

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19523

研究課題名(和文)左室と右室の心筋は本質的に異質か？

研究課題名(英文)Are left ventricular cardiomyocytes intrinsically different from right ventricular ones?

研究代表者

八代 健太(Yashiro, Kenta)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60432506

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):右室の心筋は左室とは本質的に異なり、高い大動脈圧を長期に支える能力を欠く事が強く示唆されるが、そのような左右心室心筋の本質的な差は不明である。本研究は、再生医療・心不全治療への新たな戦略的研究基盤の構築を目的とし、左右心室の心筋をin vitroで区別できるマウスES細胞を用いた実験システム独自に開発し、次世代シーケンサーや画像解析といった最先端の計測技術を駆使し、左右の心筋の先天的な特性の差を明らかにすることを目標とした研究を展開した。必要とする遺伝子改変ES細胞の準備が完了し、今後はデータの取得と解析へと移行する。得られた最終成果を国際学会と国際誌にて順次発表していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

右心室の心筋と左心室の心筋が本質的に異なるのであれば、まず、左右心室心筋に本質的な差がないことを前提とした右心不全の治療戦略を再考する必要性が生じる。また、現在のinduced pluripotent stem (iPS)/ES細胞を用いた再生医療用の心筋も、左右心室心筋が混在しているものであり、左室型心筋のみを抽出し使用する方が高品質である可能性が高い。残念ながら、本研究では期間内にデータ解析を完了できなかったが、研究の継続により近い将来に得られる最終成果は、上記の臨床戦略を再考すべきかどうかの医学的知見を提供し、生物学的にも極めて重要な疑問に迫ることができるはずである。

研究成果の概要(英文):Some clinical evidences strongly suggest that right ventricular cardiomyocytes are unable to support high pressure like systolic arterial pressure for long period. However, such an intrinsically different feature of right ventricular cardiomyocytes from those of left ventricle is still largely unknown. In this study, we have developed genetically modified (GM) mouse embryonic stem (ES) cell system (Bacterial Artificial Chromosome Tbx5CreERT2 transgene・ROSA26-eYFP) to discern right ventricular cardiomyocytes from left ventricular ones if differentiating in vitro. Then, we are about to isolate right ventricular cardiomyocytes and left ventricular ones originating from those ES cells in vitro, which will be then subjected to RNA-seq, phosphorylated protein profiling with mass spectrometry, and appreciation of mechanical property via calcium transient measurement. We will publish our results in international conference and scientific journal in the near future.

研究分野：発生学

キーワード：左心室心筋 右心室心筋 生物学的な相違 分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患である修正大血管転移症には、他に合併心奇形が無ければ、体循環を解剖学的右室が担うものの血行動態は生理的に修正された状態であるので症状が無い。しかし、多くの症例が長期経過で次第に心不全に陥る。この事実は、右室の心筋は左室とは本質的に異なり、高い大動脈圧を長期に支える能力を欠く事を強く示唆する。左右心室心筋の本質的な差を明確にすることは、生物学的にも医学的にも極めて重要であるが、適当なマーカーや環境の違いで生じる後天的形質の差を除外する実験系が無く、左右心室心筋の本質的な差は全く不明である。

