

## 加齢によるタイプ別心筋の機能変化

### [1] 組織

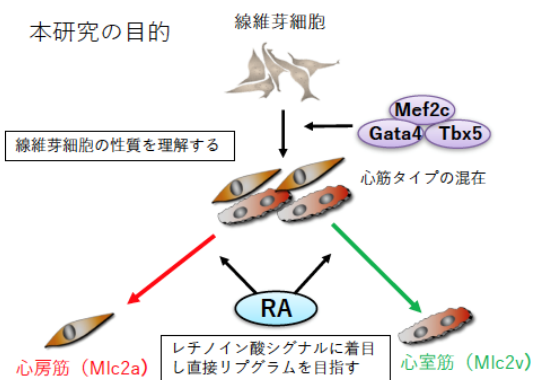
代表者：竹内 純  
(東京医科歯科大学難治疾患研究所)  
対応者：松本 健  
(東北大学加齢医学研究所)  
小椋 利彦  
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 15 万円

### [2] 研究経過

＝背景＝

胚発生過程における心臓誘導研究、および、胚性幹(ES)細胞/人為的多能性幹(iPS)細胞を用いた心筋誘導研究は、線維芽細胞から心筋への分化転換方法の樹立において大きく貢献した。しかしながら、線維芽細胞から分化転換された心筋は少なくとも克服すべき2つの課題が残されており、臨床応用や創薬開発においてまだ大きな隔りがある。一つは、機能性の異なるタイプ別心筋(心房筋・心室筋)の誘導方法が未確立であることであり、二つめは細胞年齢とともに減少する分化転換能力が未解明であることが挙げられる(下図：本研究の目的参照)。



レチノイン酸シグナルは、心臓形成において時空間的な位置情報や細胞分化・抑制などに寄与しており再生医療研究の主たる重要な因子の一つとして研究されている。よって、再生医療を見据えたレチノイン酸を用いた基礎研究・開発は、近年ますますその重要性を増している。このようなレチノイン酸の機能は、タイプ別心筋の誘導や線維芽細胞の幼若性質の維持においても深く関わり前述した課題を克服する可能性

があると考えられる。

＝目的＝

本共同研究では、レチノイン酸による心筋特異的な機能因子の選出をめざし、線維芽細胞性質の若返りおよびタイプ別心筋の誘導する分子生物学的・生理学的機構明らかにすることを目的としている。そのために、胚発生におけるレチノイン酸の分子生物学的解析研究に突出した知見・実績と解析ツールがある神経機能情報分野と共同研究を行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。

＝概要＝

胚発生過程において、レチノイン酸が重要な役割を担っていることは周知の事実である。心室筋・心房筋の誘導においてはさらに興味深いことにレチノイン酸の有無によって、誘導されてくる心筋タイプが異なる。本研究は、レチノイン酸添加によって誘導されてくる心筋タイプにおいて、マウス・ヒト共通に応答する因子の選出を目指しトランスクリプトーム解析を行った。その結果、心室筋誘導因子候補として4遺伝子、心房筋誘導因子候補として4遺伝子の選出に至った。次に、全ての候補遺伝子を用いた強制発現系を構築し、線維芽細胞から直接タイプ別心筋様細胞への分化転換に成功した。

(2020年度研究打ち合わせ等の開催状況)

本年度はコロナ状況下のため、主にメール・webで研究打ち合わせ会議・議論を行った。

- ・7月：トランスクリプトーム解析結果について
- ・9月：候補遺伝子の強制発現系の構築について
- ・11月：デザイン結果について
- ・2月：強制発現系結果について
- ・3月：課題と考察について

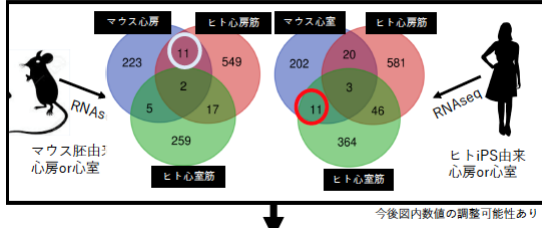
### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

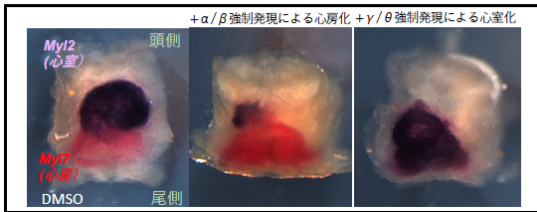
- ① 心室筋・心房筋誘導に必要なレチノイン酸応答因子の同定
  - ・マウス：ヒト間で共通して発現している遺伝子数は、心室:心房=11:11 個を選出した。マウストランスクリプトーム解析(心室特異的遺伝子数:心房特異的遺伝子数=236:241)、ヒトトランスクリプトーム解析を行った(心室特異的遺伝子数:心房特異的遺伝子数=410:556)(図1)。

