

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24657150

研究課題名（和文） 心臓再生過程における転写環境の再編成

研究課題名（英文） Remodelling transcriptional activities via chromatin-histone modulators during heart regeneration

## 研究代表者

竹内 純 (TAKEUCHI JUN)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：10451999

## 研究成果の概要（和文）：

哺乳類の心臓が再生不可能と考えられていたが、マウス新生児数日以内ならば心筋のみならず心機能も回復する。スクリーニングを行なった結果、興味深いことに、既知のクロマチン因子群が心筋誘導時に発現し成体後に減少することを見出した。クロマチン因子であるBrg1-Baf60cの心臓特異的強制発現系(BAF-TG)マウスを作製しMI（心筋梗塞）を発症させたところ、対照マウスとの比較結果から線維化が抑制され予後回復されていた。週毎に心エコー評価を行なったところ、心筋収縮率も回復されていた。この結果は、Baf60cによって心筋遺伝子プロモーターが活性化状態（クロマチン構造が紐解かれている状態）になっており、これが心筋の可塑性に関わっていると考えている。現在Baf60cを抑制する因子も明らかにできており(論文投稿中)、今後は、MI後特異的遺伝子導入を行い、クロマチン因子の発現亢進に伴う心筋再生能との関連を試みる。さらに、本萌芽研究で、再生能力の高い有尾両生類の心臓再生時、及び、マウス心臓再生可能時においても一過的にクロマチン因子の発現亢進が起る。BAF-TGマウスでは心臓再生の向上が見受けられ、ChIP法により幾つかの心筋遺伝子プロモーター領域でエピジェネティックな変化を見出した(投稿中)。つまり、再生能力低下の原因が心筋細胞のクロマチン構造の安定性が強化されたことによる転写環境の変化と考えられる。この一連の結果より、ChIP-seqを立ち上げるきっかけをつかむことが出来た。

## 研究成果の概要（英文）：

Mammalian hearts have been limited their regenerative capacity, whereas fishes and amphibians keep high plasticity even in the adult. However, no factors have been reported as key factors for cardiac regeneration between mammals and fishes. Recently, several epigenetic factors with specific roles in cardiogenesis have been reported. Especially, Brg1-BAF60c, main component in SWI/SNF chromatin remodelling complexes play as key factors for cardiomyocyte induction or differentiation (Takeuchi&Bruneau, Nature 2009; Takeuchi et al., Nature Commun 2011). Interestingly, Baf60c expression in the ventricle heart was completely disappeared by postnatal 7 days (P7D) after birth. This line is so consistent with

heart regeneration capacity in mammals, reported by Porrello et al. (Science 2011), suggesting that epigenetic molecules might be profoundly associated with mammalian heart regenerative capacity.

To address the questions whether cardiac-Baf core component, Baf60c, acts as an early response factor during heart regeneration or not, two animal models (axolotls for regenerative animals and mice for limited regenerative animals) were utilized. Baf60c mRNA and its protein were strongly up-regulated within 12 hours after heart resection in both axolotl and neonatal (P2D) mice, and their expression were maintained in both animals during heart regeneration. Interestingly, postnatal 3 weeks-mouse heart with Baf60c viral infection after resection keeps its regeneration capacity. BAF-TG mice in 8 weeks-adult, which was generated for stable expression of Baf60c in cardiomyocytes in adults, protected fibrosis post myocardial infarction (MI), following that heart function was recovered by 4 weeks.

In vivo ChIP analyses have revealed that chromatin conformation in viral infected-heart and BAF-TG hearts in adult mice was dramatically arranged. Brg1 directly binds on several cardiac fetal genes' promoters and regulates their expression levels in Baf60c dependent manner. Surprisingly, major cardiac fetal and angiogenesis gene promoters in the Baf60c-infected heart and BAF-TG heart in adults were still opened, accordingly with remodelling of histone H3K4 or H3K9 methylated-modification enzymes, DNA-methylated enzymes, HDACs and NurD components on these promoters.

These data indicated that chromatin-histone conformation change should be necessary for heart regeneration. In this session, we would like to show genome-wide analyses for understanding the mechanism of chromatin-histone regulation in heart plasticity and heart failure.

