

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890227

研究課題名(和文)細胞周期を可視化する蛍光プローブを用いた新規の心筋細胞周期調節因子の探索

研究課題名(英文) Exploring a novel cardiomyocyte cell cycle regulator by utilizing a fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator

研究代表者

橋本 寿之 (Hashimoto, Hisayuki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90528390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：終末分化した心筋細胞はほとんど細胞分裂しないため、自己修復できないことが末期心不全の難治性を規定する大きな要因となる。心筋細胞を再び細胞分裂させ、組織を再生することができれば、末期心不全患者の根治的な治療法を確立することができる。そのため我々は、心筋細胞の増殖を調節している機構を解析し、心筋細胞の細胞周期を制御している新たな調節因子を探索することを目的として研究を計画した。我々は心筋細胞の増殖期において発現量が変化しているタンパク質を同定した。現在はこのタンパク質を心筋細胞の細胞周期を調節する新たな候補分子として、心筋細胞レベルもしくは動物レベルでの解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：The minimal capacity of mature cardiomyocyte regeneration is one of the factors which determines the poor prognosis of heart failure. If we can proliferate cardiomyocytes and regenerate the heart, we will be able to completely cure heart failure. We planned to explore a novel cardiomyocyte cell cycle regulator by utilizing a fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator. We identified a protein which the expression level changes during the proliferation phase of cell cycle. We are analyzing the function of this candidate protein by over-expressing and deleting it in cardiomyocyte.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：細胞周期 ライブイメージング 心臓発生 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

末期心不全が難治性であることを規定する大きな要因は、終末分化状態に入った心筋細胞はほとんど再生しないため、自己修復ができないことにある。逆に言えば、分化した成熟心筋細胞を再び増殖させ、組織を再生することができれば、末期心不全患者の真に根治的な治療法を確立することができる。そのためには、心筋細胞の増殖を調節している機構、つまりは心筋細胞周期を制御している機構を解析する必要がある。さらに、今までは生後の心筋細胞は終末分化状態にあり、心筋細胞は細胞周期の休止期に安定していると考えられていたが、近年これを覆す報告が相次ぎ、心筋細胞はある程度外的ストレスに対して臨機応変に細胞周期をコントロールしている可能性を伺わせる。(Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. N Engl J Med. 2001 Jun, Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. Science. 2009 Apr)

現在、細胞周期研究の手法の一つとして最も主流なのが、増殖中の細胞にチミジンアナログを取り込ませて DNA の複製を検出する方法や各種増殖マーカーの抗体染色である。これらの方法では DNA の障害を伴い生理的な細胞周期を評価できず、また細胞を固定する必要があり、時間的な断片でしか細胞の観察ができなかった。

細胞周期解析にこのような技術的な制限がある中、我々は蛍光タンパク質を用いて細胞周期をリアルタイムで可視化するイメージング技術 Fucci (Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) に着目した。このシステムにおいては、分裂後から DNA 複製前の時期にある細胞の核は赤色の蛍光を、DNA 複製から分裂前の時期にある細胞の核は緑色の蛍光を発する。

以上より、我々は細胞周期解析ツール Fucci を用いて、心筋細胞の細胞周期を解析する計画を立案した。時間的な断片でしか観察が行えなかった今までの研究とは全く異なり、Fucci を利用すれば生きている心筋細胞における細胞周期進行の時間空間的パターンを観察でき、新たな発見が期待できた。しかし、現状では ex vivo での心臓のライブイメージングデータの報告は未だなく、このシステムを心臓に応用することは技術的に不可能であった。

そのため、我々はまず Fucci プローブを恒常的に発現するトランスジェニックマウスを用いて、この新規システムが心筋細胞においても正確に細胞周期の変動を反映していることを古典的な細胞周期の解析法と照合

して確認した。Fucci トランスジェニックマウスの心臓固定切片を心筋マーカーで免疫染色し、心筋細胞の細胞周期を観察した。心筋細胞において Fucci プローブの発色が観察され、古典的な細胞増殖マーカーである phospho histone H3 (PHH3) と共染した結果、Fucci Green と PHH3 は相関を認めた。また、胎仔期 11.5 日から成獣になるまでを解析した結果、胎仔期 11.5 日には約 40% 近く存在した S/G2/M 期の心筋細胞は経時的に減少し、出生後に速やかに低下し、成獣ではほとんど観察されなくなった。

