

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390248
 研究課題名（和文） 最適化された細胞外環境を用いた心筋細胞移植法の確立

研究課題名（英文） Cardiomyocyte niche for cardiac regeneration:

研究代表者

牧野 伸司 (MAKINO SHINJI)
 慶應義塾大学・医学部・特任准教授
 研究者番号：20306707

研究成果の概要（和文）：心室形成不全の表現型を持つメダカ変異体動物を化学変異剤により作製、ポジショナルクローニング法により原因遺伝子の同定と作用機序の解明を行った。

ポジショナルクローニング法により原因遺伝子は、versican というコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるという結果を得た。プロテオグリカンは脊椎動物の細胞外マトリックスで生物活性など持たない物理的な支えと考えられてきたが、カエデ蛍光蛋白の導入実験成果から、接触している心筋幹細胞の移動を能動的に制御して微小環境を形成していることが分かった。心室形成のためには心筒形成後に外部からの心臓幹細胞の流入が必要であることを発見した。

研究成果の概要（英文）：Ventricular chamber growth requires cardiomyocyte proliferation and progenitor cells migration from outside the heart tube. We investigated how these progenitors are integrated into heart.

Using forward-genetic ENU mutagenesis screening, we identified a cardiovascular mutant Medaka fish called linear heart tube (lht). Mutant embryos terminated at the linear heart tube stage. Positional cloning and sequencing analyses revealed a mutation in the versican, a proteoglycan gene. Semiquantitative RT-PCR showed normal versican mRNA levels in the lht mutant, but significantly decreased protein levels. Injection of a versican-specific morpholino recapitulated the lht phenotype. Photoconverted Kaede labeled newly differentiated cardiomyocytes in the ventricular chamber from outflow in wild-type fish, but this recruitment of cardiac progenitors was disrupted in the lht mutant.

Versican is essential for ventricular chamber formation through recruitment of cardiac progenitor cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：めだか、順遺伝学、プロテオグリカン

1. 研究開始当初の背景

我が国における心不全患者は160万人とも言われ、食生活の欧米化とともにその数は年々

増加の一途をたどっており、心不全に対する有効な治療法の確立が社会全体で急務となっている。重症心不全の根本的治療方法とし

では心臓移植法が確立しているが、日本では著しいドナー不足、移植後の拒絶反応、脳死判定を巡る倫理観から心臓移植はいまだ普及しておらず、新しい心筋再生療法の確立が急がれている。

2. 研究の目的

心筋細胞の増殖、分化維持における最適な細胞外環境をつくることにより、心筋再生医療の実現を目指すことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

心室形成不全の心臓表現型を持つ変異体動物を化学変異剤により作製した。変異体動物からポジショナルクローニング法により、原因遺伝子の同定と生命現象の可視化による作用機序の解明を行った。

4. 研究成果

ポジショナルクローニング法により原因遺伝子は、versican というコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるという結果を得た。プロテオグリカンは細胞外マトリックスの主要成分であり、多様な分子群を結集し組織構築に寄与する。最近までプロテオグリカンは脊椎動物の細胞外マトリックスで生物活性など持たない物理的な支えや、たんなる足場と考えられてきた。しかし我々のカエデ蛍光蛋白の導入実験成果から、接触している心筋幹細胞の移動を能動的に制御している niche であることが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

(1)Onizuka T, Yuasa S, Kusumoto D, Shimoji K, Egashira T, Ohno Y, Kageyama T, Tanaka T, Hattori F, Fujita J, Ieda M, Kimura K, Makino S, Sano M, Kudo A, Fukuda K. Wnt2 accelerates cardiac myocyte differentiation from ES-cell derived mesodermal cells via non-canonical pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2011 Nov 29. 査読有

(2)Hara M, Yuasa S, Shimoji K, Onizuka T, Hayashiji N, Ohno Y, Arai T, Hattori F, Kaneda R, Kimura K, Makino S, Sano M, Fukuda K. G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation *The Journal of Experimental Medicine* 2011 Apr 11; 208(4):715-27 査読有

(3)Li W, Yamashita H, Hattori F, Chen H, Tohyama S, Satoh Y, Sasaki E, Yuasa S, Makino S, Sano M, Fukuda K. Simple autogeneic feeder cell preparation for pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. 2011 Jan;6(1):83-9. 査読有

(4)Tamura Y, Matsumura K, Sano M, Tabata H, Kimura K, Ieda M, Arai T, Ohno Y, Kanazawa H, Yuasa S, Kaneda K, Makino S, Nakajima K, Okano H, and Fukuda K. Neural crest-derived stem cells migrate and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Jan 6 査読有