研究代表者は、転写因子 *Tbx5* を発現する心臓前駆細胞をマウス胚で追跡するシステムである Bacterial Artificial Chromosome (BAC) *Tbx5*^{CreERT2} transgene (Tg)・*ROSA26-eYFP* (*R26R-eYFP*) マウスを樹立し解析することで、転写因子 *Tbx5* を発現する細胞系譜はほとんどが心筋に分化し、左心室に寄与し右心室には寄与しないことを見出した (Kokkinopoulos, Yashiro et al. *PLoS One*. 2015)。この独自のマウスの胚盤胞から Embryonic Stem (ES) 細胞を樹立し、かつ心筋にしか分化出来ない独自に開発した単分化心筋前駆細胞の単離法を利用すれば (Ishida, Yashiro et al. *Cell Reports*. 2016)、左心室と右心室の心筋細胞を同一の培養条件で ES 細胞から分化誘導し、後天的な表現型を付与する可能性がある環境の差を排除した *in vitro* で分化した左室心筋と右室心筋をそれぞれ単離して比較解析する独自の実験系が構築可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、後天的に付与される表現型を排除し、左右の心室の心筋を単離できる独自の実験系の開発を起点として、これを用いて左右の心筋の先天的な特性の差を明らかにし、再生医療と心不全治療に対して新たな戦略的研究基盤を構築する事を目的とした。この目的を達成するために、研究代表者の独自の研究結果を用いて、左室心筋と右室心筋を同一条件下で *in vitro* で分化誘導してそれぞれ単離し、次世代シーケンサー、質量分析計、画像解析といった最先端の計測技術を駆使して比較検証することを目標とした。

3. 研究の方法

上記の背景と研究目的をふまえ、研究計画の概要は以下の通りであった。(1) *in vitro* で分化した左右の心室心筋間での網羅的遺伝子発現プロファイルの比較を行い解析する。BAC *Tbx5*^{CreERT2} Tg・*R26R-eYFP* マウス ES 細胞に、汎レチノイン酸受容体阻害剤 (心室型心筋への分化促進) と 4 水酸化タモキシフェン (左室心筋へ eYFP を遺伝学的にラベリング) の存在下で心筋へと分化誘導をかけることで、分化した左心室心筋 (eYFP 陽性) と 右心室心筋 (eYFP 陰性) を分離する。それぞれに対して次世代シーケンサーによって RNA-seq を行い、遺伝子発現プロファイル解析とパスウェイ解析により特性差を比較解析する。(2) *in vitro* で分化した左右の心室心筋間での網羅的蛋白発現プロファイルの比較解析を行う。マウス ES 細胞由来の左右心室心筋から膜蛋白分画と細胞質分画リン酸化蛋白を調整し、質量分析計ショットガンにより網羅的に膜蛋白とリン酸化蛋白の定量的蛋白発現プロファイル解析とパスウェイ解析を行い、(1)のデータと統合して左右心室心筋間の本質的な特性の差を明らかにする。(3) *in vitro* で分化した左右の心室心筋間での力学特性の比較解析を行う。マウス ES 細胞から得た左右心室心筋の一細胞レベルで力学特性の違いを、カルシウム・トランジェントを測定するなどをして比較検証を行う。

4. 研究成果

研究代表者の研究施設の移動、予期しなかった研究資源の喪失、及び新型コロナウイルス感染拡大による研究活動の制限などにより、当初予定していた研究計画に遅れを生じたが、研究としては進展した。研究期間内に得た下記のような成果を元に、今後も研究を継続し、成果を国際学会と国際誌にて公表していく予定である。

(1) *in vitro* で分化した左右の心室心筋間での網羅的遺伝子発現プロファイルの比較

当初は、数年前に BAC *Tbx5*^{CreERT2} Tg · *R26R-eYFP* マウスの胚盤胞より樹立したマウス ES 細胞 (Kokkinopoulos, Yashiro et al. *PLoS One*. 2015) を用いて研究を開始したが、現在広く普及している 2i+LIF 培地による維持培養法に起因すると考えられた ES 細胞の変調に直面し、ES 細胞の分化能に大きな問題が発生した。これを解決するために、新しく BAC *Tbx5*^{CreERT2} Tg · *R26R-eYFP* マウスの胚盤胞から ES 細胞の樹立を行った。3i+LIF 培地を用いて胚盤胞を培養し、増殖した内部細胞塊由来の細胞を数回 3i+LIF 培地上で継代し、フィーダー細胞フリーの条件で ES 細胞グレードの血清+LIF 培地で継代できる ES クローンを樹立した。

