

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06871

研究課題名(和文) 拍動する心筋前駆細胞ACMsにおける多核形成のメカニズムとその調節機構の検討

研究課題名(英文) Study of the mechanism of polynuclear formation and its regulatory mechanism in self-beating myocardial progenitor cells ACMS

研究代表者

尾松 万里子 (Omatsu-Kanbe, Mariko)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80161397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：心臓には幹細胞や前駆細胞が含まれている。申請者は、成体マウスの心室組織から心筋細胞を含まない小型細胞分画を集めて立体(3D)培養したところ、自発的に拍動を開始する細胞が存在することを発見し、「非定型心筋細胞(Atypically-shaped cardiomyocytes, ACMS)と命名した。この細胞は心室筋、心房筋、および洞房結節細胞の特徴を併せ持つ細胞であり、胎児心筋の特徴を有しながら終生にわたって心臓に存在し続ける。今回の研究で、ACMsは心筋細胞とは異なり、細胞融合を行うことによって多核細胞となり、拍動リズムを同期させることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
心筋細胞は低酸素や機械的刺激、酸性化に感受性が高く、損傷した組織の再生は不可能である。しかし、心臓組織中に低酸素等への耐性の高いACMsが生存していることは、何らかの生理的意義をもつと考えられ、将来の再生技術への手がかりとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The adult mammalian heart contains several kinds of cardiac stem or progenitor cells. Atypically-shaped cardiomyocytes (ACMS) are derived from mouse heart that spontaneously develop into beating cells. We found that the ACMS can fuse with each other to become multinucleate large beating cells.

研究分野：細胞生理学

キーワード：心筋細胞 ACMS 心筋前駆細胞 多核 細胞融合 虚血耐性

1. 研究開始当初の背景

心臓には幹細胞や前駆細胞が含まれている。申請者らは、成体マウスの心室組織を酵素処理して得られた、心筋細胞を含まない小型細胞分画を集めて立体(3D)培養したところ、枝分かれした形態に変化するとともに自発的に拍動を開始する細胞が存在することを発見した。この細胞はこれまで知られていなかった種類であり、「非定型心筋細胞 (**Atypically-shaped cardiomyocytes, ACMS**)」と命名した。

ACMs は拍動するという大きな特徴をもつが、成体の心室筋細胞は洞房結節とは異なり自動的に拍動(収縮)しない。マウスにおいては新生仔期のみ、単離された心室筋細胞が拍動することが知られている。**ACMs** の細胞機能を検討してきた結果、この細胞は心室筋、心房筋、および洞房結節細胞の特徴を併せ持つ細胞であり、胎児心筋の特徴を有しながら終生にわたって心臓に存在し続けることが明らかになった。一方、通常的心筋細胞は単核あるいは二核が多いにも関わらず、**ACMs** のほとんどは三核以上であり、五核以上の核をもつことも少なくないなど、通常的心筋細胞とは大きく異なる特徴を示し、さらなる検討が必要である。

2. 研究の目的

申請者らは、マウスの心臓を酵素処理して得られた細胞群の中に拍動する新規の細胞を見出し、「非定型心筋細胞 (**Atypically-shaped cardiomyocytes, ACMS**)」と命名した。**ACMs** は、心室筋、心房筋および洞房結節細胞の特徴を併せ持つ真菌前駆細胞の一種として、終生にわたって心臓に存在することを明らかにしてきたが、多くは三核以上の多核であり、不規則あるいは不完全な核分裂により細胞とは異なる特徴も示す。

本研究は、**ACMs** が通常的心筋細胞と比べて明らかに多くの核を形成することに着目し、多核形成のメカニズムとその調節機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

核分裂の分析について、培養中の **ACMs** における核分裂の過程とその後の核の移動や再分裂などを高倍速でタイムラプス撮影する。核の変動が終了した後、膜透過性核染色剤によって生細胞における核形態を記録・解析する。核膜の形成に大きく影響するタンパク質の発現を調べ、正常的心筋細胞と比較する。

