79　心不全進展におけるエピゲノム制御因子の意義の解明	桑原　宏一郎

【目的】慢性心不全の病態形成においては、病的ストレスにより惹起される心筋の形態学的、機能的な変化である心筋リモデリングが重要な役割を果たす。こうした病的心筋リモデリング過程での心筋遺伝子発現変化の中で、特によく知られている現象が、胎児期の心室に認められるが、生後心臓の成熟と共に低下する一連の遺伝子発現プログラムが再誘導される、心筋胎児型遺伝子再活性化である。このような心筋胎児型遺伝子群の再活性化は、心不全の病態進行と相関するのみならず、心不全の進行そのものにも関与すると考えられている。したがって、心不全に至る過程における心筋胎児型遺伝子再活性化をはじめとする心筋遺伝子発現変化の分子メカニズムを明らかにすることが、慢性心不全の発症・進展に深く関わる分子機序の解明、さらには心不全に対する新規予防法、治療法確立のための標的分子の同定に繋がりうる。しかしいまだ最終分化した心筋細胞における遺伝子発現制御経路、特にその病的プロセスに関わる転写・エピゲノム制御因子の役割は明らかで無い点が多い。そこで本研究では、現在までに心不全発症・進展に関わる意義を我々が明らかにしてきたNRSF転写抑制複合体に関して、同複合体を構成するエピゲノム制御因子の役割に注目し、最近得た未発表の知見や新規モデル動物を解析することにより、心筋機能の維持と破綻における転写・エピゲノム制御因子の役割の詳細な解明とそれに基づく新規心不全治療標的同定をめざす。

【方法】NRSF転写抑制複合体を形成するエピゲノム因子である、*HDAC1/2*、*G9a*、*LSD1*それぞれの心筋特異的コンディショナルノックアウトを作製し、その心臓における表現形質と分子機序を解析した。

【結果】1. *HDAC1/2* 心筋特異的コンディショナルノックアウトマウス（HDAC1/2 dcKO）の解析

HDAC1/2 flox マウスと心筋特異的タモキシフェン誘導性 CRE マウスを交配し、成体マウス心筋において心筋特異的に HDAC1/2 dcKO を誘導し、その表現型を解析した。タモキシフェン投与後、一部の心筋胎児型遺伝子の発現誘導が観察され、投与 8 週後に HDAC1/2 dcKO メスでは対照マウスに比べて顕著な左室収縮力の低下が認められた（下図）。HDAC1/2 dcKO メスの心筋組織では対照マウスに比べて明らかな線維化の亢進を認め、1 年以内に約半数が死亡した。またマイクロアレイ解析にて、HDAC1/2 dcKO メスの心室筋では心筋胎児型遺伝子および心房特異的遺伝子の発現亢進が認められ、その少なくとも一部は NRSF 転写抑制複合体により制御される遺伝子であることが確認された。本結果により NRSF-HDAC1/2 複合体の心筋恒常性維持における重要性が確認された。

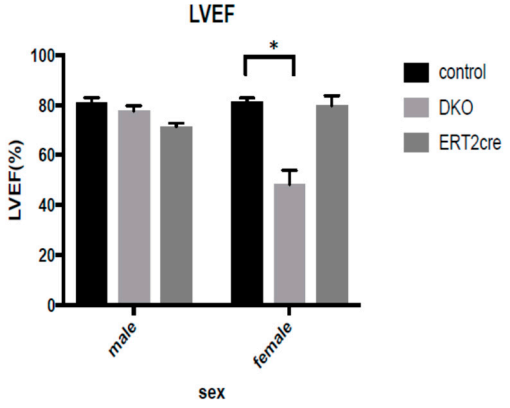
2. *G9a* 心筋特異的コンディショナルノックアウトマウス（G9a cKO）の解析

G9a cKO を作製しその心機能を解析した。G9a cKO は心機能に明らかな差を対照マウスと比較して認めなかったが、心筋において一部胎児型遺伝子の発現誘導が起きていることを確認した。現在、本マウス心臓に種々のストレスをかけその反応を解析している。

3. *LSD1* 心筋特異的コンディショナルノックアウトマウス（LSD1 cKO）の作製

LSD1 flox マウスと心筋特異的タモキシフェン誘導性 CRE マウスの交配を行い、心筋特異的誘導性 LSD1 ノックアウトマウスの作製、解析を開始し、現在継続中である。

