

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15447

研究課題名(和文) 心筋細胞周期を調整するlincRNAの機能解析と心疾患治療への応用

研究課題名(英文) Functional analysis of linc RNA that regulates cell cycle of cardiomyocytes and its application for heart diseases

研究代表者

片岡 雅晴 (Kataoka, Masaharu)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：20445208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：lincRNAアレイや定量的PCR法を用いて成体マウス心臓の病態心筋において発現量が大きく変動する重要なlincRNAを絞り込み、"linc-Heart"と名付けた。linc-Heartは、胎生期心臓では発現量が低下しており、成長に伴い発現量が増加した。さらに、アデノ関連ウイルスベクターを用いてlinc-Heartを発現誘導させた心臓では、病態モデル作成後の心筋細胞の大きさが維持され細胞数が増加していた。linc-Heartが心筋細胞の細胞周期の調整に重要な役割を果たしていることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果を応用することによって、従来の概念から逸脱した全く新しい概念として、もともと存在している正常な成熟心筋細胞を、lincRNAを介して細胞増殖させることにより治療する、という発想が可能な時代が到来する可能性がある。特に、linc-Heartと同様の機能を有するヒトlincRNAを同定し、それを既に他疾患治療で臨床応用されている2型AAVを用いて心筋へ遺伝子導入する等の方法により、ヒト心筋梗塞後のリモデリング抑制や心筋症での心機能改善等へ応用できる可能性が広がり、臨床への将来的な貢献が多いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：Using the lincRNA array and quantitative PCR, we narrowed down the most important lincRNA whose expression level fluctuates greatly in the pathological myocardium of adult mouse hearts and named it as "linc-Heart". The expression level of linc-Heart decreased in the embryonic heart and increased with growth. Furthermore, in the heart in which the expression of linc-Heart was induced using an adeno-associated virus vector, the size of cardiomyocytes was maintained and the number of cells was increased after the pathological model heart was created, suggesting that linc-Heart plays an important role in the regulation of cell cycle of cardiomyocytes.

研究分野：循環器病学

キーワード：lincRNA 心筋細胞 細胞分裂

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全染色体 DNA の半分以上は RNA へと転写されており、蛋白質をコードしない RNA (non-coding RNA) が大量に存在することが近年注目されている。Non-coding RNA のうち、約 200 塩基以上の長さを有する long intergenic non-coding RNA (lincRNA) については、その存在や機能について、いまだ解明すべき余地が多く残されている。

近年、ES 細胞から心筋細胞への分化誘導を Braveheart という lincRNA が規定していると報告された(1)。また、ヨーロッパのグループからは、Fendrr という新規 lincRNA が同定され、Fendrr が胎生期心臓の正常構造の構築に寄与していると報告された(2)。ただし、成体期心臓での lincRNA の機能や、心筋細胞周期への関与については報告が無い。

心筋細胞は幼若期には細胞分裂能・増殖能を有しているが、成体期の成熟心筋細胞では細胞周期が停止し、細胞分裂しない。そのため、成体期の心臓にて、心筋梗塞や心筋症が発症して心筋細胞が死滅すると、生存している成熟心筋細胞は細胞分裂しないために心機能が低下する。

マウスの心臓では、生後 1 週間まで心筋細胞分裂を行うが、生後 1 週間以降は細胞周期が静止期に入り細胞分裂が以後は起こらないことが報告されている(3)。心筋細胞の細胞周期を静止期に移行させる key factor としてマウスにおいて Meis1 が報告されているが(4)、いまだその詳細なメカニズムは不明である。

本研究では、成体期の心臓における lincRNA の機能を解明することを目標とすにあたり、特に、いまだ未解明である成体期心筋細胞での細胞周期調整のメカニズムに、lincRNA がどのように関わっているかを解明し、さらに心臓病態時の治療への発展性を模索する。

### 2. 研究の目的

心筋細胞は幼若期には細胞分裂能・増殖能を有しているが、成体期成熟心筋細胞では細胞周期が停止し、細胞分裂しない。本研究では、いまだ未解明である成熟期心筋細胞での細胞周期調整のメカニズムに、lincRNA がどのように関わっているかを解明し、さらに心臓病態時の lincRNA を用いた治療への発展性を模索することを目標とする。

