

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560214

研究課題名(和文)心筋細胞分化制御メカニズムのフィジオーム解析

研究課題名(英文)Physiomic analysis of the regulatory mechanism of cardiomyocyte

研究代表者

毛利 聡 (Mohri, Satoshi)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00294413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞は細胞分裂によって組織修復できないため、再生医療による新規治療法開発の研究が進められている。本研究では胎児が低い酸素環境(～20mmHg)から出生後に高濃度酸素(～90mmHg)に移行することに着目して、胎児心筋が酸素分圧の変化によって細胞分裂を停止させるという仮説を検証した。マウス培養心筋細胞の分裂を可視化する方法を確立し、低濃度から高濃度酸素への暴露によって細胞分裂を確認した。また、マウス胎児培養心筋細胞における酸素環境による遺伝子発現変化をマイクロアレイにて検討した。変動の大きい遺伝子について遺伝子発現を抑制して細胞周期関連タンパクへの影響や培養細胞系での分裂抑制効果を検討した。

研究成果の概要(英文)：Cardiomyocytes are terminally differentiated cells that can not proliferate for repairing damaged tissues as with nerve cells. Regeneration medicine is a possible approach for these untreatable diseases, which is developing the techniques to create functional issues to repair the damaged organs. In this study, we focused on the changes in oxygen concentration during maternal period. In utero, partial oxygen pressure is about 20 mmHg and it increases to about 90 mmHg after birth because of the breathing activity. We tested the hypothesis that a dramatic increase in oxygen tension arrests the cell cycle of cardiomyocytes. First, we visualized the dividing cultured cardiomyocytes using medial engineering technology and confirmed that cardiomyocytes arrested cell cycle when exposed to high oxygen tension. Then, we investigated the alteration of gene expression in this change of oxygen tension and performed silencing these genes to confirm the involvement to regulate cell cycle.

研究分野：循環生理学

キーワード：心筋細胞 細胞分裂 酸素環境 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞は終末分化細胞と呼ばれ、神経細胞と同様に組織障害の際に細胞分裂によって修復することができない。このような組織の疾患に対して、様々な細胞への分化が可能な細胞を用いて治療に応用しようとする再生医療の研究が進められている。iPS 細胞はその細胞ソースとして、卵細胞から採取する ES 細胞に比べ倫理的問題や拒絶反応の回避が可能という点で注目を浴びているが、生体内で機能を発揮する細胞を作り上げる方法論が不明という点では ES 細胞と同様である。このような状況で、心筋細胞については細胞分裂再開による増殖を目指して遺伝子操作によるアプローチが盛んに行われている。しかしながら、生体内で活動する心筋細胞は圧力や剪断応力といった物理的刺激や酸素環境などの変化に適切に反応しており、関与する遺伝子と形質獲得のプロセスは明らかでない点が多い。従って、遺伝子発現を制御する因子として、生体酸素環境は重要な役割を果たしている可能性があり、生体工学的な方法論を駆使して分子・細胞から臓器・個体までを統合的に解析することは生体機能を理解し、再生医療に資する情報を得ることになり得る。

2. 研究の目的

成人の動脈血酸素分圧 (~90mmHg) に比べ、胎内での酸素環境は 20mmHg 程度と極めて低く保たれており、細胞分裂を繰り返す胎児形成期において酸化ストレスによる DNA 損傷を防いでいる。そのために酸素運搬を担う赤血球ヘモグロビンも成人に比べて格段に酸素親和度が高く、容易に末梢組織に酸素を供給しないシステムとなっている。出生後には肺呼吸が始まりヘモグロビンも成人型に変換され、末梢組織への大量酸素供給が開始される。この劇的な酸素環境変化が、出生前の細胞数増加を優先した器官形成期から、出生後の自立生存のための発育期に転換するためのシグナルとして作用していると考えている。本研究では対象を心筋細胞に絞り、酸素供給環境変化による分裂能と肥大(分化)応答の分子メカニズムを明らかにする。具体的な目的を以下に挙げる。

(1) マウス培養心筋細胞を用いた細胞分裂可視化システムの構築：細胞分裂を対照とする研究では、細胞周期を制御するタンパク質の発現をもって対象細胞が分裂能を有するか否かを判断する場合が多い。しかしながら、細胞分裂には核分裂、細胞質分裂といった過程があり、実際に細胞分裂の様子を観察した報告は無いため、細胞採取時より厳密な酸素分圧制御を行い、タイムラプスによる観察法を確立する。