交付決定額

(金額単位：円)			
	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：心臓再生、エピゲノム、ChIP-seq、器官形成

#### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の心臓を再生することは非常に難しい。しかしながら、SadekとOlsonによって出生後1週間以内の乳児ならば心筋のみならず心臓機能も再生することが報告された(Porrello et al., Science 2011)。これは、二つの理由があり、一つは、心臓幹細胞の数は出

生後もそれほど変化しないにもかかわらず心臓再生が難しくなることから、心臓幹細胞の分化能力が制限されていくと考えられる。もう一つは、再生応答する心筋状態の可塑性が変化すると考えられる。どちらも再生が不完全となる大きな一要因であると考えられるが、加齢とともに寄与出来なくなる原因は明らか

にされていない。

申請者は、数種のクロマチン因子群が心筋誘導時は発現し成体後に減少することを見出しており (Nature Commun 2011; Nature 2009)、2年間かけ実験系を確立した結果、再生能力低下の原因が心筋細胞のクロマチン構造の安定性強化による転写環境の変化と考えた。さらには、再生能力の高い有尾両生類の心臓再生時には一過的にクロマチン因子の発現が見受けられることを組織学的に見出した (申請者未発表)。このことから、心臓再生メカニズムを研究する新たなアプローチスタイルとしてクロマチン構造状態を知る必要性がある。

## 2. 研究の目的

心筋再生・心臓再生は、哺乳類においても出生間もなくは可能であるが、成体で不可能となる。この理由として、発生に伴い、心筋遺伝子と心臓幹細胞遺伝子のプロモーター上のクロマチン構造が強固となり紐解かれなため、再生遺伝子群の発現環境が抑制されていることが考えられる。よって、本疑問を解明するために、1) 心臓再生時でのクロマチン複合体の構成(パートナー)因子の変換可否と、2) 心臓再生時における心筋遺伝子と心臓幹細胞ゲノム上でのクロマチン環境変化と発現制御状態を明らかにすることを目的とする。本研究は、上記2つを基軸とする研究を推進する上で、新しいin vivo解析系も立ち上げる。

## 3. 研究の方法

(1)細胞選別質量分析系を用いた再生時特異的生体パートナーの同定

マウス胎児心臓形成時 (10.5日胚)、マウス心臓再生時(出生後5~7日目)と再生不可能時 (2週、4週) の、4つのステージにおける心臓幹細胞と心筋での亢進型クロマチン因子Brg1と抑制型CHD4の生体パートナ

ーの同定と相違から再生必須複合体の理解を目指す。心臓幹細胞はcKit or Sall1陽性細胞分画として、心筋はaMHC (必要に応じてcTnT) 陽性分画としてフローサイトメトリー(FACS)法を用いて細胞選別が可能であることは確認済みである。この分画をBrg1とCHD4で免疫沈降し、免疫沈降産物を質量分析法により明らかとし、クロマチン因子のパートナーの変化とそれに伴う機能の変化を明らかにすることを目的とする。

マウス心臓再生手術 (小島瑞代: 研究補佐員)、FACS 細胞分画選別 (塚原由布子: 特任研究員/杉崎弘江: 研究補佐員)、タンパク精製と質量分析 (横田直子: 技術職員/加藤茂明教授・小布施力史教授: 研究協力)、免疫沈降法によるサンプル精製 (中村遼: 修士1年) の5人をもって研究を推進する。現時点では、本研究室内で独立的に心臓幹細胞と心筋を効率よく分離する技術も立ち上げており (塚原由布子/杉崎弘江)、心臓組織からのタンパク精製も可能となった (横田直子)。また、樹立したin vivo ChIP法を用いてNppa/Tnnt2/aMHC心筋プロモーターにおけるBrg1とCHD4の結合能を調べた結果、心筋成熟期に従ってBrg1の標的因子の一つである心トロポニンプロモーター上に結合できなくなっていた (中村遼)。これら3つを統合し、再生メカニズムを知る研究を精力的に推進できる準備が整ったため、本萌芽研究1として、遂行する。

(2)再生時特異的なクロマチン因子Brg1/CHD4の制御領域の改変

(1)と同様に、マウス胎児心臓形成時 (10.5日胚)、マウス心臓再生時(出生後5~7日目)と再生不可能時 (2週、4週) の4つのステージにおけるBrg1とCHD4のゲノム上での制御領域の変化を見いだす。心臓幹細胞と心筋状態変化は、ゲノム上におけるBrg1と

