

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04521

研究課題名（和文）軟らかく分裂能の高い心筋細胞による革新的心筋再生戦略の創出

研究課題名（英文）Creation of innovative myocardial regeneration strategy with soft and highly dividing cardiomyocytes

研究代表者

橋本 謙 (Hashimoto, Ken)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80341080

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,900,000円

研究成果の概要（和文）：心筋細胞は胎生期にのみ分裂能を有する為、成体では心筋梗塞等で失われた心筋を再生することは出来ない。本研究では、我々が同定した心筋分裂促進因子[Fam64a, Novex-3]を用いた心再生を検討した。Fam64aについては過剰発現/KOマウス、及び、成体期心傷害マウスへの一過性且つ局所的なFam64aの導入等の手法により心再生効果を立証できた。Novex-3についてはKOマウスを用いた解析により、Novex-3が細胞分裂に必須の中心体を保護し、微小管の核への移行を阻害することで核を柔軟に保つことにより心筋分裂を促進する分子機序を見出した。今後はこれらを組み合わせた心筋再生の実現を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋細胞は出生直後に分裂能を失う為、成体期において心不全等の心疾患で失われた心筋を再生することは出来ない。iPS細胞由来の心筋は現段階では未熟な胎児様心筋であり、成体心筋の代替としては不十分である。本研究では、我々が同定した心筋分裂促進因子Fam64a, Novex-3の分子作用機序を検討し、将来的な心再生への適用可能性を探った。マウスを用いた過剰発現、ノックアウト、傷害心筋に対する一過性・局所性の導入発現等の手法により、Fam64aの心再生効果を確認できた。Novex-3についても心再生のベースとなる心筋分裂促進機序を明らかにすることが出来た。今後は、両者を組み合わせた心再生の実現を目指す。

研究成果の概要（英文）：Fetal cardiomyocytes (CMs) actively proliferate to form the primitive heart, but they stop dividing shortly after birth. Therefore, CM regenerative potential upon injury is very limited in adult hearts. Here we tested the heart regenerative potential of Fam64a and Novex-3, which we have recently identified as a candidate gene. We have established regenerative potential of Fam64a using CM-specific transgenic/knock out mice models and transient and local administration of Fam64a upon heart injury in adult mice. As for Novex-3, using Novex-3 KO mice models, we demonstrated that Novex-3 in fetal CMs maintained the integrity of the centrosome, which was essential for cell division, and inhibited microtubule relocation from the centrosome to nuclear envelope, thereby keeping CM nuclei compliant and thus promoting CM proliferation. Combined introduction of Fam64a and Novex-3 will be a promising strategy for heart regeneration.

研究分野：心臓生理学

キーワード：心筋 分裂 再生 酸素環境 Fam64a Novex-3

1. 研究開始当初の背景

我々哺乳類の心筋細胞は胎生期子宮内では活発に分裂して原始心臓を形成するが、出生後は細胞周期から離脱し、分裂を停止する。従って、成体では心筋梗塞や心不全等の虚血性心疾患で失われた心筋細胞を分裂・再生することは出来ず、故に本疾患は致死的であり、治療戦略の開発が急務である。我々は最近、心筋分裂には胎生期の低酸素環境が必須であり、出生後の肺呼吸開始による酸素の増加が心筋分裂を停めることを突き止め、胎生期心筋の分裂を促進する重要な三つの遺伝子 (Fam64a, APC/C, Novex-3) を同定した。Fam64a と APC/C は協調して心筋細胞周期を促進する (Hashimoto *Sci Rep* 2017)。一方、Novex-3 は核の柔軟性を増すことで“軟らかい”核を実現し、そのことが心筋分裂を促進する (Hashimoto *Sci Rep* 2018)。本研究では、胎生期に心筋分裂を最大化し得るこれら三因子を最適比率にて成体心筋に導入し、胎内環境を可能な限り再現することで、“軟らかく分裂能の高い”心筋細胞による革新的な心筋再生医療の創出を目指す。