次に心臓における ex vivo ライブイメージング法は未だに報告されていないため、我々は次にそのシステムの構築に着手した。心臓は短時間であれば低体温にすることにより臓器障害を最小限に抑えられるという仮説のもと、マウスを低体温にして仮死状態にした。心臓を取り出し、ピプラトームで 200~400  $\mu\text{m}$  の厚さにスライスし、メッシュを足場にした培養液に浸してゆっくり復温していくと自己心拍が再開し、約 1 週間培養液の中で心臓の拍動を継続させることに成功した。これは出生後 5 日目の新生仔期までは再現性を持って確認できたが、それ以上成長したマウスの心臓では培養が困難であった。この心臓 ex vivo 培養法を用いて Fucci トランスジェニックマウスの心臓のライブイメージングを行った結果、中期マウス胚 (E11.5 ~ 14.5) に比べて後期マウス胚 (E18.5) や新生仔期の心筋細胞の S/G2/M 期の長さは 1.5 倍ほど延長しているという新知見が得られた。つまり、中期マウス胚から後期マウス胚の成熟過程において心筋細胞周期の調節機構が変化している可能性が考えられた。

上記の結果より、心筋細胞周期の調節機構が変化していると予測される新生仔期の Fucci トランスジェニックマウスの心臓を用いて、フローサイトメトリーにより S/G2/M 期にある心筋細胞を振るい分け、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、我々は S/G2/M 期にある心筋細胞において著名に mRNA 発現量が変化しているいくつかのタンパク質を同定した。

## 2. 研究の目的

この結果を踏まえ、我々は後期マウス胚以降において心筋細胞の細胞周期を制御している新たな調節因子を探索することを次なる目的として研究を計画した。Fucci トランスジェニックマウスの心臓を用いて、フローサイトメトリーにより S/G2/M 期にある心筋細胞を振るい分け、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、我々は S/G2/M 期の心筋細胞において著名に mRNA 発現量が変化しているいくつかのタンパク質を同定した。現在はこれらを心筋細胞の細胞周期を調節する新たな候補分子として解析を進めている。

最終的には、終末分化状態に入った心筋細胞を再び増殖させ、組織を再生し、末期心不全患者の新たな根治療法を確立することが本研究の目標である。

### 3. 研究の方法

(1) 心筋細胞の細胞周期を制御している新たな調節因子候補の *in vitro* 発現解析

上記の DNA マイクロアレイ解析の結果より、新規の心筋細胞周期調節因子の候補を解析する。まずは *in vitro* 解析として、各ステージ間のマウスの心臓で候補因子の発現量を QT-PCR で比較し、実際にどの発育段階で多く発現しているかを評価する。また胎仔期マウスを用いて候補因子の *in situ* hybridization を行い、実際に胎仔期において候補因子が心臓で発現していることを確認する。

(2) 心筋細胞の細胞周期を制御している新たな調節因子候補の *in vitro* 機能解析

同定した遺伝子を CAG promoter を有する発現 plasmid に組み換え挿入し、COS7 細胞に遺伝子導入しタンパク質を発現させる。COS7 細胞に一過性又は安定導入し、培養上清中にタンパクが存在するかを Western blot で確認し、組み換えタンパク質を作成・精製する。同タンパク質を用いて初代培養心筋細胞に様々な条件で添加する。心筋細胞の増殖、肥大などを評価することはもちろん可能であるが、Fucci トランスジェニックマウスの心筋細胞を用いることにより心筋細胞の細胞周期の変動をライブイメージングで解析することが可能である。この系により候補因子のタンパク質が心筋細胞に対してどのような働きを持っているかを明らかにする。

(3) 心筋細胞の細胞周期を制御している新たな調節因子候補の *in vivo* 機能解析

*in vivo* 解析として MHC promoter を用いて候補因子の心臓特異的過剰発現遺伝子改変マウスを作製する。このマウスを用いて、プラグが付着した妊娠マウスの胎仔を胎生 11.0 日目から 1 日ごとに胎仔の心臓を観察する。また、生後直後から 8 週間後の成獣になるまでの各ステージでも心臓を観察する。これにより候補因子が心臓の発生、および成熟においてどのような役割を果たしているのかを明らかにする。Fucci トランスジェニックマウスと掛け合わせることで、細胞周期の評価も定量的に可能である。

