

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893043

研究課題名(和文)成体心筋細胞の分裂メカニズムの解析と制御に関する研究

研究課題名(英文)Analysis of cell cycle regulators in adult cardiomyocytes

研究代表者

武田 憲文(TAKEDA, NORIFUMI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60436483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：成体心筋細胞は新陳代謝しており、既存の心筋細胞が分裂・増殖することが主なメカニズムである。本課題では、増殖能を保持・獲得した心筋細胞の特性を明らかにするため、(1)細胞周期インディケータFucciを用いて、心筋細胞特異的に細胞周期を単離・解析可能なin vivo, in vitroシステムを構築するとともに、(2)臓器や器官の適切な大きさ(増殖の程度)を決める役割を担い、心筋細胞の増殖能にも関連するHippo-YAP経路を修飾する薬剤のスクリーニング作業を開始できた。これらの成果を生理的および病態モデルマウスで検証し応用することで、成体心筋細胞の増殖能を増幅する治療方法の開発に繋げたい。

研究成果の概要(英文)：Although a consensus has emerged that cardiomyocytes themselves are the most prominent source of ongoing cardiomyocyte renewal in the adult mammalian heart, those cardiomyocytes having the potential to proliferate for regeneration have not been well characterized. To visualize and isolate live mitotic cardiomyocytes, we generated useful in vitro and in vivo systems allowing investigation of cell cycle status in cardiomyocytes by use of the Fucci technology. In addition, we performed high-throughput screening for Yes-associated protein (YAP)-activating drugs, which could modulate Hippo signaling pathway to promote cardiomyocyte proliferation and survival. These need to be verified in animal models of cardiogenesis and heart failure, but would provide new insights on adult heart regeneration strategies by enhancing cardiomyocyte proliferation, in the near future.

研究分野：循環器内科

キーワード：心筋再生 成体心筋細胞 Fucciシステム 細胞周期 Hippo経路 YAP 創薬

1. 研究開始当初の背景

従来、成獣心筋細胞は「最終分化細胞であり分裂しない」と考えられてきたが、心筋細胞が僅かながらでもターンオーバーしていることが証明され、その主な起源(細胞種)として既存の心筋細胞が分裂した結果であろうと考えられるようになった。しかしながら、その分裂頻度が非常に低く(1%以下)、これらを検出可能なツールが従来無かったことも、この発見が遅れた要因であった。一方で、発生過程の心筋細胞は盛んに分裂・増殖している。マウス生直後の心筋傷害モデルでは、既存心筋細胞の分裂によって完全に心筋再生が成され、瘢痕を残さない。また、一部の魚類や有尾両生類の心尖部を切除後に起こる心筋再生でも、既存心筋細胞の分裂が主な再生メカニズムであった。

マウスやヒトの成獣心筋細胞が僅かでも分裂能を保持・獲得できるならば、この既存心筋細胞の分裂能を増強・促進させることは、安全で効率的な内因性心筋再生を目指す上で非常に重要な一戦略である。しかしながら、生きたままの分裂期細胞を可視化・単離するツールがないために、(1)成体心筋細胞の分裂能が著しく減弱(ほぼ停止)する分子機序、(2)増殖能を保持または再獲得する成体心筋細胞の特徴とその制御機構、に関する基礎的および臨床応用に向けた研究の進捗状況は十分とは言えない。

2. 研究の目的

本課題では、内因性心筋再生の機序の解明とその増幅のため、特に既存心筋細胞の分裂能に着目し、増殖期の心筋細胞を抽出・解析するツールを開発し、更にそれらを修飾する内因性および外因性要素を解明・制御することを主目的とする。

最近、臓器や器官の「適切な大きさ(増殖の程度)」を決める Hippo-YAP 経路が、心筋細胞の増殖にも関与する可能性が指摘され

ている。上皮細胞での Hippo 経路では、細胞が接触する細胞外基質や隣接する細胞との接着といった「細胞の接触状態」が、その増殖シグナルの制御に関与している。しかしながら、心筋細胞内での制御機構や Hippo 経路の最終的なエフェクター(転写補因子)である YAP や TAZ の標的因子は知られておらず、またその制御方法もないのが実情である。本課題では、成体心筋細胞の増殖能を制御するシグナル伝達系として Hippo-YAP 経路にも着目し、その標的因子の解明や制御する薬剤の開発(創薬)にも着手したい。

3. 研究の方法

(1) 分裂期心筋細胞を可視化する *in vitro* システムの構築

心筋細胞特異的に細胞周期依存性の蛍光プローブ(fucci)を発色するアデノウイルスを作成し、ラット初代心筋培養細胞と大量細胞機能評価装置(InCellAnalyzer)を用いた解析系を構築する。

