

令和元年6月22日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09497

研究課題名(和文) 出生後早期発現遺伝子群による心筋細胞増殖制御およびその分子機序の検討

研究課題名(英文) The investigation of the role of early-postnatal expressing genes in cardiomyocyte proliferation

研究代表者

中島 康弘 (NAKASHIMA, YASUHIRO)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：20565585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞の増殖能が失われる出生後早期に発現が変化する遺伝子群のうち、細胞増殖制御に関わる候補遺伝子を同定し、その分子機能の検討を行った。心臓での経時的発現変化を示す遺伝子群の一部は非心筋細胞由来であった。心筋細胞に発現し出生後経時的に発現低下を認める遺伝子のうちCRP1は、成体心筋細胞で発現するファミリー分子MLPと、in vitroでの増殖性、遺伝子発現調節に対して異なる作用を持つことが示され、胎生期心筋細胞特異的な細胞機能への関与が示唆された。また、MLPの心筋症を来すヒト遺伝子変異は、細胞内局在や遺伝子発現制御に異常を来すことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRP1およびMLPは心血管疾患に関わる遺伝子であるが、その分子機能については未だ不明な点が多い。本研究ではその分子機能やヒト変異における分子機能異常について新たな知見を見出した。これらの機能解明は心血管疾患の成因、病態および遺伝的要因の意義についての理解をさらに進める上で重要であり、より優れた治療・予防法・リスク評価の構築につながるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the molecular function of the genes that are expressed in the heart specifically before early-postnatal stage and also promote cell proliferation. Part of the genes were expressed specifically from non-cardiomyocytes. It was shown that CRP1 was expressed specifically in fetal and neonatal cardiomyocytes and also promoted the proliferation of cardiac myoblast cell line, and that CRP1 and MLP, its family gene expressed in cardiomyocytes over adulthood had a distinct effect on proliferation and gene expression, suggesting that the difference of expression level of these LIM proteins, at least in part, would potentially lead to a distinct cell function between fetal and adult cardiomyocytes.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋分化 細胞増殖 心発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

心筋細胞は終末分化すると増殖能を失い、成体では心筋細胞はほとんど増殖しないと考えられているが、その機序についてはよくわかっていない。胎生期の心筋細胞は増殖により心臓のサイズを増大させ、心臓転写因子やシグナリング分子の遺伝子改変によって心筋細胞増殖の促進も見られる (rf1, Nakashima-Y *et al* 2014)。生後まもなくの間は哺乳動物の心臓でも心筋細胞の増殖がみられるという報告が近年散見され、マウス新生仔に心筋梗塞を起こすと、心筋細胞増殖活性の亢進を伴って心筋組織が再生するとの報告がある。一方、生後1週間を越えると同再生はおこらず、線維化組織により修復される。出生直後には増殖能を持つ心筋細胞が存在するが、生後短期間のうちに増殖能を失うと考えられるが、そのメカニズムは不明である。心筋細胞が増殖能を持つ時期に発現している遺伝子群が、生後の心筋細胞の増殖制御に重要と考え、それらの遺伝子群の働く分子機序について検討を行う。

## 2. 研究の目的

本研究では、心筋細胞の増殖能が失われる出生後早期に発現が変化する遺伝子群のなかから細胞増殖制御に関わる候補遺伝子を同定し、その分子機序を検討する。

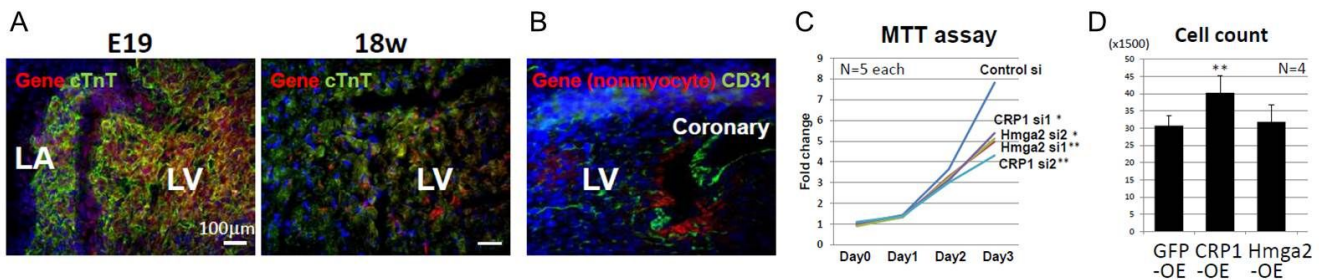
## 3. 研究の方法

心筋細胞の増殖能が失われる出生後早期に発現が低下し、かつ細胞増殖を促進する遺伝子の機能について各種分子生物学的手法により検討を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 出生後の心筋細胞での発現低下および細胞増殖能への関与を示す遺伝子の同定

