

## エピゲノム解析と分化転換を利用した新たな心筋分化機構の解明

橋本寿之

慶應義塾大学医学部 循環器内科・予防医療センター

### 【研究の背景】

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。我々はこのダイレクトプログラミング法において、一貫して転換効率を改善する方法の研究を行ってきた<sup>1-4)</sup>。我々はその過程で、心筋プログラミング因子により活性化されるエンハンサーの多くは心臓発生過程においても活性化されており、この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<sup>1)</sup>。このような知見から、今度は逆に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。

さらに我々は無作為に選択した約 1000 個のヒト遺伝子を用いた大規模なスクリーニングを行い、心筋への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が<sup>3)</sup>、これらの誘導因子がどのようなサブタイプの心筋細胞を誘導しているかは未解析である。

心疾患における致命的な不整脈の起源は心房筋や心室筋等の作業心筋のみならず、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存在する。しかし心臓発生における刺激伝導系形成の分子メカニズムに関しては依然として不明な点が多く、特殊心筋細胞を効率よく作成する技術は未だ確立されていない。

### 【目 的】

よって、本研究ではプログラミングを初期スクリーニングに利用し、我々が同定した心筋プログラミング誘導因子の中から特殊心筋細胞を誘導する因子を探索する。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。

### 【方 法】

マウス線維芽細胞においてレトロウイルスを用いて、我々がすでに報告している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プログラミング因子 (AGHMT) に追加し、心室刺激伝導系のマーカーである Cntn2 と Myl2 の発現を定量 PCR (qPCR) 法で確認する。その中で最も効果の強かった転写因子 (因子 X) を用いて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。また、因子 X 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 X 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】

我々はプログラミング効率を増幅する 29 個の因子の中から、心室刺激伝導系のマーカーである Cntn2 と Myl2 の発現を強く誘導する FOXL1 という転写因子を同定した。次に心筋プログラミング因子に FOXL1 を加えた心筋様細胞のトランスクリ

リプトーム解析を行ったところ、GO 解析で心室刺激伝導系に関連する遺伝子が全体的に強く誘導されていることが確認できた。また、ChIP-seq 解析でも FOXL1 は心室刺激伝導系遺伝子群の近傍に結合し、エンハンサーを活性化することが判明した。以上より、我々はマルチオミクス解析を用いて FOXL1 が心筋リ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。

### 【考 察】

FOXL1 は主に消化管に発現しているが、心臓にも発現している。しかし心臓における機能は未解析の興味深い転写因子である。そのため、今後は FOXL1 が心筋分化に及ぼす影響を解析するために、Tet-On 発現誘導システムを用いて分化段階毎に FOXL1 の発現を誘導し、免疫染色法と qPCR 法等を用いて Cntn2 や Myl2 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。最終的にはヒト細胞へと技術を応用することを目標としている。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

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。

### 【参考・引用文献】

1. **Hashimoto, H.**, Wang, Z., Garry, G.A., Malladi, V.S., Botten, G.A., Ye, W., Zhou, H., Osterwalder, M., Dickel, D.E., Visel, A., Liu, N., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. “Cardiac Reprogramming Factors Synergistically Activate Genome-wide Cardiogenic Stage-Specific Enhancers.” *Cell Stem Cell* 25, (1) 69–86 e65. (2019)
2. **Hashimoto, H.**, Olson, E.N., and Bassel-Duby, R. “Therapeutic approaches for cardiac regeneration and repair.” *Nat Rev Cardiol* 15, (10) 585–600. (2018)
3. Abad, M., **Hashimoto, H.**, Zhou, H., Morales, M.G., Chen, B., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. “Notch Inhibition Enhances Cardiac Reprogramming by Increasing MEF2C Transcriptional Activity.” *Stem Cell Reports* 8, (3) 548–560. (2017)
4. Zhou, H., Morales, M.G., **Hashimoto, H.**, Dickson, M.E., Song, K., Ye, W., Kim, M.S., Niederstrasser, H., Wang, Z., Chen, B., Posner, B.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. “ZNF281 enhances cardiac reprogramming by modulating cardiac and inflammatory gene expression.” *Genes & development* 31, (17) 1770–1783. (2017)