4. 研究成果

ACMs が多核細胞になる原因として、まず細胞質分裂を伴わない核分裂の可能性が考えられる。マウスの心臓では、出生から数日間、心筋細胞の核が分裂し、細胞質分裂が起こらないために多核となり、1つの細胞の大きさが増大するが、その時期を過ぎるとこのような現象は見られなくなる。実際、成体マウスの心室筋細胞を単離して観察すると二核が一番多く見られ、三核あるいはそれ以上の数の核を持つ細胞も存在することがわかった。このような正常の心筋細胞で見られる多核形成が **ACMs** でも起こっている可能性があると考え、培養 **ACMs** の長期観察を行った。核のリアルタイムでの観察を行うためには膜透過性核染色剤を用いるより、**native** な細胞観察が好ましいことから、核に蛍光物質を発現させた **Fucci2** トランスジェニックマウスを用いることにした。**Fucci2** トランスジェニックマウスは、**Rosa26 promoter drives Fucci2 reporter system** を発現させており、**G1** 期に **mCherry**、**S/G2** 期に **mVenus** を発現する遺伝子改変マウスであり、細胞周期をリアルタイムに検出する目的で用いられている。**Fucci2** トランスジェニックマウスの心臓から単離した **ACMs** は、同一マウスから単離した心室筋細胞と同様、常に赤い蛍光発色 (**mCherry**) を示したことから、細胞周期は停止していることが確認できた。**Fucci2** マウスから調製した **ACMs** の核に発現する **mCherry** を高速スピンドISK型共焦点レーザー顕微鏡を用いて三日間観察した。その結果、**ACMs** は培養の初段階からすでに複数の核を有しており、核分裂を観察することはできなかった。しかし、細胞が成長して大きくなる過程において一つの核が細胞質中を移動していく様子が観察できた。さらに、複数の核が、あたかも分裂した直後のように2つずつ並んでいるもの、分裂途中のように一部で繋がったままの細胞をもっているものが少なからず観察された。これらのことから、**ACMs** 細胞核の分裂が起こっているとすれば、単離直後、あるいは心臓組織中に存在しているときにすでに起こっている可能性があると考えられた。

2つ目の多核形成の可能性として考えられるのは細胞融合である。長期培養を行うと、**ACMs** の形態には、ある程度の大きさのまま拍動を続けるもの、拍動しながら大きく成長しするもの、巨大な細胞塊のようになりながら拍動しているものがあり、一定の細胞の形はないといえる。巨大な細胞塊になった **ACMs** を高解像度顕微鏡で観察すると、非常に大きな単核をも細胞もあるが、多くの核をもち複雑な形になりながら全体では一つの細胞として拍動しているものが多い。これらのことから、**ACM** は培養中に細胞融合によって大きく成長している可能性があると考えられた。長期間の観察により、まだ拍動を開始していない **ACMs** が隣接する細胞と融合して一体化して拍動細胞に成長することがあることがわかった。さらに、既にある程度の大きさ

に成長した異なるリズムで拍動する細胞同士の細胞膜が接触した場合、融合し、同期して拍動を始めることもわかった。このような細胞融合の性質は心筋細胞では見られず、また **ACM** と融合できるのは **ACM** のみであることも明らかになった。これらのことから、**ACMs** の多核形成の原因の一つとして細胞融合が考えられた。

