

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 年度～2011 年度

課題番号：22791317

研究課題名(和文) 幹細胞移植による心筋再生療法-アクチン重合制御因子 Fhod3 を用いた新たな試み-

研究課題名(英文) Stem cell transplantation for myocardial regeneration: a new approach using actin assembly regulator Fhod3

研究代表者

神尾 明君 (KAN-O MEIKUN)

九州大学病院・心臓血管外科・医員

研究者番号：80567371

研究成果の概要(和文)：

遺伝子改変マウスを用いて、アクチン重合制御因子 Fhod3 が心筋細胞の分化、成熟に果たす役割を個体レベルで検証した。Fhod3 は胎生中期に将来心臓となる領域に存在していた。その後心臓が作られる過程で、Fhod3 は心筋の収縮装置であるサルコメアの特定の場所に存在しており、心筋細胞が分化、成熟する過程で重要な役割を担っていることが明らかになった。今回の結果から、Fhod3 を用いて幹細胞から心筋細胞への分化を促すことができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The function of actin assembly regulator Fhod3 in cardiomyocytes differentiation and maturation was investigated using genetically modified mice. In mid-gestation embryos, Fhod3 was found existing in the area where a future heart occurs. During subsequent heart development, Fhod3 localized in a particular area of sarcomere which is a contractile apparatus of myocardium, and it was suggested that Fhod3 played an important role in myocardial differentiation and maturation. Consequently, these results implied the possibility of inducing stem cell differentiation into cardiomyocytes using Fhod3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：循環器外科

科研費の分科・細目：若手研究(B)

キーワード：心筋再生

1. 研究開始当初の背景

我が国における糖尿病、高血圧、高コレステロール血症の罹患率の急激な増加に伴い、今後は虚血性心筋症患者の増加が懸念される。本疾患は、一旦うっ血性心不全に陥ると、極めて予後不良である。虚血性心筋症に対する左室形成術も行われているが、その長期成績は未だ明らかではない。心臓移植が伸び悩んでいる現状においては、より有効な治療の確立が急務である。新たな治療法として期待されているものに、幹細胞移植がある。

当科においても以前、家畜ブタを用いて虚血領域へ骨髓由来造血幹細胞を注入する実験を行った経緯がある(平成 14-15 年基盤研究 B;慢性虚血心筋における骨髓細胞移植療法の展開と臨床への応用)。この時は他の多くの研究報告と同様、虚血領域での血管新生促進が確認されたものの、明らかな心筋細胞再生は得られなかった。

世界的には 2002 年以降、いくつかの骨髓由来幹細胞移植に関する臨床試験結果が報告されている。これらの臨床試験の結果を統合すると、骨髓由来幹細胞移植による心機能改善効果は非常に僅かなものであり、移植された幹細胞の明らかな心筋細胞への分化はやはり確認されなかった。僅かな心機能改善効果は骨髓由来幹細胞からのサイトカイン分泌による、血管新生や心筋幹細胞分化の促進、炎症反応や瘢痕形成の抑制などの結果と考えられている。

以上のように、これまでに得られた幹細胞移植の治療効果は、心筋細胞に分化し得ると

いう幹細胞のポテンシャルを十分に引き出せておらず、「幹細胞から心筋細胞への分化効率」を改善することが、移植治療効果の改善に必須であると考えられる。現在、このような観点から、幹細胞に対して移植前に遺伝子操作を行い、心筋細胞への分化を促す、というアプローチが注目されている。本研究申請者は Formin ファミリーに属する Fhod3 に着目した。アクチン重合制御因子 Fhod3 は、単量体アクチン重合によるアクチンフィラメント形成を制御する。これまでに本研究申請者の所属するグループは、Fhod3 が心筋細胞に特異的に発現し、ラット培養心筋細胞においてサルコメア形成を促進することを報告した (Kanaya H, Genes Cells 2005;10:665-78 / Taniguchi K, J Biol Chem 2009;284:29873-81)。さらに、Formin ファミリーは SRF(血清応答因子)を介した転写促進を増強するが、Fhod3 も同様に SRF を活性化することを明らかにした (Taniguchi K, J Biol Chem 2009;284:29873-81)。SRF をノックアウトした ES 細胞では NKx2.5 や GATA-4、また α -actin や myocardin など、心筋細胞の分化、成熟に必要な因子が欠失あるいは低下する。すなわち、Fhod3 は心筋細胞の幹細胞からの分化、さらにはサルコメア構造の形成に深く関与していると考えられる。以上より、本研究申請者は幹細胞に前処置として Fhod3 を強制発現させたいうで梗塞部への移植を行い、治療効果を上げる、という着想を得た。すなわち、Fhod3 の強制発現により幹細胞内

のSRFを活性化し、心筋細胞への分化を促進しようとするものである。

前述のように、これまでの臨床試験で報告された幹細胞移植による心機能改善効果は、非常に僅かなものにとどまっている。幹細胞を真に心筋細胞に分化させれば、幹細胞移植の効果が飛躍的に上昇すると思われる。また、心臓血管外科領域における本研究の意義は極めて高く、急性冠症候群に対する冠動脈バイパス手術後の予後改善につながると期待される。手術時に梗塞領域を直接視認のうえ幹細胞を心外膜側より注入することでより効果的な delivery が可能であり、target vesselが ungraftable であった場合にも幹細胞移植を行うことができるためである。本研究の成果によって、手術による血行再建と同時に心筋細胞再生を行う、といった理想の治療が可能になると考えた。

