

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18952

研究課題名(和文)メカニカルストレスによる心筋のダイレクトリプログラミング制御機構の解明

研究課題名(英文)Mechanical stress induce the direct reprogramming to cardiomyocytes

研究代表者

宮坂 恒太(Miyasaka, Kota)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：20590300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：心臓を構築するのは7割以上が非心筋細胞で、そのほとんどが心筋繊維芽細胞である。本研究では、この心筋繊維芽細胞に、心拍動を模した伸展刺激を負荷することで、心筋分化マーカーの発現亢進、および、糖代謝から脂質代謝への代謝変換が起きることを明らかにした。さらに、特殊な処理により、心臓細胞を全て脱落させた心臓の骨組みに、心筋繊維芽細胞を再播種し、伸展刺激を負荷することで、一部の心筋分化マーカーの発現が上昇することを見出した。研究期間内に、自律拍動する心筋細胞を機械刺激によってのみ誘導することはできなかったが、伸展条件や培養方法等のノウハウを蓄積することができ、今後の研究の進展に大いに役に立つだろう。

研究成果の概要(英文)：It is known that more than 70% of cells consist the hearts are non-cardiomyocytes, most of which are myocardial fibroblasts. In this study, it was revealed that myocardial fibroblasts are loaded with stretching stimulus that simulates heart beat, and metabolic conversion from glucose metabolism to lipid metabolism occurs due to the expression of myocardial differentiation markers. Furthermore, it was found that the expression of some cardiomyocyte differentiation markers were elevated by stretching stimuli in re-seeding myocardial fibroblasts in the scaffold of the heart where all cardiac cells were dropped by special treatment. Within the research period, I could not induce autonomously beating heart muscle cells by mechanical stimulation, but know-how such as extension conditions and culture methods can be accumulated and will be of great help to future research progress .

研究分野：分子生物学、生理学

キーワード：メカニカルストレス 心筋細胞 ダイレクトリプログラミング 伸展刺激 脂質代謝 脱細胞処理

## 1. 研究開始当初の背景

成熟した心筋細胞は増殖能を持たず、心筋梗塞などの心疾患を患った場合、心筋細胞は壊死し、繊維芽細胞と入れ替わることで心臓の収縮力が低下する。現代社会において、循環器疾患は増加傾向にあるが、重篤な心疾患の患者に対しては**心臓移植以外の有効な治療法は存在せず**、新たな治療法の開発が望まれている。そんな中、注目を集めているのが、最終分化した体細胞を iPS 細胞を経由せずに目的の細胞に直接転換する、**ダイレクトリプログラミング**であり、家田らは繊維芽細胞に心臓発生に重要な心筋特異的転写因子 (**Gata4, Mef2c, Tbx5 : GMT**) を導入することで繊維芽細胞から直接心筋細胞 (induced cardiomyocyte : iCM) を作成することに成功した (Ieda ら 2012)。繊維芽細胞は心臓を構成する細胞の 70% を占めるため、この技術を応用することで心臓再生への道が拓けることが期待されるが、GMT を導入し iCM を誘導できる効率は **1 % 未満** であり、治療に応用していくためには、GMT の導入だけでは不十分であると考えられる。

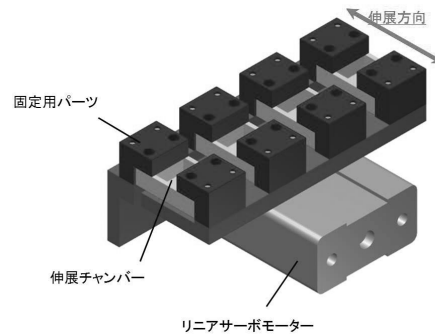
そこで申請者は、心筋へのダイレクトリプログラミングのための新たな因子として、組織に負荷される**物理的な刺激 (メカニカルストレス)**に着目した。