タモキシフェン投与 8 週後の HDAC1/2 dcKO の左室収縮能



79. 心不全進展におけるエピゲノム制御因子の意義の解明

桑原　宏一郎

信州大学 医学部 循環器内科学

Key words：心不全，遺伝子発現，転写因子，エピゲノム

緒　言

慢性心不全は、予後不良の症候群であるとともに、その患者数の劇的な増加が問題となっており、病態解明に基づく新規予防・治療法開発が強く望まれる。慢性心不全の病態形成においては、病的ストレスにより惹起される心筋の形態学的、機能的な変化である心筋リモデリングが重要な役割を果たす。その過程では、最終分化した心筋細胞において一連の遺伝子発現変化が起こり、それらが心臓組織形態の変化と共に、最終分化形質の破綻からの心機能低下、心不全の進行に寄与する。こうした病的心筋リモデリング過程での心筋遺伝子発現変化の中で、特によく知られている現象が、胎児期の心室に認められるが、生後心臓の成熟と共に低下する一連の遺伝子発現プログラムが再誘導される、心筋胎児型遺伝子再活性化である。このような心筋胎児型遺伝子群の再活性化は、心不全の病態進行と相関するのみならず、心不全の進行そのものにも関与すると考えられている。したがって、心不全に至る過程における心筋胎児型遺伝子再活性化をはじめとする心筋遺伝子発現変化の分子メカニズムを明らかにすることが、慢性心不全の発症・進展に深く関わる分子機序の解明、さらには心不全に対する新規予防法、治療法確立のための標的分子の同定に繋がりうる。しかしいまだ最終分化した心筋細胞における遺伝子発現制御経路、特にその病的プロセスに関わる転写・エピゲノム制御因子の役割は明らかで無い点が多い。我々は、不全心において特徴的に認められるナトリウム利尿ペプチド、収縮蛋白、イオンチャネル、細胞内エネルギー代謝関連遺伝子などの遺伝子発現変化に関わる転写因子とその活性調節経路の解明を目指した研究を行ってきた。その結果、現在まで、心不全発症に至る病的心筋リモデリングに関与する複数の転写調節経路を明らかにしてきた［1，2］。我々は本研究において、これら転写制御経路の内、その機能低下が心機能破綻に関与する、NRSF 転写抑制複合体を構成する複数のエピゲノム制御因子の内、*HDAC1/2*、*G9a*、*LSD1* それぞれの心筋特異的ノックアウトマウスの作製をおこない、その解析から、HDAC1/2 の心筋恒常性維持における意義を明らかにし、また G9a の心筋遺伝子発現制御における意義を見出した。これら結果は最終分化した細胞の形質維持と破綻におけるエピゲノム制御因子の意義を明らかにするという点でも意義深いものである。現在これら結果を受け、さらにその分子機序なども含めさらなる解析を継続しているところである。

方　法

1. 心筋特異的薬剤誘導性*HDAC1/2*ダブルコンディショナルノックアウトマウス（dCKO）の解析による心筋形質維持におけるclass I HDACの意義の解明

我々は転写抑制因子neuron-restrictive silencing factor（NRSF）とclass IおよびIIヒストン脱アセチル化酵素（HDAC1/2およびHDAC4/5）との心筋における複合体形成を明らかにし、心臓機能維持におけるNRSF転写抑制複合体の役割と、その機能低下の心不全病態形成における意義を示した［1，3］。本研究では、HDAC1/2 floxマウスとalphaMHC-creERT2マウスを交配し、タモキシフェン誘導性心筋特異的*HDAC1/2*ダブルノックアウトマウス（HDAC1/2 dcKO）を作製し、本マウスの心臓の表現形質及びそこに関わる転写・エピゲノム制御機構と下流標的遺伝子を心エコーや心カテーテルを用いた生理学的解析、組織学的解析、Real-time PCRやDNA microarrayなどを用いた遺伝子発現解析や、ChIP-seqやレポーター遺伝子アッセイなどを用いたエピゲノム解析などの分子生物学的解析、western blotやゲルシフトアッセイなどによる生化学的解析など多面的な手法を用いて解析、検討した。

2. *G9a*心筋特異的コンディショナルノックアウトマウス（cKO）の解析による心筋形質維持におけるG9aの意義の解明

転写抑制に働くヒストンメチル化酵素G9aはNRSFとやはり複合体を形成するが、G9aの成熟心筋における心筋遺伝子発現制御、心機能制御における意義は不明である。本研究ではG9a floxマウスとalphaMHC-CREマウスを交配することにより心筋特異的*G9a*ノックアウトマウス（G9a cKO）を作製し、上記HDAC1/2 dcKO同様の解析を行った。

3. *LSD1*心筋特異的コンディショナルノックアウトマウス（cKO）の解析による心筋形質維持におけるLSD1の意義の解明

NRSFはHDACに加え、ヒストン脱メチル化酵素LSD1と複合体を形成するが、LSD1の心筋遺伝子発現制御および心筋形質維持における意義は明らかとは言えない。本研究では、上記G9a cKOと同様に、LSD1 floxマウスを用いて心筋特異的LSD1 cKOの作製を行った。