2. 研究の目的

Fhod3 を標的とした心筋細胞の分化誘導促進の可能性を検討すること。

3. 研究の方法

Fhod3 遺伝子改変マウスを用いて、個体レベルで Fhod3 が心筋細胞への分化、成熟に果たす役割を検討する。使用する遺伝子改変マウスは、Fhod3 コンベンショナル・ノックアウトマウス、および α -MHC プロモーターの下流で Fhod3 を発現するトランスジェニックマウスである。

4. 研究成果

Fhod3 の心筋細胞分化における役割を検討するため、Fhod3 のコンベンショナル・ノックアウトマウスを作成した。このノックアウトマウスは、Fhod3 遺伝子のプロモーターの下流で、Fhod3 の代わりに LacZ 遺伝子を発現するように設計した。これまで、Fhod3 は成体マウスの心臓に特異的に発現することは知られていたが、胎児期、特に心臓発生期における Fhod3 の臓器特異的な発現パターンは不明であった。そこで、Fhod3 ノックアウトマウスの変異アレルをヘテロで保有するマウスを利用して Fhod3 の発現を検討した。胎生中期のヘテロマウスを用いて LacZ 染色を行った。胎生 7.5 日では心臓原基に局限して LacZ のシグナルが認められた。胎生 8.5 日以降では、心ループに特異的な LacZ のシグナルの増強が観察された。胎生 9.5 日を以降では、心臓以外に神経組織の一部でも LacZ のシグナルが認められた。この結果より、Fhod3 は心臓発生の極早期より心筋細胞に特異的に発現しており、心筋細胞分化・成熟に関与している可能性が示された。

そこで、発生段階における心筋での Fhod3 の局在を明らかにすることにした。組織切片を用いた免疫蛍光染色にて、Fhod3 は心筋の収縮装置であるサルコメアのアクチン線維に局在していることが分かった。さらに詳細な検討により、予想に反して、Fhod3 の局在は Z 帯ではなく (in vitro では Fhod3 は他の formin family タンパク質と同様にアクチン線維のプラス端に作用する。サルコメアにおいては、アクチン線維のプラス端は Z 帯にアンカーされている)、サルコメアの中心であ

るM帯側に局在していることが分かった。この局在パターンは、成体マウス心筋や、ヒト心筋においても観察された。この事実は、心筋におけるアクチン線維の形成、維持の機構を解明する画期的な手掛かりになると期待されるため、別記のごとく学会発表や論文発表を行った。

次に、Fhod3の強制発現の影響を見るために、 α ミオシン重鎖(α -MHC)プロモーターの制御下で野生型Fhod3を発現するトランスジェニックマウスを作成した。強制発現したFhod3は、サルコメアにおいて内因性Fhod3と同様の局在を示し、機能的であると考えられたが、Fhod3の強制発現による心筋の分化・成熟への影響は観察されなかった。

一方で、Fhod3のコンベンショナル・ノックアウトマウスの表現型を解析したところ、胎生中期の心筋の分化、成熟に甚大な影響が観察された(論文投稿中)。

本研究の結果は、Fhod3を標的とした心筋細胞の分化誘導の可能性を示しており、将来的には幹細胞移植への応用が期待できることが示唆された。今後の有望な研究課題として、幹細胞へのFhod3遺伝子導入による心筋細胞への分化促進を確認することなどが考えられる。

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1件)

Expression and subcellular localization of mammalian formin Fhod3 in the embryonic

and adult heart.

Meikun Kan-o, Ryu Takeya, Kenichiro Taniguchi, Yoshihisa Tanoue, Ryuji Tominaga, Hideki Sumimoto.

PLoS ONE. 2012;7:e34765. 査読有

DOI: [10.1371/journal.pone.0034765](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034765)

[学会発表] (計3件)

① 第84回日本生化学会大会、京都、平成23年9月23日
「formin相同蛋白質Fhod3のマウス胎仔、成獣、およびヒト心筋サルコメアにおける局在」神尾明君、武谷立、田ノ上禎久、富永隆治、住本英樹

② 第34回日本分子生物学会年会、横浜、平成23年12月16日
「formin相同蛋白質Fhod3の心筋サルコメアにおける局在と機能」神尾明君、武谷立、田ノ上禎久、富永隆治、住本英樹

③ 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会、神戸、平成24年5月30日
「The essential role of mammalian formin FHOD3 in sarcomere organization during heart development」

Ryu Takeya, Meikun Kan-o, Takaya Abe, Naoyuki Kitajima, Motohiro Nishida, Ryuji Tominaga, Hitoshi Kurose, and Hideki Sumimoto

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神尾 明君 (KAN-O MEIKUN)

九州大学病院・心臓血管外科・医員

研究者番号: 80567371