メカニカルストレスとは生体が常に曝されている物理的刺激のことで、心臓や血管などの組織は、このストレスに適応的に応答することで、組織の機能や恒常性を維持をしていると考えられている (Hahn ら 2009)。心臓発生とメカニカルストレスにも密接な関係があり、申請者は心臓の発生時に拍動を強制的に停止させると、心筋細胞の増殖やルーピング、心筋のサルコメア構造の形成が阻害される現象を発見し、その分子機構として**メカニカルストレス依存的に発現が変化する microRNA の関与**を明らかにした (Miyasaka ら 2009)。さらに、心臓の弁形成に重要な microRNA である miR-21 が、血流依存的に弁予定域に発現し、弁形成を促進する分子機構を明らかにすることで (Banjo ら 2013)、心臓が正常に発生するためには拍動や血流が必要であることを世界で初めて示した。さらに他の研究グループからは心筋細胞に伸展刺激を負荷することでサルコメアのリモデリングが観察されるという報告もある (Yu ら 2005)。

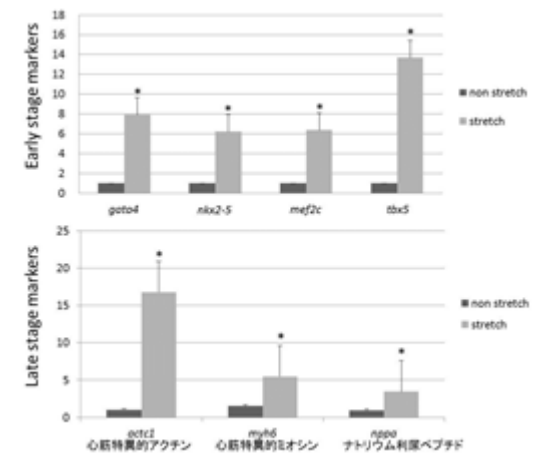
これらの結果から申請者は、**メカニカルストレスが心筋の成熟に必要な不可欠な因子**であり、心筋へのダイレクトリプログラミングを誘導するのではないかと考え、ラット由来の心臓線維芽細胞 (H9c2) に特定のメカニカルストレス (伸展刺激) を負荷する実験を行った。すると興味深いことに、内在性の GMT をはじめとする心筋分化に関わる遺伝子の発現が誘導され、心筋特異的なアクチン

やミオシンの発現が上昇した。さらに脂質代謝関連遺伝子の発現も顕著に上昇していた。つまり、**GMT などの外来因子を導入することなく、伸展刺激というストレスのみで心筋へのダイレクトリプログラミングを誘導することに成功した**。本申請研究ではこの結果を受けて、心筋へのダイレクトリプログラミングのメカニカルストレス依存的な分子機構を解明し、最終的に心臓の再構築を目標とする。

以下の図 1 は、細胞に伸展刺激を負荷するための細胞伸展装置の概略図。



以下の図 2 は、この伸展装置を用いて伸展刺激を負荷した H9c2 細胞における心筋分化マーカーの発現変化のグラフ。薄いグレーで示される伸展細胞での各マーカーの発現が、濃いグレーで示される非伸展細胞の発現量より有意に高い。



## 2. 研究の目的

**本申請研究の目的は、メカニカルストレス依存的な繊維芽細胞から心筋へのダイレクトリプログラミングの分子機構を解明し、生体において心臓を再構築することである。**

ダイレクトリプログラミングは最終分化した体細胞を、iPS などの幹細胞を経由せずに、直接目的組織の細胞へと分化させる実験手法である。近年の研究により、遺伝子導入によって繊維芽細胞から心筋細胞を直接誘

導することが可能になったが、その効率は極めて低い。本申請研究では、心筋へのダイレトリプログラミングに、伸展刺激などのメカニカルストレスが重要であると想定し、その分子機構を解明することを目的としている。さらに、最終的には、細胞単位ではなく心臓組織全体を再構築し、機能させることを目標とする。