出生後早期にマウス心で mRNA 発現レベルが経時的に低下する遺伝子群において、心筋細胞での発現変化かどうか、培養細胞での増殖能への関与について検討した (図 1)。マウス心での免疫染色において、一部の遺伝子では出生後に心筋細胞での発現低下を認めた (図 1A)、非心筋細胞でのみ発現するものも見られた (図 1B)。心筋細胞での発現変化を認める遺伝子のうち、CRP1 (Cysteine and Glycine Rich Protein 1) は培養細胞 (H9C2) において、siRNA によるノックダウン (KD) による増殖能の低下 (図 1C)、過剰発現による細胞数の増加を認め (図 1D)、細胞増殖能への関与が示唆された。



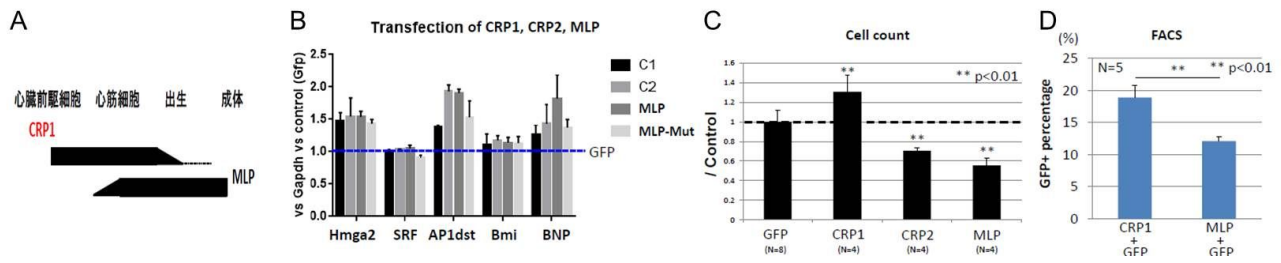
(図 1) A, B; マウス心臓組織での候補遺伝子の発現、C, D; H9C2 における KD および過剰発現

### (2) CRP1 のファミリー間での分子機能の相違についての検討

CRP1 は LIM protein の一つで、ファミリー分子に CRP2、MLP (Muscle LIM Protein) があり、これらは LIM domain からなる相同性の高い構造を持つ。また、核移行シグナルを持ち、細胞質および核に発現がみられる。MLP は心筋細胞に発現するが、発生初期以降、出生後も継続的に心筋細胞特異的に発現し、CRP1 と異なる発現パターンを持つ。CRP1 と MLP は胎生期はともに心筋細胞に発現するが、出生後は MLP のみ発現し、ファミリー分子の発現が発生過程により変化するパターンをとる (図 2A)。また、CRP1 は他に、血管平滑筋を含む平滑筋細胞等にも胎生期、出生後にわたり発現する。ファミリー分子間での分子機能の違いについてはよく知られておらず、CRP1 と MLP が増殖能に対して redundant に作用するのか、異なる機能を持ち働くのかは不明である。このため、ファミリー間での分子機能について *in vitro* で検討を行った。

各ファミリー分子の発現ベクターを H9C2 細胞に過剰発現し、qPCR により遺伝子発現を検討した (図 2B)。BNP や AP1 下流遺伝子においてファミリー間で発現レベルに変化が見られた。また、増殖能について細胞数および FACS での検討を行ったところ、CRP1 と MLP では増殖能へ

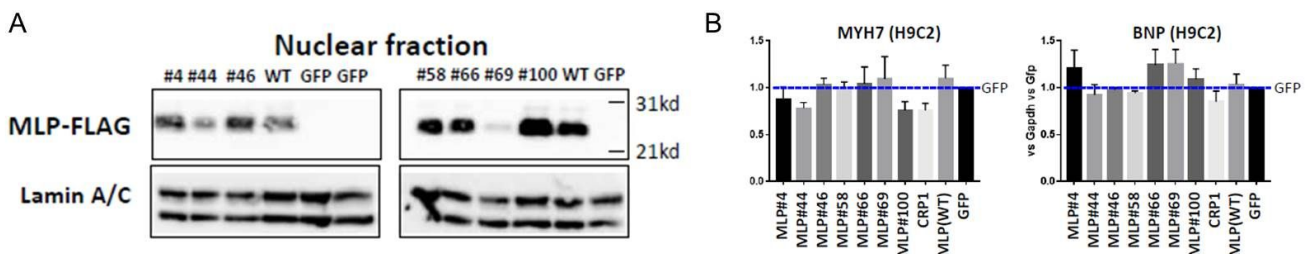
の作用が有意に異なることが示唆された(図2C,D)。CRP1 と MLP は約 70%のアミノ酸が相同で、ともに転写因子 GATA や SRF のコファクターとして発現制御に関与する報告があるが、これらの結果から、発現調節や機能制御において異なる性質も持つことが示唆された。



