

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09573

研究課題名(和文) 心筋細胞の最終分化における核内受容体の役割 - 心筋再生医療を目指した基盤研究 -

研究課題名(英文) A Transient Up-regulation of Retinoic Acid Signaling Induces Cell Cycle Arrest in Neonatal Mammalian Heart

研究代表者

海野 一雅 (Unno, Kazumasa)

名古屋大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：40709119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の心筋細胞は生後早い時期に分裂能を失うと報告されているがそのメカニズムは明らかでない。研究代表者らは核内受容体に注目しマウス心筋細胞による網羅的遺伝子発現解析の結果、核内受容体の一つであるレチノイン酸受容体とその関連遺伝子が心筋細胞分裂能喪失に関与していることを見出した。

レチノイン酸合成の律速段階酵素であるAldh1a2は生後6日をピークに一過性の発現上昇を示し、これは低酸素誘導因子であるHif1aの制御を受けていることが示されたことから、生後の高酸素環境がトリガーとなりHif1aを介するレチノイン酸受容体シグナルの活性化が心筋細胞の分裂を停止させるメカニズムであると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを含む哺乳類の心筋細胞は分裂能が無く、心筋梗塞などで一旦その数が減ると再生されないと考えられてきた。しかし、最近の報告によると哺乳類の心筋細胞もその数は限られているが分裂能を有していることが明らかになってきた。この心筋細胞の分裂効率を上昇させることができれば残存心筋から心機能を回復するだけの心筋細胞を再生させることができるかもしれない。

研究代表者らの今回の研究は、心筋細胞の分裂能喪失という新生児期に起こる現象のメカニズムを検討することで、将来的に残存心筋の分裂能を再開させ心筋再生を治療応用できるレベルまで高めることを実現する端緒となる基礎研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Several lines of evidence suggest that mammalian cardiomyocytes lose their ability of cell division during neonatal period, however, the underlying mechanism is remained yet to be elucidated. We hypothesized that nuclear receptors play a role in the process of cell cycle arrest in neonatal cardiomyocyte. We found that all trans retinoic acid, a ligand of retinoic acid (RA) receptors, inhibits the cell cycle of cardiomyocyte. Moreover, Aldh1a2, a rate limiting enzyme of RA biosynthesis, is transiently upregulated peaking at postnatal day 6 in mouse heart. We also found that the gene expression of Aldh1a2 is under control of oxygen concentration through Hif1a, hypoxia inducible factor 1a. Accordingly, we conclude that increased tissue oxygen concentration degrades Hif1a which is negatively regulating the gene expression of Aldh1a2. Stimulated RA receptors, modulate cell cycle related gene expressions including Cyclin B1 or Cyclin D1, thereby inhibit cell cycle progression.

