

# エピゲノム解析と分化転換による心筋分化誘導法の確立

慶應義塾大学医学部 予防医療センター  
橋本 寿之

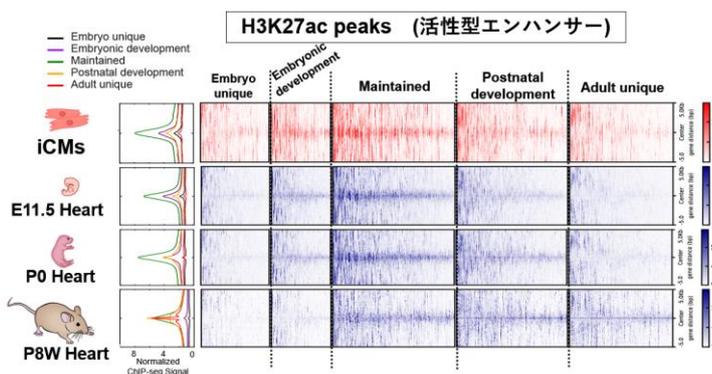
## 【研究の背景と目的】

心疾患の患者から樹立したiPS細胞由来の心筋細胞は心疾患の病態メカニズムの解析や創薬のスクリーニングに利用され、その研究成果は臨床への応用が期待されている。しかし、これらの多くの研究に利用されてきた多能性幹細胞由来の心筋細胞は、様々な心筋細胞のサブタイプが混在している雑多な細胞集団であった。そのため、心疾患の病態研究においては心筋細胞のサブタイプで表現型がどのように異なるかを詳細に解析できていないという課題が挙げられ、現状では多能性幹細胞を心疾患の病態の分子メカニズム解析ツールとして十分に活用できていない。

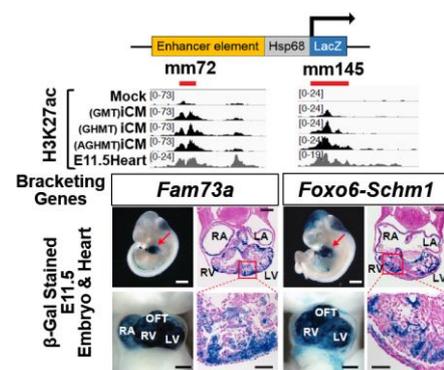
心疾患における致命的な不整脈は刺激伝導系の特殊心筋細胞のような希少な細胞集団にも起源があると提唱されているが、現状ではこれら特殊心筋を多能性幹細胞から効率的に分化誘導する方法やその転写制御機構は十分に解析できていない。よって、多能性幹細胞から特殊心筋への分化誘導を制御する転写ネットワークを解析し、分化誘導する方法を確立すれば、疾患モデルにおいてその表現型と病態解明に応用でき、多能性幹細胞の循環器再生医学への貢献と臨床応用に向けた可能性が大幅に高まることが期待される。

近年、心臓発生に重要な複数の転写因子を強制発現させることにより線維芽細胞を心筋様細胞 (induced cardiomyocyte: iCM) に直接リプログラミング (分化転換) できることが報告された。我々はこの分化転換法の分子機序を明らかにするためにエピジェネティクス解析法を用いて、分化転換中のエピゲノムを解析した。その結果、心筋分化転換 (*in vitro*) と心臓発生 (*in vivo*) という二つの異なるプロセスの転写制御機構には多くの共通点がある事を見出した (図①②: Hashimoto et al. *Cell Stem Cell* 2019)。このような知見から、今度は逆にリプログラミングの研究成果を参考にして心筋の分化を調節する新たな転写制御機構を解明することができるのではないかとこの着想に至った。

図① 分化転換と心臓発生の活性化エンハンサー比較



図② *in vivo* 心臓活性を示す分化転換エンハンサー



## 【目的】

本研究では分化転換を初期スクリーニングに利用し、我々が先行研究で発見した心筋リプログラミング誘導因子の中から刺激伝道系の特殊心筋細胞を誘導する因子を探索する (図③)。そしてこの因子を用いて、今度は多能性幹細胞から特殊心筋細胞を効率的に分化誘導する方法を樹立し、*in vivo*解析では困難である個体発生における刺激伝導系形成の新たな転写制御機構を解明することを目的とした。

