

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893124

研究課題名(和文) 出生前後における心筋細胞成熟化のメカニズム解明

研究課題名(英文) Investigation of the regulatory mechanism of perinatal cardiomyocyte maturation

研究代表者

中島 康弘 (NAKASHIMA, YASUHIRO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20565585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞は終末分化すると増殖能を失い、成体心筋細胞はほとんど増殖しないと考えられているが、この制御機構については未だ不明である。近年、生後まもなくの間は哺乳動物において心筋細胞増殖がみられるとの報告が散見されるため、同時期に発現する遺伝子群のなかから心筋細胞増殖制御因子の探索を行った。マウス心臓組織での免疫染色法、培養細胞(H9C2)でのノックダウンおよび過剰発現実験により、出生期の心筋細胞に優位に発現し、かつ細胞増殖を促進する遺伝子を複数同定した。今後、これらの因子の細胞増殖制御における分子機序につき、心筋細胞を用いた系を含めさらに検討を進める。

研究成果の概要(英文)：Proliferative capacity of adult mammalian cardiomyocytes is very limited. However, its regulatory mechanism is still unclear. Since the recent studies have suggested that the cardiomyocytes soon after birth retain the proliferative capacity to repair damaged cardiac tissue in vivo, we searched possible regulatory factors of cardiomyocyte proliferation among the genes expressed dominantly in perinatal mouse heart and identified several genes that are expressed dominantly in the perinatal stage and also promote proliferation in H9C2 cells by using immunohistochemistry of mouse heart tissue, gene knockdown and overexpression in vitro. Next we investigate the molecular mechanism by which these genes regulate proliferation of the cells including cardiomyocytes.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋分化 心発生

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞は終末分化すると増殖能を失い、成体では心筋細胞はほとんど増殖しないと考えられているが、その機序についてはよくわかっていない。胎生期の心筋細胞は増殖により心臓のサイズを増大させ、心臓転写因子やシグナリング分子の遺伝子改変によって心筋細胞増殖の促進も見られる(図1、Nakashima-Y et al. Circulation Research 2014 (引用文献1))。近年、生後まもなくの間は哺乳動物の心臓でも心筋細胞の増殖がみられるという報告が散見され、マウス新生仔に心筋梗塞を起こすと、心筋細胞増殖活性の亢進を伴って心筋組織が再生するとの報告がある。一方、生後1週間を越えると同再生はおこらず、線維化組織により修復される。このことから、出生直後には増殖能を持つ心筋細胞が存在するが、生後短期間のうちに増殖能を失うと考えられる。われわれは心筋細胞が増殖能を持つ時期に発現している遺伝子群が、生後の心筋細胞の増殖制御に重要であると考えたので、それらの遺伝子群の心筋細胞増殖に対する効果について検討を行った。

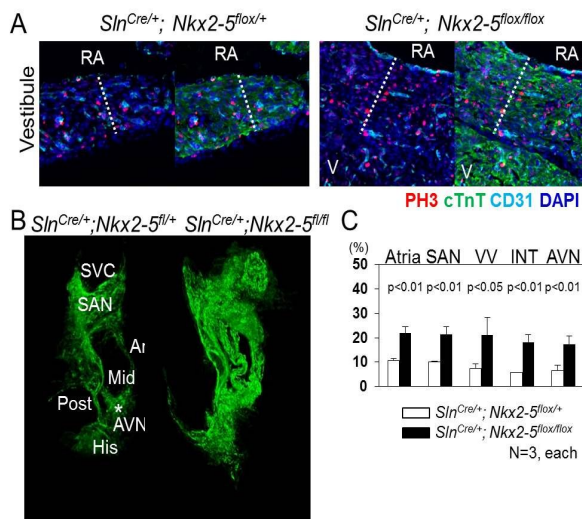


図1 Slit1-Cre Nkx2-5 コンディショナルノックアウトマウスにおける心筋細胞増殖能の亢進 (A 心房心筋、B 伝導系心筋、C 増殖活性の評価)。(Nakashima-Y et al. Circulation Research 2014 より)

2. 研究の目的

本研究では、心筋細胞の増殖能が失われる出生後早期に発現が変化する遺伝子群のなかから心筋細胞増殖を制御する因子を同定し、その分子学的意義を検討する。

3. 研究の方法

出生後早期に発現が変化する遺伝子群について、マウスの胎仔および新生仔の心臓組織での免疫染色法、ラット心臓筋筋細胞ライン(H9C2)での各遺伝子のsiRNAによるノックダウンまたはcDNAの過剰発現による細胞増殖能の検討、マウスES細胞由来分化心筋細胞での各遺伝子のノックダウンおよび過剰発現による心筋細胞増殖能の検討により、出生後早期に発現変化を示しかつ心筋細胞増殖に関与する因子を同定し、それらの心筋細胞増殖における分子学的意義を検討する。