本研究の具体的な目標としては、1) lincRNA の成体期心臓における機能を解明すること、及び、2) 従来の幹細胞や万能細胞を用いた再生医療とは異なる新しい発想(細胞周期調整に働く lincRNA を介して成体期の正常心筋細胞を増殖させて心機能を回復させるという発想)による病態心臓の治療効果を動物モデルにて実証すること、である。

循環器領域疾患においては、病態心臓での心機能をいかに回復させるか、が極めて重要な課題である。心筋梗塞や心筋症など病態心臓への治療の試みとしては、従来は骨髄間葉系幹細胞や血管内皮前駆細胞等の幹細胞移植による方法や、iPS 細胞や ES 細胞などいわゆる万能細胞移植による方法、また、近年では心臓の繊維芽細胞を直接に心筋細胞に誘導する方法(direct reprogramming)、が報告されている(5)。しかしながら、幹細胞を用いる方法では細胞取得の困難さや倫理面での問題もあり、心臓での臨床応用の実現にはまだまだ課題も多い。また、direct reprogramming 法も産生される心筋細胞の性能面の問題等により臨床応用までは課題が多い。

本研究成果によって、病態心臓内で生存している正常機能の心筋細胞を、lincRNA を介して細胞周期を調整することが可能であると実証されるならば、病態心臓における心機能回復という治療への可能性も発展する。これは従来の再生医療とは大きく異なる新規の発想法による心臓治療概念であり、lincRNA を介した心筋細胞周期調整メカニズムの解明に向けて、本研究の意義は極めて高い。

### 3. 研究の方法

#### (1) 病態モデル心筋を用いた lincRNA の網羅的解析と重要な機能を有する lincRNA の絞り込み

心筋梗塞モデルや心肥大モデルを作成し、心臓を摘出し、心筋細胞から RNA を抽出する。lincRNA アレイを用いた網羅的な lincRNA 発現解析を行う。解析ソフト GeneSpring を用いて発現量が正常コントロール心筋に比べて大きく変動する lincRNA を絞り込む。絞り込んだ lincRNA の発現量を qPCR 法にて確認し、最終的に病態心筋で重要な役割をしていることが予想される lincRNA を絞り込む。

#### (2) 絞り込んだ lincRNA を用いた in vivo gain- or loss-of-function study で心機能への影響を探る

(1)の解析で絞り込んだ lincRNA およびその short-hairpin RNA を用いて、lincRNA を心臓特異的に過剰発現またはノックダウンしたマウスを作製し、心筋梗塞モデルや TAC による心肥大モデル等の病態モデルを用いて、心機能への影響を詳細に解析する。

具体的には、アデノ関連ウイルス(AAV)ベクターによる成体心臓への lincRNA 及びその shRNA の導入を行い、in vivo gain- or loss-of-function による心機能解析を施行する。ph3, Aurora-B, Ki67 等の細胞周期マーカーによる解析等を通じて心筋細胞周期調整のメカニズムを詳細に探索する。また、アデノウイルスベクターに lincRNA 及びその shRNA を組み込むことによって、培養心筋細胞を用いた in vitro での gain- or loss-of-function study も施行する。