2. 研究の目的

現在、ES/iPS 細胞等の未分化細胞から体外で分化心筋細胞を創出する再生戦略が精力的に進められているが、その成果は皮膚や脂肪等の組織と異なり、心筋では限定的であり、臨床応用には至っていない。この問題に対して我々は発想を大きく転換し、内在性の成体期心筋細胞の分裂能力を再活性化する戦略を進めてきた。先述のように、胎生期の心筋は分裂能が最大となる環境に置かれており、この最適な胎内環境の実態を丁寧に解き明かし、成体心筋細胞に適用することで分裂再生能を付与することを目指している。我々は最近、成体期でも心筋の分裂再生が可能な両生類との比較進化的解析から、心筋分裂には低酸素環境が必須であり、哺乳類では胎生期の子宮内低酸素環境から、出生後の肺呼吸開始による酸素濃度の増加が下流の遺伝子調節を介して心筋分裂を停めることを突き止めた。また、低酸素下の胎児心筋において細胞分裂を促進する三つの重要遺伝子 (Fam64a, APC/C, Novex-3) を同定した。即ち、胎内環境は外部酸素環境を起点として下流の代謝・栄養環境から遺伝子に至る階層的な制御系を構成していると言える。以上を踏まえ、本研究の目的は、このような階層的な胎内環境を成体心筋において可能な限り再現することで、ES/iPS 細胞に依存しない、内在成熟心筋の再生能力に則った革新的な心筋再生医療の実現可能性を検証することである。

3. 研究の方法

(1) 心筋特異的 Fam64a 過剰発現 (TG) マウスを用いた解析

心筋特異的 alpha myosin heavy chain プロモーターの下流にマウス Fam64a 遺伝子配列を繋いだコンストラクトをマウス受精卵にインジェクションすることにより、内在性の Fam64a 発現が失われる出生後において心筋特異的にその発現を長期維持する心筋特異的 TG マウスを得た。本 TG マウスについて、a) 細胞周期・分裂能の解析、b) 心筋分化マーカーの発現解析、c) 心筋収縮能・カルシウム動態解析、d) 個体の生存率解析、e) 転写因子 Klf15 の関与に関する検討を行い、発生初期からの長期にわたる心筋 Fam64a の過剰発現が心筋分裂能や心機能に及ぼす影響を詳細に解析した。

(2) 成体傷害心筋に対する一過性・局所性の Fam64a 導入による心再生効果の検討

心臓冷却傷害を施した野生型成体マウスに対して傷害部近傍に局所性且つ一過性に Fam64a 遺伝子を導入・発現させ、術後 5 週にわたって心機能の回復と心再生効果を解析した。

(3) 心筋特異的 Fam64a ノックアウト (KO) マウスを用いた解析

CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により、Fam64a 遺伝子の特異的エクソンの両端に loxP 配列をノックインしたマウス (Fam64a-flox マウス) を作製し、心筋特異的 Cre マウス (Nkx2.5-Cre; 胎生早期から活性が ON) との交配により心筋特異的 Fam64a KO マウスを作製した。本マウスについて、a) 細胞周期、Ca 調節、心筋幼若化、概日リズムに関する遺伝子発現解析、b) 心筋細胞サイズ・心重量・心肥大に関する解析を行い、内在性 Fam64a が強く発現する胎生早期における Fam64a の欠損が心筋分裂能や心機能に及ぼす影響を詳細に解析した。

(4) Novex-3 KO マウスを用いた解析

Novex-3 は筋サルコメアに局在する巨大蛋白コネクチン (タイチン) の short isoform であるが、その生理機能は長らく未知であった。培養心筋を用いた先行研究では、Novex-3 が胎生期には心筋細胞のサルコメアだけでなく核にも局在し、核膜ラミンのリン酸化を介して核の物理特性を制御、具体的には核の柔軟性を増すことで“軟らかい”核を実現し、そのことが心筋分裂を促進することを見出した (Hashimoto *Sci Rep* 2018)。本研究では、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により Novex-3 特異的エクソンに終始コドン挿入することで KO マウスを作製した。本マウスについて、a) 細胞周期・分裂能の解析、b) 心筋収縮能・カルシウム動態解析、c) 個体の生存率解析、d) Novex-3 と中心体、微小管、及び核物性との関連に関する検討を行い、Novex-3 の心筋分裂促進機序を詳細に解析した。

(5) APC/C の基礎的検討

APC/C は細胞周期の M 期に働くユビキチンリガゼであり、Fam64a を適切な時期に分解に導くことで細胞周期における Fam64a の周期的な増減を実現している。APC/C は分子構造が非常に複雑であることから (10 以上の分子から構成される複合体)、本研究では、最初のステップとして、培養心筋レベルで APC/C を効率よく活性化する方法を検討した。

4. 研究成果

(1) 心筋特異的 Fam64a 過剰発現 (TG) マウスを用いた解析

Fam64a TG マウスでは、新生児期 (生後 12~15 日目)、成体期 (6~7 週齢)、及び老齢期 (25 週齢以降) の全ての時期において細胞周期関連遺伝子の発現レベルが野生型 (WT) マウスより高く、細胞周期マーカー (Ki67, pH3) の陽性率も高かった (図 1, 生後 12~15 日)。即ち、Fam64a TG マウスでは想定通り、出生後の心筋分裂能の亢進が認められた。しかし一方、TG マウスでは加齢と共に心機能の悪化が認め