(4) Fucci トランスジェニックマウスを用いた心筋梗塞後の細胞周期の解析

平成 25 年度には Fucci トランスジェニック

マウスを用いて心筋梗塞モデルを作製し、心筋梗塞後の心筋細胞周期の変化を解析する。具体的には全身麻酔下に、Fucci トランスジェニックマウスの左冠動脈前下行枝を 7-0 絹糸で結紮し、人工的に心筋梗塞を作製する。モデル作製の直後から約 3 ヶ月後までの段階的なステージにおいて心肥大および心不全における心筋細胞の増殖、細胞周期を観察する。

(5) 心筋細胞周期の調節因子を心臓特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを用いた心筋梗塞後の細胞周期および心機能の解析

上記の解析の結果を比較対象として、MHC promoter を用いて候補因子の心臓特異的過剰発現遺伝子改変マウスの心筋梗塞モデルマウスを作製する。モデル作製の直後から 3 ヶ月間観察を行い、心筋細胞が壊死していく時期からリモデリングが行われる時期にかけて心筋細胞の増殖、細胞周期を観察する。また、心筋梗塞モデルを作成した後、心エコーやカテーテルで心臓の機能を測定し、組織学的に心筋細胞数、細胞の形態や心臓の形態、線維化などを評価し、さらに生命予後を観察する。

### 4. 研究成果

我々は S/G2/M 期にある心筋細胞において著名に mRNA 発現量が変化しているいくつかのタンパク質を同定した。上記の DNA マイクロアレイ解析の結果より、新規の心筋細胞周期調節因子の候補を複数同定しており、まずは各ステージ間のマウスの心臓で候補因子の発現量を QT-PCR で比較し、実際にどの発育段階で多く発現しているかを評価した。その結果候補因子のタンパク質は胎仔期から出生後、成熟期を通じてすべての段階で心筋細胞において発現していることを確認した。同定した遺伝子を CAG promoter を有する発現 plasmid に組み換え挿入し、COS7 細胞に遺伝子導入しタンパク質を発現させる予定であったが、COS7 細胞に遺伝子を導入したものの、組み換えタンパク質を回収することが困難であった。そのため我々は、同定した遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込んで、マウス初代培養心筋細胞において強制発現させる実験を行っている。現在この強制発現系を用いて心筋細胞における候補因子の *in vitro* 機能解析を行っている。また、*in vivo* 解析として MHC promoter を用いて候補因子の心臓特異的過剰発現遺伝子改変マウスを作製しているが、こちらはプラスミドの作製までは順調に進行している。

候補因子は胎仔期から成獣期を通じて心筋細胞に発現していることが確認されたため、候補因子の機能を解析する目的で心筋細胞特異的ノックアウトマウスを作成中である。ノックアウトマウスは Cre-loxP 部位特

異的組換えシステムを利用して作製済みであり、現在 in vivo 機能解析を行っている。今後は候補因子の心筋細胞における機能および細胞周期への影響を解析し、心筋梗塞および心不全の治療への応用を目指している。

#### 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)

(1)Hisayuki Hashimoto, Shinsuke Yuasa, Hidenori Tabata, Shugo Tohyama, Nozomi Hayashiji, Fumiyuki Hattori, Naoto Muraoka, Toru Egashira, Shinichiro Okata, Kojiro Yae, Tomohisa Seki, Takahiko Nishiyama, Kazunori Nakajima, Asako Sakae-Sawano, Atsushi Miyawaki, Keiichi Fukuda.

Time-lapse imaging of cell cycle dynamics during development in living cardiomyocyte

Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 査読有 2014 Apr 3;72C:241-249.

doi: 10.1016/j.jmcc.2014.03.020

〔学会発表〕(計 1 件)

(1)Hisayuki Hashimoto, Shinsuke Yuasa, Hidenori Tabata, Shugo Tohyama, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Kazunori Nakajima, Keiichi Fukuda

「A Novel Cardiac ex vivo Culture System Revealed the Elongation of Cell Cycle Phases in Cardiomyocytes During Development」

『第30回国際心臓研究学会日本部会総会』  
米国・サンディエゴ 2013年6月29日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 寿之 (HASHIMOTO, Hisayuki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 90528390