(2) 胎児心筋細胞の高濃度酸素暴露による遺伝子発現変化の解析：培養細胞系および生体

における細胞周期制御が、酸素分圧上昇によって受ける影響について遺伝子レベルでの解析を行う。

3. 研究の方法

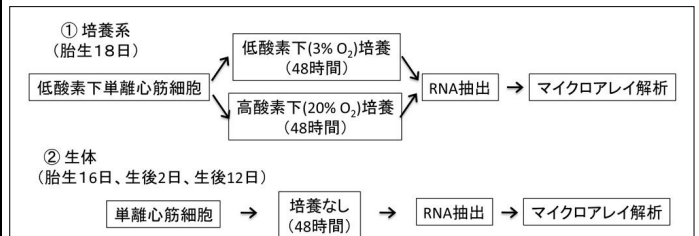
(1) マウス培養心筋細胞を用いた細胞分裂可視化システムの構築

マウス胎児(妊娠 14-18 日)心筋は切断した心室をトリプシン溶液にて単離するが、溶液は 3%酸素でパプリングして行う。細胞を単離した溶液には血管平滑筋、血管内皮、線維芽細胞が含まれるため、 α -アクチニン陽性細胞をフリーサイトメトリーにて分離して 90%以上の純度で心筋細胞を選別した。この細胞を 3%酸素環境下で培養し、タイムラプス観察を行った。

(2) 胎児心筋細胞の高濃度酸素暴露による遺伝子発現変化の解析

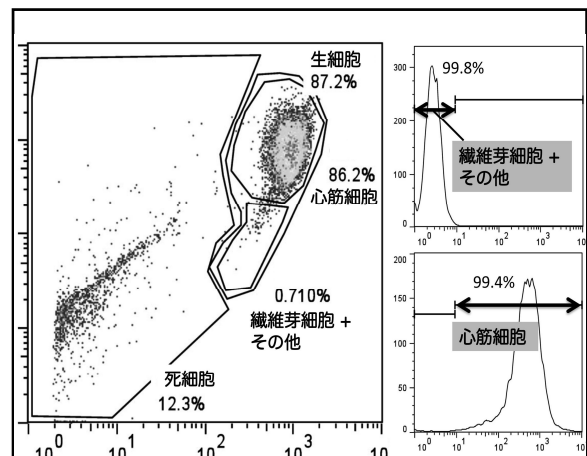
上記方法にて胎生 18 日の胎児マウス心筋細胞を収集し、3%および 20%酸素下で 48 時間培養する。その後 RNA を抽出し、PCR マイクロアレイ解析にて酸素分圧の違いで変化する遺伝子を検索する。また、出生時の血圧、剪断応力や栄養状態などの環境因子変化を含む生体内での遺伝子発現についても検討するために、胎生 16 日(低酸素環境)、生後 2 日(肺呼吸開始)、生後 12 日マウス(ヘモグロビン変換後、高濃度酸素)から心臓を摘出し、心筋細胞から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行う。(下図参照)

これらの結果より候補となった遺伝子を抑制して細胞周期タンパク発現や細胞分裂の増減を検討した。

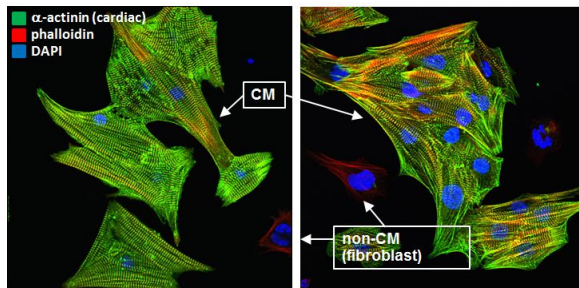


4. 研究成果

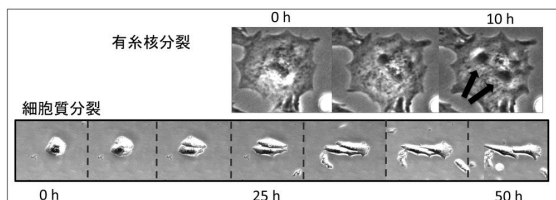
(1) フローサイトメトリーにて下図のように 90%以上の純度で心筋細胞を選別すること