研究分野：循環器内科

キーワード：心筋細胞 細胞分裂 核内受容体 レチノイン酸 低酸素誘導因子 エピゲノム修飾

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

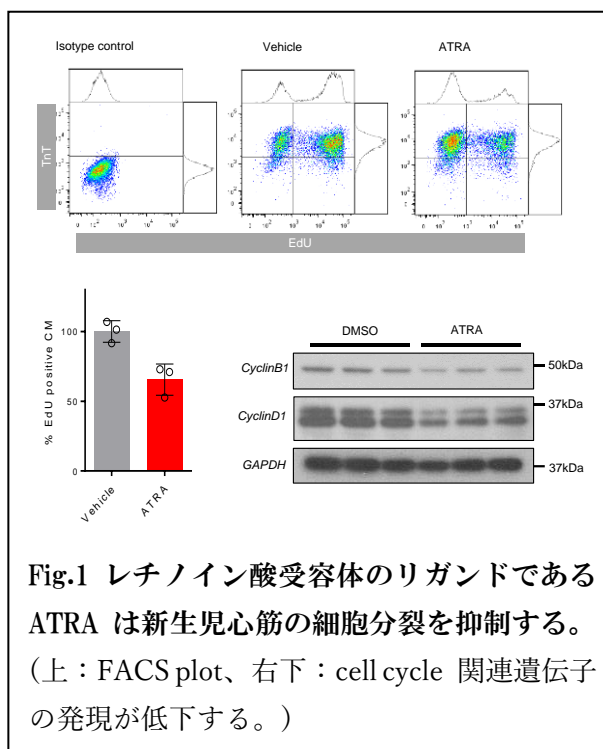
魚類や両生類の心筋細胞には分裂能が保存されており、既存の心筋細胞が傷害されても再生され心機能が復元されることが示されている。それに比べ、哺乳類の心筋細胞は最終分化した細胞で、分裂せず、したがって再生能を持たないと考えられてきた。しかし、最近になって幾つかの動物実験や ^{14}C birth-dating 法を用いたヒトでの検討により、哺乳類の心筋細胞も分裂・再生能を有していることが示されるようになったが、その分裂頻度は年率 0.5% 以下と非常に低く、心機能を回復させるには遠く及ばない。現時点で有力と考えられている心筋再生療法は、体性幹細胞を移植する方法や、iPS を心筋細胞に分化誘導しそれを心臓に移植するなどの方法が考えられているが、安全性や費用面など今後克服すべき課題も含んでいる。それに比べ魚類や両生類の様に心筋細胞の分裂能を賦活できればより効率的で生理的な再生医療が実現できると思われる。このような再生療法の実現にはさらなる心筋細胞の基礎実験が必要である。

2. 研究の目的

哺乳類成体心筋細胞の多くは分裂能を喪失している。この細胞分裂能を喪失する時期は出生後の数日以内であることがマウスの実験で示されたが、その詳細なメカニズムは明らかでない。研究代表者らは、核内受容体の一つであるレチノイン酸とその下流のシグナルが、心筋細胞分裂能喪失のメカニズムに関連しているのではないかと仮説を立てた。実際に予備実験でレチノイン酸が細胞分裂停止能を持つことを *in-vitro* 実験で確認した。また、出生後の心臓においては、レチノイン酸合成酵素の産生が極端に上昇していることがわかった。核内受容体は、DNA の転写調節領域に結合して、遺伝子発現を制御していると考えられているが、最近の研究では、エピゲノム修飾を介して、細胞の運命を司っていることがわかってきた。そこで本研究は、心筋細胞がどのように分裂能を喪失するかメカニズムを、レチノイン酸を介する経路を中心に検討した。

3. 研究の方法

心筋細胞は生理条件下では生後 7 日で分裂能を失うことが報告されているので、胎児期



終盤から新生児期のマウスを用い、遺伝子発現解析や薬剤負荷試験、遺伝子改変マウスを用いて心筋細胞の分裂能喪失に関係する分子メカニズムを明らかにした。*In-vitro* 実験では、生後 1 日以内に採取したラット心筋細胞を用い、低酸素環境や薬剤添加により心筋細胞分裂速度や遺伝子発現レベルがどのように変化するかを評価した。

4. 研究成果

マウス心筋細胞が分裂能を喪失する変化は生後 7 日間で起こることがわかっているため、生後心筋細胞を経時的に採取し、adult マウス心筋細胞と比べ遺伝子発現がどのように変化しているか検討した。今回の研究ではヒトに 48 種類あることがわかっている核内受容体遺伝子の発現を PCR 法で網羅的に検討した。その結果、レチノイン酸受容体(RAR)が新生児期に多く発現していることがわかったため、RAR のリガンドであるレチノイン酸が心筋細胞分裂能を低下させる作用があるか *in-vitro* で検討した。その結果、レチノイン酸添加にて新生児心筋の分裂速度が低下することが示され (fig.1)、cell cycle を司る分子の発現も低下していた。

次世代シーケンサーのデータから、RAR 関連遺伝子発現の経時変化を検討した結果、レチノイン酸合成の律速段階酵素である *Aldh1a2* の発現が、生後 6 日をピークに一過性に上昇していることがわかった (fig.2)。さらに、*Aldh1a2* は低酸素環境下では発現上昇を示さないことから、心臓組織が生後高酸素環境下にさらされることがこの遺伝子の発現契機になっていると考えられた。*Aldh1a2* 遺伝子発現の調節領域には種を超えて *Hif1a* の結合配列が保存されていることから、*Hif1a* が *Aldh1a2* の発現を制御していると仮説し、*Hif1a* 遺伝子の knockdown 実験を行

