

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591105

研究課題名(和文) ユビキチン系制御によるES・iPS細胞から心筋細胞への効率的分化誘導法の開発

研究課題名(英文) Efficient cardiac induction of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells through regulation of ubiquitin-proteasome pathway.

研究代表者

朝倉 正紀 (Asakura, Masanori)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究開発基盤センター・室長

研究者番号：80443505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：重症心不全の新たな診断・治療法の開発は喫緊の課題であり、幹細胞から心筋細胞への分化機序の解明が果たす役割は大きい。我々は、心筋細胞の分化過程で重要な因子を同定するための網羅的遺伝子発現解析からE3リガーゼであるAsb2を同定した。Asb2は発生の早い段階から心臓予定領域で発現を認め、その後も心筋・骨格筋に特異的な発現を認めた。データベースの解析から、Asb2がSmad9と結合することを突き止め、さらにSmad9の分解を介してBMPシグナルを調節することでAsb2が正常な心筋細胞の分化に重要な役割を果たすことを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Heart failure is one of the leading causes of death in Japan and the novel diagnosis and treatment are strongly awaited. To overcome this issue, we aimed to elucidate the molecular mechanisms of cardiac induction in embryonic stem cells (ES cells). Comprehensive gene expression analysis using ES cells identified Asb2, which is thought to be an E3 ligase. Further analysis revealed that Asb2 is specifically expressed in the heart and skeletal muscle during development. In silico data base suggested potential interaction between Asb2 and Smad9, and we confirmed that Asb2 is the E3 ligase for Smad9 and leads it to proteasomal degradation. Our data suggested that Asb2-dependent Smad9 degradation plays important role in the development of the heart through quantitative regulation of Smad9 and thus the regulation of BMP signaling.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋分化 ユビキチン プロテアソーム系

## 1. 研究開始当初の背景

心不全はあらゆる心疾患の終末像であるが、心筋細胞が終末分化細胞であるがゆえに根治療法は移植以外にないのが現状であり、新規治療・診断法の開発は喫緊の課題であり続けている。その一つとして再生医療があげられ、ES 細胞、iPS 細胞の開発以来、臨床応用への期待が高まっているが、これには心筋細胞の分化メカニズム、心臓の発生メカニズムの解明が必要であった。我々はマイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析を通して心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼを同定するなど、同手法を先駆けて導入し、同分野をリードしてきた。そこで ES 細胞を心筋細胞へ分化させ、その過程における遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、心筋細胞特異的に発現することが知られている種々の遺伝子と極めて類似した発現パターンを示す遺伝子を絞りこむことで、心臓/骨格筋特異的に発現する E3 リガーゼである Asb2 を同定することに成功した。E3 リガーゼはユビキチンプロテアソーム系を介した基質分解へ導くことが知られているが、折しも心筋発生においては、時宜を得たシグナルのシャットダウンの重要性が示唆され始めていた。そこで我々は Asb2 によるその基質分解が心筋細胞分化、心臓発生において重要な役割を示すと考えた。

## 2. 研究の目的

歴史的に心筋分化、心臓発生においては種々の転写因子の発現が重要とされてきたが、近年、時宜を得たシグナル抑制も同様に重要であることが示されてきた。我々が同定した E3 リガーゼである Asb2 はその基質の分解を促進することが予想される。そこで我々は、Asb2 による基質の量的な抑制が持つ心筋分化、心臓発生における役割を解明すること、また Asb2 による心筋細胞分化への影響を調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

我々は Asb2 の役割を解明するため、まずその発現について基礎的検討を行った。具体的には ES 細胞の分化過程における Asb2 の発現について、またマウス胚における発現の局在について検討を行った。次に、Asb2 が E3 リガーゼとして働く際にいかなるタンパク質を基質として分解しているのかを検討した。これについては、まず既存のデータベースを検索し、さらに細胞レベルで実際にユビキチン化やプロテアソームによる分解がもたらされるかを検討した。さらに、*in vivo* における Asb2 の役割を調べるため、ゼブラフィッシュを用いた表現型解析を行った。また遺伝子改変により Asb2 ノックアウト ES 細胞を作成し、さらなる機能解析を予定した。

