

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09586

研究課題名(和文) ErbB受容体を介した成熟心筋細胞の増殖誘導

研究課題名(英文) Induction of proliferation of mature cardiac myocytes through ErbB receptor signalling pathway

研究代表者

平井 希俊 (HIRAI, Maretoshi)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：60422929

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)：複数あるErbB受容体のアイソフォームのなかで、心臓のホメオスタシスを保つのにErbB2およびErbB4が特に重要な機能を持つことが知られている。本研究では、心筋細胞でErbB2受容体もしくはErbB4受容体を過剰発現させることにより、心筋細胞が増殖しうるかどうかを検討し、将来の新規再生治療の可能性について探った。ErbB2受容体、ErbB4受容体、どちらも同じシグナル経路を活性化するにも関わらず、予想に反し、ErbB2受容体の過剰発現と、ErbB4受容体過剰発現では、まったく対照的な表現型を呈した。心筋細胞の増殖誘導には従来の概念とは異なるアプローチが必要なことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋細胞は生後細胞周期の休止期に入りその後増殖することはない。そのため心筋梗塞で心筋細胞が失われると心機能障害をきたし心不全を発症してしまう。本研究ではマウスで成長因子受容体シグナルを活性化することにより、成熟心筋細胞の増殖を誘導しうるかどうかを明らかにすることを目的とした。本研究の結果、心筋細胞で成長因子受容体を過剰発現させ、その細胞を1細胞レベルで直接可視化できるマウスの作製に成功した。今後、このマウスを用いて、成熟心筋細胞の増殖を誘導することが可能であれば、梗塞後心不全に対する新規治療の開発への展望が開けるだろう。

研究成果の概要(英文)：Among a couple of ErbB receptor families, ErbB2 and ErbB4 receptors play an important function to maintain homeostasis of the heart. In this project, we examined if overexpression of either ErbB2 or ErbB4 receptor could induce proliferation of cardiac myocytes, thus examined the possibility of future novel regenerative therapy for heart diseases. It is broadly considered that both ErbB2 and ErbB4 activate the same signaling pathway by configuring heterodimer or homodimer. However, the phenotype of ErbB2 overexpressed heart was shown to be in keen contrast to that of ErbB4 overexpressed heart. Thus, to regulate and induce proliferation of cardiac myocytes in adult, we need different approach from the idea people currently assume.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋細胞 増殖 ErbB受容体 細胞周期

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心筋細胞は生後すぐに細胞周期の休止期に入り、その後増殖することはないと長らく考えられてきた (Soonpa MH et al, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1996)。ところが、新生仔期マウスの心尖部切除モデルで心臓が再生しうること (Porrelo ER et al, *Science*, 2011)、マウスで生後2週間後に心筋細胞が一過性の強い増殖活性をもつことが報告され (Naqvi N et al, *Cell*, 2014)、心臓の再生医療は容易に実現可能かのように見えた。しかし、その後、生後心筋細胞はやはり急速に細胞周期の休止期に入り、その後ほとんど増殖することはないという報告が相次いだ (Alkass K et al, *Cell*, 2015, Soonpaa MH et al, *Cell* 2015, Hirai M et al, *Circ Res*, 2016)。問題は、成体の心臓は心筋細胞だけでなく内皮細胞、線維芽細胞、壁細胞といったさまざまな種類の細胞から構成されており、心筋細胞は全体の細胞の50%ほどしかなく、細胞周期活性の高い他の種類の細胞と複雑に入り混じっているため、心筋細胞特異的に細胞周期活性を調べるのは極めて困難なことである。申請者は心筋細胞特異的に細胞周期活性を可視化するマウスを作製し、心筋細胞の細胞周期活性は生後2週間以内に急速に不活化され、その後、再活性化されないことを示した (Hirai M et al, *Circ Res*, 2016)。

このように成熟心筋細胞の細胞周期活性が認められても非常に弱いため、一度傷害された心筋は再生されることがなく、何らかの介入が必要である。報告者は、細胞運命決定分子として知られる心臓特異的変異マウスの解析を通じて、チロシンキナーゼ受容体の ErbB 受容体が恒常的に活性化することにより、胎生期で心筋細胞の異常増殖をきたすことを見出した (Hirai M et al, *JCI*, 2016)。実際、ErbB 受容体の活性化 (Bersell K et al, *Cell*, 2009, D'Uva G et al, *Nature Cell Biology*, 2015) により成熟心筋細胞の細胞周期活性が活性化されることが報告されている。ところが、上述のように生後の心筋細胞の細胞周期活性を調べるのは非常に困難であり、これらの報告で心筋細胞特異的な細胞周期活性が適切に定量されているかどうか疑問である。また、ErbB 受容体のリガンドであるニューレグリン (Nrg1) をマウスに腹腔注射しても成熟心筋細胞の細胞周期活性は活性化されなかったという報告もある (Reuter S et al, *Plos One*, 2014)。つまり、ErbB 受容体活性化により成熟心筋細胞が増殖しうかどうか、いまだ結論は出ていない。

### 2. 研究の目的

本研究では ErbB 受容体を心筋細胞で過剰発現するマウスを作製し、ErbB による成熟心筋細胞の増殖活性の制御のメカニズムを明らかにすることを目的とする。報告者の心筋細胞特異的に細胞周期活性を可視化した手法をベースに、1) ErbB 受容体の活性化により成熟心筋細胞の増殖を実際に誘導できるのかどうか、2) 下流のどのような分子が活性化されることにより増殖が誘導されるのか、を明らかにすることを目標にした。