(5)Uchida K, Aramaki M, Nakazawa M, Yamagishi C, Makino S, Fukuda K, Nakamura T, Takahashi T, Mikoshiba K, Yamagishi H Gene knock-outs of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors types 1 and 2 result in perturbation of cardiogenesis. *PLoS ONE* 2010 Sep 1;5(9). pii: e12500. 査読有

(6)Yuasa S, Onizuka T, Shimoji K, Ohno Y, Kageyama T, Yoon SH, Egashira T, Seki T, Hashimoto H, Nishiyama T, Kaneda R, Murata M, Hattori F, Makino S, Sano M, Ogawa S, Prall OW, Harvey RP, Fukuda K. Zac1 is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. *Circ Res*. 2010 Apr 2;106(6):1083-91 査読有

(7)Taneda Y, Konno S, Makino S, Morioka M, Fukuda K, Imai Y, Kudo A, Kawakami A, Epigenetic control of cardiomyocyte production in response to a stress during the medaka heart development, *Dev. Biol*. 2010 Jan 21 : 30-40 査読有

(8)Hattori F, Chen H, Yamashita H, Tohyama S, Satoh Y, Yuasa S, Li W, Yamakawa H, Tanaka T, Onitsuka T, Shimoji K, Ohno Y, Egashira T, Kaneda R, Murata M, Hidaka K, Morisaki T, Sasaki E, Suzuki T, Sano M, Makino S, Oikawa S & Fukuda K Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes *Nature methods* 2010 Jan;7(1):61-6 査読有

(9)Suzuki R, Hattori F, Itabashi Y, Yoshioka M, Yuasa S, Manabe-Kawaguchi H, Murata M, Makino S, Kokaji K, Yozu R, Fukuda K. Omentopexy enhances graft function in myocardial cell sheet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Sep 18;387(2):353-9. 査読有

〔学会発表〕(計 23 件)

(1)第 34 回日本分子生物学会 2011.12.13
横浜

ワークショップ

Can the heart regenerate? Approaches or understanding developmental cardiac diversity and reconstruction of the functional heart

Recruitment of Cardiac Progenitor Cells through Outflow Tract is Essential for Ventricular Chamber Formation in Medaka Fish

Makino S, Yoon SH, Fukuda K

(2)The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research, 2011.12.3 Tokyo

Symposium3

Alteration of Binding Between Titin and Murf1 is Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy in a Fish Model and In Human Familial HCM Patients

Shinji Makino

(3)第 84 回アメリカ心臓病学会 2011.11.12-16 Orlando Florida U.S.A.

Increased Binding Between Titin and Murf1 is Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy in a Fish Model and In Human Patients

Enomoto H, Makino S, Higashikuse Y, Fukuda K

(4)第 84 回アメリカ心臓病学会 2011.11.12-16 Orlando Florida U.S.A

Cell Type-Specific Decrease of Gene Body DNA Methylation Levels in Cardiomyocyte-specific Genes Contribute to the Transcriptional Efficiency at Postnatal Development of Mouse Cardiomyocytes

Oda M, Makino S, Fukuda K

(5)第 75 回日本循環器学会 (横浜) 2011.8.3-4

Epigenetic Changes in Myosin Heavy Chain (MHC) Gene Regulation in Mouse Cardiomyocytes

Oda M, Makino S, Fukuda K

(6)第 75 回日本循環器学会 (横浜) 2011.8.3-4

Missense Mutation in the M-band Region of titin Leads to Hypertrophic Cardiomyopathy in Medaka Fish and Human

Enomoto H, Makino S, Higashikuse Y, Sano M, Kudo A, Kawakami A, Kimura A, Arimura T, Fukuda K

(7)第 75 回日本循環器学会 (横浜) 2011.8.3-4

Recruitment of Cardiac Progenitor Cells through Outflow Tract is Essential for Ventricular Chamber Formation

Yoon SH, Shimizu A, Fujita M, Kawakami A, Kudo A, Sano M, Fukuda K, Makino S

(8)第 75 回日本循環器学会 (横浜) 2011.8.3-4

A New Animal Model of Takotsubo Cardiomyopathy by Pilocarpine-induced Epilepsy

Arai T, Kimura, K, Makino S, Sano M, Fukuda K

(9)第 88 回日本生理学会、第 116 回日本解剖学会、合同総会 (横浜) 2011. 3. 28

Symposium7 A comprehensive approach to understand the formation of the cardiovascular network

S07-5 Genetic analysis of ventricular chamber formation Makino S

(10)第 33 回日本分子生物学会 2010.12.8 神戸

ワークショップ: 小型魚類メダカやゼブラフィッシュを用いた疾患研究

Disease studies using medaka and zebrafish

心臓発生・分化の機序解明から新たな心不全治療開発へ 牧野 伸司

(11)第 83 回アメリカ心臓病学会 2010.11.13-17 Chicago Illinois U.S.A.