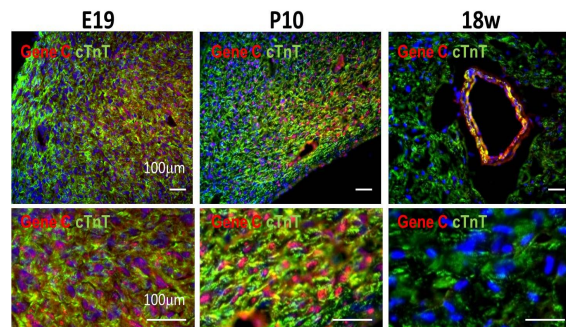


図2 胎生期、新生仔期および成体期における候補遺伝子(遺伝子C)の免疫染色による発現パターン。

4. 研究成果

(1) 出生後の心筋細胞において発現低下する遺伝子群の同定

心発生過程のうち、出生後早期にマウス心で mRNA 発現レベルが経時的に低下する遺伝子群について、各遺伝子の抗体を用いたマウス胎仔および新生仔心臓組織切片での免疫染色法を行った。いくつかの遺伝子については、心内膜細胞や間質細胞、血管構成細胞等の非心筋細胞での発現を反映したものであったが、心筋細胞での経時的発現低下を示す因子を複数同定した。出生後早期に経時的に発現低下する遺伝子AおよびCは、出生直前、出生後早期に心筋細胞での発現を認める一方、成体期の心筋細胞では発現が低下した(図2)。

(2) siRNA を用いた細胞増殖促進因子の同定

出生後心筋細胞は増殖能を喪失するが、それに一致して発現が低下する遺伝子群に心筋細胞の増殖能喪失に重要な因子が含まれている可能性を考えたので、つぎに、出生後早期に心筋細胞で発現が経時的に低下した

遺伝子について、ラット心臓筋芽細胞ライン (H9C2 ライン) を用いて各遺伝子を siRNA によりノックダウンし、増殖促進能を持つ遺伝子を探索した。ノックダウン後 2 日で細胞数が有意に低下する遺伝子を複数同定した (図 3A)。前述の遺伝子 A および C については、MTT assay により経時的な細胞増殖の評価を行ったが、どちらも siRNA により有意に細胞増殖の低下が見られた (図 3B)。

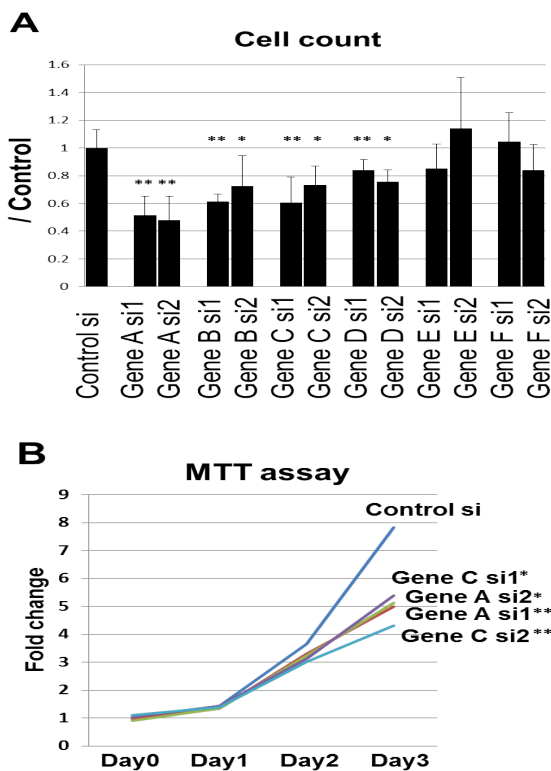


図 3 H9C2 細胞における候補遺伝子群の siRNA を用いたノックダウンによる細胞増殖能の検討

(3) 過剰発現系による細胞増殖促進因子の同定

つぎに遺伝子 A および C について、過剰発現ベクターを H9C2 細胞にリポフェクション法により遺伝子導入を行い、細胞増殖が促進されるかを検討した (図 4A)。はじめに蛋白 C 末端を Flag タグで標識した発現ベクターを遺伝子導入し、各遺伝子の蛋白発現を確認した (図 4B)。トランスフェクション 2 日後の細胞数を評価すると、GFP を発現させたコントロールに比べ、遺伝子 C の過剰発現は細胞増殖を有意に促進する結果が得られた。一方、遺伝子 A の過剰発現では、有意な変化は得られなかった (図 4C)。

