

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02092

研究課題名(和文)新規遺伝子Fam64aを用いた心筋再生医療に向けた基礎的検討

研究課題名(英文)Preliminary study for cardiac regeneration using novel cell cycle promoter Fam64a

研究代表者

橋本 謙 (Hashimoto, Ken)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80341080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞は胎生期にのみ分裂能を有する為、成体では失われた心筋細胞を再生することが出来ない。我々は最近、心筋分裂には低酸素環境が必須であることを突き止め、低酸素下の胎生期心筋の分裂を促進する遺伝子Fam64aを同定した。Fam64aの発現が減少する出生後に心筋特異的に発現が増強する過剰発現マウスを作製したところ、期待通り成体期での心筋分裂能の亢進を認めたが、一方で加齢と共に心機能が悪化した。この機序を検討したところ、過剰蓄積したFam64aが概日リズム制御を介して心筋の電気活動を障害したことが示唆された。今後は、Fam64aの過剰蓄積を防止することで、心機能悪化を伴わない真の心筋再生を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成体期心筋細胞は分裂能を失っており、心不全等で失われた心筋を再生することは出来ない。iPS細胞から作られた心筋は現段階では未熟で、成体心筋の代替としては不十分である。これに対して近年、分裂が活発な胎生期の心筋環境を成体心筋で再現することで再生を目指す戦略が注目されている。本研究では、胎生期心筋の分裂を促進するFam64aを過剰発現するマウスを作製した。本マウスでは期待通り成体期心筋の分裂能の亢進を認めたが、一方で過剰蓄積したFam64aが律動的な心筋の電気活動を障害し、加齢と共に心機能が悪化した。今後はFam64aの発現を適切に制御することで過剰蓄積を防止し、心機能悪化を伴わない再生を目指す。

研究成果の概要(英文)：Fetal cardiomyocytes (CMs) actively proliferate to form the primitive heart, but they stop dividing shortly after birth. Therefore, CM regenerative potential upon injury is very limited in adult hearts. We have recently shown the importance of hypoxic in utero environments for active fetal CM proliferation, and identified Fam64a as a fetal-specific CM cell cycle promoter. Here we analyzed CM-specific Fam64a transgenic (TG) mice, which maintained Fam64a expression still after birth, when endogenous expression was rarely detectable. Although improved CM proliferation at neonatal and adult stages was observed in TG mice, they unexpectedly showed age-related cardiac dysfunction with poor survival. Mechanistically, excessive Fam64a in TG mice disrupted normal cardiac electrical activity through perturbing circadian rhythm regulation in CMs, resulting in cardiac dysfunction. It is necessary to prevent the accumulation of Fam64a for successful heart regeneration without cardiac dysfunction.

研究分野：心臓分子生理学

キーワード：心筋細胞 分裂・再生 Fam64a 酸素環境 概日リズム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の心筋細胞は胎生期には活発に分裂して原始心臓を形成するが、出生後には分裂を停止する。従って、成体では心筋梗塞や心不全等の虚血性心疾患等で失われた心筋細胞を再生することは出来ず、故に本疾患は致死的であり、早急な治療戦略の開発が求められている。近年、iPS 細胞等の未分化細胞から体外で心筋細胞を作製する研究が精力的に進められており、一定の成果を挙げているが、現時点で作製し得る iPS 由来の心筋細胞は胎児心筋程度の成熟度(分化度)であり、成体心筋の機能を補うには不十分である。一方、胎生期心筋が活発に分裂することを利用し、この胎内環境の実態を解き明かし、その一部を成体心筋に導入することで一時的に内在性の分裂再生能力を回復させようとする戦略が注目されている。我々は最近、成体期でも心筋の分裂・再生が可能な両生類との比較進化学的解析から、心筋分裂には低酸素環境が必須であり、哺乳類では胎生期の子宮内低酸素環境から、出生後の肺呼吸開始による酸素濃度の増加が心筋分裂を止めることを突き止めた (Hashimoto *Sci Rep* 2017)。更に、ゲノムワイドな網羅的スクリーニングにより、低酸素下の胎生期心筋において分裂を促進する最重要遺伝子として Fam64a を同定した。Fam64a はガン組織で発現レベルが高く、ガン細胞の分裂を促進することが報告されているが、心筋細胞における発現や機能については全く未知である。