#### (3) lincRNA による心筋細胞の細胞周期調整のメカニズムを解明する

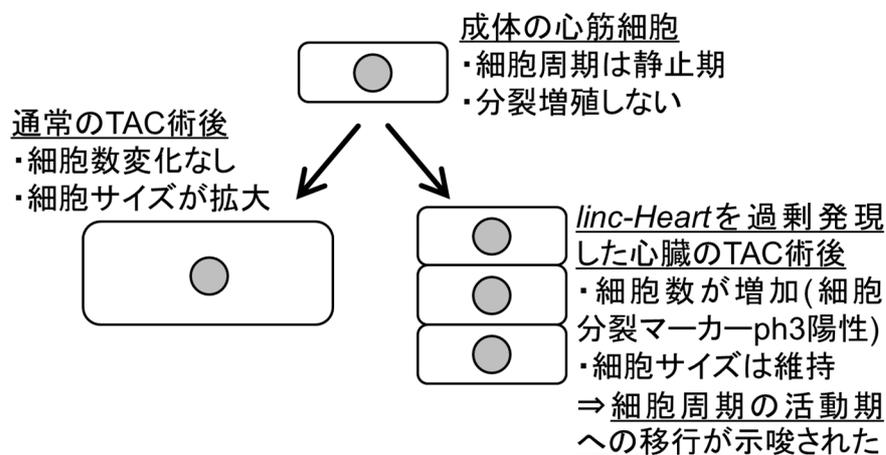
幼若期の心筋細胞の細胞周期を静止期に移行させる key factor として Meis1 が報告されてい

るが(4)、lincRNAによる心筋細胞の細胞周期調整メカニズムを、Meis1制御の可能性も含めて、in vivo studyとin vitro studyを組み合わせて、深く掘り下げて解明する。

#### 4. 研究成果

成体マウス心臓に心筋梗塞を作成して、心筋梗塞後3日後および14日後の心筋からRNAを抽出し、lincRNAアレイを用いた網羅的なlincRNAスクリーニングを施行した。その結果、心筋梗塞3日後の梗塞border-zone域において、複数のlincRNAの発現量が大きく変動することを確認した。次に、lincRNAアレイ(初期スクリーニング1万個以上)の結果から、発現量が大きく変動しているlincRNAを約160個に絞りこみ、それらの発現量を定量的PCR法にて確認し、lincRNAアレイの発現量と一致しているものをさらに13個に絞り込んだ。続いて、脳・心臓・肺・肝臓・骨格筋・脾臓からRNAを抽出して定量的PCR法とNorthern blotting法によって、最終的に心臓に特異的に発現量が多く、心筋梗塞時に梗塞域近辺で大きく発現量の変動するlincRNAを1つに絞り込み、「linc-Heart」と名付けた。linc-Heartは、胎生期心臓では発現量が低下しており、成長に伴い発現量が増加した。さらに、アデノ関連ウイルス(AAV)ベクターを用いてlinc-Heartを過剰発現させた心臓を用いて大動脈縮窄手術(TAC)後心肥大モデルを作成した際に、心筋細胞の大きさが維持され細胞数が増加しており、通常は細胞分裂しない心筋細胞の細胞増殖が生じることを発見した。現在、詳細なメカニズム解析を集学的に進めている。

本研究成果を応用することによって、従来の概念から逸脱した全く新しい概念として、もともと存在している正常な成熟心筋細胞を、lincRNAを介して細胞増殖させることにより治療する、という発想が可能な時代が到来する可能性がある。特に、linc-Heartと同様の機能を有するヒトlincRNAを同定し、それを既に他疾患治療で臨床応用されている2型AAVを用いて心筋へ遺伝子導入する等の方法により、ヒト心筋梗塞後のリモデリング抑制や心筋症での心機能改善等へ応用できる可能性が広がり、臨床への将来的な貢献が多いに期待できる。



#### <引用文献>

1. Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, Bradley RK, Fields PA, Steinhauser ML, Ding H, Butty VL, Torrey L, Haas S, Abo R, Tabebordbar M, Lee RT, Burge CB, Boyer LA. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. Cell. 2013 Jan 31;152(3):570-83.
2. Grote P, Wittler L, Hendrix D, Koch F, Währisch S, Beisaw A, Macura K, Bläss G, Kellis M, Werber M, Herrmann BG. The tissue-specific lincRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. Dev Cell. 2013 Jan 28;24(2):206-14.
3. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. Science. 2011 Feb 25;331(6020):1078-80.
4. Mahmoud AI, Kocabas F, Muralidhar SA, Kimura W, Koura AS, Thet S, Porrello ER, Sadek HA. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. Nature. 2013 May 9;497(7448):249-253.
5. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. Cell. 2010 Aug 6;142(3):375-86.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----