#### メカニカルストレスにより誘導された心筋の機能評価

メカニカルストレス依存的な心筋へのダイレトリプログラミングを示す根拠は、現在のところ**遺伝子発現解析のみ**である。そこで、すべての研究に先立ち、メカニカルストレスによって誘導した心筋細胞において、心筋を構成する収縮構造のタンパクの免疫化学染色による可視化を行い、**正常に機能する心筋細胞であるか**、その機能を評価する。また、心筋の成熟には糖代謝から脂質代謝への代謝変換が伴うことが知られており、機能の評価のために細胞内の代謝能にも着目して解析を行う。

#### メカニカルストレス依存的な心筋ダイレトリプログラミングの分子機構の解明

メカニカルストレスが細胞によって受容され、物理的な刺激が生化学的なシグナルに変換される分子機構を**メカノトランスダクション**と呼ぶが、メカニカルストレス依存的なダイレトリプログラミングにおける機構は明らかになっていない。これを解明することは、**分化効率の改善や個体への応用を考慮するうえで非常に重要**である。

#### 心臓の再構築

ラットの生体から摘出した心臓を界面活性剤を含む溶液で還流すると、**細胞外基質を残して細胞がすべて剥離**することが知られている(Ottら 2008)。この技術を応用し、細胞外基質のみにした心臓に細胞を播種して、メカニカルストレスを負荷することでダイレトリプログラミングを誘導し、**心臓を再構築**できるか検証する。形成された再生心臓に対しては、上述のような機能評価や電子顕微鏡による構造の観察を行い、生体への移植にも挑戦する。

### 3. 研究の方法

#### (1) メカニカルストレスによって誘導された心筋の機能評価

伸展刺激によってダイレトリプログラミングを誘導した細胞において、心筋の構造タンパクであるアクチニンやミオシンの免疫染色やフローサイトメーターを使用し、心筋に分化していることを示す。生体における心筋成熟の際には、糖をエネルギー源とする糖代謝から、脂肪酸をエネルギー源

とする脂質代謝への変換が伴うことが知られているが、本申請研究のダイレトリプログラミングにおいても、同様の変換が起きているかを確認する。

#### (2) メカニカルストレス依存的な心筋ダイレトリプログラミング機構の解明

GMTをはじめとする、心臓発生に必要な転写因子をノックダウンすると、伸展刺激による心筋へのダイレトリプログラミングが起こらなくなることが申請者によって確かめられているが、その中でも申請者が注目しているのが、ある転写制御因子(以下、MSTF とする)である。本申請研究ではこの MSTF をメカニカルストレス依存的な心筋ダイレトリプログラミング因子の候補として検証を行う。この因子のノックダウンによって心筋誘導がキャンセルされているか、研究目的(1)の検証方法に則って解析する。さらに、プロモーターアッセイやクロマチン免疫沈降によって、MSTF が**メカニカルストレス依存的に心筋分化関連因子のプロモーターにリクルートされるか**確認する。

しかし一方で、心筋におけるミトコンドリアの活性は、心臓発生に必要な転写因子の発現を制御することが知られており(Kasaharaら 2013)、ミトコンドリアの機能異常は心筋分化を抑制する。伸展刺激による心筋分化に関しても、MSTF のような単一の遺伝子の機能により分化が誘導されて代謝が変化するのか、もしくは代謝が大きく変化した結果、心筋へと分化するのか、どちらが優位に起きているのかを慎重に検討する必要があると考えられる。その点に関して、核内受容体が細胞内の代謝変化と筋分化の両方に関与するとの報告があり(Choら 2013)、特に ERRg のノックアウトマウスは、心筋における糖から脂質への代謝変換が起こらず生後すぐに死亡することが知られている(Alaynickら 2007)。メカニカルストレスと核内受容体の拮抗剤や作動薬、代謝阻害剤を組み合わせ、メカニカルストレス依存的な核内受容体の活性化機構を考察し(ストレス負荷により内在性のアゴニストやアンタゴニストが核移行するなど)心筋ダイレトリプログラミングにおけるメカノトランスダクションを解明する。