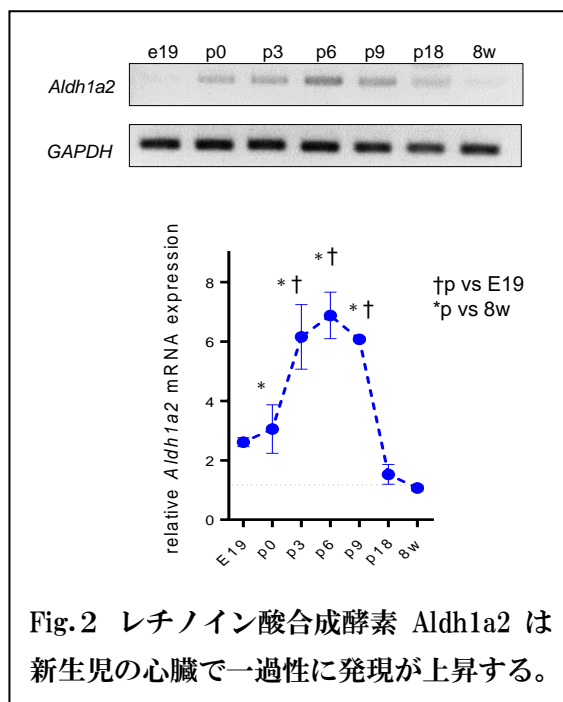


Fig.2 レチノイン酸合成酵素 Aldh1a2 は新生児の心臓で一過性に発現が上昇する。

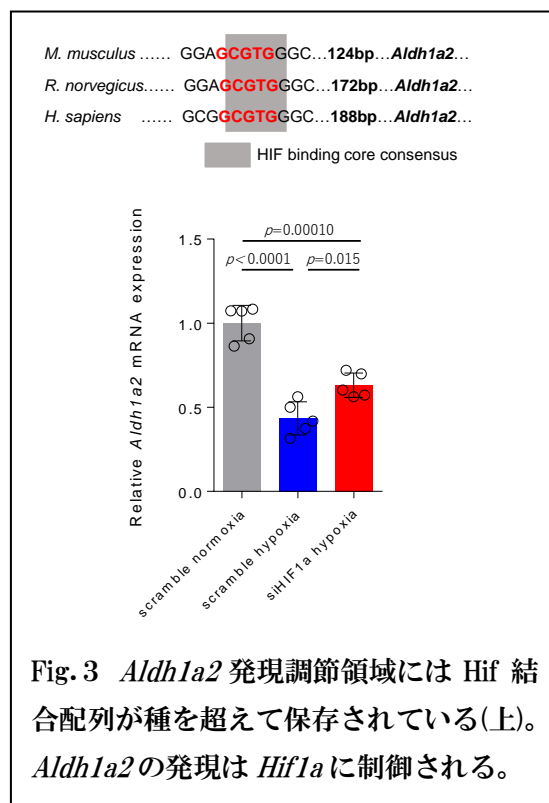


Fig.3 *Aldh1a2* 発現調節領域には Hif 結合配列が種を超えて保存されている(上)。*Aldh1a2* の発現は *Hif1a* に制御される。

い、 *Hif1a* が *Aldh1a2* の発現を negative に制御していることが示された (fig.3)。

次に、実際に RAR シグナルを抑えることにより心筋分裂能が生後 7 日以降も延長するかを検証するために、レチノイン酸 inverse agonist 投与下に、生後 7 日目に心尖部に cryoinjury モデルを作成し、心筋再生能を評価した。その結果、レチノイン酸シグナルを抑制することで、心筋分裂・再生能は生後 7 日を超えて延長することが示された (fig.4)。

