1版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ６ 月 １３ 日現在

機関番号：３５３０３
研究種目：挑戦的研究（開拓）
研究期間：2017～2021
課題番号：１７Ｈ０６２７２・２０Ｋ２０３０６
研究課題名（和文）胎児循環における物質輸送特性の再評価と胎児心血管系制御システムの解明

研究課題名（英文）Interpretation of regulatory system of fetal cardiovascular development with re-evaluation of substance transport characteristics in fetal circulation

研究代表者
毛利　聡（Mohri, Satoshi）

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：００２９４４１３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　18,500,000円

研究成果の概要（和文）：生体は多彩な細胞で構成されるが、元は１個の受精卵であり細胞分裂を繰り返して各々の機能を獲得していく。その仕組みにおいて遺伝子など分子ネットワークが重要な役割を果たしているが、本研究では胎児循環を酸素やアミノ酸に対する独自の輸送特性によって胎児生体機能を制御する情報システムとして捉え、心筋細胞の分裂・分化に焦点を当て解析した胎児循環では酸素濃度が低く、出生に伴い高濃度酸素に曝露されるが、その環境変化を情報として利用している仕組みを解明した。主要因子としてFam64aを同定し、胎生期に細胞分裂を活発に行う心筋細胞が出生後分裂能を失うメカニズムやその応用として心筋障害時の機能回復に関して検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
再生医療の実現を目指してiPS細胞など多能性を持つ細胞から様々な細胞への分化誘導の研究が精力的に進められている。出生直後に分裂能を失い心筋梗塞などの疾病後にも増殖しない心筋細胞は再生医療のニーズの高い有望なターゲットとして注目され、より高い分化・純度を求めて多くの誘導因子が報告されている。本研究では成体内での発達過程における環境として酸素およびアミノ酸濃度に着目して心筋細胞の分裂能制御メカニズムの解明に取り組んだ。出生に伴う酸素濃度変化による心筋細胞の分裂能喪失の分子メカニズムに迫ると共に、短時間の高濃度酸素曝露でも分裂能が低下することが明らかになり、効率的組織培養への知見を得ることが出来た。

研究成果の概要（英文）：The body is composed of a variety of cells, but it is originally a single fertilized egg that repeatedly divides to acquire new functions. In this study, we analyzed the fetal circulation as an information system that controls fetal biological functions through unique transport characteristics of oxygen and amino acids. The analysis focused on the division and differentiation of cardiomyocytes. We identified Fam64a as a major factor, and investigated the mechanism by which cardiomyocytes, which actively divide during fetal life, lose their mitotic potential after birth, and its application to functional recovery during myocardial injury.

研究分野：循環生理学

キーワード：胎児循環　低酸素　アミノ酸　心筋細胞　細胞分裂　心筋肥大　不整脈

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

失われた臓器機能を回復する新しい治療法としての再生医療実現のために、様々な細胞に分化する能力：多能性を持つ ES 細胞や iPS 細胞から様々な細胞への分化誘導の研究が精力的に進められている。その中でも出生直後に分裂能を失い心筋梗塞などの疾病による喪失後も増殖・回復しない心筋細胞は再生医療のニーズの高い有望なターゲットとして注目され、より高い分化・純度を求めて多くの誘導因子が報告されていたが、実用に耐える十分な分化、つまり成人ヒト心筋細胞と同等の機能を果たすことが出来る心筋細胞の創出は実現していなかった。特定の遺伝子機能を解析する要素還元的な手法でのアプローチが主流であったが、本研究ではこの状況を打開する方法論の候補として細胞分裂を活発に繰り返し急速な臓器発育を行う胎児循環における酸素やアミノ酸などの輸送特性と、遺伝子調節を含めた細胞分化プロセスを生体システムとして捉えた階層的解明に取り組んだ。

２．研究の目的

(1) 胎児循環における低酸素環境維持と心筋細胞分裂能

胎児循環は母体から胎児に酸素や体を構成する基質を輸送する一過的な循環システムであるが、成人とは異なる特性を有している。酸素運搬に関しては、胎児赤血球中のヘモグロビンは成人に比べて酸素と結びつきやすく、酸素を効率良く運搬する性質として解釈されてきた。しかしながら胎児循環で最も酸素分圧が高い臍帯静脈で～25mmHg、低い臍帯動脈では～20mmHg と大差ない低酸素濃度の血液が循環しており、細胞分裂を盛んに繰り返している胎児の DNA 損傷を防ぐことを目的とした低酸素環境維持である可能性がある。低酸素環境は、出生後肺呼吸の開始による酸素分圧上昇と一致して心筋細胞は分裂能を失い分化の方向に進むが、我々はこの酸素分圧変化が心筋細胞の分裂から分化へ向かうシグナルであると考え、その分子メカニズムを解明する。