核膜の裏打ちタンパク質として知られるラミン **A/C** およびラミン **B** は、**ACMs** の核に正常に発現していることがわかり、少なくとも核膜再構築に不全があることはない可能性が高いことがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Omatsu-Kanbe M, Fukunaga R, Mi X, Matsuura H.	4. 巻 0
2. 論文標題 An Antegrade Perfusion Method for Cardiomyocyte Isolation from mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments, in press	6. 最初と最後の頁 e61866
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/61866	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 -
1. 著者名 Kojima A, Xinya M, Fukushima Y, Ding W-G, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H.	4. 巻 0
2. 論文標題 Elevation of propofol sensitivity of cardiac I_{Ks} channel by KCNE1 polymorphism D85N	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology, in press	6. 最初と最後の頁 000-000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bph.15460	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 Omatsu-Kanbe, M. Yoshioka, K. Fukunaga, R. Sagawa, H. Matsuura, H.	4. 巻 6
2. 論文標題 A simple antegrade perfusion method for isolating viable single cardiomyocytes from neonatal to aged mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiol Rep	6. 最初と最後の頁 e13688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.13688	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 -
1. 著者名 Mi X, Ding WG, Toyoda F, Kojima A, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H.	4. 巻 161
2. 論文標題 Selective activation of adrenoceptors potentiates I_{Ks} current in pulmonary vein cardiomyocytes through the protein kinase A and C signaling pathways.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Mol Cell Cardiol	6. 最初と最後の頁 86-97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yjmcc.2021.08.004	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 Yuasa M, Kojima A, Mi X, Ding WG, Omatsu-Kanbe M, Kitagawa H, Matsuura H.	4. 巻 473
2. 論文標題 Characterization and functional role of rapid- and slow-activating delayed rectifier K + currents in atrioventricular node cells of guinea pigs.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pflugers Arch.	6. 最初と最後の頁 1885-1898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-021-02617-z	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 Yamada K, Ding WG, Omatsu-Kanbe M, Toyoda F, Tsuji S, Katsura D, Kimura F, Matsuura H, Murakami T.	4. 巻 71
2. 論文標題 Expression and function maintenance of volume-regulated anion channels in myometrial smooth muscles of pregnant mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Exp. Anim.	6. 最初と最後の頁 123-130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.21-0111	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 -

1. 著者名 Shimizu M, Mi X, Toyoda F, Kojima A, Ding W-G, Fukushima Y, Omatsu-Kanbe M, Kitagawa H, Matsuura H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Propofol, an Anesthetic Agent, Inhibits HCN Channels through the Allosteric Modulation of the cAMP-Dependent Gating Mechanism.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom12040570	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Omatsu-Kanbe M, Fukunaga R, Shimoda K, Agetsuma M, Nabekura J, Nishida M, Matsuura H.
2. 発表標題 Property and possible role of cardiac progenitors atypically-shaped cardiomyocytes
3. 学会等名 生理研心血管国際集会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fukunaga R, Shimoda K, Agetsuma M, Nabekura J, Nishida M, Matsuura H, Omatsu-Kanbe M.
2. 発表標題 Presence of ANP promotor-driven AcGFP-expressing cardiac progenitor cells in mice heart
3. 学会等名 生理研心血管国際集会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mi X, Ding W-G, Kojima A, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H.
2. 発表標題 Functional role of delayed rectifier K ⁺ current in the spontaneous automaticity of the guinea-pig
3. 学会等名 生理研心血管国際集会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾松万里子、福永 諒、下田 翔、揚妻正和、鍋倉淳一、西田基宏、松浦 博
2. 発表標題 Physiological role and the three-dimensional localization of cardiac progenitor cells in the mouse heart
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福永 諒, 尾松万里子, 松浦 博
2. 発表標題 Cell fusion and irregular nuclear division in multinuclear cardiac progenitor cells
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 糜 心雅, 福永 諒, 丁 維光, 松浦 博, 尾松万里子
2. 発表標題 Nuclear heterogeneity in multinucleated ventricular myocytes in mice
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Omatsu-Kanbe, M., Fukunaga, R., Shimoda, K., Agetsuma, M., Nabekura, J., Nishida, M., Matsuura, H.
2. 発表標題 Identification of ANP-marked cardiac progenitor cells in mouse heart that develop into beating cells.
3. 学会等名 The 50th NIPS International Symposium 'MIRACLES' in Cardiovascular Physiology - Metabolism, Interaction, Regulation, Application, Chemical Biology, Longevity, Exercise and Signaling - (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Omatsu-Kanbe, M., Fukunaga, R., Matsuura, H.
2. 発表標題 Multinucleation of cardiac progenitor cells by cell fusion and nuclear division.
3. 学会等名 J. Physiol. Sci. 70: S86. (第97回日本生理学会大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fukunaga R. Omatsu-Kanbe, M. Matsuura, H.
2. 発表標題 Irregular division of the nucleus without cytokinesis in cardiac progenitor cells of mouse heart
3. 学会等名 9th FAOPS Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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 分担者	森 雅樹 (Mori Masaki) (10602625)	滋賀医科大学・神経難病研究センター・客員准教授 (14202)	
研究 分担者	星野 真介 (Hoshino Shinsuke) (70747576)	滋賀医科大学・医学部・助教 (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------