### 3. 研究の方法

心臓には ErbB 受容体ファミリーのうち ErbB2 と ErbB4 が発現している。ErbB2 はそれ自身だけではリガンドと結合できず、通常 ErbB4 とヘテロダイマーを形成することにより、Nrg1 と結合して活性化される。そこで、心筋細胞特異的に ErbB2 もしくは ErbB4 を強発現するマウスを作製する。Rosa 遺伝子座に、CAG プロモーター、および、loxP でネオマイシン耐性遺伝子と poly-A を挟んだカセットを配置し、その下流に ErbB2 cDNA もしくは ErbB4 cDNA を配置したターゲティングマウスを作製する。そして、このマウスと心筋細胞特異的に Cre を発現するトロポニン T-Cre とを掛け合わせ、細胞系譜特異的に ErbB2 もしくは ErbB4 を強発現するマウスを作製する。心エコー、ミラーカテーターにより心機能を測定し、組織切片免疫染色により形態変化、細胞周期活性の変化を観察する。

### 4. 研究成果

まず、ErbB2 もしくは ErbB4 の発現が心筋細胞の増殖を誘導するかどうかを調べるためのツールマウスの作製を試みた。上記のように、成体内の心筋細胞で ErbB2 もしくは ErbB4 の発現を誘導するために、Rosa 遺伝子座で CAG プロモーターの下流に ErbB2 もしくは ErbB4 を発現誘導できるノックインマウスのターゲティングベクターをまず作製した。心筋細胞の細胞周期活性を vivo で直接観察できるように、当初のターゲティングベクターのデザインを、以下のように改変した。

- 1) CAG プロモーターから目的の遺伝子の発現が駆動するように、Rosa 遺伝子座に内因性に存在する ncRNA の転写開始点をすべて除去した。
- 2) また、予定外の領域での ErbB 受容体の過剰発現を避けるため、ネオマイシン耐性遺伝子の

cDNA のあとに、bGH polyA 配列および、triplicate した SV40 polyA 配列を配置し、転写を確実に止まるように設計した

- 3) 心筋細胞で癌遺伝子である ErbB2 または ErbB4 を強発現させたままにしておくのと病的な心筋細胞になってしまうため、プロゲステロンアナログで transgene を除けるようにあらたに roxP 配列を ErbB2 cDNA、ErbB4 cDNA の両端に配した。
- 4) 2A 配列を利用し、ErbB4 を強発現している細胞ではヒストン融合 mCherry を発現させ核を可視化できるようにし、ErbB4 を強発現している細胞で細胞膜 EGFP を発現させることにより細胞膜を可視化できるようにした。

上記の改変ベクターを用いて ES 細胞の Rosa 遺伝子座への相同組換えを行った。Crispr/Cas9 を用いることにより適切に相同組換えを起こした ES 細胞のクローンを効率よく得ることに成功。これらの ES クローンを 8 細胞期マウス胚にインジェクションし、キメラマウスを作製、若干の紆余曲折はあったが、いずれも最終的に germ-line transmission を得ることに成功した。また、roxP 配列では含まれた ErbB cDNA を除去するための変異プロゲステロン受容体融合 Dre リコンビナーゼを全身で発現するノックインマウスの作製にも成功した。

そして、心筋細胞特異的に Cre を発現するトロポニン T-Cre とかけ合わせ、2 ヶ月齢のマウスの心臓を採取し、凍結切片を作成、免疫蛍光染色を行った。ErbB4 過剰発現マウスではヒストン融合 mCherry が、ErbB2 過剰発現マウスでは細胞膜 EGFP が、心筋細胞特異的に発現していることを確認した。つまり、トロポニン T-Cre が発現する心筋細胞のみで、ErbB4 受容体と H2B-mCherry が強制発現するマウス、ErbB2 受容体と細胞膜 EGFP が強制発現するマウスの作製に成功したことを確認できた。もちろん内皮細胞に発現する Tie2-Cre とかけ合わせれば、内皮細胞特異的に ErbB 受容体を強制発現させることができるし、線維芽細胞に発現する PDGFR $\alpha$ -Cre とかけ合わせれば、線維芽細胞特異的に ErbB 受容体を強制発現させることができる。

ErbB2 と ErbB4 とは共通のシグナル経路を活性化するため、ErbB2、ErbB4 どちらのマウスも、同様の表現型を呈することが予想されたが、ErbB2 過剰発現マウスと ErbB4 過剰発現マウスでは、心機能において対照的な表現型を呈した。現在、RNA-seq にて、ErbB2 そして ErbB4 の特異的下流ターゲットの同定を試みているところである。また、トロポニン T-Cre-ERT2 とかけ合わせて、タモキシフェンによりモザイクに transgene の発現を誘導し、ErbB 受容体を強発現している心筋細胞と強発現していない心筋細胞で細胞周期活性がどのように変化するかを EdU の取り込みにより検討し、ErbB 受容体の過剰発現により、実際に成仔で心筋細胞の増殖を誘導することが可能かどうかを検討している。もし増殖の誘導が可能であれば、心疾患に対する非侵襲的な再生治療の選択肢に、新規軸を打ち出すことになるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平井 希俊
2. 発表標題 心臓におけるNumb, ErbB受容体による細胞周期制御
3. 学会等名 日本解剖学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 平井 希俊
2. 発表標題 心臓におけるNumb, ErbB受容体による細胞周期制御
3. 学会等名 動脈硬化Update（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020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