

令和 2 年 8 月 24 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860549

氏 名 村岡直人

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： シアトル （国名： 米国 ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
発生における染色体構造の空間時間的変化の障害と心疾患
3. 派遣期間：平成 30 年 8 月 25 日 ～ 令和 2 年 5 月 25 日
4. 受入機関名及び部局名
University of Washington School of Medicine, Department of Pathology
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入也可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入也可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

【研究・調査実施状況】

本研究は、派遣研究室の共同研究先である Zhijiu Duan 研究室で開発された新規染色体構造捕獲 (chromosome conformation capture: 3C) 技術である In situ DNase Hi-C (MaW et al, Nat Methods, 2015) を用いて、心筋分化における空間時間的な染色体高次構造の変化を明らかにし、染色体上でどのように局所または遠位で遺伝子が関わり合い、互いの発現を制御しているのかを解明する。さらには、その制御機構の破綻と心疾患の関連を明らかにするものである。Murry 研究室では Hi-C を用いた染色体 3D 構造の解析と RNA-seq 及び ATAC-seq と組み合わせて行うことで、心発生・疾患における遺伝子発現の制御機構を明らかにしてきた。具体的には、発生に関しては、筋特異的スプライシング因子である RBM20 が Titin の転写制御を行うこと、さらには Titin と異なる染色体上にある RBM20 標的因子との空間的な距離を制御することを明らかにした (Bertero et al., Nat Commu 2019)。心疾患に関しては、拡張型心筋症の表現型を示す Lamin A/C 心筋症の iPS 細胞由来心筋において、正常心筋とのグローバルな染色体高次構造の差異を明らかにしてきた (Bertero et al., JBC 2019)。

そこで、これまでに得られた知見を元に心筋成熟の新たなメカニズムに迫る研究を開始した。重度の心機能低下に対する心筋再生医療のため、移植に資する多能性幹細胞 (PSC: Pluripotent Stem Cell) 由来心筋細胞作製に向けた研究が活発行われている。留学先研究室では霊長類心筋梗塞モデルへのヒト PSC 由来心筋細胞の移植を行い、心機能改善の有効性を示した一方で、臨床応用に向け課題となる不整脈の出現も認めた (Liu et al, Nat Biotech, 2018)。その原因として移植心筋の電気生理学的な未熟性が示唆されたことから、機能的に成熟した心筋細胞の作製が求められている。In vitro の心筋作製では長期培養、電気機械的刺激、ホルモン添加等により成熟化は促進するが、成体期様心筋には至らず、胎児期に留まる (Karbassi E, Muraoka N et al, Nat. Rev. Cardiol, 2020)。心筋細胞は胎児期から成体期への移行する際に、ミトコンドリアの大きさ・数、クリステの複雑性が増すことで、酸化リン酸化を活性化し、成熟心筋の需要に見合う大量の ATP 産生を可能とする。この代謝の変化が心筋の機能的成熟化を誘導する可能性は示されているが (Mills et al, PNAS, 2017)、詳細な検討はこれまでに報告されていない。本研究では、成体期心筋細胞に存在する成熟したミトコンドリアを未熟な PSC 由来心筋細胞に輸送することで、解糖系から酸化リン酸化へと代謝を移行させ、機能的成熟化の促進を検討する (図 1)。

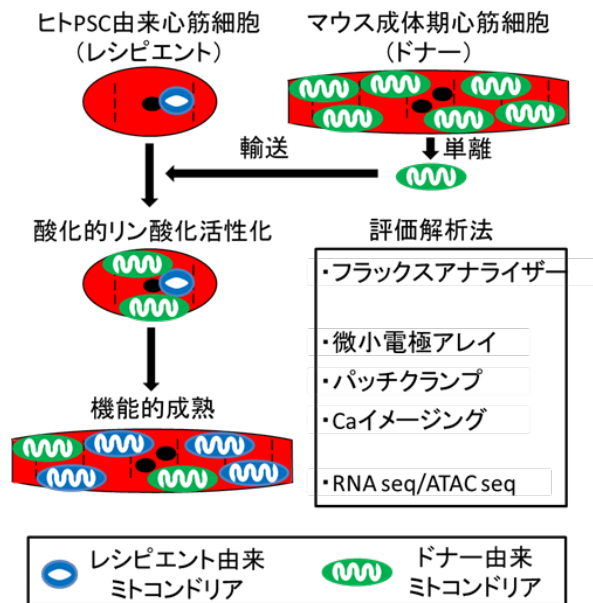


図 1: ミトコンドリア輸送による心筋成熟

1. ミトコンドリア単離・輸送技術の確立と代謝変化の確認

まずは、ヒト PSC をドナー、ヒト PSC 由来心筋細胞をレシピエントとして、ミトコンドリアの単離と輸送の技術を確認する。ミトコンドリアが染色されたドナー細胞からホモジェナイズ、遠心分

離によりミトコンドリアを単離する。ミトコンドリアのみ緑色蛍光蛋白を発現するヒトPSC (TOM20-GFP cell line)を用いて、目的であるミトコンドリアの単離の成否を明らかとした。さらには単離されたミトコンドリアが膜電位の保たれた健全なミトコンドリアであることを膜電位依存性の各種染色 (mitoTracker Red, JC-1, TMRM) により確認し (図 2)、ミトコンドリア単離方法を確立した。