## 2. 研究の目的

Fam64a は低酸素環境下の胎生期心筋細胞の核に強く発現して細胞周期を促進するが、出生後はその発現が激減する。本研究では、Fam64a の発現が減少する出生後に心筋特異的に発現が増強する過剰発現 (TG) マウスを作製し、成体期における心筋細胞周期の活性化、及び、分裂再生能の向上が見られるかどうかを詳細に検討した。また、胎生期心筋における Fam64a の役割について更なる検討を加える為、ゲノム編集技術を用い、Cre-loxP システムによる心筋特異的 Fam64a ノックアウト (KO) マウスの作製を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 心筋特異的 Fam64a 過剰発現 (TG) マウスの作製

心筋特異的 alpha myosin heavy chain プロモーターの下流にマウス Fam64a 遺伝子配列を繋いだコンストラクトをマウス受精卵にインジェクションすることにより TG マウスを得た。

### (2) TG マウスにおける細胞周期・分裂能の解析

TG マウスの新生児期 (生後 12-15 日目)、成体期 (6-7 週齢)、及び老齢期 (25 週齢以降) において、細胞周期関連遺伝子の発現解析 (定量 PCR)、及び、細胞分裂マーカー (Ki67: 細胞周期マーカー、pH3: 有糸分裂マーカー) の発現解析 (心臓組織切片を用いた免疫染色) を行い、野生型 (WT) マウスと比較した。

### (3) TG マウスにおける個体・臓器レベルの機能解析

TG マウスの新生児期、成体期、及び老齢期において、心臓組織染色 (HE 染色、マッソン・トリクローム染色)、臓器レベルの心機能・収縮率解析 (心エコー)、及び、個体の生存率解析 (Kaplan-Meier 解析) を行い、WT マウスと比較した。

### (4) TG マウスにおける細胞レベルの機能解析

TG マウスの種々の時期において、単離心筋細胞を用いた解析 (カルシウム transient 計測、収縮率測定) 及び、カルシウムハンドリングを初めとした心筋分化・成熟に関与する遺伝子の発現解析 (定量 PCR) を行い、WT マウスと比較した。

### (5) TG マウスにおける網羅的 transcriptome 解析

TG マウスと WT マウスの成体期心臓サンプルを用いた RNA seq 解析を行い、TG マウスにおける遺伝子発現パターンの変化、また、最も変動の大きかった遺伝子群、及び遺伝子パスウェイを同定した。

### (6) TG マウスにおける心臓リズム活動の解析

TG マウスの種々の時期において、概日リズム関連遺伝子の発現解析 (定量 PCR)、覚醒マウスを用いた埋め込み型テレメトリー解析 (心拍数、心電図の計測)、ギャップジャンクション遺伝子の発現解析 (定量 PCR)、及び、マウスの個体行動解析 (赤外線センサーによる非侵襲的行動解析) を行い、WT マウスと比較した。

### (7) 心筋特異的 Fam64a ノックアウト (KO) マウスの作製

CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術により、Fam64a 遺伝子の特異的エクソンの両端に loxP 配列をノックインしたマウス (Fam64a-flox マウス) を作製し、心筋特異的 Cre マウス (Nkx2.5-Cre; 胎生早期から活性が ON) との交配により心筋特異的 Fam64a KO マウスの作製を試みた。本マウスでは、胎生期の早い段階で Fam64a が活発に働いている時期に心筋特異的に Fam64a が KO される為、心筋の分裂障害や心臓発生異常が想定され、心臓の発生や心筋の分裂再生における Fam64a の機能を解析するのに理想的な動物モデルとなる。

#### 4. 研究成果

TG マウス作製の遺伝子コンストラクトをマウス受精卵ヘインジェクションすることにより、7 系統の founder マウスを得た。この中から、mRNA、及び蛋白レベルで Fam64a が十分に発現しており、且つ、発現した Fam64a が内在性 Fam64a と同様に心筋細胞の核に局在することを確認できた 2 系統を選別し、以降の実験に使用した。TG マウスでは、新生児期(生後 12-15 日目)、成体期(6-7 週齢)

及び老齢期(25 週齢以降)の全ての時期において細胞周期関連遺伝子の発現レベルが WT マウスより高く、細胞周期マーカー(Ki67, pH3)の陽性率も高かった(図 1)。即ち、TG マウスでは想定通り、出生後の心筋分裂能の亢進が認められた。

