

論文の内容の要旨

論文題目

Expression and functional analyses of chromatin remodeling factor Baf60c during heart regeneration

(心臓再生過程におけるクロマチンリモデリング因子 Baf60c の 発現および機能解析)

氏名 中村 遼

【序論】

魚類や有尾両生類は有用な再生モデル動物として知られており、四肢/鰭、網膜、レンズ、神経等の再生を目指した研究が盛んに行われている。心臓に関しては、ゼブラフィッシュやイモリは高い心臓再生能力をもつことが報告され、再生能力が低いと考えられている哺乳類においても、出生直後の新生仔マウスは心臓再生可能であることが近年報告された。遺伝子改変ゼブラフィッシュやマウスを用いた研究から、魚類や哺乳類の心臓再生機構の一端が明らかにされつつあるが、再生能をもたらす因子については未だに解明されていない。

先行研究により、転写活性型クロマチンリモデリング複合体である SWI/SNF-BAF 型複合体が心臓発生とヒト心疾患に関与することが見いだされた。哺乳類の SWI/SNF-BAF 型複合体は、Brg1 と Brm という 2 つの ATPase をコア因子として、その周りを約 10 種類の BAF 因子が取り巻いて巨大な複合体を形成する。SWI/SNF-BAF 型複合体の構成因子の一つである Baf60c は、心臓発生初期から心臓特異的に発現し、中胚葉性細胞から心筋への分化を誘導することが報告された。しかし、心臓成熟や心臓再生における Baf60c の作用機序はほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、SWI/SNF-BAF 型複合体構成因子である Baf60c に着目し、Baf60c の心臓発生・心臓再生における発現様式とその機能の一端を、免疫組織学的解析およびクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法によって明らかにした。

【結果】

マウス心臓発生における Baf60c の発現様式を調べるために、*in situ hybridization* 法を用いて各発生段階の野生型マウスにおける Baf60c の発現を精査した。Baf60c は、マウス心臓発生初期に心臓において高く発現し、出生後はその発現は弱くなることが明らかとなった。

心臓成熟・心臓再生能の低下と Baf60c が引き起こすクロマチン構造変換との関連性を調べるために、心臓再生可能な出生直後(P0)の野生型マウス心室組織と、心筋が成熟し再生能が限定されていく出生後 10 日目(P10)の野生型マウス心室組織を用いて ChIP-定量 PCR(qPCR)解析を行った。ChIP-qPCR 解析では、心臓発生や心臓再生に重要であることが報告されている転写因子 *Gata4* およびサルコメア因子 *Tnnt2* の制御領域に着目し、解析を行った。ChIP-qPCR 解析の結果、P10 の心室組織では P0 の心室組織に比べ、*Gata4* や *Tnnt2* 制御領域への Baf60c の結合が抑制されていることがわかった。さらに、クロマチン因子 Brg1 や RNA Polymerase II の結合も P10 の心室組織において抑制されていた。また、P10 の心室組織では P0 の心室組織に比べ、転写活性化に働くヒストン H3 のリジン 27 のアセチル化やヒストン H3 リジン 4 のトリメチル化が減少していることがわかった。以上から、心臓成熟に伴い *Gata4* や *Tnnt2* 遺伝子制御領域が転写されにくい環境へと変化していくことが示唆された。心臓成熟期における Baf60c の遺伝子制御領域への結合抑制と哺乳類の心臓再生能が低下していくタイミングが相関していることから、私は Baf60c が引き起こすクロマチン構造変換が心臓再生能の低下・向上に大きく関与するのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証するために、心臓再生可能な新生仔マウスおよび有尾両生類アホロートル(メキシコサンショウウオ ; *Ambystoma mexicanum*)を用い、心臓再生時における Baf60c の発現解析を行った。

まず、再生可能な野生型新生仔マウスの心臓再生過程における心筋細胞増殖について調べた。その結果、心室先端部切除後 2 日目から 8 日目に、切除部周辺において増殖能をもつ心筋細胞が一過的に増加することが明らかとなった。この一過的な心筋細胞増殖が起こるタイミングに着目し、この時期における Baf60c の発現を調べた。その結果、Baf60c の発現は開胸のみを行った個体の心室先端部では弱い、心室先端部切除後 2 日目の組織の心室先端部では強いことが明らかとなった。心臓再生時に Baf60c が発現する細胞種を調べたところ、Baf60c は切除部周辺に存在する心筋細胞と vimentin 陽性な繊維芽細胞に発現することが明らかとなった。以上から、新生仔マウスの心臓再生時には心筋細胞の一過的な増殖と Baf60c の発現亢進が引き起こされることが示された。

心臓再生時に心筋細胞増殖と Baf60c の発現上昇が起こることが示されたため、Baf60c が心筋細胞増殖へ及ぼす影響について新生仔マウスの心筋を用いて調べた。心筋細胞は、心筋細胞特異的な α -MHC 遺伝子のプロモーターにより心筋に GFP が発現する α -MHC トラン

スジェニックマウスを用い、flow cytometry 法により GFP 陽性細胞を心筋細胞として単離した。単離した心筋細胞を播種後、Baf60c に対する siRNA を投与し Baf60c の発現を抑制した。コントロールとして既知の哺乳類動物遺伝子に非特異的な配列をもつ siRNA を投与した心筋細胞を用意した。Baf60c の発現を抑制した心筋細胞とコントロールとで増殖能をもつ心筋細胞数を比較した結果、Baf60c の発現を抑制した心筋細胞において、増殖能をもつ心筋細胞数が減少することが明らかとなった。以上から、Baf60c が心筋細胞増殖に重要であることが示唆された。