図③ 本研究の概略図



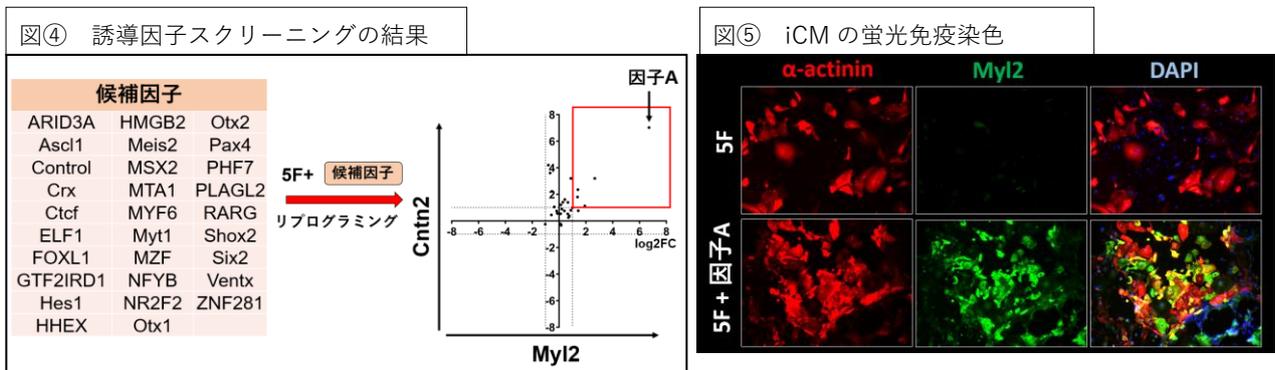
## 【方法】

我々は先行研究において無作為に選択した約1000個のヒト遺伝子ライブラリーを用いて大規模なスクリーニングを行い、心筋へのリプログラミング効率を改善する誘導因子を多数報告している (Zhou et al. *Genes Dev* 2017)。

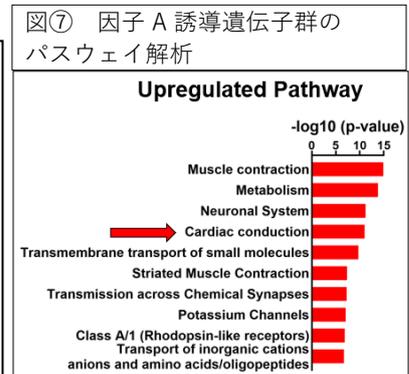
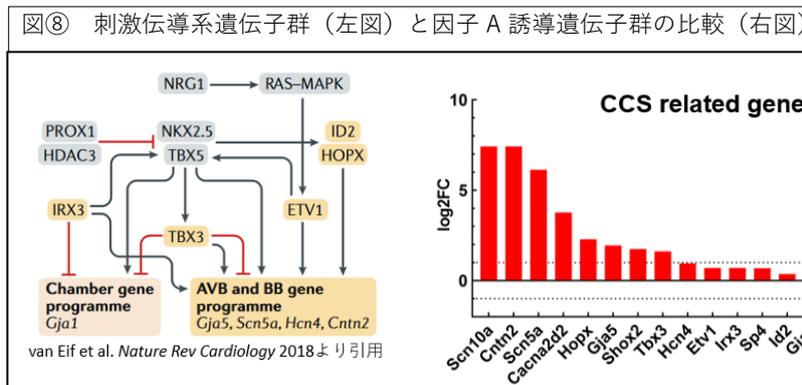
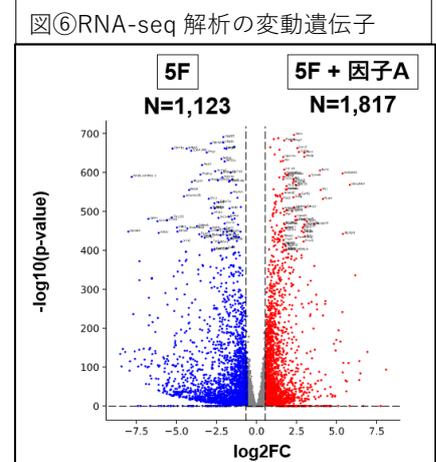
- 1) マウス線維芽細胞においてレトロウイルスを用いて、上記リプログラミング効率を増幅する29個の転写因子を一つずつ心筋リプログラミング5因子 (Akt1, Gata4, Hand2, Mef2c, Tbx5 : 5F) に追加し、心室刺激伝導系のマーカーであるCnntn2とMy12の発現を定量PCR (qPCR) 法で確認する。
- 2) その中で最も効果の強かった転写因子 (因子A) を用いてリプログラミングを行い、RNAシーケンスによりトランスクリプトーム全体での刺激伝導系マーカーの発現の上昇を確認する。
- 3) また、因子Aがどのようにして刺激伝導系マーカーの発現を調節しているかを、活性型エンハンサーのマーカーであるH3K27acと因子Aに対してクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) を行い確認する。