DNA Methylation Changes in the b-MHC Locus Mediate Gene Regulation by Antisense RNA in Mouse Postnatal Cardiomyocyte Development

Oda M, Makino S, Fukuda K

(12)第 83 回アメリカ心臓病学会 2010.11.13-17 Chicago Illinois U.S.A.

Versican is Essential for Chamber Formation by Recruiting Cardiac Progenitor Cells from the Outflow Tract in Medaka Fish

Yoon SH, Makino S, Fukuda K

(13)第 17 回 Weinstein Cardiovascular Development Conference 2010.5.20-22 Royal Tropical Institute (Tropenmuseum),

Amsterdam, The Netherlands
Mutation of the C-terminus of titin Leads to Hypertrophic Cardiomyopathy in Medaka Fish
Makino S, Higashikuse Y, Yoon SH, Sano M, Kudo A, Kawakami A, Fukuda K

(14)第 27 回 International Society of Heart Research(ISHR) 2010.5.14 Kyoto
Mutation around the Titin kinase Leads to Diastolic Dysfunction in Medaka Fish
Higashikuse Y, Makino S, Yoon SH, Sano M, Kudo A, Kawakami A, Fukuda K

(15) 第 74 回日本循環器学会 (京都)
2010.3.5-7
Versican is Essential for Chamber Formation by Recruitment of Islet-1-Expressing Cardiac Progenitor Cells
Yoon SH, Makino S, Fukuda K

(16) 第 74 回日本循環器学会 (京都)
2010.3.5-7
Hematopoietic-miRNAs Regulate Cardiogenesis and Somitegenesis in the Developing Zebrafish Mesoderm
Nishiyama T, Kaneda R, Makino S, Fukuda K

(17) 第 74 回日本循環器学会 (京都)
2010.3.5-7
Inhibition of BMP Signaling Results in Efficient Cardiomyocyte Induction through Cellular Subpopulation with DNA Hypomethylation in Cerberus 1 Homolog Gene
Oda M, Makino S, Fukuda K

(18) 第 74 回日本循環器学会 (京都)
2010.3.5-7
Dominant Negative Suppression of Rad Leads Intracellular Ca²⁺ Overload via Up-regulation of Cardiac Ryanodine Receptor Activity
Yamakawa H, Murata M, Makino S, Fukuda K

(19) 第 74 回日本循環器学会 (京都)
2010.3.5-7
DNA Methylation of the Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Gene Affects the Cardiomyocyte-prone State of Embryonic Stem Cells
Oda M, Makino S, Fukuda K

(20) 第 74 回日本循環器学会 (京都)

2010.3.5-7
Mutation of the C-terminus of titin leads to Hypertrophic Cardiomyopathy in the Medaka Fish
Higashikuse Y, Makino S, Fukuda K

(21) 第 32 回日本分子生物学会
2009.12.9-12 横浜
ゼブラフィッシュ Musashi 遺伝子の同定
Characterization of RNA binding protein Musashi in zebrafish
梅井 正彦、芝田 晋介、牧野 伸司、岡野 栄之

(22) 第 82 回アメリカ心臓病学会
2009.11.14-18 Orlando Florida U.S.A.
MicroRNA 142-3p Regulates Heart Development, Somitegenesis and Hematopoiesis in the Stage of Early Mesoderm Formation
Nishiyama T, Kaneda R, Makino S, Fukuda K

(23) 第 82 回アメリカ心臓病学会
2009.11.14-18 Orlando Florida U.S.A.
ATF4-regulated Metabolic Shift Towards Phgdh-mediated Serine Synthesis Enhances Cardioprotection against Oxidative Stress
Endo J, Sano M, Makino S, Fukuda K

[図書] (計 4 件)

(1) Shinji Makino & Keiichi Fukuda.
Regenerating the Heart (Stem Cells and the Cardiovascular System)
Part I Stem Cells for Regeneration of Mechanical Function (Chapter6 67-83)
“Methods for Differentiation of Bone Marrow Derived Stem Cells into Myocytes”
Humana Press 2011. Ira S. Cohen & Glenn R. Gaudette Editors

(2) 循環器科 66(4):404-407, 2009 循環器疾患の再生医療 update-現状と展望- (Cells and genes for cardiac regeneration) 科学評論社

(3) 呼吸と循環 57巻11号 1191-1195 心筋の再生治療 2009年11月15日 医学書院

(4) Makino S, Fukuda K Hypoxia-inducible Vascular Endothelial Growth Factor-engineered Mesenchymal Stem Cells Prevent Myocardial Ischemic Injury. Research Highlights for Personalized Medicine 2011 May

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 伸司 (MAKINO SHINJI)
慶應義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号：20306707

(2) 研究分担者

佐野 元昭 (SANO MOTOAKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：30265798

(3) 連携研究者

なし