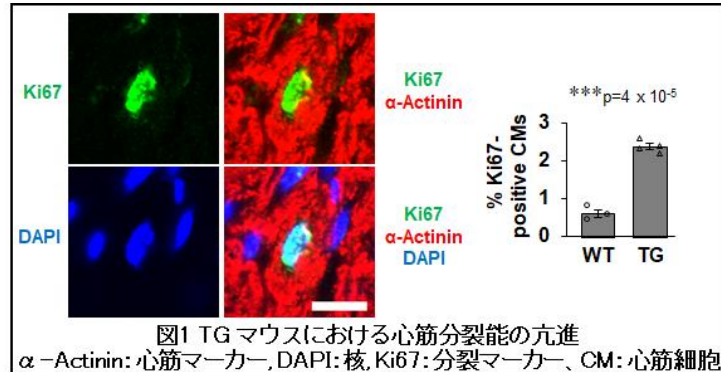


図1 TG マウスにおける心筋分裂能の亢進
α-Actinin: 心筋マーカー, DAPI: 核, Ki67: 分裂マーカー, CM: 心筋細胞

られ (組織染色における心内腔拡大、心エコー解析における左室拡大と収縮率低下)、30 週齢以降は心不全に移行し、個体生存率は WT マウスと比較して著明に低下していた。単離心筋細胞を用いた解析では、TG マウスにおいてカルシウム transient のピーク値の減少、及びピーク到達時間の遅延が認められ、カルシウム調節機構の障害が示唆された。また、単離心筋細胞における収縮率も低下していた。遺伝子レベルでは、心肥大マーカー (ANP) の発現増加、及び、カルシウム調節を初めとする心筋分化・成熟に必要な蛋白の発現低下 (L 型 Ca チャネル、リアノジン受容体、筋小胞体 Ca-ATPase、甲状腺ホルモン受容体 α) が認められた。このような心機能悪化機序を詳細に検討したところ、Fam64a が糖質コルチコイド受容体と複合体を形成し、心筋分化を促進する転写因子 Klf15 を阻害することで心筋の正常な分化を阻害し、心筋細胞を幼若化させることが心機能悪化の主要因であることが明らかとなった。このことは、細胞周期への長期にわたる過度な刺激は大量の幼若・未分化な心筋細胞を作り出し、心再生にとっては逆効果であることを示している (Hashimoto *iScience* 2022)。

(2) 成体傷害心筋に対する一過性・局所性の Fam64a 導入による心再生効果の検討

上記(1)の結果を踏まえ、十分に分化成熟した成体期心筋 (野生型) に冷却傷害を施し、Fam64a を傷害部局所に一過性に導入することにより幼若化を最小化しつつ心筋分裂・再生促進と心機能回復を実現する為の最適プロトコルを検討した。その結果、合成 mRNA を傷害心筋近傍に直接投与することにより、局所的且つ一過性 (最大 7 日) の Fam64a 発現が誘導され、これにより、傷害後 5 週にわたり、心筋細胞周期の促進 (マーカー分子の発現増加)、心線維化の抑制 (マッソン・トリクローム染色)、及び心機能の回復 (心エコー解析) を実現できた (図 2, Hashimoto *iScience* 2022)。この時、心筋の幼若化は殆ど起こっていなかった。今後は、冷却傷害の強度や傷害範囲を変化させ、各々の傷害条件に対する最適プロトコルを決定し、将来的な心筋再生の実現を目指す。

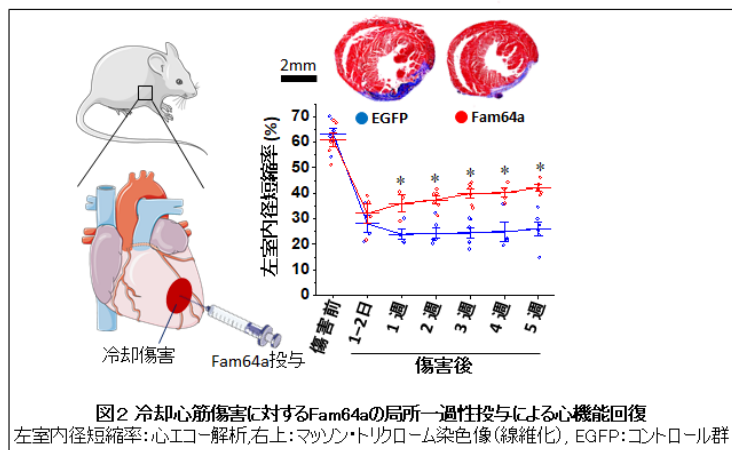


図2 冷却心筋傷害に対するFam64aの局所一過性投与による心機能回復
左室内径短縮率:心エコー解析,右上:マッソン・トリクローム染色像(線維化),EGFP:コントロール群

