

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14202  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2013～2016  
 課題番号：25460286  
 研究課題名(和文) 新しく同定された非定型心筋細胞 ACMs の生理的意義および細胞周期調節機構の検討  
  
 研究課題名(英文) Regulation of cell cycling and functional characterization of atypical-shaped cardiomyocytes (ACMs)  
  
 研究代表者  
 尾松 万里子 (Omatsu-Kanbe, Mariko)  
  
 滋賀医科大学・医学部・准教授  
  
 研究者番号：80161397  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs) は、成体マウスの心室組織から単離された細胞である。ACMsは低酸素環境に耐性を有し、培養すると自発的に大きく成長して拍動を開始する。培養ACMsを経時的に観察した結果、プリオンタンパク質を発現する小型細胞が互いに融合して多核の大型細胞に成長することを見出したが、細胞分裂は現在の培養条件下では観察されなかった。これらのことから、ACMsは幹細胞から次の段階へ分化の進んだ心筋前駆細胞の一種であると考えられた。また、ACMsはマウスおよびヒトにおいて老齢に至るまで心臓組織に存在することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We recently discovered a novel subpopulation of adult mouse heart cells that spontaneously develop into beating cardiomyocytes, defined as atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs). ACMs are likely to be cardiac progenitor cells that possess more resistance to severe ischemic conditions compared to the ventricular myocytes and survive the long-term post-natal development while preserving the expression of fetal cardiac gene products. Under culture conditions, ACMs fuse with each other to become large beating cells, however, we could not observe cell proliferation. In combination with cardiac-specific contractile protein cardiac troponin T (cTnT), PrP/cTnT-expressing cells are found in the interstitial spaces among ventricular myocytes both in mouse and human adult heart, indicating that these cells remain in the normal heart throughout the lifetime.

研究分野：細胞生理学

キーワード：心筋前駆細胞 心筋細胞 ACMS Prion protein 自動性 ヒト心筋

### 1. 研究開始当初の背景

心臓には、心筋細胞、内皮細胞、血管平滑筋細胞などに加え、cardiac progenitor cells および side population cells に分類される種々の幹細胞が存在することが明らかになり、これらの幹細胞を培養してホルモン等で刺激したり、マウスの傷害心に対して直接あるいは静脈を介して注入したりすることによって心筋細胞に分化させる方法が報告されている。

申請者らは、ランゲンドルフ灌流による成体マウス心室筋細胞単離の最終過程において、遠心によって取り除かれた上清分画（心筋細胞を含まない小型細胞分画）を集めて methylcellulose を含む半固形状培地中で培養したところ、3~5 日後の接着細胞群の中に、枝分かれした形態に変化するとともに自動的に拍動する細胞が存在することを見出した（図 1）。

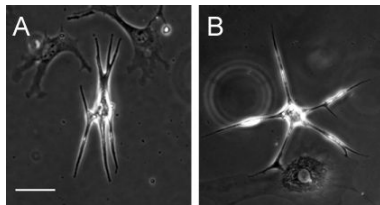


図 1. 拍動中の ACMs (bar: 50 μm)

この細胞の分裂・増殖は観察されず、幹細胞マーカーとして知られる細胞表面抗原の発現も見られなかった。ほとんどの細胞は多核であり、自動能を有し、心室筋の主要なギャップ結合タンパク質である connexin-43 の発現が確認された。また、パッチクランプ法により、洞房結節細胞に類似した自発的活動電位が記録された（図 2）。これらのことから、心室筋組織内に存在し、心室筋細胞と洞房結節細胞の両方の特徴を併せ持ったこの細胞を「非定型心筋細胞（atypically-shaped cardiomyocytes, ACMs）」として同定した。

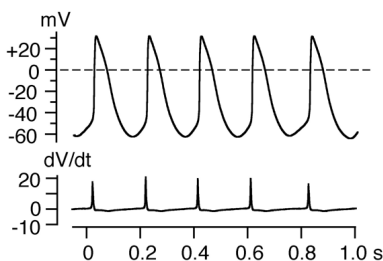


図 2. ACMs の自発的活動電位

また、出生直後から老年までのマウスの ACMs について調べた結果、生後 1 日目では数千個の ACMs が確認されたが、その後急速に減少し、成体になるとその細胞数はほぼ一定であること（図 3）、atrial

natriuretic peptide や T-type  $Ca^{2+}$  channel (Cav3.2) などの胎仔性心筋遺伝子によってコードされるタンパク質を老年に至るまで発現していることが明らかになり、ACMs は胎生期から心臓に存在している可能性が示唆された。