CHD4のアクセシビリティの変化であることを証明する為に、マウス心臓再生に関わる心臓幹細胞(cKit&Sall陽性細胞)と心筋(aMHC陽性細胞)をFACSで選別後、Brg1またはCHD4で免疫沈降し、それぞれのChIP-seqを行ない、特定の制御領域と制御領域の変化を見いだす。

ChIPサンプル回収とin vivo ChIP-seqの樹立(中村遼:修士1年/白髭克彦教授に研究協力と研究助言)、FACS細胞選別(塚原由布子:特任研究員/杉崎弘江:研究補佐員)の3人を持って研究を推進する。すでに生体組織からのChIPは樹立しており(中村遼)、この結果を発展させ、発生過程と再生過程におけるBrg1とCHD4の制御領域変化を明らかにできるとの考えから、本萌芽研究2として研究を遂行する。

前項(1)、(2)の研究結果から、以下の(3)の研究に発展させる。生体から分子解析を行ない、重要因子を同定した際には、最終的に生体での確認研究が必要であると考えている。生体モデルは、心臓再生可能生物として有尾両生類Axolotlと再生低下生物マウス乳児を用いる予定である。

#### (3)有尾両生類モデルとマウス心臓再生時に再生必須因子群

有尾両生類(Axolotl)は心臓再生するだけでなく、心臓サイズがマウス並に大きいにも関わらず、再生速度が魚並みに早い。心臓形態は哺乳類系に近く、魚で使用出来ないマウス/ヒト用抗体も使用出来る。さらに、トランスジェニックAxolotlも樹立されてきていることから、今後モデル系としての展開が見込まれる。このモデル系を用いて、上記で単離されてきた因子の発現状況を調べる。さらには心臓再生時のマウスでも確認していく。すでに、Axolotl心臓再生については、本研究室で樹立しており(未発表)、本萌芽研究と

もに発展させたい。

心臓再生モデル(塚原由布子:特任研究員/小島瑞代:研究補助員/Sedak 助教授:研究助言)、有尾両生類モデル(小柴和子講師:連携研究/研究助言/小島瑞代:研究補佐員)、特定因子抗体作製(中村遼:修士1年)の4人を保って研究を遂行する。

本研究は、樹立可能性を秘めた新しい研究方法と、生物学における再生メカニズム原理の理解に大いに貢献できると考えている。上記二つはホットな研究分野であることから、出来る限り早期に取り組むため、研究室のメンバーを最大限に参加させ、個々の特色を生かした研究計画を組んだ。

#### 4. 研究成果

##### (1)細胞選別系を用いた再生時特異的生体パートナーの同定

免疫沈降法(IP)により胚性時期にはBrg1はBaf60cと強く結合していることが分かり、出生後15日目以降ではBrg1はHDAC1/2、CHD4等のクロマチン構造を閉鎖するクロマチン因子と強く結合していることが明らかとなった。一方、胚性時期ではBrg1はHDACやCHD4とは結合していないことも同時に分かり、心筋内でBrg1は成熟に従ってパートナーを変換することが明らかとなった(投稿準備中)。現在IP-MSを立ち上げ中である。

##### (2)再生時特異的なクロマチン因子Brg1/CHD4の制御領域の改変

上記1におけるBrg1の制御領域をChIP法により同定可能か、当該年度に試みた。まず、心臓発生過程における心トロポニン(Tnnt2)と心房ナトリウムペプチド(Nppa)プロモーター領域でのBrg1制御領域の同定をBrg1によるクロマチン免疫沈降(ChIP)法を用いて試みた。すると、マウス/ヒトで高度に保存され、かつ、心臓転写因子野結合配列が存在するゲノム領域にてBrg1による結合が見出さ