(2) 胎児循環における選択的アミノ酸輸送による心筋細胞の分裂・分化制御

出産を軽くする目的で妊娠時に十分な栄養を摂らずに低体重で出生した新生児は、成人してから心・血管病のリスクが高いことが報告されており、胎児期の環境が遺伝子発現与える影響は生涯にわたり履歴として残る。胎児の体を形成するためのアミノ酸は胎盤を介して輸送されるが、胎盤において母体血と胎児血が混合せず胎盤膜と呼ばれる胎児側血管と母体側血液を境界する細胞組織に発現する輸送体（トランスポータ）によって能動的に移送される。このトランスポータは輸送するアミノ酸によって使い分けられており、胎児循環における選択的アミノ酸輸送と胎児心筋細胞の分裂・分化の相関を明らかにする。

３．研究の方法

(1)-1「心筋細胞分裂能制御因子としての酸素環境」

胎生 16 日のマウス心筋細胞を単離し、酸素濃度調節下（3%, 21%）に細胞が分裂する様子を観察・定量化するシステムを確立した。この手法により Ki67 細胞や pH3 など分裂マーカーによる分子的な解析に加え、多核細胞である心筋細胞が細胞質分裂まで完了する比率を評価した。また、短時間の大気曝露でも心筋細胞の分裂に影響がある可能性を考え、マウス胎児心筋細胞を単離するプロセスでも胎内酸素環境とほぼ同等の 3%を維持し、比較検討した。

(1)-2「出生に伴う高濃度酸素曝露による遺伝子発現変化」

出生に伴う肺呼吸の開始により、胎児循環による低酸素環境は終了し高濃度酸素に曝露される。この酸素環境変化をトリガーとする遺伝子発現変化を解明するために、1) 胎生 16 日マウスと出生後 2 日の仔マウスの心筋細胞における遺伝子発現比較　2) 胎生 18 日マウス心筋細胞を単離・培養し、異なる酸素濃度（3%, 21%）で 48 時間培養した後に遺伝子発現比較を行った。

(1)-3「心筋細胞分裂促進因子 Fam64a の解析」

出生前後における心筋細胞の遺伝子発現変化と培養心筋細胞の低酸素から高濃度酸素への切り替えによる遺伝子発現変化の比較から、胎児期に心筋細胞の分裂を促進し出生による酸素濃度変化により分裂を停止させる因子として同定した Fam64a について出生前後の発現量変化、培養細胞での酸素分圧変化に伴う発現量変化を検討した。更に siRNA を用いた **Fam64a** 発現抑制と哺乳類細胞に効率よく感染するバキュロウイルスによる遺伝子導入により、胎児心筋細胞における Fam64a の過剰発現系による検討を行った。

(1)-4「Fam64a トランスジェニックマウス解析と心筋再生への応用」

αミオシン重鎖プロモーター下流に **Fam64a** 配列をクローニングし、心筋細胞特異的に **Fam64a** を高発現するトランスジェニック（TG）マウスを作成した。心エコーによる心機能評価

や、電図による催不整脈性、Fura-2 による Ca^{2+}トランジェントなどの計測、赤外線モーションディテクターを用いたマウスの運動量解析による運動活性評価を行った。更に、**Fam64a** の持つ細胞周期促進作用を心筋再生医療に応用することが出来るか検討するために、野生型成体マウスの心臓を凍結損傷させて Fam64a-FLAG またはコントロール EGFP をコードする mRNA を直接心筋内に注入して細胞分裂能や心機能評価を行った。

(2)-1 **「心筋細胞のアミノ酸環境解析」**

ラット胎児、新生児、成体の全血（遠心分離後の血漿）および心臓組織液（生理食塩水にて灌流後心室をホモジナイズして上清を分離）の各種アミノ酸濃度を比較してその特徴を評価した。