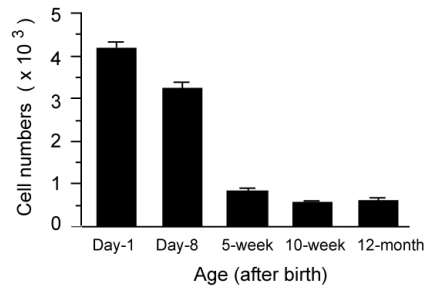


図 3. 出生後の ACM の細胞数の変化

さらに、ACMs を低酸素環境下に曝したところ、心室筋細胞に比べて生存率が高いことが明らかになった。正常の条件下で培養中の ACMs について、細胞内微細構造を調べてみると、自食（オートファジー）によりミトコンドリアなどを取り込んだと見られる多数の自食泡（オートファゴソーム）がリソソームによる種々の段階の加水分解を受けている様子が観察された（図 4）。オートファジー阻害剤である Bafilomycin A<sub>1</sub> によって細胞の成長（形態変化と拍動の開始）および低酸素環境に対する耐性が抑制されたことから、ACMs におけるオートファジーの恒常的活性化が、細胞の成長と虚血耐性に貢献していることが推察された。

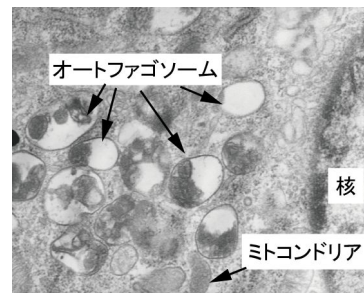


図 4. ACM の透過型電子顕微鏡像

### 2. 研究の目的

ACMs の細胞周期の分子基盤とその調節および電気生理学的性質について、心室筋細胞、心房筋細胞、洞房結節細胞、心臓に存在する幹細胞との相違点を明らかにすることにより、ACMs の生理的意義および細胞周期調節機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ACMs の単離と培養

マウスの心臓をランゲンドルフ灌流装置を用いて酵素液で灌流し、心筋細胞を遠心して除いた分画をさらに遠心し、沈殿した小型の細胞を Methylcellulose を含む半固形状培地で培養した。

#### 形態的観察とタンパク質発現

培養細胞の動画を撮影し、拍動の様子を記録した。発現タンパク質の確認は、抗体染色画像を記録することによって行った。

#### マイクロアレイ解析

フィルム上に培養した ACMs をレーザーマイクロダイセクション装置を用いて切り出して集め、RNA を抽出し、増幅した後に DNA に逆転写し、マイクロアレイ解析を行った。

#### 4. 研究成果

ACMs は、ランゲンドルフ灌流による成体マウス心室筋細胞単離の最終段階で得られた「心筋細胞を含まない小型細胞分画」の培養中に発見された、自動的に拍動する細胞である。ACMs の多くは多核であり、 $\alpha$ -actinin や cardiac troponin T (cTnT) などの収縮タンパク質を発現しているが、Sca-1 などの心臓に存在する体性幹細胞マーカーを発現していないことがわかった (図 5)。

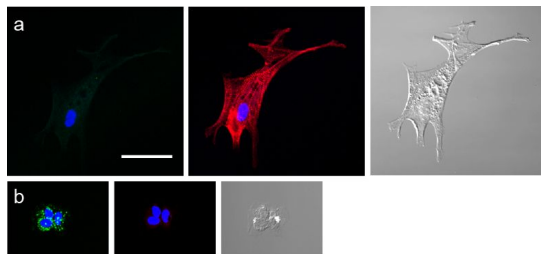


図 5. a. ACM はアクチニン (赤) 陽性 Sca-1 (緑) 陰性 b. 幹細胞はアクチニン陰性 Sca-1 陽性の細胞であることを示す。

心筋細胞は明らかになっている表面抗原マーカーがほとんどない。ACMs のマーカーを探索したところ、心筋細胞心筋前駆細胞のマーカーとして報告されている CD230 (prion protein, Prp) を細胞膜に強く発現していることを明らかにした (図 6)。

