

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15050

研究課題名（和文）心臓ペースメーカー細胞の成熟および性質維持機構の解明

研究課題名（英文）A study of maturation and maintenance mechanism of cardiac pacemaker cells

研究代表者

森田 唯加（Morita, Yuika）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・研究員

研究者番号：50783685

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は生体心臓を用いて領域ごとの代謝相違を明らかにし、細胞の成熟や性質維持における機序を解明することを目的としている。生体マウスの心臓を用いて、領域ごとの代謝産物量の測定を行った結果、心房と心室では特に多くの代謝産物の蓄積に違いがあることを明らかにした。そこで、これらの代謝相違が各心筋の生存や性質維持に関与しているのか明らかにするため、複数の細胞種が混在する生体組織ではなくヒト多能性幹細胞から心筋を誘導する手法を検討し、高効率で誘導させることに成功した。またトランスクリプトーム解析・プロテオミクス解析等の解析により、心筋が心室筋に比べてエネルギー代謝がより活性化していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代謝はエピゲノム環境を変化させ遺伝子発現を制御することが報告されているが、ヒト多能性幹細胞由来の心筋と心室筋の代謝相違は明らかにされておらず、代謝相違が生存や機能維持に関わっていることも不明である。本研究は代謝が細胞に及ぼす影響を解明する重要性を示しており、学術的意義は大きい。また、各心筋の正常な代謝を理解することで、今後ヒト多能性幹細胞由来の心筋を移植する際にも正常な心筋を代謝の観点から判別できる他、疾患ヒト多能性幹細胞由来の心筋との代謝比較により疾患原因を解明する手掛かりになる可能性もあり、再生医療や薬剤応答評価に繋げることができ社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to understand the maturation and maintenance mechanisms of human pluripotent cell-derived cardiomyocytes (hPSC-CM) by the use of knowledge of region-specific metabolites using mouse heart tissue. After I qualified the metabolites of adult mouse heart tissue with IMAGING-MS system which able to measure metabolites as exact as possible, I found that there were huge differences between atria and ventricle in vivo. To reveal whether these metabolic differences influence on the survival and functional maintenance of atria and ventricular cardiomyocytes, I established atrial cardiomyocytes differentiation method from human pluripotent stem cells (hPSCs) because I should have utilized high purity of cardiomyocytes, and then I compared characteristics between hPSC-derived atria and ventricular cardiomyocytes by multi-omics system. These analyses revealed that hPSC-derived atria cardiomyocytes are more hyperenergetic than PSC-derived ventricular cardiomyocytes.

研究分野：発生学

キーワード：心筋分化 代謝 再生医療 心臓発生

1. 研究開始当初の背景

心臓は最も初期に機能し始める臓器の一つだけでなく、全身に血液や酸素等を運搬するポンプとしての機能を担っている生命の根幹である。その心臓の拍動を司る細胞は刺激伝導系である。刺激伝導系の中でも洞房結節は拍動の起点であり、この洞房結節の機能異常は徐脈等の不整脈を引き起こすことから、洞房結節の機能維持を解明することは疾患の発生病序を理解する上で重要である。しかしながら、分化した洞房結節の細胞がどのようにしてペースメーカー細胞としての機能を維持し続けるのか、分化後の生理学的メカニズムの解明には至っていない。また、分化後の固有心筋は幼若心筋から成熟心筋へと性質を変化させるが、洞房結節細胞においては不明である。

2. 研究の目的

本研究では、成体心臓に着目して心臓領域ごとの代謝比較を行い、領域特異的な代謝機能の傾向を明らかにする。特に洞房結節特有の代謝経路・物質の同定、および洞房結節細胞の幼若一成熟化の存在を明らかにし、洞房結節の機能維持メカニズムを解明することを目指す。

3. 研究の方法

(1) MALDI-IMAGING MS を用いた生体心臓組織の代謝解析

生体組織の代謝解析は、採取するまでに時間を要するため正確な代謝産物の解析はこれまで困難であった。そこで本研究では、代謝産物の分解をなるべく回避するために成体マウス心臓組織を瞬時に凍結し切片化する手法を確立し、その後 MALDI-IMAGING MS による解析を行う。この手法により生体内の領域の情報を失うことなく、また代謝産物がなるべく分解されず正確に解析することができる。洞房結節の領域の特定には組織の連続切片を使用した免疫組織化学法により、判別する。

(2) 洞房結節の遺伝子発現プロファイルの作製

MS 解析による代謝産物の解析に加えて、各心筋の比較を詳細に行うために遺伝子発現解析を行う。具体的には、洞房結節に発現する遺伝子 Hcn4 の遺伝子座に GFP が挿入されている Hcn4-GFP マウスを用いて、心房・心室・洞房結節を採取し網羅的な遺伝子発現プロファイルを作製する。

(3) 洞房結節特異的な代謝阻害による表現型の解析

(1), (2) の解析結果に基づき、洞房結節特異的な代謝経路の阻害を行う。Hcn4-GFP マウスの洞房結節を外科的に採取し、候補となる代謝経路の阻害剤もしくは、酵素遺伝子の siRNA を用いたノックダウン実験を行う。洞房結節細胞の解析には、免疫組織化学法、拍動解析、qPCR 解析を行う。