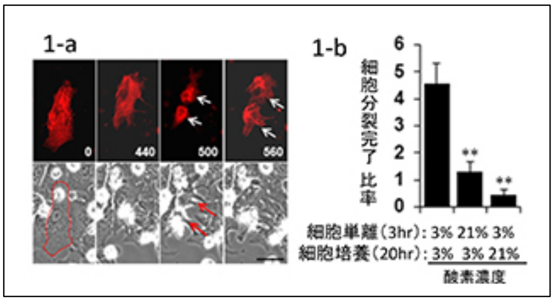
(2)-2 **「心筋分裂において重要な役割を果たすアミノ酸の探索・同定」**

アミノ酸不含の培地に一般的に用いられている培養液に含まれるアミノ酸（15 種）を一種ずつ添加した溶液を作成し、マウス胎児心筋細胞を培養して細胞分裂マーカーによる評価を行った。逆にアミノ酸を一種ずつ除去した溶液を作成して同様の評価を行った。また、標準市販培地に含まれるアミノ酸の種類を除去した培地を作成し、胎生 17 日、20 日のラット心筋細胞を単離し、20 時間培養して Ki-67 にて分裂能評価を行った。

４．研究成果

(1)-1 **「胎児心筋細胞は短時間の高濃度酸素曝露で分裂能が低下する。」**

心筋細胞単離に要する 3 時間とその後の培養 24 時間を、それぞれ酸素濃度 3%と 21%の組み合わせとして細胞分裂が完了する割合を検討した。心筋細胞であることを確認するためにサルコメアαアクチニン-mCherry バキュロウイルスを導入した細胞分裂動態の代表的なタイムラプス記録（図 1 -a）と高濃度酸素曝露による細胞分裂の比率（図 1 -b）を示す。図中の数字は時間（分）を示し、有糸分裂と細胞質分裂のイベントを矢印で示している。単離作業・培養中とも低酸素で維持した群は 4.5%が細胞分裂を完了したのに対し、低酸素で培養したとしても単離の段階で大気酸素に曝露されると細胞分裂する比率は 1.2%に低下した。また、低酸素下で分離した後 24 時間大気酸素濃度に曝露されると全て低酸素の群に比べて細胞分裂する比率は 1/10 となった。この結果より活発に細胞分裂し臓器を成長させる胎児には短時間でも高濃度な酸素に曝されることのないロバスト低酸素環境が必要であることが示唆された。

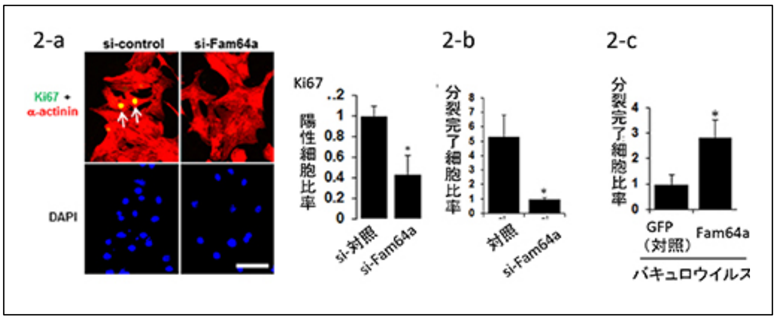


(1)-2 **「出生後酸素濃度上昇により発現減弱する胎生期心筋細胞増殖因子：Fam64a の同定」**

胎児と新生児マウスの心筋細胞、酸素濃度を 3%→21%発現と変化させた時のマウス培養心筋細胞での比較を行った。そしてプロファイルが共通する重要遺伝子を選定し、それぞれのノックダウンによる細胞増殖抑制効果判定により細胞周期促進遺伝子を最も強く抑制する遺伝子として Fam64a を同定した。細胞周期停止の調節因子として知られる p53 は、出生前後の心筋細胞でも培養心筋細胞の酸素への曝露によっても変化しなかった。同様に、細胞成長の重要調節因子である mTOR および代謝制御因子である AMPKαにも変化は認められなかった