(2) 分裂期心筋細胞を検出する *in vivo* システムの構築

Cre-loxP システムを用いて心筋細胞特異的に細胞周期依存性の蛍光プローブ(fucci)を発色するマウスを作成する。

(3) Hippo-YAP 経路の標的因子を探索

心筋細胞特異的に、HA タグを付した活性化(核内型)YAP を発現できるアデノウイルスおよびトランスジェニック・マウスを作成する。

(4) Hippo-YAP 活性化剤の開発(創薬)

約 20,000 種類の未知化合物ライブラリー(東京医科歯科大学所蔵)から、(a) YAP 活性化薬は、ヒト網膜色素上皮細胞に YAP1 と TEAD 応答レポーターを発現させて、化合物投与後のレポーター活性を指標に、(b) TAZ 活性化薬は、ヒト乳腺上皮細胞 MCF10A に野生型の TAZ を発現させ、化合物を投与すると浮遊状態で生存可能となってスフェア

(mammosphere) を形成する現象をもとに、各々の1次スクリーニングを施行する。さらに、ラット新生児心筋培養細胞と InCellAnalyzer を用いて、心筋細胞の増殖を促す化合物を絞り込む(2次スクリーニング)。

4. 研究成果

(1) 分裂期心筋細胞を可視化する *in vitro* システムの構築

ラット心筋トロポニン T プロモーター (cTnT promoter: -492~+172) を単離し、cTnT プロモーター下に静止期 (G1 期) のみに存在する赤色蛋白 mKusabira-Orange-hCdt1(30-120) (Amalgaam AM-V9001) と分裂期 (S/G2/M 期) にのみ存在する緑色蛋白 mAzami-Green-hGeminin(1-110) (Amalgaam AM-V9014) を発現するようなアデノウイルス (Agilent Adenoviral Vector System) を作成した。分裂期・静止期と単核・2核を区別できる InCellAnalyzer 用のプログラミングを作成し、0.1%と2%血清下でのラット新生児培養心筋細胞の細胞周期を観察したところ、2%血清下で分裂期細胞が有意に多いことを確認できた。

従来の *in vitro* 観察手法では、細胞固定の後に免疫染色などを用いて評価する必要があったが、本手法を用いれば生きたままで心筋細胞の細胞周期を観察できることから、心筋細胞の細胞周期を低経費・短時間で評価可能となる。実際、下記(4)での2次スクリーニングでも併用し、その信頼性と有効性を確認できた。

(2) 分裂期心筋細胞を検出する *in vivo* システムの構築

第二世代 fucci (G1: mCherry-hCdt1, S/G2/M 期: mVenus-hGeminin) を発色できる floxed マウス (*R26R-Fucci2*; Development 140:237-246, 2013) と心筋細胞特異的な Cre マウス (\square *MHC-Cre*) を交配して、胎生期心筋細胞を観察したところ、心筋細胞特異的な

fucci 蛋白の発現を確認できた。今後は、分裂期心筋細胞を生きたままで単離 (FACS など) して解析するなどしてその特性を解析するとともに、下記(4)について、*in vivo* 効果検証等にも利用予定である。

(3) Hippo-YAP 経路の標的因子を探索

ラット cTnT promoter を用いて、心筋細胞特異的に HA-tagged 恒常的核内型 YAP (YAP-S127A: addgene #19058) を発現するアデノウイルスを作成し、ラット新生児心筋培養細胞に対する効果を確認したところ、対象群 (心筋細胞特異的 LacZ 発現アデノウイルス) よりも有意に心筋細胞の分裂を促進させることができた。同トランスジェニックマウスについても、数ラインの個体を確保できている。次世代で発現確認などを行って選別予定である。今後は、Hippo-YAP 経路の標的因子の探索のために、トランスクリプトーム解析、ChIP-Seq 解析などを行う予定である。

(4) Hippo-YAP 活性化剤の開発 (創薬)

1次スクリーニングの結果、合計 64 種類の薬物を選出した。心筋細胞の増殖能に与える効果については、DNA 合成 (EdU 取り込み)、核分裂 (pH3 染色)、細胞質分裂 (Aurora B 染色)、細胞周期 (上記(1)の *in vitro* システム) を指標に InCellAnalyzer を用いて検証し (2次スクリーニング)、現在までに2種類の機能未知・有機化合物の選出に成功している。いずれも抗酸化作用、抗アポトーシス活性などを有している。今後は、側鎖構造を改変することによって、生体内で安定し活性も高く (フッ素化など) 一方で毒性も少ない薬剤の創出を試みた上で、詳細な作用機序の検証を追加する。

また、上記(1)~(4)で、重症心不全の診療に応用し得る化合物や因子について、細胞腫特異的な遺伝子改変動物や *in vivo* 投与実験を用いて、マウス心筋梗塞や拡張型心筋症モデルの心機能や心筋細胞の増殖能に与える影響を検証していくことで、成体心筋細胞の