(3) 心筋特異的 Fam64a ノックアウト (KO) マウスを用いた解析

ゲノム編集により心筋特異的 Fam64a KO マウスの作製に成功し、現在、表現型解析を進めている。定量 PCR による遺伝子発現解析では、新生児心臓において、細胞周期遺伝子群、カルシウム調節遺伝子群、心筋幼若マーカー遺伝子群、及び、概日リズム遺伝子群のいずれも KO マウスで減少する傾向が認められた。また、新生児期での心臓拡大、成体期における個々の心筋細胞サイズの増大、及び、体重に占める心重量比の増大が認められ、KO マウスでは加齢と共に何らか

の機序で心肥大が進行することが示唆された。今後は、成体期マウスにおいて上記の心臓冷却傷害を施し、野生型マウスとの反応の違いや、Fam64a の一過性導入による心機能回復を検討すると共に、内在性の Fam64a が強く発現する胎生早期に着目し、Fam64a の欠損が心筋分裂能や心機能に及ぼす影響を分子レベルで詳細に明らかにする予定である。

(4) Novex-3 KO マウスを用いた解析

胎生期心筋を用いた解析では、Novex-3 が心筋のサルコメアだけでなく核膜全域に渡って斑点状に局在し、これらの一部が更に spot 状に集積し、細胞分裂に必要且つ微小管形成中心を構成する中心体の構成蛋白 (γ -tubulin, PCM-1, PCNT, AKAP9) と共局在し、これらの核への移行を阻害することで中心体機能を正常に維持し、結果として分裂能を維持していることが示唆された (図 3)。出生後に Novex-3 が核から消失するとこの阻害がなくなり、中心体と微小管形成中心が核周囲に移行することで中心体機能が喪失し、分裂が停止する。Novex-3 KO マウスでは胎生期において既にこの移行が起こり、胎生中期[妊娠 13 日目]には心筋細胞の分裂阻害が認められた。また、核周囲に微小管が異常に蓄積することで、心筋核は野生型に比べて硬く、細胞内の端部に偏った異常な配置を示した。新生児期には、上記の分裂阻害を代償する為、個々の心筋サイズが増大し、同時に分化不全の兆候が認められた。更に、加齢と共に心筋収縮不全、カルシウム調節機構の破綻が起こり、高齢期には左室拡張、壁厚減少、心不全を呈し、生存率が有意に低下した。以上の知見は、再生能を失った成体期心筋に核型 Novex-3 を導入発現させることで、正常な中心体を復元し、軟らかく分裂能の高い心筋を創出する再生戦略の基盤となり得る (図 4)。

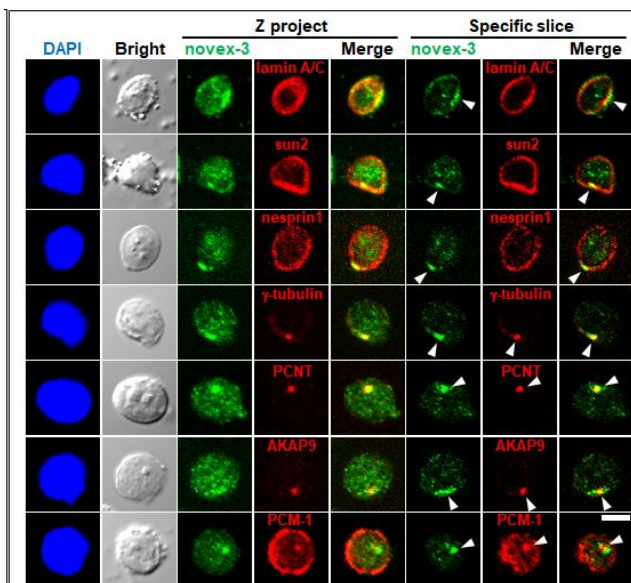
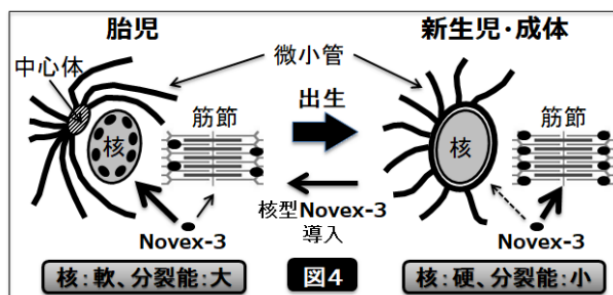