図1：パイオインフォマティクス解析



・胚外培養系 (*ex utero* whole-embryo culture: WEC) を用いて、前述した候補遺伝子群からレチノイン酸に反応する遺伝子の絞り込みを行った (心室特異的の遺伝子数: 心房特異的の遺伝子数=4:4) (図2)。

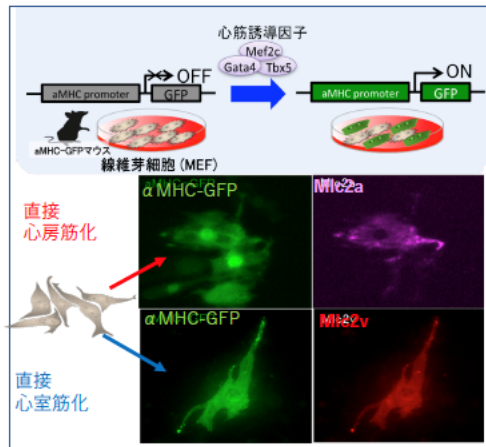
図2：プログラム実験



・前出した候補因子については、*exo utero* (胚外 *in vivo* 解析系) 強制発現系を立ち上げ実際に心室筋および心房筋を誘導する遺伝子の選出をした (図2)。

・線維芽細胞からの直接心室筋・心房筋への分化転換能力について解析を行った結果、前述した因子は心筋誘導因子候補同士の協調的作用によってレチノイン酸と同様な機能を有し分化転換を誘引することが明らかとなった (図3: 現在論文投稿準備中)。

図3：リプログラム実験



② 分化転換におけるレチノイン酸の機能

・線維芽細胞から直接心筋への分化転換機構において、心房筋へ優位に分化することが明らかとなった。この理由として、胚発生において線維芽細胞においてレチノイン酸シグナルが優位に活性化していることを突き止め、その結果心室筋への分化誘導が抑制されていることを明らかにした。

さらに、レチノイン酸に反応する心室筋抑制因子 (心房筋誘導因子) を同定した。

・エピゲノム解析を行った結果、心房筋特異的な遺伝子群の上流ゲノム領域はアセチル化されており、一方、心室筋特異的な幾つかの遺伝子群の上流ゲノム領域はメチル化されていた。このことは、線維芽細胞から分化転換させた心筋タイプ別研究を行う上で、大きな知見であると考えられる。今後は、胚発生過程でレチノイン酸シグナルに影響を受ける遺伝子が機能している様々な臓器分化研究報告を再確認し、各臓器に存在する線維芽細胞においてレチノイン酸シグナルの活性化状態を研究していく必要があると考えられる。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、学外研究者との交流が飛躍的に活性化し、米国との国際共同研究プロジェクトに発展した (2021 年度研究開始・以下参照①)。また、本共同研究で明らかになったレチノイン酸反応因子の成果は、ES/iPS 細胞を介さずに線維芽細胞から直接特定心筋誘導という新しい研究領域の開拓 (萌芽的研究の発見) に結びつき、基礎生物学研究のみならず、先天性心疾患発症原因および創薬開発研究においても今後の発展が期待されている (2019 年度研究開始・以下参照②)。

- ① 二国間交流事業 オープンパートナーシップ共同研究 (2021~2022 年度・日本学術振興会) 「ヒト心疾患発症重症化の理解と緩和を目指す *in vivo/in vitro* 統合研究」 (代表 竹内 純)
- ② 国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化(B)) (2019~2021 年度・日本学術振興会) 「ヒト先天性心疾患発症を惹起する非コード領域の制御機構の理解と基盤研究」 (代表 竹内 純)

また、本研究に関して、国際研究学会・シンポジウムにて発表報告・招待講演を行った (以下 [4] 成果資料参照)。

[4] 成果資料

- ① 第 19 回日本再生医療学会「心室—心房運命決定と分化転換を制御する因子群」O-17-4 パシフィコ横浜 5/29, 2020
- ② 20<sup>th</sup> Anniversary International Symposium [Defining the Transcriptional Factors to Specify the Cell Fate between CMs and ECs During development in Mammals] Gladstone in San Francisco (US) 3/19-20, 2021