

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10219

研究課題名(和文) 幹細胞移植による心筋再生療法-アクチン重合制御因子Fhod3を用いた新たな試み-

研究課題名(英文) Myocardial regenerative therapy by stem cell transplantation with actin-organizing protein Fhod3

研究代表者

帯刀 英樹 (Tatewaki, Hideki)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：40343321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期において、Fhod3は心臓の発生と心筋の成熟に重要であることを示した。新生仔期の心臓においても、Fhod3が心筋の成熟に必須であることを示した。一方で、成獣期の心臓では、Fhod3を後天的に欠失させても生存に影響しないことを示した。また、成獣期にFhod3を後天的に欠失させたコンディショナルノックアウトマウスでは、 β 1アドレナリン受容体刺激に対する応答性が高く、Fhod3が心機能調節に関与している可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文)：At the embryonic stage, Fhod3 is crucial of cardiac development and achievement of myofibril maturation. The cardiac-specific deletion of Fhod3 in the perinatal stage leads to neonatal lethality, indicating that Fhod3 is essential to myocardial maturation in the normally developed heart.

On the other hand, its specific deletion in the adult heart does not significantly affect the survival. Moreover, the biological response for systemic stimulation with the β 1-adrenergic receptor agonist increases more in adult Fhod3-deleted mice, indicating that Fhod3 is associated with functional maintenance of the adult heart.

研究分野：心不全外科学

キーワード：心不全 心筋疾患 サルコメア 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

心疾患は、本邦での死亡原因の上位に位置し、特に、うっ血性心不全に陥った場合の死亡率が年間 20%に及ぶとも言われている。心不全死をいかにして減らすかが、現代の課題であり、その治療戦略にはいまだ改善の余地がある。心臓移植が伸び悩んでいる現状においては、心臓移植の代替となる効果的な治療法の確立が急務である。

骨髄由来幹細胞移植はすでに臨床応用されている治療法が存在するものの、移植された幹細胞自体が心筋細胞へ分化したことはいまだに確認されていない。治療効果は、骨髄由来細胞からのサイトカイン分泌による血管新生や心筋幹細胞分化誘導の促進、炎症反応や瘢痕形成の抑制などの二次的な効果であると考えられており、その治療効果は限定的と言わざるを得ない現状がある。移植効果を十分に発揮させるためには、幹細胞移植の技術を応用した、従来とは異なったアプローチによる心筋再生を促す必要があると考えられる。

これまでに、我々は、心筋細胞における恒常性の維持に関係する研究を行ってきた。特に、単量体アクチンの重合によるアクチンフィラメント形成を制御する Formin ファミリーに属する Fhod3 に着目し、これまでに以下の研究成果を発表してきた。

- ・ Fhod3 は、心筋細胞に特異的に発現し、ラット培養心筋細胞においてサルコメア形成を促進する。

- ・ Fhod3 を遺伝的にノックアウトしたマウスは、胎生致死となり、その死亡原因は心不全死である。

- ・ Fhod3 を遺伝的にノックアウトしたマウス胎児に Fhod3 を強制発現させることで、Fhod3 が胎生期の心臓発生段階において心筋サルコメアの形成に重要な役割を果たす。

- ・ Fhod3 のサルコメア内での局在は、胎生期と成獣期とで同様である。

これらの事実より、成獣においても、Fhod3 が心筋サルコメア形成に対して何らかの役割をはたしているのではないかと、いう次なる仮説に行きついた。さらに、Fhod3 が果たす心筋サルコメア形成に対する役割は、病的な心筋細胞に対しても修復機転に関与する役割を持っているのではないかと、この仮説に発展した。

そこで、我々が、着目している Fhod3 を心筋細胞内に導入することができれば、従来の治療法と異なったメカニズムにより心筋細胞の再生を導くことができる可能性を模索し、新規の心不全治療につながるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

心臓における Fhod3 の役割を明らかにすることを研究の主たる目的とし、将来的な新規心不全治療の可能性を模索するものである。

3. 研究の方法

Fhod3 遺伝子を欠失したノックアウトマウスおよび時期特異的・心臓特異的に Fhod3 遺伝子を欠失させるコンディショナルノックアウトマウスを作出した。

心形態および組織学的・生化学的検討を行った。特に、サルコメア構造の確認およびサルコメア関連蛋白質の局在の確認には、免疫染色・電子顕微鏡による評価を行った。また、過去に精製した Fhod3 蛋白質を認識する特異的な抗体を用いて、発現蛋白質の検出に使用した。