(図2) A ; 心発生過程での発現パターン、B-D ; ファミリー間での遺伝子発現と増殖能への作用

### (3) MLP のヒト変異体の分子機能についての検討

上記の結果から CRP1 と MLP の発現パターンの違いが出生前後での心筋細胞での機能変化に影響を与えている可能性が考えられる。MLP はノックアウトマウスが出生後早期や成体での心不全による致死を呈し、心筋細胞機能において必須の役割を持つ分子であることが知られている。CRP1 ではノックアウトマウスは明らかな心臓の異常や致死性の表現型は示さず、CRP1 のノックアウトは発生過程においては、細胞増殖への潜在的影響も含めて代償可能と考えられる。しかしながら、CRP1 の発現増加やアミノ酸変異による dominant negative(DN)、constitutively active(CA)変異体が生体での細胞機能に異常を来す可能性は考えられる。MLP についてはヒトの一アミノ酸変異により肥大型心筋症を来すことが知られており、心筋細胞での肥大シグナルへの関与が示唆されるが、その分子病態については未だ不明な点が多い。そこで MLP について心筋症の報告のある一連の変異体を作成し、*in vitro* で検討を行った。H9C2 細胞に強制発現し蛋白発現の検討を行ったところ、MLP の変異体は細胞内局在の異常を示すことを見出した(図3A)。また、qPCR で肥大マーカーを検討したところ、各変異体では野生型に比し発現レベルに変化を認めた(図3B)。この結果から、MLP の心筋症を来す点変異は細胞内局在の恒常的な異常を来し、これにより心筋細胞の遺伝子発現や細胞機能を変化させている可能性が示唆された。



(図3) A ; MLP ヒト変異体の核分画での発現(WB)、B ; 肥大マーカーの発現(qPCR)。(H9C2 細胞)

### (4) CRP1、CRP2 のヒト変異体の分子機能異常の検討

CRP1、CRP2 についてもゲノム上でヒトの rare variant が検出されている。多くはごく稀であるが蛋白コード領域にも変異が検出される。CRP1、2 については血管でのフェノタイプがあり、ノックアウトマウスにおいて動脈障害時の動脈硬化病変形成に対してそれぞれ抑制効果、促進効果を持つことが知られることから、CRP1、2 蛋白の構造異常はヒトにおいても動脈硬化形成に関与する可能性が考えられる。ヒト CRP1、2 変異例での明らかな疾患は指摘されていないが、動脈硬化は多因性病態であることから、分子機能異常のある変異体は動脈硬化の悪化要因の一つとならないかと考えた。CRP1、2 についてヒト変異体の発現ベクターを作成し、上記同様に検討を行った。複数の CRP1 ヒト遺伝子変異体で、肥大型心筋症を来す MLP 変異と同様の細胞内局在の異常を検出した。これらが、遺伝子発現や発現制御、増殖能等の細胞機能、血管平滑筋細胞にどのような影響を与えるかについてさらに検討中である。