#### (3) 心臓組織の再構築

心臓に界面活性剤を環流して細胞外基質のみを残す手法はラットで報告されたものだが、本申請研究では、細胞外基質のみにしたマウスの心臓に線維芽細胞を播種し、心臓ごと、もしくは左心室部分を小片にして直接伸展刺激を負荷して**ダイレトリプログラミングを誘導し、心臓の再構築を目指す**。伸展の際には保持のためコラーゲンゲル等に包埋する。単層培養とは環境が大きく異なる

ことが推測されるため、**伸展の条件は詳細に再検討する必要がある**と考えられる。刺激を負荷した組織は、電子顕微鏡による観察や電気生理学的な解析を行い、心臓が機能しているか検証する。細胞懸濁液の環流は大動脈弓から行うが、繊維芽細胞を環流させた後、血管内皮細胞を環流することで、冠動脈や心内膜組織の再構築を目指す。

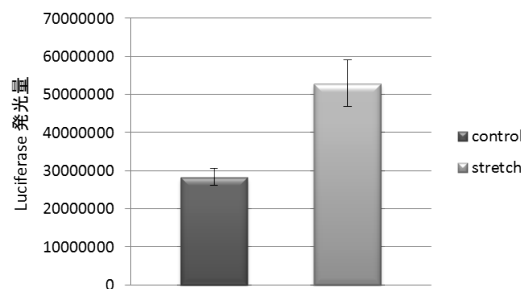
#### (4) 研究遂行の工夫

本申請研究の目的は、**外来遺伝子を必要としないメカニカルストレスによる心筋へのダイレクトリプログラミング制御**であるが、現時点では心筋への分化誘導を示す証拠は遺伝子発現の変化のみである。研究を遂行するに当たり、メカニカルストレスだけでは十分な誘導効率が得られないと判断した場合には、外来遺伝子の導入も検討する。しかし、その際には心筋発生に必要な転写因子に限らず、脂質代謝を制御する核内受容体などの導入も検討し、他の研究との差別化を図る。

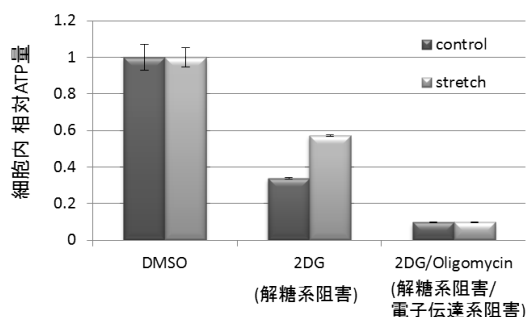
#### 4. 研究成果

(1) 伸展刺激を負荷した心筋線維芽細胞を、アクチニンで染色したところ、伸展細胞でのみ、アクチニン陽性細胞が確認された。また、解糖阻害剤と脂肪酸酸化の阻害剤で段階的に処理して、細胞内のATP濃度を計測することで、伸展刺激を負荷した細胞では、糖よりも脂質をおもなエネルギー源として、ATPを産生していることが明らかとなった。