れた。この領域は心臓発生がすすむに連れて **Brg1**の結合がみられなくなり、出生後14日目以降では完全に結合されていないことが分かった。ここで**Brg1**タンパク質の発現は維持されていることから**Brg1**の結合消失はその発現量に非依存性であり、**Brg1**は胚性時と成体時において結合パートナーを変えていることが分かる。では、その意味は？同様に、この領域でH3K27me3とH3K27ac及びPolIIIでChIPを行なったところ、**Brg1**が**Baf60c**と結合している時期ではH3k27acが亢進しておりPolIIIの結合が見受けられた。一方、出生後時期が経つと**Brg1**はHDACやCHD4と結合する傾向があり、さらにこの領域はH3k27me3されていることが分かった。これらの結果から、**Brg1**の結合パートナーがその近傍クロマチン構造のみならず、ヒストン修飾をも変化させ、トロポニンや心房ナトリウムペプチドの発現制御が行なわれていることが明らかとなった。CHD4が**Brg1**と結合している時、トロポニンや心房ナトリウムペプチドのプロモーター領域には結合しているのか？これにはまだ良い回答は得られていない。しかしながら、**Brg1**の結合能力が消失していることから、**Brg1**結合と心臓遺伝子の転写亢進は深く関連があり、**Brg1**の結合消失が心臓遺伝子の転写環境におけるクロマチン状態だけでなくヒストン修飾とともに生じており、かつ、この減少が心臓再生能に関わることは新たな発見である。この発見は心筋増殖のメカニズムの理解にも繋がる。

### (3)有尾両生類モデルとマウス心臓再生時に再生必須因子群

心臓再生の開始が早急に起るAxolotlは再生の関わるkey遺伝子を同定・解析するには適した生物である。心臓再生が開始されるに従っていち早く発現が見受けられるのが**Baf60c**・**Brg1**である。**Baf60c**は心臓切除後1

日後以内には発現亢進が見受けられることから、心筋再生にはクロマチン構造変換が重要であると示唆される。**Baf60c**のタンパク量は再生が活発とされる時期にはされる際に発現が亢進する遺伝子であると示唆される。ではこの結果を元に、マウスで**Baf60c**を強制発現させると心筋再生能は延長するのだろうか？この疑問を解くために、我々はaMHCプロモーター直下に**Baf60c** cDNAをつなぐことによって、心筋特異的に**Baf60c**タンパクを発現するマウス(BAF-TGマウス)を作製した。興味深いことに心臓遺伝子のプロモーターのクロマチン状態やヒストン修飾状態もは胎児期のそれとほぼ同状態であり、転写の亢進が維持されていた。このBAF-TGマウスでは出生後2週齢においても転写亢進が見受けられ、実際に心臓切除をしても心臓再生が見受けられた。

この一連の実験より、哺乳類の心臓再生を向上させる上では、まずクロマチン状態を可塑性の保った状態にしてあげることが重要であり、そのkey因子として**Baf60c**の存在は欠かせないと考えられる。

これからの課題は、①ChIP-seq法を用いて、このBAF-TGマウスにおいて全ゲノムにおける特異的な領域のクロマチン構造・ヒストン修飾変換が行われているのか(特異性の解析)と、②どういう因子が**Baf60c**を誘導してくるのか(上流因子の探索)、③**Baf60c**は単独で機能しているのか(生体パートナー因子の同定と制御機構の特性)、④クロマチン構造・ヒストン修飾変換が生じた心筋で起る生理現象の理解、を明らかにして行く必要性があげられる。できる限り早急な解析系によって、心筋自体の特異性理解に努めたい。

## 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3件)

- (1) 竹内純、エピジェネティクスで組織可塑性を理解する、羊土社、実験医学、査読無、Vol.30 No.18、2896-2901、2012
- (2) 中村遼、塚原由布子、竹内純、心臓発生と心疾患のエピジェネティクス—クロマチンモデリング因子・ヒストン修飾因子が織りなす複雑な臓器発生機構のモデルとして—、羊土社、実験医学、査読無、Vol.30 No.18、2923-2931、2012
- (3) 森田唯加、小柴和子、竹内純、心臓発生とその分子メカニズム、メディカルレビュー社、血管医学、査読無、Vol.13 No 3、97-113、2012

〔学会発表〕(計20件)