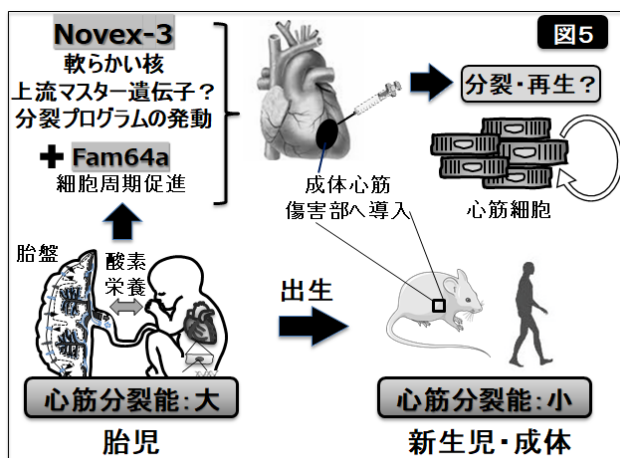
図3 核膜に発現するNovex-3の中心体蛋白との共局在
DAPI: 核, Bright: 明視野, Z-project: Z積算, Specific slice: 特定断面, scale: 5 μ m



(5) APC/C の基礎的検討

本研究では、最初のステップとして、培養心筋レベルで APC/C を効率よく活性化する方法を検討したが、APC/C の分子構造が非常に複雑であることから (10 以上の分子から構成される複合体)、現時点で期待したような成果は得られていない。今後は APC/C の主要活性化因子 Cdc20, Cdh1 に着目し、これらの強発現により APC/C 複合体の活性化を実現できる可能性を様々な手法を用いて検討していく予定である。

以上の成果を踏まえ、今後は Fam64a と Novex-3 を組み合わせた心筋再生戦略を構築する (図 5)。まずはマウス等の小動物で、次にブタなどの大型動物での検討を行い、将来的にヒト臨床に応用可能な形での再生を目指す。これにより、ES/iPS 細胞に依存しない、内在成熟心筋の再生能力に則った革新的な心筋再生医療の実現を目標に今後も検討を重ねたい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hashimoto K, Kodama A, Ohira M, Kimoto M, Nakagawa R, Usui Y, Ujihara Y, Hanashima A, Mohri S	4. 巻 25(5)
2. 論文標題 Postnatal expression of cell cycle promoter Fam64a causes heart dysfunction by inhibiting cardiomyocyte differentiation through repression of Klf15	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.104337.	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 橋本 謙, 臼居 優, 花島 章, 氏原嘉洋, 塚田孝祐, 毛利 聡	4. 巻 48(10)
2. 論文標題 酸素環境と心臓再生 (Oxygen environment and cardiac regeneration)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 30(494)-33(497)
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 Usui Y, Kimoto M, Hanashima A, Hashimoto K, Mohri S.	4. 巻 17(11)
2. 論文標題 Cardiac hemodynamics and ventricular stiffness of sea-run cherry salmon (<i>Oncorhynchus masou masou</i>) differ critically from those of landlocked masu salmon	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0267264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0267264	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本 謙
2. 発表標題 心筋細胞分裂促進因子Fam64aの長期強制発現は Klf15の抑制により心不全を誘発する
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ken Hashimoto
2. 発表標題 Evolutionary significance of low oxygen environments in utero: Implications for heart regeneration.
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ken Hashimoto
2. 発表標題 Analysis of hypoxic in utero environments that maintain cardiomyocyte proliferation and its implications for regeneration in adults
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akira Hanashima
2. 発表標題 Evolution of the coronary circulation hearts by shortening the elastic regions of connectin
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本 謙
2. 発表標題 コネクチンnovex-3は胎児心筋細胞の核を軟らかくすることで分裂を促進する
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学 生理学1教室 オリジナルホームページ
<https://physiology1kawasaki.wixsite.com/website-2>
リサーチマップ：橋本 謙（代表者）
<https://researchmap.jp/read0071085>
ORCID：橋本 謙（代表者）
<https://orcid.org/0000-0001-6194-9971>

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	毛利 聡 (Mohri Satoshi) (00294413)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究分担者	花島 章 (Hanashima Akira) (70572981)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	
研究分担者	氏原 嘉洋 (Ujihara Yoshihiro) (80610021)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (13903)	

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
---------	---------