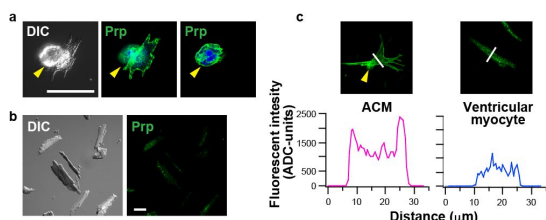


図 6. ACMs と心筋細胞における Prp (緑) の発現。

培養中の ACMs を経時的に観察したところ、既に拍動している ACMs に対して小型で丸い形状の Prp 陽性細胞が遊走し融合することを見出した (図 6)。しかしながら、現在の培養条件下では ACMs の分裂・増殖は観察されなかった。このことから、ACMs は細胞融合によって、より大型で複雑な形状の多核細胞に成長する可能性があると考えられた。

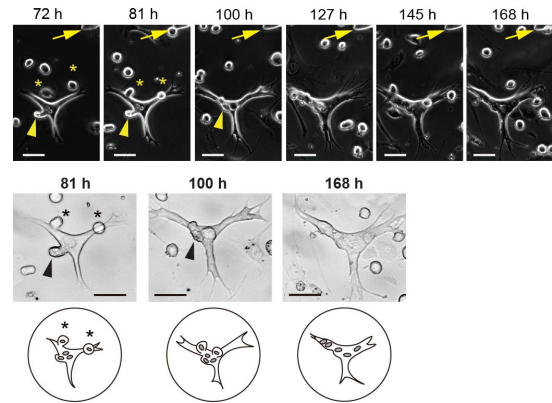


図 6. 培養中の ACMs の細胞癒合の様子

Prp はほとんどの細胞に発現しているため、心筋収縮タンパク質との共発現を調べることににより、ACMs を認識できることを見出した。マウス心室組織を調べたところ、Prp と cTnT を共発現する小型細胞が心室筋細胞の間隙に単独またはクラスター状で存在することがわかった (図 7)。Prp 陽性細胞は血球系幹細胞マーカーである CD45 を発現していなかった。これらのことから、Prp/cTnT 陽性細胞は心筋前駆細胞の一種である可能性が示唆された。

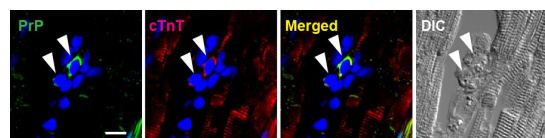


図 7. マウス心臓組織における Prp/cTnT 陽性細胞

マウスの ACMs と心室筋細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った結果、ACMs は心室筋細胞に比べて発現が増加している遺伝子は少ないことがわかった。一方、ACMs で発現が低下している遺伝子は多く、クラスター解析によって、ミトコンドリアや収縮タンパク質に関連したタンパク質をコードする遺伝子群であることが明らかになった。これらの結果は、ACMs において、オートファジーによるミトコンドリアの自食や、電子顕微鏡像による低密度な筋繊維分布を裏付けるものであると考えられた。

さらに、ヒト心室組織においても、PrP/cTnT陽性細胞が心室筋細胞の間隙に存在することを明らかにした(図8)。

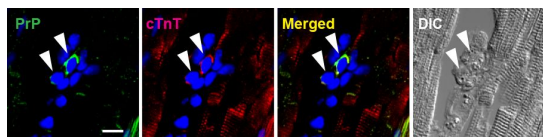


図8. ヒト心室組織における PrP/cTnT 陽性細胞

これらのことから、ACMsは成体の心臓において、胎生期からの心臓細胞が心筋前駆細胞の一種として細胞間隙に残存していることが示唆され、ACMは通常は静止であること、隣接する心筋細胞が単離されると成長して拍動細胞となることが推察された。ACMsは、幹細胞から心筋細胞へと分化が進んだ細胞であり、化学的な刺激がなくても成長することから、細胞周期は停止しているものと考えられた。ACMsは多核細胞が多く、当初は分裂が起きている可能性があると考えていたが、その原因は細胞融合にある可能性が高いことが本研究により明らかになった。今後は、この細胞周期を再開させて心筋細胞に再生させる手段の開発が望まれる。

#### 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 7件)

**Omatsu-Kanbe M**, Nozuchi N, Nishino Y, Mukaisho K, Sugihara H, **Matsuura H**. Identification of cardiac progenitors that survive in the ischemic human heart after ventricular myocyte death. *Sci Rep* 7: 41348, 2017. (査読有)