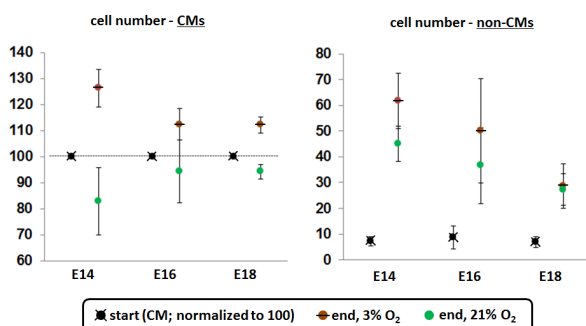
が出来た。この細胞を培養し、心筋細胞分裂観察に使用した。(下図は心筋細胞特異的タンパクである -アクチニン：緑、アクチンを染色するファロイジン：赤、核を染色する DAPI：青による免疫染色画像)



2) 低酸素下培養心筋細胞において有糸核分裂や細胞質分裂をタイムラプス顕微鏡にて観察することが出来た(下図参照：上段は有糸核分裂、下段は細胞質分裂)。心筋細胞の分裂機構を解明して再生医療に応用を試みる研究は多くなされているが、実際の分裂を観察した報告は殆ど無く、1970年代に静止写真での観察が報告されているのみで、抗体作成など分子生物学的手法が未確立で本当に心筋細胞なのかも確かではなかった。低酸素環境維持など、摘出マウス心臓の処理方法を工夫することで新たな可視化技術を確立出来た。



3) 酸素分圧上昇によって細胞分裂停止が起こるといふ仮説を検証するために、胎生 14、16、18 日のマウス胎児心筋を低酸素環境下に摘出し、心筋細胞および非心筋細胞(線維芽細胞、血管内皮細胞など)を分離・培養したのちに、それぞれを 3% および 20%酸素環境に 96 時間培養した。細胞数を数えて分裂能を評価した。(下図参照 CMs：心筋細胞、non-CMs：非心筋細胞、黒は酸素分圧変化前、茶は 3%酸素維持、緑は 20%酸素に上昇)



心筋細胞では胎生日数が早いほど 3%酸素下 96 時間培養後の細胞数が多く、高い分裂能が示された。また、21%酸素下培養では、細胞数の減少が観察された。この結果より、胎児心筋細胞は母胎内での低酸素環境によって細胞分裂能を維持し、出生に伴う高濃度酸素暴露によって分裂から分化(肥大)へと向かうことが示唆された。

非心筋細胞については、低濃度酸素、高濃度酸素下培養の両方で細胞数が著明に増加した。心臓は多種の細胞からなるが、出生時に酸素濃度変化によって細胞分裂を停止させるのは心筋細胞のみであると考えられる。細胞分裂活性を評価する他の指標として Ki-67 にて染色し、低酸素環境下培養の心筋細胞が高濃度酸素の細胞よりも高率に陽性であることを確認した。

4) 酸素濃度変化に伴う遺伝子発現変化をマイクロアレイで検討した。上述の培養心筋細胞での実験と伴に、出生前後での生体内変化を評価するために、胎生 16 日マウスと出生後 2-3 日の新生児マウスで比較を行った。予備実験として、出生後の仔ラットを母親ラットと一緒に低酸素環境(12% O₂, これ以上上げると授乳せず仔ラットが死亡する)で飼育すると、仔ラットの心筋細胞の大きさは変わらずに心筋量は 2 倍近くに増加していたため、生体内でも培養系と同様の変化を予想した。下に、胎児と新生児の比較、低濃度酸素と高濃度酸素の比較を示す。それぞれ発現の増加した遺伝子、低下した遺伝子の上位 10 遺伝子系統について記載している。

i) 胎児 新生児

up (>2.0)

- 1 Fatty_acid_metabolism
- 2 Tryptophan_metabolism
- 3 Fatty_Acid_Beta_Oxidation
- 4 Triacylglyceride_Synthesis
- 5 Fatty_Acid_Beta_Oxidation
- 6 Bile_acid_biosynthesis
- 7 Mitochondrial_LC-Fatty_Acid_Beta-Oxidation
- 8 Butanoate_metabolism
- 9 Complement_and_Coagulation_Cascades
- 10 gamma_Hexachlorocyclohexane_degradation

down (<0.5)

- 1 Cell_cycle
- 2 DNA_Replication
- 3 G1_to_S_cell_cycle_control
- 4 Glycolysis_and_Gluconeogenesis
- 5 One_Carbon_Metabolism
- 6 Nucleotide_Metabolism
- 7 Starch_and_sucrose_metabolism
- 8 Pentose_phosphate_pathway
- 9 Glycolysis_Gluconeogenesis
- 10 One_carbon_pool_by_folate

ii) 3% 酸素 20% 酸素 (培養心筋細胞)