さらに、 *Aldh1a2* の心筋特異的タモキシフェン誘導 knock out マウスを作成し、心筋の分裂能を生後 7 日の時点で評価した結果、野生型マウスにくらべ、knock out マウスで Ki67 陽性細胞が多く観察された (fig.5)。

以上の結果から、マウス心筋細胞では生後上昇する酸素分圧により *Hif1a* が分解され、二次的に *Aldh1a2* の遺伝子発現が亢進し、RAR シグナルが活性化されると考えられる。これにより、*Cyclin B1* や *Cyclin D1* などの cell cycle 関連遺伝子の発現が抑制されることで、細胞分裂が停止するものと考えられた。

結果のまとめ

- 核内受容体の一つである RAR を活性化すると、新生児マウス心筋細胞分裂が停止する。
- レチノイン酸合成律速段階酵素である *Aldh1a2* は生後一過性に発現上昇を示す。
- *Aldh1a2* の発現は酸素濃度と関係しており、低酸素環境下では発現上昇は見られない。
- 酸素分圧の上昇による *Aldh1a2* 発現は *Hif1a* が媒介していると考えられる。
- RAR シグナルを抑制することで、新生児期の細胞分裂能は 7 日を超えて延長する。

自己総括

当初予定した実験は概ね遂行できたと考えるが、予期せぬトラブルにより遺伝子改変マウスの準備が遅れたため、現在も追加実験を行っている。早期論文発表を目指したい。

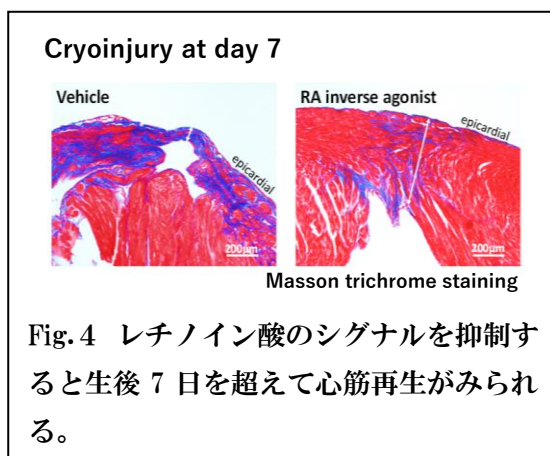


Fig.4 レチノイン酸のシグナルを抑制すると生後 7 日を超えて心筋再生がみられる。

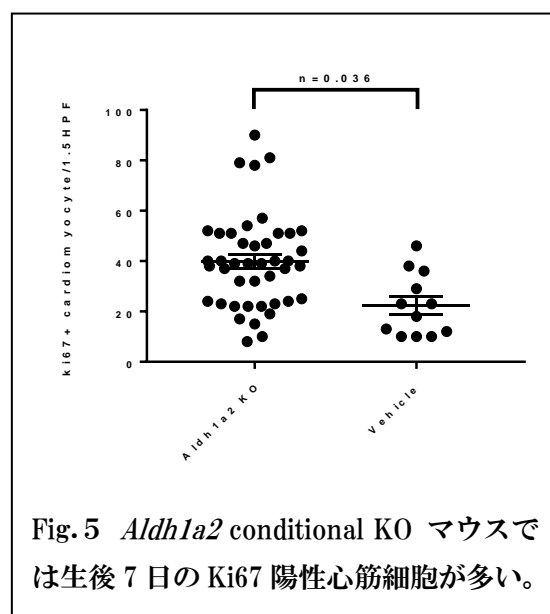


Fig.5 *Aldh1a2* conditional KO マウスでは生後 7 日の Ki67 陽性心筋細胞が多い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakaguchi Teruhiro, Takefuji Mikito, Wettschureck Nina, Hamaguchi Tomonari, Amano Mutsuki, Kato Katsuhiko, Tsuda Takuma, Eguchi Shunsuke, Ishihama Sohta, Mori Yu, Yura Yoshimitsu, Yoshida Tatsuya, Unno Kazumasa et al.	4. 巻 140
2. 論文標題 Protein Kinase N Promotes Stress-Induced Cardiac Dysfunction Through Phosphorylation of Myocardin-Related Transcription Factor A and Disruption of Its Interaction With Actin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 1737 ~ 1752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041019	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 Wang Hailong, Meng Xiangkun, Piao Limei, Inoue Aiko, Xu Wenhui, Yu Chenglin, Nakamura Kae, Hu Lina, Sasaki Takeshi, Wu Hongxian, Unno Kazumasa, Umegaki Hiroyuki, Murohara Toyoaki, Shi Guo Ping, Kuzuya Masafumi, Cheng Xian Wu	4. 巻 8
2. 論文標題 Cathepsin S Deficiency Mitigated Chronic Stress Related Neointimal Hyperplasia in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	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) 10.1161/JAHA.119.011994	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 該当する
1. 著者名 Unno Kazumasa, Oikonomopoulos Angelos, Fujikawa Yusuke, Okuno Yusuke, Narita Singo, Kato Tomohiro, Hayashida Ryo, Kondo Kazuhisa, Shibata Rei, Murohara Toyoaki, Yang Yanfei, Dangwal Seema, Sereti Konstantina-Ioanna, Yiling Qiu, Johnson Kory, Jha Alokumar, Sosnovik David E., Fann Yang, Liao Ronglih	4. 巻 133