しかし一方、TG マウスでは加齢と共に心機能の悪化が認められ(組織染色における心内腔拡大、心エコー解析における左室拡大と収縮率低下; 図 2) 30 週齢以降は心不全に移行し、個体生存率は WT マウスと比較して著明に低下していた(図 3)。単離心筋細胞を用いた解析では、TG マウスにおいてカルシウム transient のピーク値の減少、及びピーク到達時間の遅延が認められ、カルシウムハンドリング機構の障害が示唆された。また、単離心筋細胞における収縮率も低下していた。遺伝子レベルでは、心肥大マーカー(ANP)の発現増加、及び、カルシウムハンドリングを初めとする心筋分化・成熟に必要な蛋白の発現低下(L 型 Ca チャンネル、リアジン受容体、筋小胞体 Ca-ATPase、甲状腺ホルモン受容体  $\alpha$ ) が認められた。以上より、心筋細胞レベルでのカルシウムハンドリング、及び収縮機構の障害が TG マウスにおける心機能低下や生存率低下に繋がっているものと考えられた。以上の結果は、既に分裂を停止し、収縮・弛緩という機械的仕事に特化した成体成熟心筋を強制的に再分裂させることが必ずしも心筋再生や心機能の維持・向上に寄与する訳ではなく、逆に心機能を悪化させ得ることを示しており、今後の再生戦略の構築において非常に重要な問題を提起していると言える。

そこで、TG マウスにおける心機能悪化の機序を詳細に明らかにする為、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq による網羅的 transcriptome 解析を行ったところ、TG マウスにおいて最も変動した遺伝子パスウェイとして意外にも「概日リズム」が同定された。実際、TG マウスの心筋において詳細な解析を行ったところ、主要な概日リズム制御遺伝子(Cry1, Bmal1, Per2, Npas2)の発現が変動していた(図 4)。

覚醒マウスを用いた埋め込み型テレメトリー実験では、TG マウスにおいて昼夜の心拍変動リズムの異常、及び心拍低下が見られ、心室期外収縮が高頻度に認められた(図 5)。また、不整脈の発生に密接に関連する心筋再分極過程を制御する多くの K チャンネル遺伝子の発現が一律に低下し、ギャップジャンクションの主要構成成分(コネクシン 43)の発現も低下していた。これらの結果は、TG マウスにおいて概日リズム制御機構に異常が発生し、心筋の律動的な電気活動が障害されている可能性を示唆している。更に、マウス個体の行動解析では、TG マウスにおいて昼夜の行動パターン(活動量)に異常が認められた。以上より、TG マウスでは過剰に発現・蓄積した Fam64a が概日リズム制御を

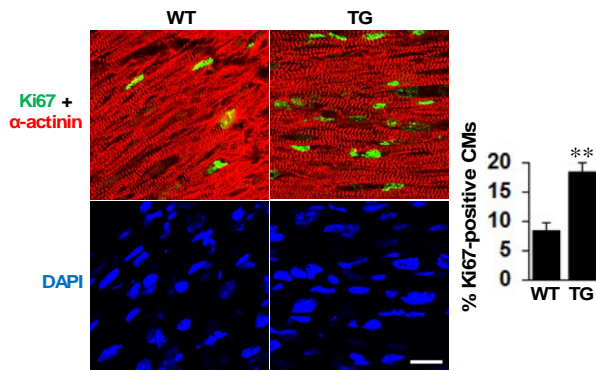


図 1 TG マウスにおける心筋分裂能の亢進  
( $\alpha$ -actinin: 心筋マーカー、DAPI: 核、Ki67: 細胞分裂マーカー、CM: 心筋細胞)

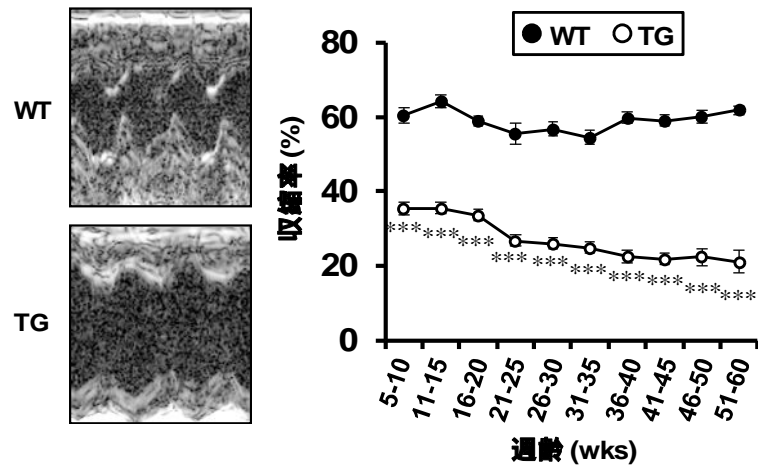


図 2 TG マウスにおける心機能悪化(心エコー)