分裂メカニズムの解明と制御に関する研究を継続予定である。

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11件)

(1) 武田憲文, 小室一成. 成体心筋細胞の増殖に重要な役割を担うHippo-YAP経路. 日本再生医療学会雑誌(印刷中)2015(査読無)

(2) 武田憲文, 小室一成. 再生医療がもたらす心筋梗塞の治療の将来性についておしえてください. 治療 96(3):272-274, 2014(南山堂)(査読無)

(3) 武田憲文, 藤田大司, 犬塚亮, 谷口優樹, 縄田寛, 山内治雄, 加藤昌義, 西村敬史, 永原幸, 中島淳, 小野稔, 小室一成. マルファン症候群と類縁疾患. 呼吸と循環(印刷中)2015(医学書院)(査読無)

(4) 藤田大司, 武田憲文, 今井靖, 平田恭信. マルファン症候群の現状と展望. 綜説シリーズ-現代医学の焦点(380). 日本臨床72(6):1163-1171, 2014(日本臨床社)(査読無)

(5) 武田憲文, 小室一成. 心臓と肺血管系の発生に共通した前駆体細胞の発見. 再生医療 13(1):81, 2014(査読無)

(6) Jain R, Barkauskas C.E, Takeda N, Bowie E.J, Aghajanian H, Wang Q, Padmanabhan A, Manderfield L.J, Gupta M, Li D, Li L, Trivedi C.M, Hoan L.M, Epstein J.A. Plasticity of Hopx+ type I alveolar cells to regenerate type II cells in the lung. Nature Communications (in press 2015)(査読有)

(7) Yagi H, Hatano M, Takeda N, Harada S, Suzuki Y, Taniguchi Y, Shintani Y, Morita H, Kanamori N, Aoyama T, Watanabe M, Manabe I, Akazawa H, Kinugawa K, Komuro I. A case of congenital contractural arachnodactyly

without *FBN1* or *FBN2* gene mutation, complicated with dilated cardiomyopathy. Internal Medicine 2015 (in press) (査読有)

(8) Fujita D, Takeda N, Imai Y, Inuzuka R, Komuro I, Hirata Y. Pathophysiology and Japanese clinical characteristics in Marfan syndrome. Pediatr Int 2014;56(4):484-491. (査読有)

(9) Takeda N, Jain R, Li D, Li L, Lu MM, Epstein JA. Lgr5 identifies progenitor cells capable of taste bud regeneration after injury. PLoS One. 2013;8:e66314. (査読有)

(10) Takeda N, Jain R, Leboeuf MR, Padmanabhan A, Wang Q, Li L, Lu MM, Millar SE, Epstein JA. Hopx expression defines a subset of multipotent hair follicle stem cells and a progenitor population primed to give rise to K6+ niche cells. Development. 2013;140:1655-64. (査読有)

(11) Ogawa N, Imai Y, Nishimura H, Kato M, Takeda N, Nawata K, Taketani T, Morota T, Takamoto S, Nagai R, Hirata Y. Circulating transforming growth factor -1 level in Japanese patients with Marfan syndrome. Int Heart J 2013;54:23-6 (査読有)

【学会発表】(計4件)

(1) Fujita D, Takeda N, Kato M, Nishimura H, Inuzuka R, Imai Y, Hirata Y, Komuro I. Marfan syndrome - Fibrillin I mutation and clinical phenotypes. 第17回日本成人先天性心疾患学会(東京, 2015年1月16-18日)

(2) Fujita D, Takeda N, Imai Y, Hirata Y, Hirata Y. Comparison between the original and revised Ghent criteria in Japanese Marfan syndrome. 9th International symposium on Marfan syndrome and related disorders (Paris, 2014/4/11-13)

(3) Imai Y, Fujita D, Takeda N, Hirata Y.
Comprehensive evaluation and
multidisciplinary management of Marfan
syndrome patients 第 78 回日本循環器学会
(東京, 2014 年 3 月 21-23 日)

(4) Fujita D, Imai Y, Takeda N, Hirata Y
et al. Risk Factors for Acute Aortic Event
in Japanese Marfan Patients. Can we
predict aortic dissection? 第 78 回日本循
環器学会学術集会 (東京, 2014 年 3 月 21-23
日)

【図書】(計 1 件)

(1) 武田憲文, 原弘典, 小室一成. 生体心
筋細胞は分裂するのか? Annual Review
2015. 小室一成、佐地勉、坂田隆造、赤阪隆
史編集 (中外医学社) p1-7, 2015

【産業財産権】

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ: なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

武田 憲文 (TAKEDA, Norifumi)

東京大学・医学部附属病院循環器内科・助
教

研究者番号: 6 0 4 3 6 4 8 3

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

原 弘典 (Hara, Hironori)