心臓再生時における Baf60c の機能を調べるため、心臓損傷時、Baf60c の発現を抑制すると心臓再生能力が障害されるかどうかについて解析を行った。心臓再生可能な生後 2 日目の野生型新生仔マウスの心室尖端部へ Baf60c に対する siRNA を投与後、心室尖端部を切除し、その後の再生過程を観察した。コントロールとして既知の哺乳類動物遺伝子に非特異的な配列をもつ siRNA を投与した心臓を用意した。Baf60c の発現を抑制した心臓では、コントロールと比べて切除部周辺の繊維化が進行していた。また、切除後 7 日目の心室組織を用いて *Gata4* 制御領域における ChIP-qPCR 解析を行った結果、Baf60c の発現を抑制した心室組織において、RNA Polymerase II の結合抑制、および転写促進に働くヒストン H3 リジン 4 のトリメチル化の減少が観察された。同様の傾向が、サルコメア因子 *Tnnt2* 制御領域においても観察された。また、血管新生に重要な *Vegfa* の制御領域に着目し同様の ChIP-qPCR 解析を行った結果、Baf60c の発現を抑制した心室組織において、RNA Polymerase II の結合が抑制されていることが明らかとなった。さらに、Baf60c の発現を抑制した心室組織において、クロマチン因子や心臓特異的転写因子、サルコメア因子、血管新生関連遺伝子などの発現が顕著に減少していた。以上から、心臓損傷時、Baf60c の発現抑制によって *Gata4* などの遺伝子制御領域のクロマチン環境が変化し、再生可能な新生仔マウスの心臓においても再生能力が障害される可能性が示唆された。

最後に、Baf60c の心臓再生における発現が種を超えて保存されているかどうかを確かめるために、新生仔マウスと同様に高い再生能力をもつ有尾両生類アホロートルの心室切除後の再生過程と Baf60c の発現様式を観察した。アホロートルの心臓は切除後 3 週目には切除部の再生が完了し、興味深いことに、再生過程に繊維化した組織はほとんど観察されなかった。また、心室尖端部切除後 2 日目の心室組織において、増殖能をもつ細胞が心室組織全体で多数観察された。切除後 9 日目以降の心室組織では増殖能をもつ細胞数は減少していた。さらに、ウェスタンブロッティング解析の結果、開胸のみを行った心室組織、または手術をしていない心室組織では、Baf60c の発現はほとんど検出されないが、心室尖端部切除後 3 日目の心室組織では Baf60c の発現が亢進することが明らかとなった。以上から、新生仔マウスの心臓再生時と同様に、アホロートルの心臓再生時においても増殖能をもつ細胞が一過的に

現れること、および Baf60c の発現がアホロートルの心臓においても保存されており、Baf60c が心臓再生時に発現することが示された。

【考察】

本研究では、脊椎動物の心臓再生過程における Baf60c の発現様式とその機能の一端を明らかにした。Baf60c はマウス胎生期初期および再生可能なアホロートルと新生仔マウスの心臓再生時に強く発現し、新生仔マウスにおける Baf60c の発現抑制は心筋細胞増殖の低下と心臓切除後の心臓発生関連遺伝子領域のクロマチン環境変化を引き起こした。これらの結果から、Baf60c の発現亢進が心臓損傷時の転写調節を担う可能性が考えられる。さらに、マウス心臓成熟に伴って *Gata4* および *Tnnt2* といった心臓発生関連遺伝子の制御領域が閉鎖されていくタイミングと哺乳類の心臓再生能力が限定されていくタイミングが相関していることも合わせて考察すると、哺乳類成体における Baf60c の発現量の低下が哺乳類成体における心臓再生能力の低下に直接的に関与する可能性が考えられる。つまり、哺乳類成体では Baf60c の発現量が低いため、心臓損傷時にクロマチン構造変換が誘導されず、その結果として転写因子やサルコミア因子の転写が促進されないために心臓の機能が回復できないのではないかと考えている。哺乳類の心筋細胞は出生後、酸素供給量の増加に伴い細胞が多核化し、細胞周期が停止することが報告されている。心臓再生時に Baf60c の発現亢進と共に心筋細胞増殖が亢進すること、および Baf60c が心筋細胞増殖の維持に関与していること、Baf60c の発現抑制により *Gata4*、*Tnnt2*、*Vegfa* の転写が抑制されることから、Baf60c の一過的な発現上昇が、*Gata4*、*Tnnt2* などの再生に重要な遺伝子群の転写環境を調節し、増殖能をもつ心筋の産生と損傷部位への新たな心筋の供給や血管新生を促している可能性が示唆される。

さらに、再生能力の高い有尾両生類アホロートルと新生仔マウスの心臓再生過程の比較から、両者に共通な現象と異なる現象が明らかとなった。Baf60c の発現亢進と一過的な細胞増殖の亢進は、アホロートルおよび新生仔マウスの両方の心臓再生時に引き起こされることが示された。一方、心室尖端部切除後の切除部における繊維化に関しては、アホロートルの心臓では繊維化がほとんど観察されず、この点は哺乳類や魚類などの心臓再生過程とは異なることが示された。また、新生仔マウスを用いた解析により、心臓再生時、Baf60c は心筋細胞のみならず、心臓損傷後に一過的に現れる vimentin 陽性な繊維芽細胞にも強く発現することが明らかとなった。これらの結果から、再生過程における繊維化の機構や繊維芽細胞の役割の理解が、種間における再生能力の違いや器官の再生機構を解明する上で重要である可能性が考えられる。

本研究は心臓再生におけるエピジェネティック制御機構の一端を明らかにした。本研究により、エピジェネティック因子が心臓再生能と関連する可能性が初めて示され、今後の器官再生におけるエピジェネティック制御機構の理解に貢献することが期待できる。