この新しく樹立した BAC *Tbx5*^{CreERT2} Tg · *R26R-eYFP* マウス ES 細胞に心筋分化誘導を誘導し、心臓前駆細胞の段階で GFRA2 陽性・PDGFRa 陽性・KDR 陰性の細胞を FACS にて回収し、pan-RAR 阻害剤 AGN 194310 と 4-hydroxytamoxifen 存在下で分化培養を継続し、左室心筋 (eYFP 陽性) と右室心筋 (eYFP 陰性) を FACS で単離し、RNA-seq を行う予定にしている。期間内にデータの取得完了までに至らなかったが、今後も研究を継続し、データを取得し解析に移る予定である。

(2) *in vitro* で分化した左右の心室心筋間での網羅的蛋白発現プロファイルの比較解析

(1)同様に左室心筋と右室心筋を単離し、ショットガンによる質量分析計を用いたタンパク発現プロファイルを解析する予定であったが、まだデータを取得し解析を完了させるに至っていない。質量分析計で解析するための試料の準備が完了次第、データを取得し解析を行う予定である。

(3) *in vitro* で分化した左右の心室心筋間での力学特性の比較解析

(1)で準備し用いることとなっている ES 細胞と分化誘導法にて得る左室心筋と右室心筋を用いて、カルシウム・トランジエントを測定することで力学的特性の差を解析する予定であるが、残念ながらデータを取得し解析を完了させるに至らなかった。試料の準備が完了次第、データを取得し解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 八代健太	4. 巻 35
2. 論文標題 左室心筋と右室心筋は何が違うのか	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学増刊 心不全のサイエンス	6. 最初と最後の頁 204-211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kenta Yashiro, Shigeru Miyagawa, and Yoshiki Sawa.	4. 巻 82
2. 論文標題 The past is never dead. It's not even past. -William Faulkner, from "Requiem for a Nun"; A lesson from Thalidomide Tragedy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation J.	6. 最初と最後の頁 2250-2252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-18-0775	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Rie Saba, Keiko Kitajima, Lucille Rainbow, Sylvia Engert, Mami Uemura, Hidekazu Ishida, Ioannis Kokkinopoulos, Yasunori Shintani, Shigeru Miyagawa, Yoshiakira Kanai, Masami Kanai-Azuma, Peter Koopman, Chikara Meno, John Kenny, Heiko Lickert, Yumiko Saga, Ken Suzuki, Yoshiki Sawa, Kenta Yashiro.	4. 巻 -
2. 論文標題 Sox17 expression in endocardium precursor cells regulates heart development in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/548289, 2019	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 八代 健太、宮川 繁、澤 芳樹	4. 巻 68
2. 論文標題 特集 心臓の発生・再生・創生 .心臓の発生と進化 左右軸の分子機構と心臓形成	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 520 ~ 524
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.11477/mf.2425200722	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yashiro Kenta, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki	4. 巻 33
2. 論文標題 臓器錯位症候群の発生機序	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本小児循環器学会雑誌	6. 最初と最後の頁 349 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.9794/jspccs.33.349	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bridge Katherine S., Shah Kunal M., Li Yigen, Foxler Daniel E., Wong Sybil C.K., Miller Duncan C., Davidson Kathryn M., Foster John G., Rose Ruth, Hodgkinson Michael R., Ribeiro Paulo S., Aboobaker A. Aziz, Yashiro Kenta, Wang Xiaozhong, Graves Paul R., Plevin Michael J., Lagos Dimitris, Sharp Tyson V.	4. 巻 20
2. 論文標題 Argonaute Utilization for miRNA Silencing Is Determined by Phosphorylation-Dependent Recruitment of LIM-Domain-Containing Proteins	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 173 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.06.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Saba Rie, Kitajima Keiko, Rainbow Lucille, Engert Silvia, Uemura Mami, Ishida Hidekazu, Kokkinopoulos Ioannis, Shintani Yasunori, Miyagawa Shigeru, Kanai Yoshiakira, Kanai-Azuma Masami, Koopman Peter, Meno Chikara, Kenny John, Lickert Heiko, Saga Yumiko, Suzuki Ken, Sawa Yoshiki, Yashiro Kenta	4. 巻 9
