

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659417

研究課題名(和文) 心臓幹細胞は生理的にどのような働きをしているのか？

研究課題名(英文) What is the physiological role of cardiac stem cells ?

研究代表者

内藤 篤彦 (NAITO, Atsuhiko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10588891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：心臓内に心筋幹細胞が存在するという報告が散見されるが、心筋幹細胞が心臓内でどのような生理的役割を示す細胞なのかはほとんど明らかになっていない。本研究では心筋幹細胞で発現するとされるc-kit遺伝子およびαMHC遺伝子の両方を発現する細胞で特異的にCre/LoxP反応を誘導するモデルマウスの作成を試みた。本研究で作成したiaMHC-NCreマウスは、特定の細胞系譜(心房筋、心室筋、刺激伝導系など)特異的にtTA遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを交配することで、心臓の中の特定の心筋細胞集団のみで遺伝子改変を行うためのツールとして広く利用することができる。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence suggests the presence of so called 'cardiac stem cells'. However, physiological role of cardiac stem cells are not known yet. In this study, we tried to establish a mouse model that can induce Cre/LoxP recombination only in cardiac stem cells which express both c-kit and alpha MHC (αMHC). We have successfully established a transgenic mice which express Cre gene with nuclear localization sequence under the control of inducible αMHC promoter. By crossing with another transgenic mice which express tTA (tetracycline transactivator) or rtTA (reverse tTA), we can induce Cre/LoxP recombination exclusively in a specific type of cardiomyocytes, such as pacemaker cells, ventricular cells, and cardiac stem cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学 心臓幹細胞 c-kit

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

心臓にも他の臓器と同じく内因性の幹細胞が存在し、心筋細胞が新生されている。1990年代初頭に提唱されたこの学説は循環器領域における一つの大きな議論的となってきた。

2005年 Frisen らは核実験により大量に放出され、その後の核実験禁止条約により急激に減少した大気中の ¹⁴C 濃度と、永久歯のエナメル質に含まれる ¹⁴C 濃度が相関することを利用して、歯の持ち主の生まれた年が正確に予測できることを明らかにした (Nature 2005;437(7057):333.)。2009年同じ技術を用いて Frisen らは、1つの心臓の中に含まれる個々の心筋細胞の生まれた年を測定し、心臓には誕生後新生された様々な年齢の心筋細胞が存在することを明らかにした (Science 2009; 324(5923):98.)。

この報告は心筋細胞が非常に緩徐にはあるが新生していることを意味し、古くからの「心臓は再生しない臓器」という概念を覆したが、心筋細胞の新生が心筋幹細胞からの分化の結果起こっているのか、成熟した心筋細胞が分裂した結果起こっているのかを示すことはできなかった。

本研究の特色・独創性および予想される結果と意義

心筋幹細胞の研究はその臨床応用ばかりが注目され、多くの研究者が「取った、打った、良くなった」的な研究を競って行っており、心筋幹細胞の生体内での挙動や生理的意義の証明といった本来まず行うべき本質的な研究はほとんど報告されておらず、本研究の独創性は非常に高い。本研究の結果から明らかとなる正常心、病的心における心筋幹細胞からの心筋細胞新生に関する基礎的データは心臓が何故再生しないかという疑問を解決するために必須となる最初のアプローチであり、真の意味での心筋再生療法、すなわち心臓の障害後失われた心筋細胞を、内因性に起こっている心筋細胞新生を促進することで補うという治療法の知識的・技術的基盤となるため、その意義の大きさは計り知れない。

近年、様々な研究グループが心筋幹細胞を単離し、心臓に注入することで心臓の機能を回復させる報告をしているが、それらの心筋幹細胞が心臓内でどのような特徴をもち、生理的挙動を示す(あるいは示していた)細胞なのかといった基本的な部分はほとんど明らかになっていない。本研究では独自のアイデアに基づく遺伝子ターゲティング法を用いて心筋幹細胞の生体内での characterization と生理的意義の解明に挑戦する。