下図3、伸展細胞でのATP量は、非伸展細胞より有意に高かった。



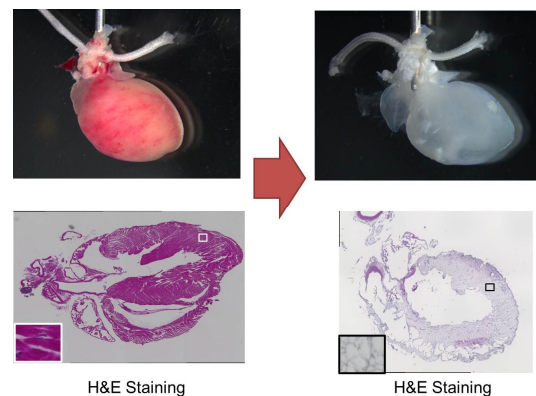
下図4、伸展細胞のATP産生は電子伝達系に依存していることが分かる。



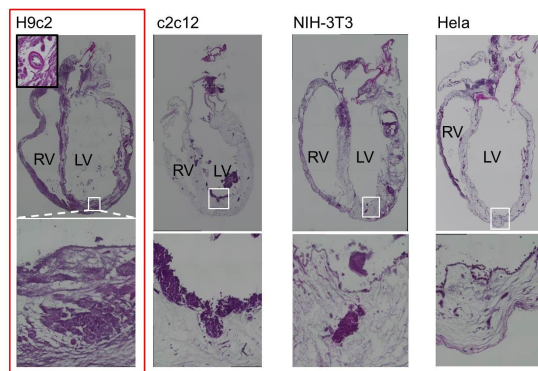
(2) MSTFのノックダウンによって、伸展刺激依存的な心筋分化マーカーの発現の誘導効率が優位に低下することを示した。また、これらの細胞では、アクチニン陽性細胞は確認されず、糖を主なエネルギー源としていることも明らかとなった。これらの結果は、少なくとも、一部の機能において、MSTFはメカニカルストレス依存的な心筋分化を制御していることを示唆している。

(3) 生体マウスから摘出した心臓を界面活性剤で処理し、心筋繊維芽細胞を播種して培養する実験を立ち上げた。先行研究では細胞の播種をシリンジによる局所注入によって行っていたが、この手法は再現性に乏しく、自ら新たな新手法を開発する必要があった。そこで、脱細胞処理に用いた環流系に、そのまま細胞外基質と心筋繊維芽細胞をかん流させることで、高効率の細胞再播種に成功した。この再構築心臓組織を、コラーゲンゲルに包埋して、ゲルごと伸展刺激を負荷した。伸展後の心臓組織では、心筋分化マーカーの発現上昇や心筋特異的なタンパクの発現量の増加が確認されたが、自律拍動が可能なまでには分化は進行しなかった。

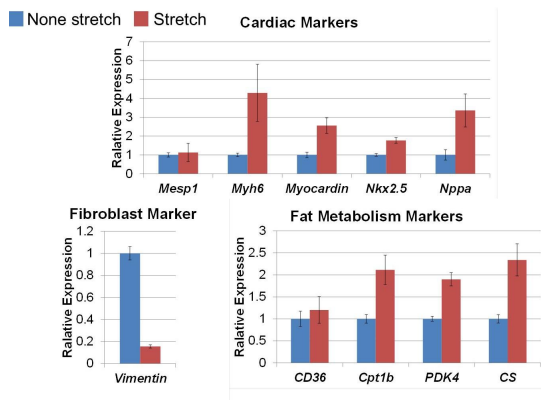
下図5、左は摘出したマウスの正常心臓。右は環流処理により脱細胞した心臓。下はそれぞれの薄切切片画像。



下図6、脱細胞心に細胞を再播種した。細胞種によって心臓の細胞骨格足場への接着性に差が見られた。



下図 7、脱細胞後に細胞を再播種し、伸展刺激を荷した再構成心臓組織において、心筋分化マーカーの発現上昇、および繊維芽細胞マーカーの発現低下が確認された。



本研究機関では、自律拍動する心筋細胞を機械刺激にのみで誘導することはできなかったが、今後の研究によって、これらの機械的刺激負荷の実験系を改良し、細胞遺伝学的な手法をと併せることによって、更なる分化効率の上昇や、心筋の最終分化の誘導などが可能になるのではないかと期待している。

#### 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 2 件)

宮坂恒太、細胞と細胞外基質間のメカノトランスダクションによる分化制御機構、実験医学、査読なし、34 巻、2016 年、54-61 頁

宮坂恒太、久保純、小椋利彦、生体におけるメカノトランスダクション、Clinical Calcium、査読なし、26 巻、2016 年、79-86 頁

〔学会発表〕(計 1 件)

宮坂恒太、メカニカルストレスは細胞内の代謝変化を誘導し細胞分化を制御する、第 39 回日本分子生物学会、2015 年 12 月 1 日～2015 年 12 月 4 日、兵庫県神戸市 神戸コンベンションセンター

〔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

宮坂 恒太 (MIYASAKA, Kota)  
 東北大学・加齢医学研究所・助教  
 研究者番号：20590300

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )