

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05083

研究課題名(和文)低酸素シグナルによる心臓再生

研究課題名(英文) Hypoxia Signaling and Cardiac Regeneration

研究代表者

木村 航 (Wataru, Kimura)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：60452182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は心筋の細胞周期調節における低酸素シグナルの役割を明らかにすることを目的とし、第一に、哺乳類での出生後の心筋細胞の増殖能喪失におけるミトコンドリア代謝の役割について解析を行った。その結果、マウス培養心筋細胞に加えて新生児・成体心筋細胞、そしてヒトiPS細胞由来心筋細胞において、代謝制御因子の遺伝学的・薬理的阻害により心筋細胞増殖を誘導できることを示した。第二に、増殖能を保った心筋細胞での低酸素シグナルの機能について検討するため、コンディショナルノックアウト・ノックインマウスを使った解析を行い、成体での心筋細胞増殖において低酸素シグナルおよび酸化ストレス除去が重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、心筋細胞の細胞周期制御を担う新たな因子としてミトコンドリア代謝と低酸素シグナルが同定された。この成果は代謝と細胞周期とをつなぐシグナル伝達経路の一端を明らかにしたことに加えて、心筋細胞増殖を介した心筋再生達成のための基礎となる知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to characterize the role of hypoxia signaling in cardiomyocyte cell cycle regulation. Firstly, we found that mitochondrial metabolism plays critical roles in cardiomyocyte cell cycle arrest in the postnatal heart. Secondly, in order to determine the roles of hypoxia signaling in proliferative cardiomyocytes in the adult heart, we utilized conditional knock-in and knock-out mouse model and found that hypoxia inducible factor 1 alpha (hif1a) and amelioration of oxidative stress are both critical for maintenance of cardiomyocyte turnover in the adult heart. Our research provides a unique insight into mechanisms underlying cardiomyocyte cell cycle, and may pave the way to induce cardiomyocyte proliferation in the human infarcted heart.

研究分野：再生生物学

キーワード：心筋細胞 細胞周期 低酸素シグナル ミトコンドリア 酸化ストレス 心筋梗塞 心不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心疾患は全世界での死因の第一位を⁽¹⁾、日本では第二位を占めており⁽²⁾、心臓再生法の開発はきわめて重要な研究課題である。哺乳類の成体では大部分の心筋細胞が増殖能を持たず、我々には心臓再生能がない^(3,4)。一方ゼブラフィッシュやイモリ、哺乳類の胎児および出生直後の新生児では、多くの心筋細胞が細胞周期に入る能力があり、彼らには心臓再生能がある^(5,6)。したがって、脊椎動物では心筋細胞が細胞周期に入る能力と心臓再生能とは完全に対応しており、心筋細胞の細胞周期を制御する機構を理解することは、心臓再生法の開発に大きく資すると考えられる。しかし現在に至るまで、成体の心筋細胞の細胞周期を再び活性化できる分子機構に関する知見は断片的なものにとどまり、成体の心臓を再生させる方法は未だ発見されていない。

これまでに、マウス胎児期の心筋細胞の増殖およびゼブラフィッシュの心臓再生において低酸素応答因子 Hif1 (Hypoxia inducible factor 1 alpha) を介した低酸素シグナルが重要な役割を果たすことが報告されている。そこで我々は低酸素シグナルを介した低酸素代謝は心筋細胞の増殖能を維持する上で必須であると考え、新生児期の再生能をもつ心臓では、増殖可能な心筋細胞は酸素代謝を低く保っていることを示した⁽⁹⁾。次に、成体にわずかに存在する増殖能を保った心筋細胞は低酸素シグナルを活性化しており、Hif1 依存的に Cre を発現するトランスジェニックマウス (以下 ODD Tg マウスと呼ぶ) により特異的に標識できることを示した⁽¹⁰⁾。さらに、成体のマウスを長期間酸素分圧 7% の環境に置くことで、心筋梗塞後に心筋細胞増殖による心機能回復を誘導することに成功した⁽¹¹⁾。一方、成体の心筋細胞での低酸素シグナルの機能はまだ十分理解されていない。そこで低酸素シグナルの心筋細胞周期制御における機能を明らかにすることで、低酸素シグナルを利用した新しい心臓再生法の開発が可能になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本プロジェクトは心筋の細胞周期調節における低酸素シグナルの役割を明らかにすることを目的とし、第一に、哺乳類での出生後の心筋細胞の増殖能喪失におけるミトコンドリア代謝の役割を明らかにする。第二に、増殖能を保った心筋細胞での低酸素シグナルの役割について検討する。第一の目的では、既知のミトコンドリア代謝制御因子に対する阻害によって心筋細胞の細胞周期制御に変化が見られるか検討し、つづいて成体においてその因子が心筋細胞の細胞周期停止維持に必要であるか検討する。第二の目的では、低酸素シグナルのマスター制御因子である Hif1 を、成体において増殖能を保った心筋細胞特異的にノックアウトもしくは強制発現する。それにより酸素代謝と酸化ストレス、心筋ターンオーバーレートに与える影響について検討する。並行して同様のマウスを用い、加齢に伴う酸化ストレスの蓄積と心筋ターンオーバーレート変化、およびそれらに対する低酸素シグナルの機能を検討する。

3. 研究の方法

新生児マウスに対して酸素代謝関連経路の阻害剤を投与し、心筋細胞増殖について検討する。さらに培養心筋細胞および成体マウスに対する阻害剤投与実験を行い、心筋細胞増殖について検討する。また Hif1 の flox アリルをもつマウスを入手し、ODD Tg マウスと交配することで成体において増殖能を維持した心筋細胞特異的に Hif1 をノックアウトし、心筋細胞ターンオーバーについて検討する。また新生児期には酸素代謝活性化による酸化ストレスを介して心筋細胞増殖停止が起こることをふまえ、成体での心筋細胞の細胞周期制御における酸素代謝の影響について検討するため各種月齢での心筋ターンオーバーレートと酸化ストレスとの相関について検討する。

4. 研究成果

(1) 新生児マウスに対する各種阻害剤投与実験を行った結果、ミトコンドリア代謝制御因子 A の活性化により出生後の心筋細胞増殖期間が延長されることを見出した。さらにマウス新生児から単離した一次培養心筋細胞、そしてヒト iPS 細胞由来の心筋細胞に対しても、同様に因子 A の活性化により心筋細胞増殖が促進されることを明らかにした。さらに因子 A の活性化型フォームの AAV を用いた強制発現により、新生児の心筋細胞において細胞分裂が活性化されることを見出した。加えて、成体マウスでの因子 A 活性化とマイルドな低酸素処理 (10% O₂, 2 週間) を同時に行うことにより、心筋細胞の細胞周期エントリーが促進されることを見出した。

(2) 成体マウスにおいて増殖能を保った心筋細胞特異的に Hif1 をノックアウトすることにより、心筋細胞ターンオーバーが抑制されることを見出した。これにより、成体における心筋細胞ターンオーバー維持において Hif1 を介した低酸素シグナルが必須の役割を果たしていることを見出した。現在、増殖能を維持した心筋細胞において特異的に低酸素シグナルを活性化することを、Hif1 タンパク分解を担うプロリルヒドロキシラーゼ PHD の心筋特異的ノックアウトマウスを作成中であり、心筋ターンオーバーにおける低酸素シグナルの機能をより詳細に解析していく予定である。

(3) ODD Tg マウスにおいて加齢にしたがって心筋ターンオーバーレートが低下していくことを見出した。また同様に加齢にしたがってターンオーバーに寄与する心筋細胞において酸化ストレスが蓄積していくことも明らかになった。このことから、加齢による酸化ストレスの蓄積が加齢性の心機能低下を誘導している可能性が示唆された。今後の解析を通じて、酸素代謝、酸化ス

トレスが心筋細胞の細胞周期に与える影響についてより包括的な解析が行われる予定である。

以上の研究により、心筋細胞の細胞周期制御における低酸素シグナルとミトコンドリア代謝の役割が示され、脊椎動物における代謝制御と再生能とのトレードオフ関係を支える分子機構の一端を明らかにすることができた。

引用文献

- (1) Heron, National Vital Statistics Reports 65 (2016)
- (2) 厚生労働省, 人口動態統計の概況
- (3) Bergmann *et al.*, **Cell** 18, 1566-1575 (2015)
- (4) Senyo *et al.*, **Nature** 493, 433-436 (2013)
- (5) Poss *et al.*, **Science** 298, 2188-2190 (2002)
- (6) Porrello *et al.*, **Science** 331, 1078-1080 (2011)
- (7) Compernelle *et al.*, **Cardiovasc. Res.** 60, 569-579 (2003)
- (8) Jopling *et al.*, **Circulation** 126, 3017-3027 (2012)
- (9) Puente and Kimura *et al.*, **Cell** 157, 565-579 (2014)
- (10) Kimura *et al.*, **Nature** 523, 226-230 (2015)
- (11) Nakada *et al.*, **Nature** 541, 222-227 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakaguchi Akane, Nishiyama Chihiro, Kimura Wataru	4. 巻 1867
2. 論文標題 Cardiac regeneration as an environmental adaptation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 118623 ~ 118623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2019.118623	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 木村航	4. 巻 90
2. 論文標題 酸素代謝による心筋細胞の細胞周期制御と心臓再生	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 385-387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900385	査読の有無 無
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 坂口あかね、木村航	4. 巻 50
2. 論文標題 心筋細胞増殖制御機構の解明	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 心臓	6. 最初と最後の頁 1276-1282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kimura, W., Nakada, Y. and Sadek, H. A	4. 巻 123
2. 論文標題 Hypoxia Induced Myocardial Regeneration	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Appl. Physiol	6. 最初と最後の頁 1676-1681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1152/jappphysiol.00328.2017	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 該当する

1. 著者名 中田祐二, 木村航, Hesham A. Sadek	4. 巻 35
2. 論文標題 低酸素環境による成体マウスでの心臓再生	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 981-983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 木村航	4. 巻 68
2. 論文標題 酸素代謝による心筋細胞の増殖制御	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 548-553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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22件 (うち招待講演 14件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 木村航
2. 発表標題 環境適応と心臓再生能
3. 学会等名 第17回幹細胞シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村航
2. 発表標題 Heart Regeneration
3. 学会等名 ASUKA Symposium2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村航
2. 発表標題 酸素代謝による心筋細胞の細胞周期制御
3. 学会等名 第55回日本小児循環器学会 総会・学術集会(ポスター発表)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村航
2. 発表標題 環境ストレスと心筋ターンオーバー
3. 学会等名 第28回日本Cell Death学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村航
2. 発表標題 酸化ストレス応答と心筋再生
3. 学会等名 第17回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村航
2. 発表標題 Environmental Stress and Myocardial Regeneration
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村航
2. 発表標題 Oxidative Metabolism and Cardiomyocyte Cell Cycle Regulation
3. 学会等名 The 50th NIPS International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村航
2. 発表標題 Oxidative Metabolism and Myocardial Homeostasis
3. 学会等名 CVMW2019心血管代謝週間 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村航
2. 発表標題 哺乳類の環境適応と心筋再生能
3. 学会等名 兵庫県立こども病院理化学研究所 生命機能科学研究センター (BDR) 第 4 回ジョイントシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村航
2. 発表標題 環境応答と心筋再生
3. 学会等名 第2回信州大-理研BDR合同セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 航
2. 発表標題 Hypoxia and Cardiac Regeneration
3. 学会等名 Weinstein 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 航
2. 発表標題 Hypoxia-Induced Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Regeneration
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 航
2. 発表標題 Myocardial Regeneration by Engineering Mitochondrial Turnover
3. 学会等名 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 航
2. 発表標題 DNA 損傷応答と心臓再生
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 航
2. 発表標題 酸化的代謝と心筋再生
3. 学会等名 第9回山口県循環器病セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 航
2. 発表標題 DNA損傷応答による心筋細胞周期制御と心臓再生能
3. 学会等名 千里ライフサイエンスセミナーM1 老化メカニズムと疾患制御（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 航
2. 発表標題 酸化ストレス応答と心筋再生
3. 学会等名 大阪大学循環器内科セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 航
2. 発表標題 環境応答と心臓再生能
3. 学会等名 新潟分子心血管セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 航
2. 発表標題 酸化ストレス応答と心筋恒常性維持機構
3. 学会等名 公開シンポジウム「生物は加齢とともにどのように変化するのか：最先端研究から見えてきたもの」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wataru Kimura
2. 発表標題 Oxygen Metabolism and Myocardial Regeneration
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村航
2. 発表標題 酸化的代謝と心筋再生
3. 学会等名 基礎と臨床から循環器疾患を考える会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wataru Kimura
2. 発表標題 Hypoxa-Induced Myocardial Recovery
3. 学会等名 The 1st JCS Council Forum on Basic Cardiovascular Research（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 木村 航 他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 420
3. 書名 再生医療の開発戦略と最新研究事例集	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----