本研究の目的を達成する上で最大の技術的チャレンジは、心筋幹細胞特異的遺伝子ターゲティング法の確立である。そもそも現在、

心筋幹細胞を規定する一つの基準はなく、様々な基準で心筋幹細胞は定義されている。我々も SP 細胞や Sca-1(+)細胞を用いた心筋幹細胞研究を行ってきたが、表1のように定義される細胞は極めてヘテロな集団であり、実際に心筋細胞へと分化する細胞は非常に少ないことを経験してきた。そこで本研究では、c-kit といった幹細胞表面抗原に加え、成熟した心筋細胞で発現するサルコメアタンパクである α -Myosin Heavy Chain(α MHC)を低レベルで発現する細胞の中に高率に心筋細胞へと分化する分画が存在するという報告 (PNAS 2008;105(50):19762) に基づき、c-kit(+), α MHC(+)細胞で特異的に Cre 遺伝子を誘導する遺伝子ターゲティングシステムを考案した(図1)。

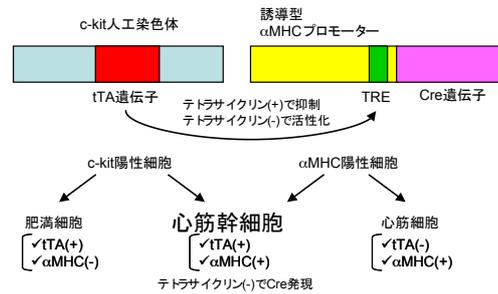


図1 心筋幹細胞特異的遺伝子ターゲティング。c-kit遺伝子座にtTA遺伝子を挿入、誘導性 α MHCプロモーターにCreを連結。心筋幹細胞ではテトラサイクリン(-)でCre発現。

本システムでは c-kit 発現細胞で tTA を発現するトランスジェニックマウスと誘導型 α MHC プロモーター (Circ Res 2003;92(6):609) の下流で Cre を発現するトランスジェニックマウスを樹立し、マウスの飲用水を任意の時期にテトラサイクリンが含まれないものに変更することで c-kit(+), α MHC(+)細胞、すなわち心筋幹細胞で特異的に Cre 遺伝子の発現を誘導することができる。本システムで確立されたマウスと、種々の flox マウスとを交配することで(研究計画・方法参照)、正常心、病的心における心筋幹細胞からの心筋細胞新生の様子や、心筋幹細胞の生理的意義など、今まで全く不明であったことが明らかになり心筋幹細胞研究に与える影響は甚大である。

また、本システムを用いて得られる c-kit(+), α MHC(+)細胞は、これまでに報告されている心筋幹細胞と比べ、 α MHC という心筋サルコメアタンパクを発現していることから、より心筋細胞への分化に特化した細胞と考えられる。この細胞を単離し、遺伝子解析や膜タンパクの解析を行うことで、心筋細胞への分化に特化した心筋幹細胞の表面マーカーを同定することができる。また、単離した c-kit(+), α MHC(+)細胞を in vitro で効率的に増殖・分化させる薬剤や分子をスクリーニングすることで、真の意味での心筋再生療法、すなわち心臓の障害後に失われた心筋細胞を十分補うだけの心筋細胞新生を誘導する治療法の開発に発展する可能性がある。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで、胚性幹細胞の心筋細胞分化の研究を行うとともに (PNAS 2006;103(512):19812.)、心臓固有の心筋幹細胞に関する研究も行ってきた (J Cell Biol 2007;176(3):329, J Mol Cell Cardiol 2010 in press)。

本研究では、心筋幹細胞に特異的かつ誘導性に Cre 遺伝子を発現するマウスを作成することで、

- (1) 正常心、病的心における心筋細胞新生を観察し、生後の心筋細胞新生をプロスペクティブに証明するとともに、心筋細胞新生が完全な心臓再生に至らない機構を明らかにする。
- (2) 心筋幹細胞に細胞死を誘導するシステムを確立し心筋幹細胞の生理的意義を明らかにする。

