM4D マウスで発現が低下し、成熟心筋細胞で高発現している Cscdc2 についての検討を行った。7 週齢のオス C57BL6 マウスにおいて、組織間の Cscdc2 遺伝子発現を比較すると、分裂活性が乏しい心臓と脳でその発現が特に高かった(図 2A)。また、発生段階の異なるマウスから心筋細胞を単離して遺伝子発現を比較すると、Cscdc2 は出生後に発現が上昇し、7 週齢の成熟心筋細胞で顕著に高かった(図 2B)。続いて Cscdc2 の発現上昇と分化の相関性が *in vitro* で再現できるかどうかを検討するために、C2C12 に骨格筋分化を誘導したところ、C2C12 の分化に伴い Cscdc2 の遺伝子発現は約 10 倍上昇した(図 2C)。これらの結果を基に、C2C12 分化における Cscdc2 の機能評価を行った。

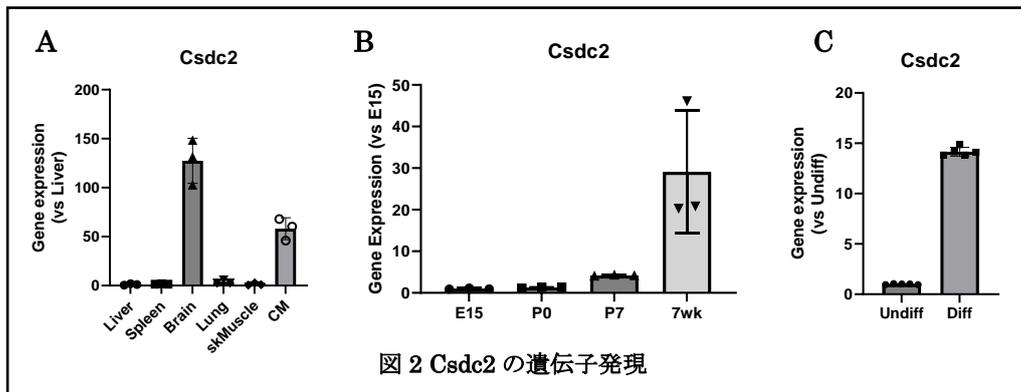


図 2 Cscdc2 の遺伝子発現

DOX 依存的に Cscdc2 の発現を誘導できる C2C12 細胞株(iOE 細胞)および Cscdc2 の発現を抑制できる細胞株(iKD 細胞)を用いて、Cscdc2 の発現が C2C12 分化に影響するかどうかを検討した。iOE 細胞において、DOX 処理により Cscdc2 発現は約 30 倍上昇するが、分化の程度には優位な影響を示さなかった(図 3A)。iKD 細胞において、DOX 処理により Cscdc2 発現は約 80%抑制されるが、分化の程度には優位な影響を示さなかった(図 3B)。

Cscdc2 の発現は細胞分化および細胞周期の逸脱と関連することから、細胞分化と何らかの関与が示唆されるが、C2C12 細胞においてはその発現は分化に直接的な影響は与えなかった。分化した細胞でどのような役割を果たしているのか明らかにするために更なる実験が必要である。

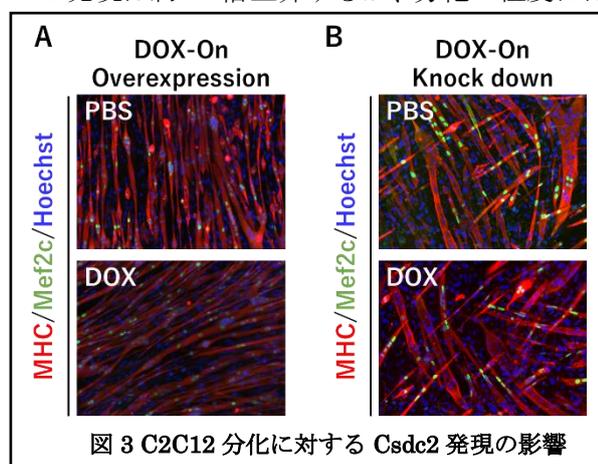


図 3 C2C12 分化に対する Cscdc2 発現の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中彩乃, 潮田亮平, 辻田悠希, Alex Anderson 誠二, 小山恭平, 紙谷寛之
2. 発表標題 Cold Shock Domain Containing C2(Csdc2)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

〔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
---------	---------