- (1) Jun K Takeuchi, et al., How to Build a Four Chambered Heart: Molecular Mechanism Underlying Atrial and Ventricular Septation in Vertebrate Heart, CDB シンポジウム「The Making of a Vertebrate.」(神戸)、2013.3.4
- (2) 竹内純、Epigenetic Factors in Cardiac Development and Regeneration、第7回日仏先端科学(JFFoS)シンポジウム招待講演(滋賀)、2013.1.25
- (3) 竹内純、心疾患重篤化と心機能再生に関わるエピジェネティック因子群、奈良県立医科大学セミナー招待講演(奈良)、2012.12.26
- (4) 竹内純、他、Dnmt1 specifically functions in heart development and maintenance、第35回日本分子生物学会年会(福岡)、212.12.11
- (5) 竹内純、他、心臓再生における統合的なクロマチン構造変換、第35回日本分子生物学会年会(福岡)、212.12.11
- (6) 竹内純、他、新規心臓転写因子による心

- 臓細胞運命決定と機能的な心臓再生、第35回日本分子生物学会年会(福岡)、212.12.11
- (7) Jun K. Takeuchi, et al., Sa+ Cells, a Novel Cardiac Lineage, Promote Heart Program and Its Regeneration, 第29回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会総会(福岡)、2012.10.26
  - (8) 竹内純、他、特定転写因子による心臓幹・前駆細胞運命プログラム機構、第11回日本心臓血管発生研究会(福島)、2012.10.19
  - (9) 竹内純、他、心筋再生におけるエピゲノム制御機構、第11回日本心臓血管発生研究会(福島)、2012.10.19
  - (10) 竹内純、他、特定転写因子による心臓幹・前駆細胞運命プログラム機構、第3回Molecular Cardiovascular Conference II(北海道)、2012.9.8
  - (11) 竹内純、心臓再生能力を司るクロマチン結合制御因子群、第33回日本炎症・再生医学会(福岡)、2012.7.5
  - (12) Jun K Takeuchi, et al., Fetal epigenetic modifiers stimulate cardiomyocyte regeneration and protect fibrosis in mammalian/ampfibian models, 第10回国際幹細胞学会(ISSCR)年次総会(横浜)、2012.6.14
  - (13) Jun K Takeuchi, et al., Sall promotes cardiac progenitor cell fate and fully contribute to cardiomyocyte lineages, 第10回国際幹細胞学会(ISSCR)年次総会(横浜)、2012.6.14
  - (14) 竹内純、他、心臓再生向上因子としてのクロマチン制御機構、第11回日本再生医療学会総会(横浜)、2012.6.13
  - (15) 竹内純、他、Sallは心臓前駆細胞必須因子として全心臓細胞系譜を制御する、第11回日本再生医療学会総会(横浜)、2012.6.13
  - (16) 竹内純、クロマチン因子から見る心臓再

生と心筋可塑性、第 55 回日本腎臓学会学術  
総会(横浜), 2012.6.1

(17) Jun K Takeuchi, et al., Epigenetic  
factors and the capacity for heart  
regeneration in mammals, 第 45 回日本発  
生生物学会(神戸), 2012.5.28

(18) Jun K Takeuchi, et al., Cell-Fate  
Spficiation of Cardiac Progenitors/Stem  
Cells by Defined Factors in vivo and in  
vitro, 第 45 回日本発生生物学会(神戸),  
2012.5.28

(19) Jun K Takeuchi, et al., Sall+ Cells  
Represent a Renewing cardiac Progenitor  
Population, 2012 Weinstein cardiovascular  
development conference (Chicago USA),  
2012.5.3

(20) Jun K Takeuchi, et al., The novel  
mechanism of histone-chromatin regulation  
for cardiomyocytes regeneration, 2012  
Weinstein cardiovascular development  
conference (Chicago USA), 2012.5.3

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 特定因子による心臓幹・前駆細胞の誘  
導/活性化方法

発明者: 竹内純、森田唯加、塚原由布子

権利者: 東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-011458

出願年月日: 2012 年 12 月 21 日

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/junktakeuchi-lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 純 (TAKEUCHI JUN)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号: 1 0 4 5 1 9 9 9

(2) 研究分担者

塚原 由布子 (TSUKAHARA YUKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任研  
究員

研究者番号: 7 0 6 0 9 3 9 6

(3) 連携研究者

小柴 和子 (KOSHIBA KAZUKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・講師

研究者番号: 3 0 4 6 7 0 0 5

白髭 克彦 (SHIRAHIGE KATSUHIKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

研究者番号: 9 0 2 7 3 8 5 4