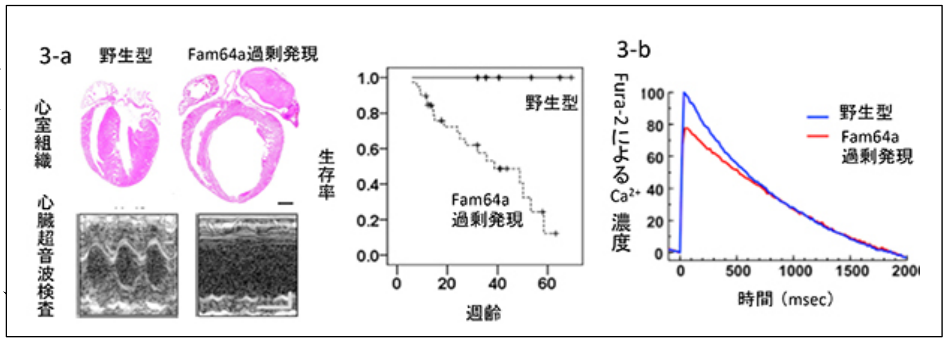
(1)-3 **「Fam64a は低酸素によって胎児期心筋細胞に発現増加し、分裂能を維持している。」**

低酸素環境の心筋細胞核には Fam64a タンパク質が豊富に発現していたが、この発現は培養中の高濃度酸素曝露によっても、呼吸を開始して酸素濃度が上昇する出生後の心筋細胞においても劇的に抑制されていた。低酸素環境下の培養胎児心筋細胞において Fam64a をノックダウンすると、主要な細胞周期促進遺伝子および核内 Ki-67 発現が有意に抑制された（図 2-a）。更に、このノックダウンにより培養胎児心筋細胞の分裂が 82%著しく抑制された（図 2-b）。更にバキュロウイルスによる遺伝子導入により、培養胎児心筋細胞に Fam64a の過剰発現系を確立した。過剰発現実験は、高酸素条件下で内因性の Fam64a a の発現低下した状態で行い、Fam64a の mRNA 発現量は対象と比較して、約 80 倍に増加した。Fam64a の過剰発現は、GFP タグ付きタンパク質として検出され、内在性 Fam64a と同様に心筋細胞および線維芽細胞の核に局在した。Fam64a の過剰発現は、心筋細胞分裂を有意に促進し、Fam64a の発現レベルが心筋細胞の増殖と正相関を示しており（図 2-c）、細胞周期促進因子としての Fam64a の役割を示唆している。



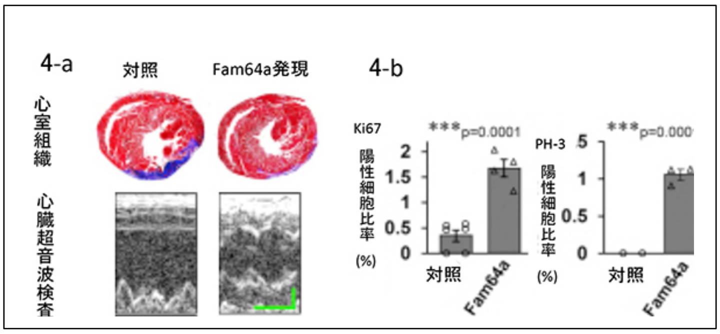
(1)-4　**「Fam64a 過剰発現は Klf15 を抑制することで心筋細胞の分化を阻害し心機能を障害するが、分化した心臓では障害時の機能回復を促進した。」**

生体内では出生後の酸素濃度上昇により著しく発現低下する Fam64a を遺伝子操作により発現を維持すると、左心室の著明な収縮性の低下と拡大を認め、生存率解析では、TG マウスの生存率が著しく低下していた（図 3-a)。Ca^{2+}トランジェント測定では、野生型マウスと比較して、TG マウスでは Ca^{2+}振幅のピークの減少およびピークまでの時間の遅延が認められ、減衰期の時定数が増加して筋小胞体の Ca^{2+}量が減少し、TG マウスでは筋小胞体への Ca^{2+}取込が損なわれていることが示唆された。(図 3-b)。qPCR 解析により、Myh7、Nppa、Nppb、Tnnt1、Acta2、Myl4、Cacna1h、Pi16 など、TG マウスにおける様々な未熟児遺伝子が強く誘導され、Fam64a TG マウスでは、出生後発生過程で心筋細胞の分化が損なわれ、未成熟な胎児マーカーの発現が増加して心機能発達に障害をもたらすことが示された。RNA-seq 解析では、最も差次的に変化した経路として概日リズムを同定した TG マウスでは、日中・夜間にかかわらず心拍数は低かった。(2)TG マウスの夜間と昼間の心拍数の比は WT マウスより有意に低く、昼間（不活性期）優位の心拍調節異常であることがわかった。さらに、TG マウスでは、連発する心室性期外収縮を頻繁に認めた。コネキシン 43、K^+チャネル遺伝子の発現低下が原因の可能性がある。