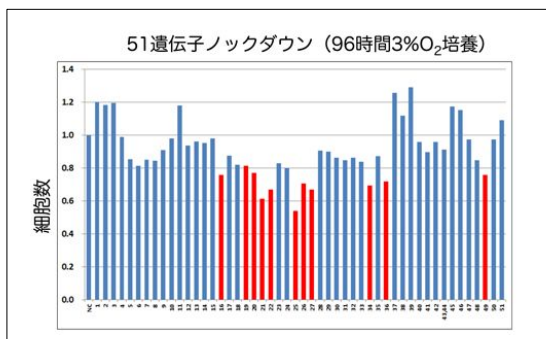
up (>1.5)	
1	Kit_Receptor_Signaling_Pathway
2	Myometrial_Relaxation_and_Contraction_Pathways
3	Apoptosis
4	Apoptosis_Mechanisms
5	Striated_Muscle_Contraction
6	T_Cell_Receptor_Signaling_Pathway
7	IL-5_Signaling_Pathway
8	Calcium_Regulation_in_the_Cardiac_Cell
9	Apoptosis_Modulation_by_HSP70
10	Oxidative_Damage

down (<0.67)	
1	DNA_Replication
2	Cell_cycle
3	Glycolysis_and_Gluconeogenesis
4	Glycolysis_Gluconeogenesis
5	Striated_Muscle_Contraction
6	G1_to_S_cell_cycle_control
7	Fructose_and_mannose_metabolism
8	Electron_Transport_Chain
9	Galactose_metabolism
10	Pentose_phosphate_pathway

上記の結果より、マイクロアレイの実験から酸素分圧上昇に伴う遺伝子発現変化が明らかになった。細胞周期関連遺伝子に加え、解糖系やペントースリン酸経路などのエネルギー代謝経路に関連する遺伝子も劇的に変化していた。また、個々の遺伝子についても検討し、変動が大きいもの、或いは細胞周期に関連のある 51 遺伝子を選んで培養心筋細胞にて siRNA によるノックダウンを行った。(下図参照) その結果、細胞数の減少が大きかった 11 遺伝子(赤色で表示)を選定し、細胞周期関連遺伝子の発現を変化させる 2 つの遺伝子に注目して解析を進めている。

周産期における酸素分圧変化が心筋細胞の分裂停止の情報として用いられていることが明らかになったが、酸素分圧をセンシングしている具体的な分子を明らかにする試みとして低酸素誘導因子(HIF1- α)、prolyl hydroxylase (PHD)3 についてもノックダウンを行ったが、細胞数の変化は小さく、センサー候補分子としては否定的な結果であった。

5) まとめ



本研究では、哺乳類の心筋細胞が生後すぐに分裂能を失う際の情報として酸素環境について着目し、培養心筋系での分裂可視化とともに、関連する遺伝子を絞り込むことが出来た。周産期は様々な生体内環境が劇的に変化するタイミングであり、酸素環境だけが要因ではないと考えられる。例えば血圧や心室からの血液拍出量など力学的な変化や、出生直後の飢餓状態によるオートファジーなども関与していることが予想される。本研究では生体における遺伝子変化と、培養細胞系における遺伝子変化を比較することで、酸素環境による変化を抽出することが出来た。

本研究での成果をもとに、出生時に心筋細胞が分裂能を失う分子メカニズムを明らかに出来れば、再生医療に資することが出来ると考えている。

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)

[学会発表](計 2件)

出生時の肺呼吸開始による酸素分圧上昇が心筋細胞の分裂停止に果たす役割の検討 橋本 謙、氏原嘉洋、毛利 聡 第66回日本生理学会中国四国地方会 2014年11月 情報通信交流館 e-とぴあ・かがわ 高松 香川

出生時の心筋タイチンのアイソフォームスイッチ機構の解析 橋本 謙、氏原嘉洋、毛利 聡 第92回日本生理学会大会 2015年4月 神戸コンベンションセンター 神戸 兵庫

6. 研究組織

(1)研究代表者

毛利 聡 (MOHRI Satoshi)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00294413

(2)研究分担者

橋本 謙 (HASHIMOTO Ken)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80341080

(3)研究分担者

氏原 嘉洋 (UJIHARA Yoshihiro)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80610021