2. 論文標題 Alteration in ventricular pressure stimulates cardiac repair and remodeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 174 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmcc.2019.06.006	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 Otaka Naoya, Shibata Rei, Ohashi Koji, Uemura Yusuke, Kambara Takahiro, Enomoto Takashi, Ogawa Hayato, Ito Masanori, Kawanishi Hiroshi, Maruyama Sonomi, Joki Yusuke, Fujikawa Yusuke, Narita Shingo, Unno Kazumasa, Kawamoto Yoshiyuki, Murate Takashi, Murohara Toyoaki, Ouchi Noriyuki	4. 巻 123
2. 論文標題 Myonectin Is an Exercise-Induced Myokine That Protects the Heart From Ischemia-Reperfusion Injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation Research	6. 最初と最後の頁 1326 ~ 1338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.118.313777	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 Mori, H. Isobe, S. Suzuki, S. Unno, K. Morimoto, R. Kano, N. Okumura, T. Yasuda, Y. Kato, K. Murohara, T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Prognostic value of left ventricular dyssynchrony evaluated by gated myocardial perfusion imaging in patients with chronic kidney disease and normal perfusion defect scores	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Nucl Cardiol	6. 最初と最後の頁 288-297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12350-017-0889-9	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 Hayashida Ryo, Kondo Kazuhisa, Morita Sumio, Unno Kazumasa, Shintani Satoshi, Shimizu Yuuki, Calvert John W., Shibata Rei, Murohara Toyoaki	4. 巻 81
2. 論文標題 Diallyl Trisulfide Augments Ischemia-Induced Angiogenesis via an Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Mechanism	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 870 ~ 878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-16-1097	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 Tsuda Takuma, Takefuji Mikito, Wettschureck Nina, Kotani Kazuhiko, Morimoto Ryota, Okumura Takahiro, Kaur Harmandeep, Eguchi Shunsuke, Sakaguchi Teruhiro, Ishihama Sohta, Kikuchi Ryosuke, Unno Kazumasa, Matsushita Kunihiro, Ishikawa Shizukiyo, Offermanns Stefan, Murohara Toyoaki	4. 巻 214
2. 論文標題 Corticotropin releasing hormone receptor 2 exacerbates chronic cardiac dysfunction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1877 ~ 1888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20161924	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 藤川 裕介、海野 一雅
2. 発表標題 A Transient Up-regulation of Aldh1a2/RARs/Wif-1 Axis Induces Cell-cycle Arrest in Neonatal Heart
3. 学会等名 第一回日本循環器学会基礎研究フォーラム (BCVR) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤川 裕介
2. 発表標題 A Transient Up-regulation of Retinoic Acid Signaling Induces Cell-cycle Arrest in Neonatal Mammalian Heart
3. 学会等名 アメリカ循環器学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----