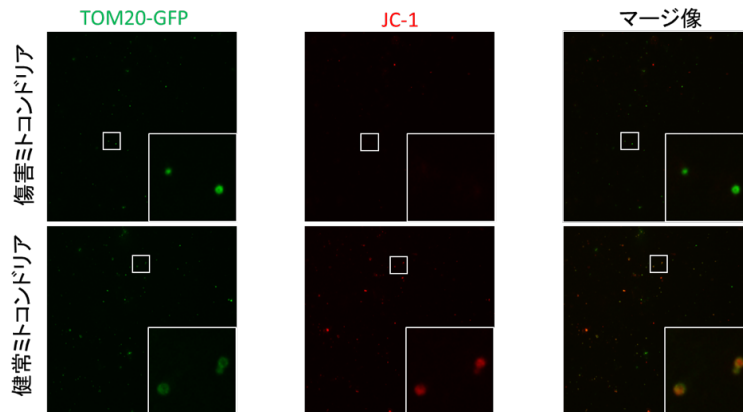


図 2: 単離ミトコンドリア (上段: FCCP 添加あり、下段: FCCP 添加なし)

次に、単離されたミトコンドリアをレシピエント細胞と混合の上、遠心分離を行うことで、レシピエント細胞への輸送を行い (Kim et al, Sci Rep, 2017)、輸送 24 時間後にフローサイトリーと免疫染色により、ドナー由来ミトコンドリアのレシピエントへの移行が確認された (図 3, 4)。

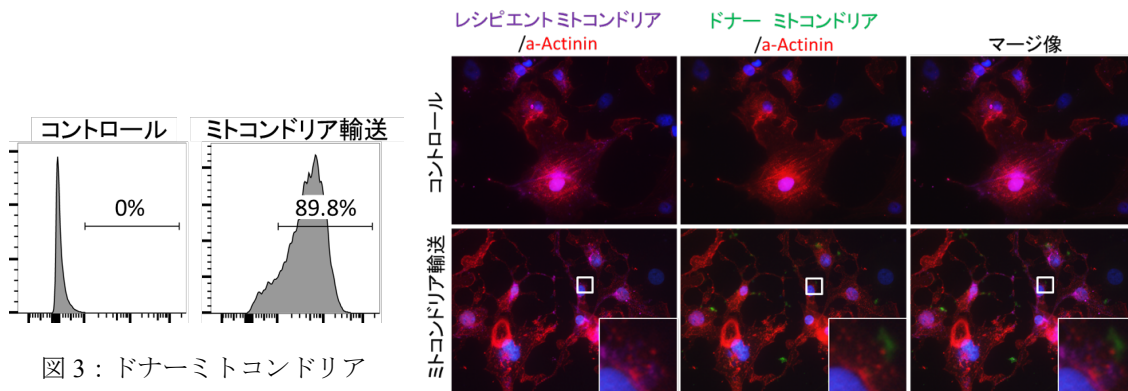


図 3: ドナーミトコンドリア陽性レシピエント細胞

図 4: ドナーミトコンドリア陽性レシピエント細胞

続いて、成体期マウス心筋細胞をドナー、ヒトPSC由来心筋細胞をレシピエントとして、前述の手法によりミトコンドリア単離と輸送を行ったところ、輸送後 24 時間、さらには 5 日でもドナー由来ミトコンドリアがレシピエント内に存続することを確認した (図 5)。今後は代謝の変化をフラックスアナライザーで評価する。

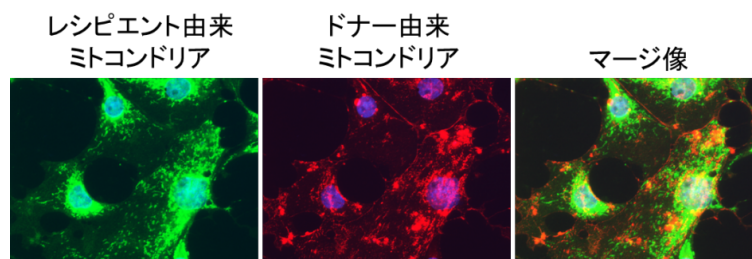


図 5: ドナー由来ミトコンドリアのレシピエント細胞内への輸送(輸送後 5 日)

2. 代謝変化による機能的成熟化及びそのメカニズム解明

ヒトPSC由来心筋の代謝変化を確認後、電気生理学的検査を用いて、機能的成熟化を評価する。具体的には、微小電極アレイによる細胞外電位、パッチクランプによる活動電位、Caイメージングによる細胞内Ca動態を評価する。また、ミトコンドリア輸送前、輸送による代謝変化後、機能的成熟後の各段階、さらには成体期心筋のRNA-seq及びATAC-seqの結果を比較検討することで、遺伝子発現及びエピジェネティックレベルでのグローバルな成熟段階を評価すると共に、代謝変化による成熟化のメカニズムに迫る。

【成果の発表・関係学会への参加状況等】

該当なし