## 【結果】

- 1) 我々はリプログラミング効率を増幅する29個の因子をリプログラミング因子5Fに追加し、心筋分化誘導2日目のiCMを用いてqPCR法でCnntn2とMy12の発現量を確認した。その結果、心室刺激伝導系のマーカーであるCnntn2とMy12の発現を強く誘導する因子Aという転写因子を同定した (図④)。因子Aを追加することにより、蛍光免疫染色でも心筋様細胞におけるMy12と心筋マーカーである $\alpha$ -actininとMy12の共発現が確認でき、タンパク質レベルでの誘導も確認することができた (図⑤)。



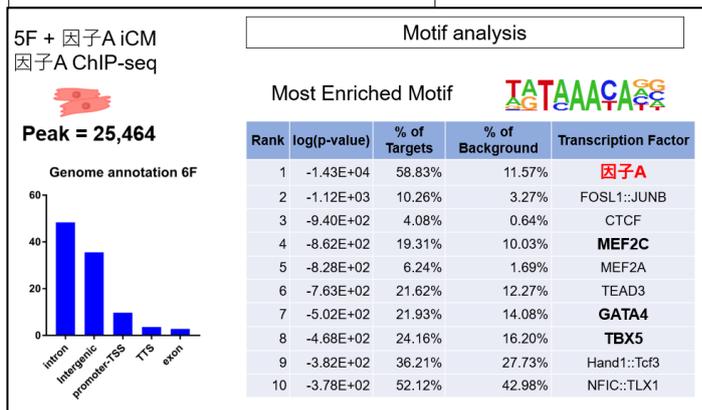
- 2) 次に因子Aがどのような遺伝子群を活性化するかを確認するため、心筋リプログラミング5因子に因子Aを加えた心筋様細胞のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、因子Aにより有意に誘導される遺伝子を1,817個認め、これらの遺伝子を用いてパスウェイ解析を行ったところ、刺激伝導系に関連する遺伝子群 (Scn10a, Cnntn2, Scn5a等) が全体的に強く誘導されていることが確認できた (図⑥⑦)。さらに詳細に各遺伝子を解析すると、刺激伝導系の中でも心室に発現が豊富なCnntn2, Scn5a, Gja5等の発現が強く誘導されていた (図⑧)。



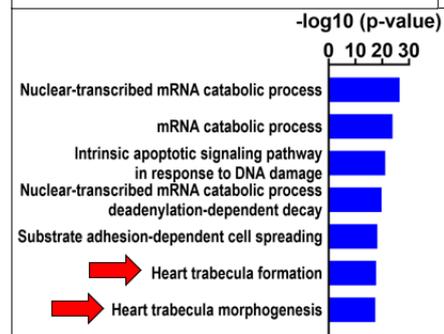
- 3) 因子Aは心臓における機能解析報告のない遺伝子のため、因子Aが実際刺激伝導系関連遺伝子の発現に直接作用しているのかを検証するために、クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイとシーケンスを組み合わせたChIP-seq法を用いてゲノム全体における因子A結合部位とヒストン修飾H3K27acに基づいたエンハンサー活性を解析した。

因子AのChIP-seq解析では、結合領域のモチーフ解析は期待通り因子Aの結合配列に最も富んでいた（図⑨）。そして、結合領域近傍の遺伝子を用いてGO解析を行った結果、心臓形成に関わる遺伝子群との関連が見られた（図⑩）。例として心室刺激伝導系形成に関わる *Tbx3* のプロモーター領域の結合シグナルを以下に示す（図⑪）。