### (5) 考察

胎生期心筋細胞と異なり、成体心筋細胞では増殖能が欠如するが、そのメカニズムは不明で

あることから、出生後早期に心筋細胞で発現レベルが低下し、かつ細胞増殖能を促進する遺伝子の分子機能について、特に CRP1 を中心に検討を行った。心筋細胞自体での発現変化については出生前後のマウス心臓組織の免疫染色により確認した。CRP1 は LIM protein の一つで、LIM domain を持ち、転写因子のコファクターとしての作用がある。前述のとおり、ノックアウト (KO) マウスは心臓の明らかな異常を認めず、少なくとも心発生過程においては代償可能な因子である。一方、CRP1 のファミリー遺伝子である MLP は出生後も心筋細胞に発現し、その KO はマウスで心肥大を伴う拡張型心筋症を来す。CRP1 と MLP で増殖能への作用が異なることから、出生後早期以前では CRP1 の存在が MLP の作用を修飾する可能性は考えられる。他の候補因子の一つ Hmga2 も出生後心筋細胞での発現低下、H9C2 での KD による増殖能低下を認めた。Hmga2 は細胞増殖に関わる核内蛋白で、KO マウスはサイズの著明な減少を認める。全身での細胞増殖の促進に関与すると考えられるが、今回過剰発現での増殖能促進は明らかでなかった。既報のマウス心臓組織を用いた発生・発達過程での網羅的遺伝子発現解析の結果からも示されるように (rf2,3)、再生能を持つ時期の心筋細胞は成体心筋細胞とは異なる遺伝子発現パターンをとり、これには上記因子を含め増殖能に関わる因子も含まれる。出生前後での酸素化や体循環・肺循環の変化等、心臓の環境変化およびその後の心筋成熟過程が心筋細胞および非心筋細胞での遺伝子発現変化を来すと考えられ、細胞内での発現パターンの違いは、増殖能の有無を含め、胎生期と成体の心筋細胞での性質の違いに影響すると考えられる。新生仔期以前の心臓や同時期の障害モデルにおける心筋再生部位では細胞周期に関与する遺伝子の発現レベルが増加していることが指摘されていたが (rf2,3)、ごく最近、出生後の心臓で遺伝子発現変化を来す細胞周期関連因子でのスクリーニングから、複数の細胞周期制御因子の強制発現により成体マウスの心筋細胞増殖が誘導され、成体での梗塞サイズも減少することが報告された (rf4, *Cell* 2018)。同報告は CDK4, CyclinD1 および CDK1, CyclinB1 (4F)、または TGF $\beta$ , Wee1 の inhibition (2F2i) により G1/S, G2/M 移行の両者を促進することで成体での心筋細胞増殖を誘導した。成体心筋細胞では胎生期心筋細胞に比べ、これらの細胞周期制御因子の発現上昇をブロックする内因性、外因性の機構が存在するものと考えられる。一方、このような抑制因子の KO によって増殖能のない時期での心筋細胞増殖の報告もあり、Salv と Mdx の Double KO マウスでは心尖部切除後の過剰な心筋細胞増殖を示した (rf5, *Nature Letter* 2017)。これらの報告は、key となる因子の改変により成体心筋細胞の増殖が誘導可能であることを示している。

CRP1 と CRP2 は血管平滑筋細胞にも発現し、CRP1 KO マウスでは血管の発生異常は認めないものの、血管障害モデルにおいて内膜増生が抑制される。一方 CRP2 KO マウスは相反する結果を示すことから、ファミリー間での機能の違いを考えると、両者で分子的に拮抗するメカニズムがあると考えられる。心筋細胞では、経時的に CRP1 と MLP の発現量が変化するパターンをとることから、同様に分子間相互作用をもつ可能性が考えられる。MLP は心発生に必須であり、心筋症を来すことから、CRP1 の欠損や変異は MLP の機能修飾を介して心筋細胞機能に悪影響を来す可能性がある。MLP の一アミノ酸変異はヒトで心筋症を来すことが報告されており、遺伝学的解析から原因遺伝子の一つとして同定されているが、その分子病態についてはよくわかっていない。本研究で MLP 変異体の分子機能を検討したところ、培養細胞レベルで、疾患を来す変異では核分画の MLP 量に変化を認め、いくつかの遺伝子発現レベルにも影響が見られた。MLP 遺伝子変異体は心筋細胞でも同様の異常を来す可能性が考えられ、これにより肥大等の心筋細胞機能異常につながるのかもしれない。さらに、CRP1 と MLP の分子的類似性から、CRP1 変異体についても同様に検討し、CRP1 ヒト変異において新たな分子機能異常を見出した。DN や CA 変異は KO と代償機構が同一でない可能性があり、これらの変異は MLP や CRP2 の作用に悪影響を来す可能性があるため、増殖能への影響を含め、その分子機能異常についてさらに検討中である。

## References

1. Nakashima Y et al. *Circulation Research* 114,1103-1113 (2014)
2. Haubner BJ et al. *Aging* 4(12),966-976 (2012)
3. O' Meara CC et al. *Circulation Research* 116,804-815 (2015)
4. Mohamed TMA et al. *Cell* 173,104-116 (2018)
5. Morikawa Y et al. *Nature Letter* 547,227-231 (2017)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。