結果および考察

1. 心筋特異的薬剤誘導性 HDAC1/2 dcKO の解析による心筋形質維持における class I HDAC の意義の解明

HDAC1/2 dcKO ではタモキシフェン投与後、ANP、BNP など一部の心筋胎児型遺伝子の発現誘導が観察され、投与 4 週後よりメスにおいて心機能低下をきたし始め 8 週後には HDAC1/2 dcKO メスでは対照マウスに比べて顕著な左室収縮力の低下が認められた（図 1）。HDAC1/2 dcKO メスの心筋組織では対照マウスに比べて明らかな線維化の亢進も認め、1 年以内に約半数が死亡した。マイクロアレイ解析にて遺伝子発現を網羅的に解析したところ、HDAC1/2 dcKO メスの心室筋では心筋胎児型遺伝子および心房特異的遺伝子の発現亢進が認められ、その少なくとも一部は NRSF 転写抑制複合体により制御される遺伝子であることが確認された。またオスではタモキシフェンによるノックアウト誘導後、通常の飼育では左室収縮率の低下は明らかでなかったものの、圧負荷によるストレスを心臓に加えると対照マウスに同様の心負荷を加えた場合と比較してより顕著な心機能の低下が観察された。これら結果により NRSF-HDAC1/2 複合体の心筋恒常性維持における重要性が確認された。

2. G9a cCKOの解析による心筋形質維持におけるG9aの意義の解明

G9a cKO は少なくとも生後 20 週令まで明らかな心機能や心形態に異常を示さなかったが、心室の心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）の遺伝子発現は有意に更新していた。これらのことから G9a が心室における心筋遺伝子発現調節に寄与していることが示唆され、今後心負荷を加えるなどし、その機能的意義をさらに解析することとした。

3. LSD1 cCKO の解析による心筋形質維持における LSD1 の意義の解明

LSD1 cKO の作製を行った。現在その表現型を解析中である。

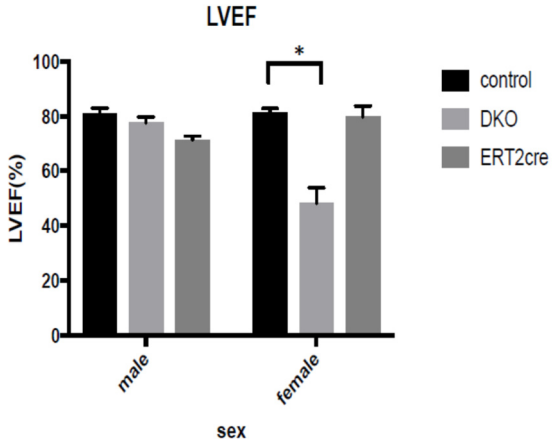


図1. タモキシフェン投与8週間後のHDAC1/2dcKOの左室収縮能
Control：HDAC1/2 floxマウス、DKO：HDAC1/2 cKOマウス、ERT2cre：ERT2creマウス、
*$p < 0.05$ by fisher's test。

共同研究者・謝辞

本研究で使用したマウスの一部は UTSW EN.Olson 先生（HDAC1/2 flox マウス）、理化学研究所の眞貝洋一先生（G9a flox マウス）、IGBMC の P.Chambon 先生（alhaMHC-cre ERT2 マウス）よりご供与いただいた。ここに謝辞を表する。

文　献

1） Kuwahara K, Saito Y, Takano M, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Takahashi N, Adachi Y, Takemura G, Horie M, Miyamoto Y, Morisaki T, Kuratomi S, Noma A, Fujiwara H, Yoshimasa Y, Kinoshita H, Kawakami R, Kishimoto I, Nakanishi M, Usami S, Saito Y, Harada M, Nakao K. NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. EMBO J. 2003 Dec 1;22(23):6310-21. DOI: 10.1093/emboj/cdg601

2） Kuwahara K, Wang Y, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Hill JA, Olson EN. TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. J Clin Invest. 2006 Dec;116(12):3114-26. Epub 2006 Nov 9. DOI: 10.1172/JCI27702

3） Nakagawa Y, Kuwahara K, Harada M, Takahashi N, Yasuno S, Adachi Y, Kawakami R, Nakanishi M, Tanimoto K, Usami S, Kinoshita H, Saito Y, Nakao K. Class II HDACs mediate CaMK-dependent signaling to NRSF in ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol. 2006 Dec;41(6):1010-22. Epub 2006 Oct 2. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2006.08.010