2. 論文標題 Endocardium differentiation through Sox17 expression in endocardium precursor cells regulates heart development in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48321-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yashiro, K., Saba, R., Ishida, H., Kanai, Y., Meno, C., Koopman, P., Lickert, H., Saga, Y., Miyagawa, S., Suzuki, K., and Sawa, Y.
2. 発表標題 SoxF class transcription factor Sox17 identifies endocardium progenitor cells and regulates the heart development in mice
3. 学会等名 American Heart Association scientific Sessions 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八代健太, 佐波理恵, 石田秀和, 小垣滋豊, 宮川繁, 大園恵一, 鈴木恵, 澤芳樹
2. 発表標題 Sry関連HMG-box転写因子Sox17が 心内膜前駆細胞の分化と心臓発生に果たす役割
3. 学会等名 第54回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yashiro, K., Saba, R., Ishida, H., Kanai, Y., Meno, C., Koopman, P., Lickert, H., Saga, Y., Miyagawa, S., Suzuki, K., and Sawa, Y.
2. 発表標題 SoxF class transcription factor Sox17 identifies endocardium progenitor cells and regulates the heart development in mice.
3. 学会等名 第82回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八代健太
2. 発表標題 Sry関連HMG-box転写因子Sox17が 心内膜前駆細胞での発現と心臓形態形成における機能
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八代健太
2. 発表標題 単一細胞遺伝子発現プロファイルより見えてきた心臓前駆細胞の新知見.
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会年会, 第90回日本生化学会大会) (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 八代健太
2. 発表標題 単一細胞遺伝子発現プロファイリングより見えてきた心臓発生の分子機構
3. 学会等名 第120回日本小児科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenta Yashiro
2. 発表標題 Glycosylphosphatidylinositol-anchor containing neurotrophic factor receptor GFRA2 identifies cardiac progenitors and mediates cardiomyocyte differentiation via an alternative signal pathway.
3. 学会等名 CDB symposium 2017 “Towards Understanding Human Development, Heredity, and Evolution”
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hidekazu Ishida, Rie Saba, Ioannis Kokkinopoulos, Yasushi Sakata, Leo Dunkel, Andrew Tinker, Anna-Katerina Hadjantonakis, Yoshiki Sawa, Hiroshi Sasaki, Keiichi Ozono, Ken Suzuki, and Kenta Yashiro
2. 発表標題 Glycosylphosphatidylinositol-anchor containing neurotrophic factor receptor GFRA2 identifies cardiac progenitors and mediates cardiomyocyte differentiation via an alternative signal pathway.
3. 学会等名 Takao International Symposium 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hidekazu Ishida, Rie Saba, Ioannis Kokkinopoulos, Yasushi Sakata, Leo Dunkel, Andrew Tinker, Anna-Katerina Hadjantonakis, Yoshiki Sawa, Hiroshi Sasaki, Keiichi Ozono, Ken Suzuki, and Kenta Yashiro
2. 発表標題 Glycosylphosphatidylinositol-anchor containing neurotrophic factor receptor GFRA2 identifies cardiac progenitors and mediates cardiomyocyte differentiation via an alternative signal pathway.
3. 学会等名 Weinstein Cardiovascular Development and Regeneration Conference 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔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
研究協力者	茂田 昌樹 (Shigeta Masaki)		
研究協力者	奥崎 大介 (Okuzaki Daisuke) (00346131)		
研究協力者	元岡 大祐 (Motooka Daisuke) (10636830)		
連携研究者	澤 芳樹 (Sawa Yoshiki) (00243220)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
連携研究者	高島 成二 (Takashima Seiji) (90379272)	大阪大学・生命機能研究科・教授 (14401)	