上記のような Fam64a の表現形をもたらす分子機序として 、調律と心筋細胞分化の障害などの特徴的な表現型を示したことから、これらのプロセスに関与する主要転写因子 Klf15 に着目した。Klf15 の阻害を仲介し得る Fam64a の相互作用パートナーを免疫沈降法により包括的に検索し、グルココルチコイド受容体（GR）を同定した。そして HEK293T/17 細胞のルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、Fam64a が GR による Klf15 の転写活性化を抑制すること、デキサメタゾンによる Klf15 の活性化が Fam64a によってブロックされることを確認した。これらは、Fam64a が、GR を介した転写調節により、Klf15 の発現を阻害することを示している。

野生型成体心臓の凍結損傷直後に Fam64a-FLAG またはコントロール EGFP をコードする mRNA を直接心筋内に注入して心機能や組織学的解析を行ったところ、凍結損傷直後は両群とも心収縮機能が著しく損傷していたが、Fam64a-FLAG mRNA を投与したマウスは、対照の EGFP mRNA を投与したマウスと比較して、5 週間の追跡期間中に左心室の拡張を最小限に抑え、機能回復が漸次改善し、Masson の三色染色による組織学的評価では、損傷後 3 週間で、Fam64a-FLAG 群では線維化が少なかった（図 4-a)。。受傷後 5 週目の凍結損傷部位を含む心臓切片の評価では、Ki-67 および pH3 の陽性率の上昇によって示されるように、EGFP 群よりも Fam64a-FLAG 群の方が細胞周期活性が高いことが示された(図 4-b)。Fam64a は発生初期の心筋細胞の分化を阻害するが、一度分化した成体心筋細胞の脱分化を誘導しないことを示し、心筋細胞傷害時の心臓機能回復に寄与する可能性が示唆された。



(2)-1

血中アミノ酸の検討では、胎児にてリシンとフェニルアラニンが顕著に高値を示した。また、異なる動物種として成体でも心筋細胞の分裂能を有し心筋細胞障害時には細胞分裂により組織修復能を示す両生類のアホロートルでは 3-メチルヒスチジンが高価であった。心室組織液中アミノ酸では胎児期に著しく高値を示すものは無かったが成体ではグリシンやセリン、トレオニンが低値であった。アホロートルではアルギニン、ヒスチジン、イソロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、チロシン、3-メチルヒスチジンと多くの種において著明な高値を示した。

(2)-2

アミノ酸添加による心筋細胞分裂能の検討では濃度による差はあるものの、不含培地に比較して多くのアミノ酸が細胞分裂を示す Ki-67 の発現増加を惹起した一方、フェニルアラニンやトリプトファンでは Ki-67 の発現が減弱していた。アミノ酸除去に関しては、①「セリン・グリシン・システイン」、②「ヒスチジン・トリプトファン・イソロイシン」、③「ヒスチジン・メチオニン・ロイシン・バリン・リシン・グリシン・アルギニン・システイン・イソロイシン・セリン」を除去した３群で比較した。①群、②群とも Ki-67 陽性率は低下しており、両群を含んで除去した③群では更に Ki-67 陽性率は低下した。この傾向は胎生 17 日目よりも胎生 20 日目の心筋細胞において顕著であった。

まとめ

哺乳類の顕著な特性の一つである胎生を維持する胎児循環はロバスト低酸素環境を維持するシステムであり、今回の研究対象とした心筋細胞に関しては出生前後の酸素分圧変化が分裂から分化へのシグナルとして機能していることが示唆された。酸素はエネルギー獲得のために不可欠な因子であるが、胎児期細胞にとっては過剰な供給は機能・形態を制御する情報であり、再生医療におけるティシュエンジニアリングにおいては短時間の高濃度酸素曝露でも注意を払う必要がある。また、胎盤のアミノ酸輸送タンパクには選択性があり、胎児・新生児・成体では異なる環境となっており、酸素同様に生体情報として機能している可能性がある。今後の生物研究として遺伝子を始めとする分子メカニズムに基づいた要素還元的な研究の重要性は論を待たないが、多階層のシステムとしての生体研究についても同様に重要であると認識された。

引用文献

1. Hashimoto K, Kodama A, Honda T, Hanashima A, Ujihara Y, Murayama T, Nishimatsu SI, Mohri S. Fam64a is a novel cell cycle promoter of hypoxic fetal cardiomyocytes in mice. Sci Rep. 2017 Jun 30;7(1): 4486..