(4) ES 細胞分化心筋細胞を用いた、心筋細胞増殖促進の検討

つぎに、同定された遺伝子群が、心筋細胞

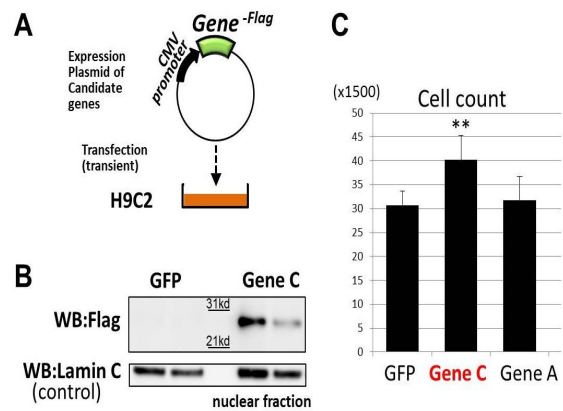


図 4 H9C2 細胞における候補遺伝子の過剰発現による細胞増殖能の検討

での増殖制御に関与するかを検討するために、ES 細胞由来分化心筋細胞を用いて実験を行った。ES 細胞からは心筋細胞をはじめ、様々な組織の細胞を分化させることができる。われわれが以前作成した Nkx2-5-Neo ES 細胞ライン (Nakashima-Y et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010 (引用文献 2)) は、ネオマイシンによる薬剤選別により心筋細胞のみを得ることができる。同 ES 細胞由来分化心筋細胞において同定された遺伝子の過剰発現が心筋細胞の増殖促進に働くかを検討している。図 5 はネオマイシン選別後の ES 細胞由来分化心筋細胞で、免疫染色法により遺伝子 C の発現を確認した (図 5)。今後、同心筋細胞に対して siRNA によるノックダウンや過剰発現の効果について検討していく。

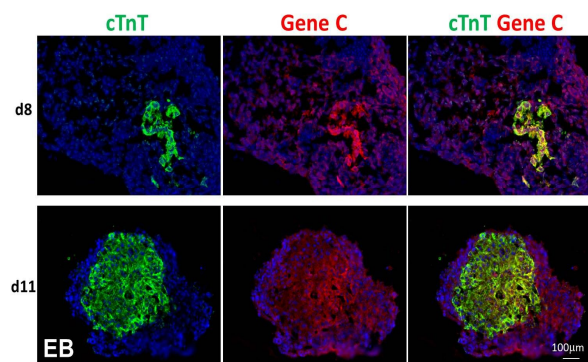


図 5 ネオマイシン選別により純化した ES 細胞由来分化心筋細胞における遺伝子 C の発現 (免疫染色)

(5) 考察

これらの結果から、出生後早期に発現が低下する遺伝子のうち、培養細胞レベルで細胞増殖を正に制御するものを同定することが

できた。出生後の同因子の発現低下が、生後の心筋細胞においても増殖能低下に關与する可能性、また同因子の発現増強により増殖能が亢進する可能性が示唆される。今後、上記 ES 細胞由来分化心筋細胞およびラット初代培養心筋細胞において、候補遺伝子群の心筋細胞増殖制御への關与や、過剰発現による心筋細胞増殖促進の可能性について検討する。

今回同定された遺伝子は出生後に発現が低下し、H9C2 での細胞増殖に促進的に働くことが示唆される。遺伝子 A は、非ヒストンクロマチン関連蛋白で、おもに発生期を中心に幅広い組織に発現し、細胞増殖を促進するとの報告があり、ノックアウトマウスの検討でも同様の結果が示唆されている。遺伝子 C は、細胞骨格に結合する蛋白で、核移行を示す。胎生期より心筋細胞を含め幅広い組織に発現が見られ、他組織では成体でも発現が維持されるが、心臓では発現が低下する。心筋細胞の増殖能については古くから注目されており、増殖因子による効果や細胞周期解析を含め多くの検討がなされているが、その制御機構については未だ不明な点が多い。今回の結果から、出生後早期に発現が低下する遺伝子群には、培養細胞レベルでの細胞増殖に關与するものが含まれていた。これらの遺伝子の発現低下が、出生後の心筋細胞増殖能の抑制に単独または共同で關与している可能性はあり得ると考えられ、さらに心筋細胞での解析を含め検討を進める。

ごく最近の報告から、クロマチン修飾や micro RNA、また転写因子 Meis、Hippo signaling といった細胞増殖制御シグナルが出生後の心筋細胞増殖制御に關与している可能性が示唆されているが (Porrello-ER, Olson-EN. Stem Cell Research 2014 (引用文献 3))、心筋細胞で増殖が抑制される詳しい機序については未だ不明な点が多い。本研究の候補遺伝子とこれらの因子との関連性についての検討についても有用と考えられる。

<引用文献>

1. Nakashima Y, Yanez DA, Touma M, Nakano H, Jaroszewicz A, Jordan MC, Pellegrini M, Roos KP, Nakano A. Nkx2-5 Suppresses the Proliferation of Atrial Myocytes and Conduction System. *Circulation Research* 2014;14:1103-1113

2. Nakashima Y, Ono K, Yoshida Y, Kojima Y, Kita T, Tanaka M, Kimura T. The search for Nkx2-5-regulated genes using purified embryonic stem cell-derived cardiomyocytes with Nkx2-5 gene targeting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;390:821-826.

3. Porrello-ER, Olson-EN. A Neonatal Blueprint for Cardiac Regeneration. (review) *Stem Cell Research* 2014;13:556-570

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 件)
なし
[学会発表](計 件)
なし
[図書](計 件)
なし
[産業財産権]
なし
[その他]
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
中島 康弘 (NAKASHIMA, Yasuhiro)
京都大学・大学院医学研究科 循環器内科学・特定病院助教
研究者番号：20565585

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし