

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300148

研究課題名（和文） 胎児-新生児遷移に伴う酸化ストレスと心筋細胞の終末分化・  
正帰還制御ループ研究課題名（英文） Oxidative stress during fetal-neonatal transition and the formation  
of a positive-feedback loop for the terminal differentiation of  
mammalian cardiomyocytes.

研究代表者

河原 剛一（KAWAHARA KOICHI）

北海道大学・名誉教授

研究者番号：20125397

研究成果の概要（和文）：本研究では、「生後まもなく心筋細胞が細胞周期から逸脱して終末分化し、細胞分裂能を喪失する現象には、胎児における胎盤呼吸から新生児における空気呼吸への個体発生的変化（fetal-neonatal transition,胎児-新生児遷移）、それに伴う酸化ストレスが関与している」という独創的な仮説の立証を目指した。その結果、ラット心筋細胞においては、胎児-新生児遷移に伴った酸化ストレスに起因する活性酸素種（reactive oxygen species, ROS）→ p38 MAPK → Cx43 発現（とくにミトコンドリア内膜）シグナル伝達系が閉じた正の伝達系、すなわち正帰還制御ループ（positive-feedback regulation loop）を形成することが、出生後における心筋細胞の終末分化に、極めて重要な役割を果たしている可能性を明らかにすることが出来た。

研究成果の概要（英文）：Shortly after birth, mammalian cardiomyocytes irreversibly exit from the cell cycle and become terminally differentiated. The genetic cues for the irreversible exit from the cell cycle in mammalian cardiomyocytes soon after birth remain largely unknown. We examined whether and if so how oxidative stress to mammalian hearts during fetal-neonatal transition produces changes in the proliferative activity and terminal differentiation of cardiomyocytes. Scavenging of reactive oxygen species (ROS) during fetal-neonatal transition, especially after birth, resulted in an increase in the proliferative activity and a decrease in the ratio of binucleated cardiomyocytes. Exposure to ROS in cultured cardiomyocytes increased the activity of p38 MAPK and the expression of connexin43 (Cx43). Not only knockdown of Cx43 using siRNA but also the inhibition of p38 MAPK activity resulted in a significant decrease in the production of ROS in cardiomyocytes. This study demonstrated that the ROS-induced formation of a positive-feedback loop ROS-p38 MAPK-mtCx43 for the sustained activation of p38 MAPK soon after birth possibly contributes to the loss of cell division and binucleation in mammalian cardiomyocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：細胞情報工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：心筋細胞，細胞周期，酸化ストレス，正帰還ループ，増殖能喪失

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢化の進展に伴い、疾病構成が変化して、従来のガンに加えて、生活習慣病が大きな比重を占めつつある。生活習慣病は多くの場合、虚血性心疾患などの重篤な循環器系疾患や、脳卒中などの中枢神経性疾患を併発する 경우가多く、心臓病や脳卒中は、がんと併せて3大国民病と呼ばれており、とくに重症循環器系疾患の患者数は、今後急速な増加が見込まれている。一般的に成人の心筋細胞は終末分化した細胞と考えられ、生まれた直後に分裂能を失い、増殖しないものと理解されてきた。したがって、心筋梗塞や拡張型心筋症によって心筋細胞に壊死が起こった場合、心筋細胞は再生されずに心不全になって死亡する。

(2) これまで、重症循環器系疾患の患者における心機能を回復させることを目的として、細胞移植をはじめとする様々な心筋再生療法に関する研究が、国内外の多くの研究者によって、精力的に実施されてきた。しかし、幹細胞などの細胞移植による心筋再生療法には、以下のような問題点が指摘されており、現状では心機能を回復させるに足る有効な手法となっていない。細胞移植法の問題点としては、①自己骨格筋芽細胞移植の場合、未だ適用例は少ないものの、細胞移植6ヶ月後においても心機能の改善が有意に認められない、②自己骨髄単核球移植の場合においても、心機能改善効果に一定の見解が得られていない、③多能性幹細胞移植の場合、移植細胞が心筋細胞に分化する割合は低い、事などが挙げられる。それ故、細胞移植療法に代わる新規な治療法として、組織工学的手法により三次元的な心筋組織を体外で再構築し、移植する研究が注目されている。しかしこの場合には、体外で再構築した心筋細胞シートに対する酸素・栄養の供給の問題が有るばかりでなく、細胞シートが周囲の心筋細胞群とギャップ結合などを介した細胞間相互作用を機能させることが重要であり、もし、それが難しい場合には、電気的な空間的不均一性の増大により、心室頻拍や心室細動などの致死性不整脈の出現確率が高まると思われる。

(3) 以上のことから、増殖能を喪失した心筋細胞を細胞周期に回帰させて、しかも単核の状態に細胞分裂を誘起させる、いわゆる、自己心筋細胞の増殖による新規な心筋再生療法の開発が、虚血性心疾患などの重篤な循環器系疾患の治療法として有効な治療法となり得る。

## 2. 研究の目的

本研究では、「生後まもなく心筋細胞が細胞周期から逸脱して終末分化し、細胞分裂能を喪失する現象には、胎児における胎盤呼吸から新生児における空気呼吸への個体発生学的変化 (fetal-neonatal transition,胎児-新生児遷移)、それに伴う酸化ストレスが関与している」という独創的な仮説の立証を研究目的としている。具体的には、胎児-新生児遷移に伴った酸化ストレスに起因する活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) → p38 MAPK → Cx43 発現 (とくにミトコンドリア内膜) シグナル伝達系が閉じた正の伝達系、すなわち正帰還制御ループ (positive-feedback regulation loop) を形成することが、出生後における心筋細胞の終末分化に、極めて重要な役割を果たしているという独創的な仮説の立証を目的としている。

## 3. 研究の方法

増殖能を維持したラット胎児および増殖能を喪失した新生ラット心筋細胞の培養系を対象とした *in vitro* 実験と、妊娠ラットを対象とした *in vivo* 実験、および成ラットを対象とした左冠動脈結紮による心筋梗塞モデル実験を行う。①ラット胎児および新生ラット・単離心筋細胞：培養心筋細胞に対して、酸化ストレス ( $H_2O_2$ ) を付加することによる心筋細胞増殖能の変化を解析する。また、その増殖能変化に関与している原因遺伝子発現の変化を、蛍光免疫染色、Western blot, RNA 干渉法等によって解析する。とくに、ミトコンドリア分画の Cx43 発現変化に着目する。酸化ストレス除去後における細胞内活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の持続的発生の有無を、その蛍光指示薬を用いて解析する。②妊娠ラット：妊娠中の酸化ストレスを軽減させるために、飲み水に抗酸化剤である NAC を付加する。また、出産後におけるラット新生児の酸化ストレスを軽減するために、腹腔内に NAC を微量注入する。対照ラット新生児と比較して、心重量 (体重で正規化) や多核化の程度、および様々な細胞周期関連遺伝子発現を解析する。③心筋梗塞モデル：上記の結果から推定された、心筋細胞増殖とアポトーシス防御併用療法の有効性を検証する。

## 4. 研究成果

(1) 心筋細胞に対する酸化ストレスとして、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を培養系に対して付加した。その結果、p38 MAPK の活性化を介した Cx43 発現の増加が生じ、とくにミトコンドリア

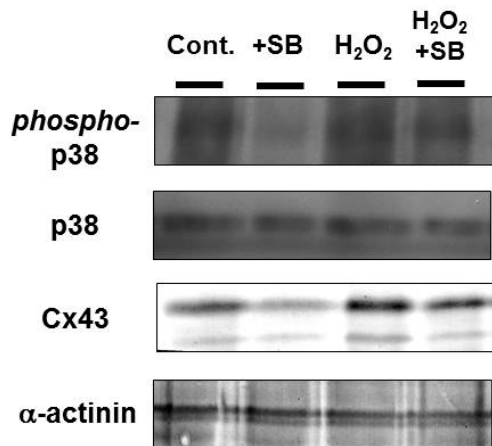


図1. 酸化ストレス付加による p38 MAPK 活性化, Cx43 発現増加 (Western Blot) 解析, SB: SB203580

ア内膜での Cx43 発現の増加が活性酸素種 (ROS) の発生増加に関与している可能性を明

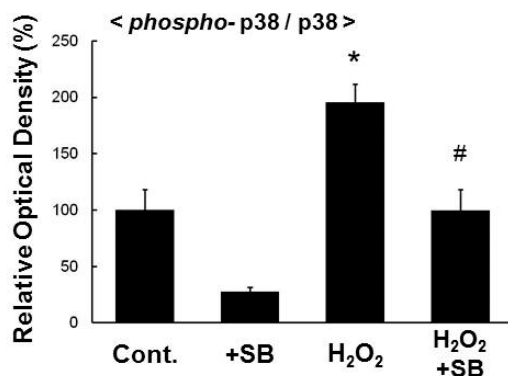


図2. 酸化ストレス付加による p38 MAPK 活性化, Cx43 発現増加 (\* p<0.05 vs Cont.; # p<0.05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment)

らかにできた。

(2) 新生ラットから単離した心筋細胞に対して, siRNA transfection によって Cx43 knock-down (KD)を行った。その結果, Cx43 KDによって心筋細胞の ROS 生成が抑制されることがわかった。そしてこのことには, Cx43 KD によりミトコンドリア内膜での Cx43 発現減少が関与している可能性を明らかにできた。

(3) 妊娠ラットに NAC を投与した新生ラットの群 (NAC<sup>+/+</sup>), NAC 投与妊娠ラットから出産した新生児の腹腔内に NAC を投与した群 (NAC<sup>+/+</sup>), 対照ラットから生まれた新生児の腹腔内に NAC を投与した群 (NAC<sup>-/-</sup>), 対照ラットから生まれた対照新生児群 (NAC<sup>-/-</sup>) の 4 群のラット心における遺伝子

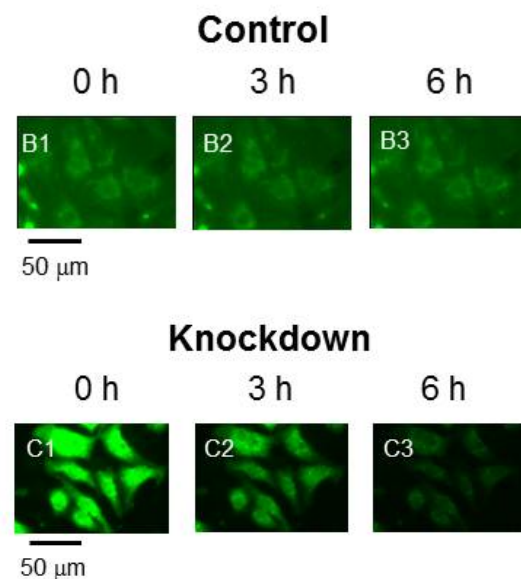


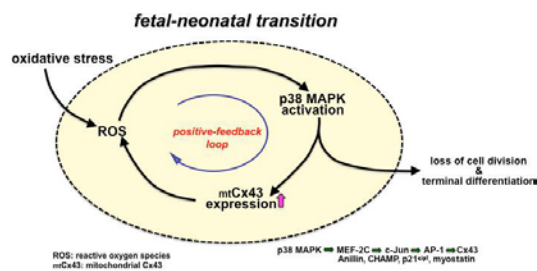
図3. Cx43 siRNA KDによる ROS 生成の抑制. 細胞内 ROS は H2DCF-DA の蛍光強度で評価

発現変化を解析した結果, NAC<sup>+/+</sup>群のラット新生児は, 他の群のラットと比較して, p38 MAPK や Cx43 の発現が有意に減少していることが明らかとなった。

(4) NAC 投与妊娠ラットから出産した新生児の腹腔内に NAC を投与した群 (NAC<sup>+/+</sup>) のラット新生児の心筋細胞は, 他の群の新生児から単離した心筋細胞と比較して, 有意に多核細胞の割合が減少しており, 胎児-新生児遷移時における活性酸素種の除去によって, 心筋細胞の分裂能が上昇している可能性を明らかにできた。

(5) 新生ラットから単離した培養心筋細胞に対して, 酸化ストレスとして過酸化水素を添加すると, 心筋細胞における p38 MAPK の活性化および Cx43 発現が上昇した。一方, Cx43 siRNA 添加によって心筋細胞における Cx43 knockdown (Cx43 KD) を行うと, 心筋細胞内活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の生成が抑えられ, p38 MAPK 活性も抑制された。これらの実験結果は, 因果関係 (原因と結果) が逆転しており, 制御ループが閉じていることを示唆している。

(6) 以上, 研究期間内で得られた研究結果から, 胎児-新生児遷移に伴った酸化ストレスに起因する活性酸素種 → p38 MAPK → Cx43 発現シグナル伝達系が閉じた正の伝達系, すなわち正帰還制御ループ (positive - feedback regulation loop) を形成することが, 出生後における心筋細胞の終末分化に, 極めて重要な役割を果たしている可能性を明



かに出来た。

図4. 本研究から得られた研究成果のまとめ。酸化ストレスに起因する心筋細胞・遺伝子発現正帰還シグナル伝達系の模式図

#### 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 9 件)

- ① Okada, A., Mizutani Y., Agus S., Hosoi, H., Nakamura M., Sueoka K., Kawahara, K. and Okajima T. Direct observation of dynamic force propagation between focal adhesions of cells on microposts by atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*, 査読有, 99:263703, 2011.  
DOI: 10.1063/1.3672225
- ② Kunugi, S., Iwabuchi, S., Matsuyama, D., Okajima, T. and Kawahara, K. Negative-feedback regulation of ATP release: ATP release from cardiomyocytes is strictly regulated during ischemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 416:409-415, 2011.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.11.068
- ③ Miyaoka, A., Mizutani, Y., Tsuchiya, M., Kawahara, K. and Okajima, T. Rheological properties of growth-arrested fibroblast cells under serum starvation measured by atomic force microscope. *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有, 50:08LB16, 2011.  
DOI: 10.1143/JJAP.50.08LB16
- ④ Iwabuchi, S. and Kawahara, K. Inducible astrocytic glucose transporter-3 contributes to the enhanced storage of intracellular glycogen during reperfusion after ischemia. *Neurochemistry International*, 査読有, 59:319-325, 2011.  
DOI: 10.1016/j.neuint.2011.06.006
- ⑤ Matsuyama, D. and Kawahara, K. Oxidative

stress-induced formation of a positive-feedback loop for the sustained activation of p38 MAPK leading to the loss of cell division in cardiomyocytes soon after birth. *Basic Research in Cardiology*, 査読有, 106:815-828, 2011.

DOI: 10.1007/s00395-011-0178-8

- ⑥ Endo, H. and Kawahara, K. 10 Hz periodic component influences lower frequency component of the physiological tremor at low force levels. *European Journal of Applied Physiology*, 査読有, 111:2695-2705, 2011.  
DOI: 10.1007/s00421-011-1903-6
- ⑦ Iwabuchi, S. and Kawahara, K. Functional significance of the negative-feedback regulation of ATP release via pannexin-1 hemichannels under ischemic stress in astrocytes. *Neurochemistry International*, 査読有, 58:376-384, 2011.  
DOI: 10.1016/j.neuint.2010.12.013
- ⑧ Endo, H. and Kawahara, K. Gender differences in hand stability assessed in normal young people. *Ergonomics*, 査読有, 54(3):273-281, 2011.  
DOI: 10.1080/001401309.2010.547607
- ⑨ Endo, H. and Kawahara, K. Relationship between hand stability and the 10-Hz physiological tremor during various manual tasks. *Ergonomics*, 査読有, 53(4):491-501, 2010.  
DOI: 10.1080/00140130903556336

[学会発表] (計 3 件)

- ① 功刀聡彦, 岩淵禎弘, 松山大輔, 河原剛一, 虚血時における心筋細胞の ATP 放出制御とそのシグナル伝達機構に関する研究, ME とバイオサイバネティクス研究会, 2011 年 3 月, 東京, 玉川大学
- ② 渡辺知晴, 岩淵禎弘, 河原剛一, ケージドグルタミン酸への局所的な光照射を用いた *in vitro* 新規脳虚血モデルの開発, ME とバイオサイバネティクス研究会, 2010 年 6 月, 札幌, 北海道大学
- ② 五十嵐博之, 水谷祐輔, 岩淵禎弘, 松山大輔, 河原剛一, 成ラット単離心筋細胞の高頻度電気刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  および  $Mg^{2+}$  のダイナミクス, ME とバイオサイバネティクス研究会, 2010 年 3 月, 東京, 玉川大学

[図書] (計 1 件)

- ① Kawahara, K. and Matsuyama, D., Positive-feedback regulation loop for the loss of cell division and binucleation shortly after birth in cardiomyocytes. In: *Proceedings of*

the IFMBE 37, Jobbágy, Á. (Ed.),  
Springer-Verlag, Berlin, pp.423-426, 2011.

[その他]

ホームページ等

<http://cell-c.ist.hokudai.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河原 剛一 (KAWAHARA KOICHI)

北海道大学・名誉教授

研究者番号：20125397

### (2) 研究分担者

斉藤 直 (SAITOH TADASHI)

山形大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：20454770