また、研究代表者のこれまでの心筋細胞分化に関する研究を応用し、

- (3) Cre 遺伝子を発現する心筋幹細胞を分離し、遺伝子解析によりこの幹細胞のマーカーを開発するとともに、培養系で心筋細胞分化を促す手法を検討するための技術的基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) c-kit 陽性細胞特異的に tTA 遺伝子を発現するマウスの作成

c-kit の BAC を用いたトランスジェニックマウス作成は、EGFP をノックインした文献 (PNAS 2009;106(6):1808) を参考に、EGFP に変えて tTA 遺伝子と IRES 配列、EGFP を連結させた DNA 配列を c-kit の BAC に挿入する (c-kit-tTA) (図 2)。

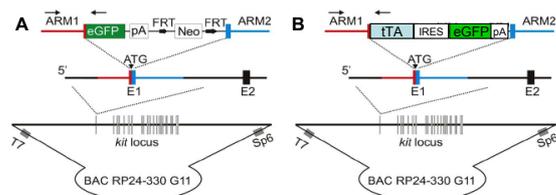


図2 c-kit特異的遺伝子発現。(A) PNAS 2009;106(6):1808 より、c-kit遺伝子座にeGFP遺伝子を挿入している。(B)本研究で作成するトランスジェニックマウスに用いるコンストラクト

(2) 誘導型αMHC プロモータの制御下で Cre を発現するマウス (iaMHC-Ncre) は、αMHC プロモータの近位に変異を入れた上で TRE (Tetracycline responsive element ; Tetracycline operator (TetO) と呼ばれる) を挿入した誘導型αMHC プロモータ (Circ Res 2003;92(6):609) の下流に、核内移行シグナルを付加した Cre 遺伝子を連結して作成する (図 3)。

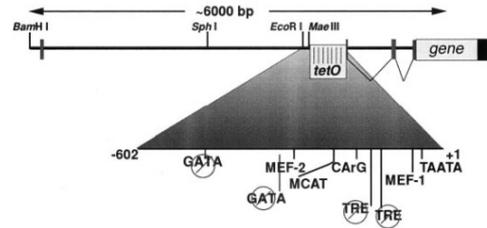


図3 誘導型αMHCプロモータの構造。Circ Res 2003;92(6):609 より。αMHC遺伝子のexon1直前にTRE (TetO) を挿入し、バックグラウンドを低減させるためにGATA配列、Thyroid responsive element (TRE) を除去している。

- (3) flox されることで b-galactosidase (B6.129S4-Gt (ROSA)26Sor<tm1Sor>J), diphtheria toxin receptor (ヒト型 heparin binding EGF receptor (HB-EGFR), (C57BL/6-Gt (ROSA)26Sor <tm1 (HBEGF)Awai>/J) を発現するマウスは The Jackson Laboratory より購入する。
- (4) flox されることで diphtheria toxin receptor (ヒト型 heparin binding EGF receptor (HB-EGFR), (C57BL/6-Gt (ROSA)26Sor <tm1 (HBEGF)Awai>/J) を発現するマウスは The Jackson Laboratory より購入する。

上記 (1)-(4) のマウスを作成が完了した後 (2) で作成した iaMHC-Ncre (+) マウスをまず (3), (4) の flox マウスと交配し、iaMHC-Ncre (+), f/f マウスを作成、basal level での leak がないことを確認する。その後ドキシサイクリン (テトラサイクリンのアナログ) を飲用水に加えた上で、iaMHC-Ncre (+), f/f マウスと (1) で作成したマウスと交配することで c-kit-tTA(+), iaMHC-Ncre(+), f/+ マウスを得る。

- B6.129S4-Gt (ROSA)26Sor<tm1Sor>J (flox されることで b-galactosidase を発現するマウス) を用いた解析。
c-kit-tTA(+), iaMHC-Ncre(+), f/+ マウスは、交配時ならびに妊娠・授乳中の母親マウスの飲用水にドキシサイクリンを加えておくことで、胎児・新生児期の Cre 発現を防ぐ。任意の時期にドキシサイクリンを含まない飲用水に変更することで、Cre の発現を誘導、ROSA26 遺伝子座に存在する loxP 配列で挟まれた領域を flox し、b-galactosidase を発現させることができる。

このシステムを用い、ドキシサイクリンを含まない飲用水に変更後、心臓を X-gal 染色することで心筋幹細胞およびその子孫細胞を同定することができるため、心筋幹細胞からの心筋細胞新生が正常心で生理的に起こっている現象なのかをプロスペクティブに証明することができる。また、圧負荷性心不全を誘導する大動脈縮窄術や心筋梗塞を誘導する冠動脈結紮術をマウスに行うことで、病的心における心筋細胞新生の変化が明らかになる。またドキシサイクリンを含まない飲用水に変更する時期 (すなわち心筋幹細胞に b-galactosidase を発現させる時期) を術

前、術後1週、4週などと変化させることで、心筋細胞新生が病態の進行(具体的には心肥大から心不全への進展および心筋梗塞後のリモデリング)とともにどのように変化しているか、あるいは心筋細胞新生の変化が病態に影響を及ぼしているかを明らかにすることができる。

また、b-galactosidase と反応すると緑の蛍光を発する Fluorodeoxyglucose を用いて c-kit(+), aMHC(+)細胞を分離することができる。この細胞はこれまで報告されている心筋幹細胞と比べ、aMHC という心筋サルコメアタンパクを発現していることから、より心筋細胞への分化に特化した細胞と考えられる。分離した細胞に対して microarray 解析を行い、オンラインの検索ソフトを用いてシグナル配列と膜貫通領域をもつ遺伝子を抽出し、表面マーカーとして応用できるものがないか検索する。また、分離した細胞を Wnt や BMP などの分泌性タンパク、既知の薬剤、低分子化合物で培養することにより増殖、分化をそれぞれ促進する因子を検索する。

- C57BL/6-Gt (ROSA) 26Sor<tm1 (HBEGF) Awa i>/J (flox されることで diphtheria toxin receptor を発現するマウス)を用いた解析。

上記と同様、c-kit-tTA(+), iaMHC-Ncre(+), f/+ マウスは、任意の時期にドキシサイクリンを含まない飲用水に変更することで、c-kit(+), aMHC(+)細胞に diphtheria toxin receptor (ヒト型 HB-EGFR)を発現させることができる。マウス HB-EGFR は diphtheria toxin と結合しないためマウス細胞は元来 diphtheria toxin 抵抗性であるが、diphtheria toxin receptor を発現させることにより感受性が出現し、diphtheria toxin の投与により細胞死を誘導することができる。このシステムを用い、ドキシサイクリンを含まない飲用水に変更後、diphtheria toxin をマウスに投与することで、心筋幹細胞に細胞死を誘導することができる。Diphtheria toxin 投与後も心臓に大きな表現形が観察されず、寿命の変化も認められないようであると、心筋幹細胞は心筋細胞新生を行うが、正常心にとっては必要不可欠なものではないという結論が生まれ、逆に心不全や致死性不整脈など大きな表現形が観察された場合、心筋幹細胞は心筋細胞新生を通じて心臓の恒常性維持に必須の細胞であるという結論が得られる。これまで心筋幹細胞の生理的意義をこのような loss-of-function の実験系で報告した研究は皆無であり、どのような表現形が観察されても大変興味深い。

4. 研究成果

(1) c-kit-tTA マウスを作成するために、当初は c-kit の BAC を用いる予定であったが、トランスジェーンのリコンビネーションが順

調に実施することができず、また同時期に BAC を用いた場合、多くて2コピー程度しかトランスジェーンを導入することができないとのアドバイスをを受け、BAC 全長ではなくプロモータおよびイントロンの一部を用いたトランスジェニックアマウスを作成する方針へと転換した。トランスジェーンのリコンビネーションを順調に実施できなかった理由としては tTA 遺伝子の遺伝子配列と c-kit BAC 配列の相同性等の問題ではなかったと考察している。

c-kit のプロモータおよびイントロンの一部を用いたトランスジェニックマウスを作成するため、イタリア Milano-Bicocca 大学の Ottolenghi 教授より c-kit 遺伝子プロモータ、第一エクソン、第一イントロンを含むコンストラクトの供与を受け (Caima LA et al., Blood 2003)、第一エクソンの転写開始点にインフレームで tTA-IRES-EGFP を導入することに成功した。同コンストラクトをマウス ES 細胞に導入し、胚様体形成法で緑色蛍光を発する細胞が既報通りに心筋幹細胞および心筋細胞へと分化するかを検討したが、遺伝子導入後も胚様体形成法にて分化誘導を行っても緑色蛍光を発する細胞は出現しなかった。コンストラクト作成の際の変異や遺伝子導入効率が悪かったなどの問題点が考えられた。マウス ES 細胞を用いた実験からコンストラクトを用いたトランスジェニックマウスを作成しても目的とする c-kit 陽性細胞で tTA 遺伝子および緑色蛍光色素の発現を誘導することが期待できないことから、トランスジェニックマウスの作成は断念した。

(2) i-aMHC-Ncre マウスを作成するためのコンストラクトを作成し、制限酵素で消化した後285匹の胚へと注入、18匹(うち2匹は死亡)のファウンダーマウスを得た。遺伝子型を検査した結果、2匹が目的のトランスジェーンを有しており、野生型 C57BL/6 と交配を重ねることでトランスジェニックマウスを2系統樹立することに成功した。

(3) flox されることで b-galactosidase を発現するマウスは Jackson 研究所より購入した。

(4) flox されることで HB-EGF を発現するマウスは Jackson 研究所より購入した。

心筋幹細胞を標識するために最も重要になる c-kit-tTA マウスの作成が不成功に終わったため、以降のマウス交配実験および表現型解析実験を実施することはできなかった。2013年8月には Nadal-Ginard らによって、本研究計画とほぼ同一の報告が行われた (Ellison et al. Cell 2013)。Nadal-Ginard らは c-kit 遺伝子プロモータによって Cre を発現するレンチウイルスを作成し、これを Cre/LoxP 反応が起こることで蛍光を発するマウスに感染させることで心臓における c-kit 陽性細胞を標識している。遺伝的に誘導性に c-kit 陽性細胞において遺伝子改変を

行うことができる本研究計画の方法がより正確な系であるとは考えられるが、簡便性・迅速性という観点から Nadal-Ginard らが採用したレンチウイルスのシステムを用いることを考慮に入れるべきであった。なお、Nadal-Ginardらの報告ではc-kit陽性細胞が内因性の心筋再生に必要十分であることが示されており、本研究の目的でもある心筋幹細胞の生理的役割が明らかになっている。

本研究で作成した iaMHC-NCre マウスは、特定の細胞系譜（心房筋、心室筋、刺激伝導系など）特異的に tTA 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを交配することで、心臓の中の特定の心筋細胞集団のみで遺伝子改変を行うためのツールとして広く利用することができる。

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10件）

英文論文

1. Oka T, Akazawa H, Naito AT, Komuro I. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ Res.* 2014 Jan 31;114(3):565-71. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300507. 査読有り
2. Ozasa Y, Akazawa H, Qin Y, Tateno K, Ito K, Kudo-Sakamoto Y, Yano M, Yabumoto C, Naito AT, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Kobayashi Y, Komuro I. Notch activation mediates angiotensin II-induced vascular remodeling by promoting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res.* 2013 Oct;36(10):859-65. Doi: 10.1038/hr.2013.52. 査読有り
3. Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Hara Y, Shimizu I, Zhu W, Toko H, Katada A, Akazawa H, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Walsh K, Kikuchi A, Matsumoto M, Botto M, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell.* 2012 Jun 8;149(6):1298-313. Doi: 10.1016/j.cell.2012.03.047. 査読有り
4. Yasuda N, Akazawa H, Ito K, Shimizu I, Kudo-Sakamoto Y, Yabumoto C, Yano M, Yamamoto R, Ozasa Y, Minamino T, Naito AT, Oka T, Shiojima I, Tamura K, Umemura S, Paradis P, Nemer M, Komuro

I. Agonist-independent constitutive activity of angiotensin II receptor promotes cardiac remodeling in mice. *Hypertension.* 2012 Mar;59(3):627-33. Doi:

10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.175208. Epub 2012 Jan 30. 査読有り

5. Hayashi K, Hashimoto M, Koda M, Naito AT, Murata A, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M. Increase of sensitivity to mechanical stimulus after transplantation of murine induced pluripotent stem cell-derived astrocytes in a rat spinal cord injury model. *J Neurosurg Spine.* 2011 Dec;15(6):582-93. Doi:10.3171/2011.7.SPINE10775. 査読有り

和文論文

1. 内藤篤彦 Wnt シグナルと心臓の生老病死 心臓 2014 46:290-295 査読無し
2. 内藤篤彦 補体分子 C1q と心血管疾患 血管医学 2013 14:87(427)-93(433) 査読無し
3. Naito AT, Komuro I. [Chronic inflammation and organismal aging]. *Clin Calcium.* 2013 Jan;23(1):51-8. Doi: CliCa13015158 査読無し
4. 内藤篤彦 Wnt シグナルによる心臓・大血管発生の制御 心臓 2011 43:594-598 査読無し
5. 内藤篤彦、住田智一、小室一成 ヒト循環器疾患モデルとしての iPS 細胞の利用 再生医療 2011 10:204 査読無し

〔学会発表〕（計12件）

1. 内藤篤彦 Wnt シグナルと老化関連疾患 日本心血管内分泌代謝学会 2013年11月22日-23日 吹田市
2. Atsuhiko Naito. Wnt signaling in the Heart ~From the Cradle to the Grave~ 河口湖カンファレンス 2013年7月13日-14日 東京
3. 内藤篤彦 Wnt signaling in the Heart ~From the Cradle to the Grave~ 日本分子生物学会 2013年12月3日-6日 神戸市
4. 内藤篤彦 心臓の生老病死における Wnt シグナルの役割 北海道カルディアックセミナー 2013年9月28日 札幌市
5. Atsuhiko Naito. The role of Endothelial Wnt signaling on Cardiac function. International Society for Heart Research Jun 29-Jul 3 2013 San Diego, CA.
6. Katsuki Okada, Atsuhiko Naito, Issei

Komuro. The Interaction of FoxO with b-catenin Contributes to Skeletal Muscle Myopathy. International Society for Heart Research Jun 29-Jul 3 2013 San Diego, CA.

7. 内藤篤彦 Wnt シグナルと老化関連疾患 脳心血管抗加齢研究会 2013 2013年12月14日-15日 大阪市
8. 内藤篤彦 The Role of Complement Protein Clq in activation of Wnt signaling during aging. 日本臨床分子医学会 2012年4月13日-14日 京都市
9. 内藤篤彦 The role of complement protein Clq in activation of Wnt signaling during aging. 日本分子生物学会 2012年12月11日-14日 博多市
10. 内藤篤彦 補体ClqはWntシグナル活性化を通じて老化を誘導する 日本薬理学会 2012年3月21日-23日 博多市
11. 内藤篤彦 Clq-induced Wnt signaling activation in arterial remodeling associated with hypertension. 血管生物医学会学術集会 2012年12月5日-7日 徳島市
12. 内藤篤彦 新規老化因子による Wnt シグナル活性化と血管リモデリング 日本高血圧学会総会 2012年9月20日-22日

〔図書〕(計3件)

1. 内藤篤彦 Annual Review 循環器 2013 中外医薬社 2013年 285 ページ
2. 内藤篤彦 慢性炎症と生活習慣病 南山堂 2013年 175 ページ
3. Naito AT, Shiojima I, Komuro I. Novel Therapeutic Targets and Strategies against Myocardial Diseases. In Hill J, Willerson JT, Ryburn FM, Olson E, Welch RA (Eds.), *MUSCLE FUNDAMENTAL BIOLOGY AND MECHANISMS OF DISEASE* 2012:739-743. Elsevier Inc. (ISBN: 978-0-12-381510-1) 1528 ページ

〔産業財産権〕

該当無し。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 篤彦 (NAITO, Atsuhiko)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：10588891