2. Hashimoto K, Kodama A, Ohira M, Kimoto M, Nakagawa R, Usui Y, Ujihara Y, Hanashima A, Mohri S. Postnatal expression of cell cycle promoter Fam64a causes heart dysfunction by inhibiting cardiomyocyte differentiation through repression of Klf15. iScience. 2022 May 20; 25(5): 104337.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　4件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Hashimoto K, Kodama A, Sugino M, Yobimoto T, Honda T, Hanashima A, Ujihara Y, Mohri S.	４．巻 -
２．論文標題 Nuclear connectin novex-3 promotes proliferation of hypoxic foetal cardiomyocytes.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-018-30886-9.	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 Honda T, Hanashima A, Ujihara Y, Hashimoto K, Tanemoto K, Mohri S.	４．巻 44
２．論文標題 Turtle spongious ventricles exhibit more compliant diastolic property and possess larger elastic regions of connectin in comparison to rat compact left ventricles	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Kawasaki Medical Journal	６．最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11482/KMJ-E44(1)1	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 Hashimoto K, Kodama A, Honda T, Hanashima A, Ujihara Y, Murayama T, Nishimatsu SI, Mohri S.	４．巻 -
２．論文標題 Fam64a is a novel cell cycle promoter of hypoxic fetal cardiomyocytes in mice.	５．発行年 2017年
３．雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-017-04823-1	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 2.Hashimoto K, Kodama A, Ohira M, Kimoto M, Nakagawa R, Usui Y, Ujihara Y, Hanashima A, Mohri S.	４．巻 -
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 -
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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　1件）

1．発表者名 花島章，氏原嘉洋，岩佐真衣，児玉彩，橋本謙，毛利聡
2．発表標題 進化とともに高弾性化する脊椎動物心臓：バネ分子コネクチンの一次構造決定による心室機械特性の検討
3．学会等名 第58回生体医工学会大会
4．発表年 2019年

1．発表者名 氏原嘉洋，花島章，本田威，児玉彩，橋本謙，毛利聡
2．発表標題 鳥類心臓の拡張機能の基礎的解析
3．学会等名 第58回生体医工学会大会
4．発表年 2019年

1．発表者名 Ken Hashimoto, Aya Kodama, Miki Sugino, Tomoko Yobimoto, Takeshi Honda, Akira Hanashima, Yoshihiro Ujihara, Satoshi Mohri
2．発表標題 Nuclear connectin novex-3 is essential for proliferation of hypoxic fetal cardiomyocytes
3．学会等名 9th FAOPS (Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress)（国際学会）
4．発表年 2018年

1．発表者名 Ken Hashimoto, Aya Kodama, Miki Sugino, Tomoko Yobimoto, Takeshi Honda, Akira Hanashima, Yoshihiro Ujihara, Satoshi Mohri
2．発表標題 Connectin novex-3 enhances cardiomyocyte proliferation in hypoxic fetal environment.
3．学会等名 第57回日本生体医工学会大会
4．発表年 2019年

１．発表者名 橋本謙、児玉彩、呼元知子、杉野充希、花島章、氏原嘉洋、毛利聡
２．発表標題 低酸素環境を起点とする多階層の心筋分裂・再生機構の解析
３．学会等名 第95回日本生理学会大会
４．発表年 2018年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学・生理学１　ホームページ https://physiology1kawasak.wixsite.com/website-2

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	塚田　孝祐 (Tsukada Kosuke) (00351883)	慶應義塾大学・理工学部（矢上）・教授 (32612)	
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	橋本　謙 (Hashimoto Ken) (80341080)	川崎医科大学・医学部・准教授 (35303)	

6．研究組織（つづき）

	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	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