さらに、成獣期コンディショナルノックアウトマウスに対し、薬剤持続投与モデルを作成した。薬剤投与群とコントロール群との比較のために、蛋白質レベルまたは mRNA レベルでの心不全マーカー・心肥大シグナル関連因子の発現を確認するとともに、心エコー装置を用いての心機能評価（左室拡張末期径、左室収縮末期径、心室中隔径、左室後壁径、左室駆出率、左室心筋重量）を行った。

4. 研究成果

過去に報告した論文では、胎生後期に発現するプロモーターを用いて、Fhod3 遺伝子欠失マウスの心臓に Fhod3 を強制発現させ、その効果を確認したが、本研究では、胎生早期より心臓特異的に発現する別のプロモーターを用いて、Fhod3 遺伝子欠失マウスの心臓で Fhod3 強制発現の効果を確認した。これにより、胎生早期から発現する Fhod3 が心臓の発生と胎生期における心臓の発達に重要であることを示した。

続いて、周産期に心臓特異的に Fhod3 遺伝子を欠失させるコンディショナルノックアウトマウスを作出し、解析を行った。このコンディショナルノックアウトマウスはほぼ全例が新生仔期に死亡した。Fhod3 蛋白質の心筋細胞内での減少に伴い、サルコメア構造の破綻を認めた。正常発生した心臓においても Fhod3 が心筋の成熟に必須であることを示した。

一方で、成獣期に心臓特異的に Fhod3 遺伝子を欠失させるコンディショナルノックアウトマウスを作出し、解析した。新生仔期には必須である Fhod3 を、成獣期に後天的に欠失させても生存に影響しなかった。さらに、Fhod3 蛋白質が心筋細胞内で減少しても、サルコメア構造は破綻しなかった。この点で、Fhod3 は成獣期では少なくとも生存に影響し

ないことを示した。また、後天的に Fhod3 を欠失させたマウスでは、1 アドレナリン受容体刺激に対する応答性が高く、Fhod3 が心機能調節に関与している可能性があることを示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Noriko Fujimoto, Meikun Kan-O, Tomoki Ushijima, Yohko Kage, Ryuji Tominaga, Hideki Sumimoto, Ryu Takeya.

Transgenic expression of the formin protein Fhod3 selectively in the embryonic heart: role of actin-binding activity of Fhod3 and its sarcomeric localization during myofibrillogenesis.

PLoS One 2016;11(2):e0148472 2016

(査読あり)

2. Tomoki Ushijima, Noriko Fujimoto, Sho Matsuyama, Meikun Kan-O, Hiroshi Kiyonari, Go Shioi, Yohko Kage, Sho Yamasaki, Ryu Takeya, Hideki Sumimoto.

The actin-organizing formin protein Fhod3 is required for postnatal and functional maintenance of the adult heart in mice.

Journal of Biological Chemistry

2018;293(1):148-162

(査読あり)

3. Sho Matsuyama, Yohko Kage, Noriko Fujimoto, Tomoki Ushijima, Toshihiro Tsuruda, Kazuo Kitamura, Akira Shiose, Yujiro Asada, Hideki Sumimoto, Ryu Takeya
Interaction between cardiac myosin-binding protein C and formin Fhod3

Proc Natl Acad Sci U.S.A

2018;115(19):E4386-E4395

(査読あり)

[学会発表](計 4 件)

1. 藤本智子、牛島智基、神尾明君、武谷立、住本英樹

心筋サルコメア形成過程における formin 蛋白質 Fhod3 の局在と機能

第 38 回日本分子生物学会年會/第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (2015 年)

2. 牛島智基、藤本智子、神尾明君、鹿毛陽子、武谷立、住本英樹

マウス心発生および心機能維持における formin 蛋白質 Fhod3 の役割

第 39 回日本分子生物学会年會 (2016 年)

3. 牛島智基、藤本智子、神尾明君、武谷立、住本英樹、塩瀬明
クチン重合制御因子 Fhod3 が心発生および心機能維持に果たす役割の解析
第 121 回日本循環器学会九州地方会(2017 年)
Young Investigator Award セッション

4. 牛島智基、藤本智子、松山翔、神尾明君、清成寛、塩井剛、鹿毛陽子、山崎晶、武谷立、住本英樹
マウス心臓の出生後発達と心機能維持におけるフォルミン蛋白質 Fhod3 の役割
第 69 回日本細胞生物学会大会 (2017 年)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

帯刀 英樹 (TATEWAKI, Hideki)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 40343321

(2)研究分担者

大石 恭久 (OISHI, Yasuhisa)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 20529870

研究分担者

藤本 智子 (FUJIMOTO, Noriko)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 40567377

研究分担者
牛島 智基 (USHIJIMA, Tomoki)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：70529875