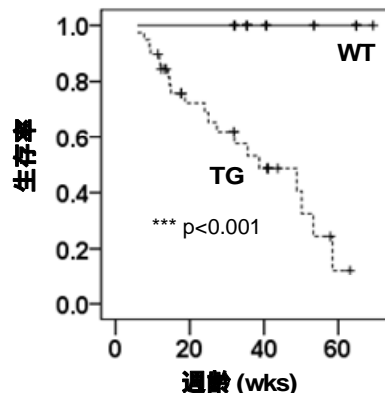


図 3 TG マウスにおける生存率低下 (Kaplan-Meier 解析)

介した何らかの機序で律動的な心筋の電気活動を障害し、結果として心機能悪化をもたらしたと考えられた。

本来、胎生期心筋の分裂には、Fam64a の十分な発現、及び、細胞周期の特定時期（有糸分裂後期の直前）におけるユビキチンリガーゼ APC/C による Fam64a の分解の両方が必要、即ち、Fam64a の発現レベルが細胞周期に応じて周期的に増減することが必要である（Hashimoto *Sci Rep* 2017）。胎生期は Fam64a、APC/C 共に活性が高く、Fam64a の周期的増減が活発に起こっているが、出生後は Fam64a、APC/C 共に発現・活性が低下し、心筋分裂は停止する。今回、我々が作製した Fam64a TG マウスでは APC/C による分解系をコントロールしていない為、出生後の心筋において Fam64a が過剰に蓄積し、上記の概日リズムや心筋電気活動の障害を通して心機能を悪化させた可能性が考えられる。今後は、Fam64a だけ

だけでなく、APC/C を同時に活性化することで、Fam64a の過剰蓄積を防ぎ、心機能悪化を伴わない真の心筋分裂再生の実現に向けた新たな戦略の構築を進めていきたい。

最後に、心筋特異的 Fam64a KO マウス作製の進捗状況について述べる。CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術により、マウス Fam64a 遺伝子内における、エクソン 3 の上流、及び、エクソン 4 の下流の各イントロン配列内にガイド RNA を設定し、ノックイン用のドナー DNA としてホモロジーアーム（左:47p、右 49bp）を含む loxP 配列（34bp）を準備した。まず、この配列に対してエレクトロポレーション法にてマウス受精卵にゲノム編集を行い、正しくノックインされたマウスを選別した。交配によりこのホモノックインマウスを一定数得た。次に、これらから作製した受精卵を用い、この配列に対して同様のゲノム編集を行い、同様の選別・交配作業を経て、両方のホモノックインマウス（flox マウス）を得た。現在、flox マウスと Nkx2.5-Cre マウス（Jackson 研究所より購入）を交配しており、ヘテロ Nkx2.5-Cre/Fam64a-flox を得ることが出来た段階であり、想定通り、とで挟まれたゲノム領域（エクソン 3, 4）が欠損していることを確認した。今後はヘテロマウス同士の交配により、目的のホモノ Nkx2.5-Cre/Fam64a-flox マウスが得られる見通しである。本マウスでは、胎生期の早い段階で Fam64a が活発に働いている時期に心筋特異的に Fam64a が KO される為、心筋の分裂障害や心臓発生異常が想定され、心臓の発生や心筋の分裂再生における Fam64a の機能を解析するのに理想的な動物モデルとなる。

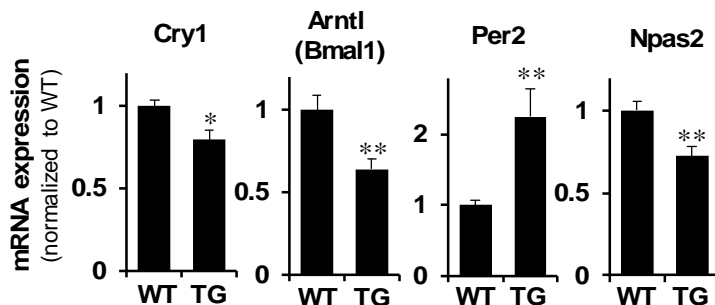


図4 TG マウスにおける概日リズム遺伝子の変動

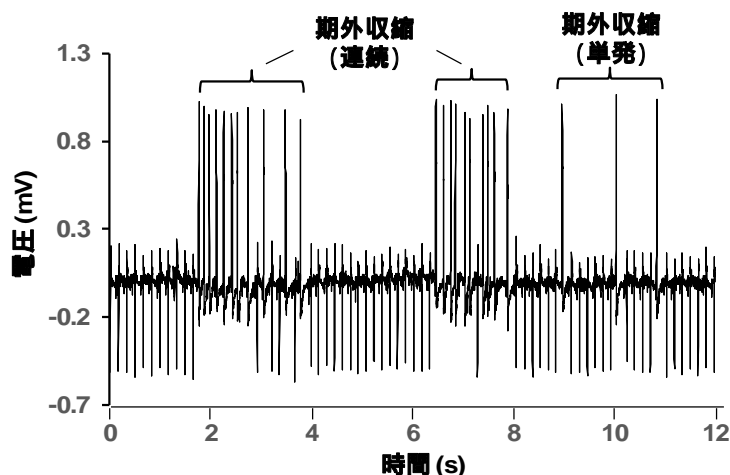


図5 TG マウスにおいて認められた心室性期外収縮

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hashimoto K, Kodama A, Sugino M, Yobimoto T, Honda T, Hanashima A, Ujihara Y, Mohri S.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Nuclear connectin novex-3 promotes proliferation of hypoxic foetal cardiomyocytes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-30886-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Honda T, Ujihara Y, Hanashima A, Hashimoto K, Tanemoto K, and Mohri S.	4. 巻 44(1)
2. 論文標題 Turtle spongious ventricles exhibit more compliant diastolic property and possess larger elastic regions of connectin in comparison to rat compact left ventricles.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kawasaki Medical Journal	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11482/KMJ-E44(1)1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto K, Kodama A, Honda T, Hanashima A, Ujihara Y, Murayama T, Nishimatsu SI, Mohri S.	4. 巻 7(1), 4486
2. 論文標題 Fam64a is a novel cell cycle promoter of hypoxic fetal cardiomyocytes in mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-04823-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hanashima A, Hashimoto K, Ujihara Y, Honda T, Yobimoto T, Kodama A, Mohri S.	4. 巻 596
2. 論文標題 Complete primary structure of the I-band region of connectin at which mechanical property is modulated in zebrafish heart and skeletal muscle.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 19-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2016.10.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ken Hashimoto
2. 発表標題 Nuclear connectin novex-3 is essential for proliferation of hypoxic fetal cardiomyocytes.
3. 学会等名 9th FAOPS Congress (Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken Hashimoto
2. 発表標題 Connectin novex-3 enhances cardiomyocyte proliferation in hypoxic fetal environment.
3. 学会等名 第57回日本生体医工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ken Hashimoto
2. 発表標題 Multi-scale regulatory mechanism of cardiomyocyte proliferation/regeneration based on low oxygen environments.
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本 謙, 児玉 彩, 呼元 知子, 本田 威, 花島 章, 氏原 嘉洋, 毛利 聡
2. 発表標題 コネクチンnovex-3アイソフォームはマウスにおいて胎児心筋細胞の分裂を促進する
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 毛利 聡, 花島 章, 氏原 嘉洋, 橋本 謙
2. 発表標題 脊椎動物の心臓進化：冠循環の血流特性と心臓メカニクスからの推測
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>川崎医科大学 教員情報  <a href="https://kweb-res.kawasaki-m.ac.jp/kwhp/KgApp?section=13&amp;kyoinId=ymdegoogy">https://kweb-res.kawasaki-m.ac.jp/kwhp/KgApp?section=13&amp;kyoinId=ymdegoogy</a>          日本生理学雑誌 2017年第79巻4号 表紙に当該研究内容が掲載された  <a href="http://physiology.jp/nisseishi/20326/">http://physiology.jp/nisseishi/20326/</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	毛利 聡  (Mohri Satoshi)  (00294413)	川崎医科大学・医学部・教授    (35303)	
研究分担者	花島 章  (Hanashima Akira)  (70572981)	川崎医科大学・医学部・講師    (35303)	
研究分担者	氏原 嘉洋  (Ujihara Yoshihiro)  (80610021)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授    (13903)	