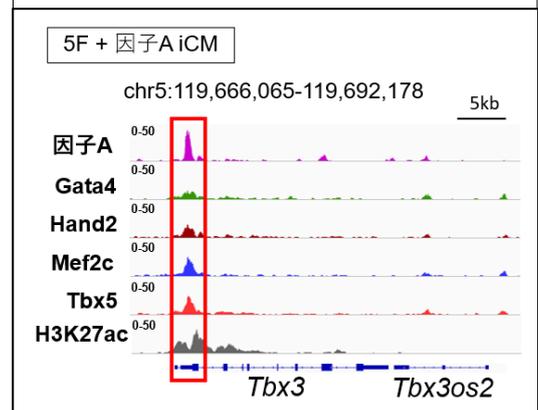
図⑨ 因子A結合領域のGO解析



図⑩ 因子A結合領域のGO解析



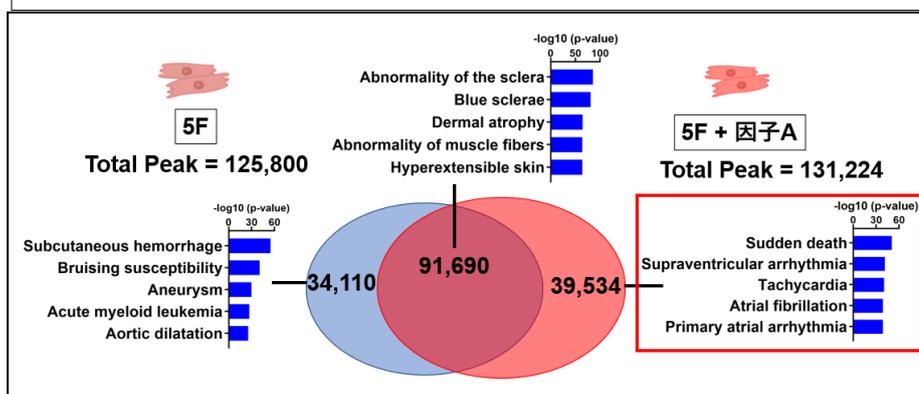
図⑪ *Tbx3* 遺伝子座における ChIP-seq シグナル



4) 次にH3K27acのChIP-seq解析により、5Fと5F+因子Aにより誘導したiCMの活性型エンハンサーを比較した。その結果、因子Aにより特異的に活性化されたエンハンサーは突然死や不整脈関連の遺伝子群と強い関係があることが判明した（図⑫）。

以上より、我々はマルチオミクス解析を用いて因子Aが心筋プログラミング中に心室刺激伝導系に関連した転写ネットワークを活性化することを明らかにした。

図⑫ 各 iCM における活性型エンハンサー (H3K27acpeaks) の GO 解析



【考察】

因子Aは主に消化器系に発現しており、肝臓の前駆細胞や腸管における機能解析が報告されている。一方、複数の公共データベースで心臓における発現も確認されているが、心臓における機能は未解析である。そのため、今後は因子Aが心筋分化に及ぼす影響を解析するために、多能性幹細胞においてTet-On発現誘導システムを用いて分化段階毎に因子Aの発現を誘導し、免疫染色法とqPCR法を用いてCnnt2やMy12等の心室刺激伝導系マーカーの発現を誘導するか確認する。そしてトランスクリプトーム解析を行い、誘導した心筋細胞が特殊心筋細胞のマーカーを網羅的に発現している事を確認する。そして最終的には因子Aを用いて多能性幹細胞から特殊心筋細胞を誘導することを目標とする。

また、本研究で特殊心筋細胞を誘導する転写制御機構及び誘導方法を開発することにより、今まで解析する事が困難であった不整脈疾患における特殊心筋の表現型が *in vitro* で解析できるようになる。特に遺伝性不整脈疾患において特殊心筋が表現型にどのように寄与するかは不明な点が多く、本研究成果により不整脈疾患の病態メカニズムの新知見を得る事が期待される。何よりも本研究の成果によりダイレクトリプログラミングは心疾患の新たな治療法の候補としてのみならず、心臓形成の新知見を得るための新たな *in vitro* ツールとしても発生学及び再生医学の分野に貢献できることを立証することになる。