Kubo T, Ding, W-G, Toyoda F, Fujii Y, **Omatsu-Kanbe M**, **Matsuura H**. Phosphatidylinositol4-phosphate 5-kinase prevents the decrease in the HERG potassium current induced by Gq protein-coupled receptor stimulation. *J Pharmacol. Sci* 127: 127-134, 2015. (査読有)

**Omatsu-Kanbe M**, Nishino Y, Nozuchi N, Sugihara, H, **Matsuura**, **Matsuura H**. Prion protein- and cardiac troponin T-marked interstitial cells from the adult myocardium spontaneously develop into beating

cardiomyocytes. *Sci Rep* 4: 7301. 2014. (査読有)

**Omatsu-Kanbe M**, **Matsuura H**. Novel intracellular mediator of adiponectin secretion from adipocyte. *J Physiol* 592(23): 5141, 2014. (査読有)

Kiyonaka S, Kajimoto T, Sakaguchi R, Shinmi D, **Omatsu-Kanbe M**, **Matsuura H**, Imamura H, Yoshizaki T, Hamachi I, Morii T, Mori Y. Fluorescent coiled-coil proteins for visualizing subcellular thermoregulation in living cells. *Nat Methods*, 10; 1232-1238, 2013. (査読有)

Kojima A, Kitagawa H, **Omatsu-Kanbe M**, **Matsuura H**, Nosaka S. Sevoflurane protects ventricular myocytes against oxidative stress-induced cellular Ca<sup>2+</sup> overload and hypercontracture. *Anesthesiology*. 119:606-620, 2013.(査読有)

**Omatsu-Kanbe M**, **Matsuura H**. Ischemic survival and constitutively active autophagy in self-beating atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs): Characterization of a new subpopulation of heart cells. *J Physiol Sci*, 63:17-29, 2013. (査読有)

[学会発表](計 5件)

**Omatsu-Kanbe M**, **Matsuura H**. Ischemic survival of cardiac progenitors in the human heart tissue after ventricular myocyte death. *J. Physiol. Sci*. 67: S119. (第94回日本生理学会大会) 2017 3/28-30, 浜松

**Omatsu-Kanbe M**, Nishino Y, Nozuchi N, **Matsuura H**. Presence of prion protein-expressing cardiac progenitor cells in human cardiac ventricles with myocardial infarction. *J. Physiol. Sci*. 66: S98. (第93回日本生理学会大会) 2016 3/22-24, 札幌

**Omatsu-Kanbe M**, Nozuchi N, Nishino Y, **Matsuura H**. Cardiac interstitial small cells co-expressing prion protein (PrP) and cardiac troponin T (cTnT) spontaneously develop into beating atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs). *J. Physiol. Sci.* 65: S210. (第102回日本解剖学会第92回日本生理学会合同大会) 2015 3/21-23, 神戸

Nishino Y, Nozuchi N, **Omatsu-Kanbe M**, **Matsuura H**. Self-beating atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs), a novel subpopulation of heart cells, originate from cardiac progenitor cells expressing prion protein (PrP) in adult mouse heart. *J. Physiol. Sci.* 64: S131. (第91回日本生理学会大会) 2014 3/16-18, 鹿児島

Nozuchi N, Nishino Y, **Omatsu-Kanbe M**, **Matsuura H**. Identification of a novel type of possible cardiac progenitor cells co-expressing prion protein (PrP) and cardiac troponin T (cTnT) in adult human heart. *J. Physiol. Sci.* 64: S131. (第91回日本生理学会大会) 2014 3/16-18, 鹿児島

〔図書〕(計 1 件)

**Omatsu-Kanbe M**, **Matsuura H**. (The presence of LC3 and LAMP1 is greater in normal sino-atrial nodal cells than in ordinary cardiomyocytes, indicating a constitutive event. In *Autophagy: Cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection and aging*. (Elsevier, edited by Hayat, M.) volume 7, chapter 14. pages 219-226, 2015.

〔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〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
尾松 万里子 (Omatsu-Kanbe, Mariko)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80161397

(2)研究分担者  
松浦 博 (Matsuura, Hiroshi)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60238962

(3)連携研究者  
( )  
研究者番号：

(4)研究協力者  
山元武文 (Yamamoto, Takefumi)  
森 康博 (Mori, Yasuhiro)  
( )