(4) ヒト多能性幹細胞からペースメーカー細胞の分化誘導

成体マウス心臓を用いて得られる特異的な代謝がヒトにおいても同様に見られるのか明らかにするために、ヒト多能性幹細胞からペースメーカー細胞の分化誘導を行う。これまで報告されている手法は、spheroid を形成して 3D で誘導する手法であったが、安定した誘導及び再現性を考慮して 2D での分化誘導法の樹立を行う。ヒト多能性幹細胞由来ペースメーカー細胞を用いて、マウス細胞と同様に代謝阻害物の添加や siRNA を用いたノックダウン実験を行い、表現型を免疫組織化学法、拍動解析、qPCR 解析を行い、解析する。

4. 研究成果

(1) 心臓内では領域ごとに代謝産物の蓄積が異なる

成体マウス心臓内の代謝産物を MALDI-IMAGING MS 解析を行った結果、心臓内では領域ごとに代謝産物の蓄積が異なることが明らかになった。特に、心房と心室では大きく異なり、心房では解糖系代謝産物が多く蓄積している一方で、心室では脂肪酸代謝産物・酸化的リン酸化代謝産物およびグルタミン代謝産物が多く蓄積していた。洞房結節に蓄積が見られる代謝産物は確かに存在していたが物質の特定には至らず、まずは代謝が大きく異なると推測される心房と心室の代謝相違と性質・生存に及ぼす影響を調べていくことにした。次に、出生後においても心房と心室で代謝傾向が似ているか明らかにするために、出生後 2 日目のラットの心房と心室を外科的

に採取し、メタボローム解析を行った結果、IMAGING-MS 解析結果を裏付ける結果が得られた。IMAGING-MS による解析は生体内の代謝変動を見る上で非常に強力なツールとなり、今後心臓にかかわらず様々な臓器や組織の発生研究や再生研究の幅を飛躍的に広げると考えられる。

(2) ヒト多能性幹細胞から心房筋の分化誘導法の樹立

齧歯目の心房と心室で見られた代謝相違がヒト心房と心室においても同様に見られるのか明らかにするため、また生体組織には心筋以外の線維芽細胞や血管内皮細胞、平滑筋細胞も混ざり正確な心筋同士の比較を行うためにヒト多能性幹細胞由来の心房筋と心室筋を用いて検討を進めていくことにした。心室筋の誘導法は当研究室にてすでに確立されているため、心房筋誘導法を検討した。心臓発生学では、心房の形成にレチノイン酸 (RA) が強く関わっていることが報告されている。実際にレチノイン酸合成酵素 *Raldh* を欠損したマウスでは、心臓のルーピングに異常を来し、心房や静脈洞の発生に異常を呈することが報告されている。また、ヒト多能性幹細胞から心房筋を誘導する報告がなされている。しかし、誘導効率が低いことが問題であった。そこで本研究では RA を用いた高効率の心房筋誘導方法を確立することを目指し、RA の濃度や添加時期などについて検討を行った。誘導効率は免疫組織化学法とセルソーターを用いて評価を行った。心房筋では *MLC2A* が発現し心室筋では *MLC2V* が発現するが、心臓発生過程と同様で幼若心室筋においても *MLC2A* が発現する。そこで、ヒト多能性幹細胞由来の心房筋・心室筋をそれぞれの誘導効率を正確に評価するため、誘導 30 日目および 60 日目にセルソーターによる解析を行った。cTNT 抗体と *MLC2A* 抗体を用いて cTNT 陽性細胞中の *MLC2A* 陽性細胞数の割合を算出した。その結果、誘導 30 日目では心筋は幼若であり、RA の投与による *MLC2A* 陽性割合に変化は見られなかった。しかしながら誘導 60 日目では心室筋の成熟化が進行し、*MLC2A* の発現が 10 %ほどまでに低下した。そして RA の量依存的に *MLC2A* 陽性の cTNT 陽性心房筋が効率よく誘導され、95 %程度の割合まで *MLC2A*+/*cTNT*+細胞を誘導することができた。

また、RA の投与による心筋分化効率の低下は一切見られなかった。これらの結果から、ヒト多能性幹細胞由来の心筋は誘導 30 日目では幼若な状態であり、60 日目には成熟化が進行し心房筋と心室筋でより顕著に違いを見ることができた。免疫組織化学法においても、セルソーターを用いた解析結果と同様の傾向が見られた。心房筋の高効率な誘導法は、薬剤応答を研究するためにも非常に有効であると考えられた。

(3) ヒト多能性幹細胞由来心房筋と心室筋のオミクス解析

(2) の手法により、高効率で得られた心房筋と心室筋を用いて、齧歯目を用いた代謝解析と同様の代謝傾向が見られるのか明らかにするために誘導 60 日目の各心筋を用いてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、非常に興味深いことに生体組織とは異なり、エネルギー代謝に関わる解糖系・酸化リン酸化・脂肪酸代謝 (β -酸化) に関わる酵素遺伝子の発現が心房筋で高いことが明らかとなった。また、プロテオミクス解析においても心房筋では上記の代謝酵素量が心室筋よりも多いことが判明した。これらの違いを生む要因として、生体内と培養環境では全く異なる上に、誘導心筋は生体ほどの成熟化が進行していない可能性も考えられる。今後、各心筋の代謝相違が生存や性質維持に関与しているのか明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

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