## 4. 研究成果

(1)Asb2 は心臓・骨格筋に特異的に発現する  
ES 細胞をハンギングドロップ法で心筋細胞へ誘導し、遺伝子発現を検討した。Asb2 は Nkx2.5 や Gata4 といった心筋細胞特異的な転写因子と極めて類似した発現パターンを示した。また、心筋細胞への分化能が知られている P19CL6 細胞においても同様に心筋細胞誘導に応じた Asb2 の発現上昇を認めた。そこでさらに、マウス胚における発現を Whole mount *in situ* hybridization で確認したところ、E6.5 という早期から心臓予定領域で発現が認められ、その後も心臓において（発生中期以降では体節・骨格筋においても）特異的な発現を示すことがわかった。

(2)Asb2 は Smad9 を基質とする

E3 リガーゼはその基質分解を介して生理的役割を果たすと考えられる。そこでわれわれはまず *in silico* データベースから結合タンパクを検索した。その結果、二つの独立したデータベースにおいて、BMP シグナルの伝達因子である Smad9 が候補として挙げられていた。実際に細胞実験で確認したところ、

Asb2 が Smad9 をユビキチン化し、プロテアソームによる分解へ導くことが示された。

(3)Asb2 は心筋細胞分化、心臓発生に重要である  
Asb2 の心臓発生における役割を調べるためゼブラフィッシュによる検討を行った。Morpholino Oligoを用いたノックダウンでは、MO-Asb2 によって心室壁の菲薄化と心室の拡大、収縮の低下が認められた。Asb2 のノックダウンは、すなわち Smad9 の集積と同じであると考え、Asb2 と Smad9 をともにノックダウンしたところ、表現型はレスキューされた。

(4)Asb2 ノックアウト ES 細胞の作製  
Asb2 の心筋細胞分化過程における役割、さらにその後の心臓における役割を解明するため、ノックアウト ES 細胞の作成を行った。予めデザインしたベクターを用いてまず片側アレルの相同組み換え体を得、さらに残るアレルについても相同組み換えを得る計画であったが、最終的に得られたクローンを詳細に検討したところ野生型アレルが残存していることが判明したため、やむなく計画を中止とした。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )  
なし

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

Min KD, Asakura M, Ito S, Imazu M, Shindo K, Asanuma H, Kitakaze M  
Pressure overload to the heart induces pulmonary up-regulation of genes coding secretory proteins involved in the cardiovascular diseases.  
ESC Congress 2014, Barcelona Spain, August,30-September3,2014

Min KD, Asakura M, Ito S, Imazu M, Shindo K, Kitakaze M

Temporal and quantitative regulation of Smad9 by its specific ligase Asb2 is required for cardiac development through the induction of Tbx2 expression by BMP2 stimulation.  
BCVS 2014, Las Vegas, NV.,U.S.A.,July, 14,2014

Min KD, Asakura M, Ito S, Imazu M, Shindo K, Kitakaze M

Temporal and quantitative regulation of Smad9 by its specific ligase Asb2 is required for cardiac development through the induction of Tbx2 expression by BMP2 stimulation  
American Heart Association Scientific Sessions 2014, Best of AHA Specialty Conferences  
Chicago, U.S.A.,November15-19, 2014

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況 ( 計 0 件 )

[ その他 ]

特に無し

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

朝倉 正紀 ( ASAKURA, Masanori )  
国立循環器病研究センター ・  
研究開発基盤センター ・ 室長  
研究者番号 : 80443505

### (2)研究分担者

北風 政史 ( KITAKAZE, Masafumi )  
国立循環器病研究センター ・

研究開発基盤センター・部長

研究者番号：20294069

(3)連携研究者 該当なし

(4)研究協力者

関 庚徳 (MIN, Kyung-Duk)