

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19545

研究課題名(和文) 成体哺乳類心臓に内在する2倍体心筋細胞の特性と生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Characterization of diploid cardiomyocytes in adult mammalian hearts

研究代表者

藤尾 慈 (Fujio, Yasushi)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：20359839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：心臓は、心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞など多様な細胞から成っているが、心筋細胞も決して均一ではない。哺乳類の心筋細胞は、生直後はほとんどが2倍体細胞であるが、その後急速に4倍体細胞が増加する。2倍体細胞を多く含む心臓は成体(Adult)においても修復再生能が高いという報告があるが、これまで両者を分子生物学的に比較した研究はない。本研究では、1細胞解析を用いて、マウス成体心筋細胞の性質を解析した。その結果、2倍体細胞と4倍体細胞とを遺伝子発現プロファイルに基づいて明確に区別することはできないが、前者のほうが幼若な性質を有していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会の高齢化と食生活の過栄養化に伴い、循環器疾患が増加し、その結果、心不全患者も増加している。心不全は、心臓の機能が低下し、息切れや浮腫が生じる予後不良の病態である。心臓の筋肉は、骨格筋と異なり修復再生能が低いいため、循環器疾患により傷害を受けても回復しないことが、心不全の原因であると考えられている。本研究の成果は、成体の心筋細胞の中にも幼若な細胞集団が含まれていることを示すものであり、特に、そのような幼若な細胞集団を標的として介入を加えることによる、新たな心不全治療が開発される可能性があることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Heart is composed of various kinds of cells, including cardiomyocytes, vascular endothelial cells, smooth muscle cells and cardiac fibroblasts. Interestingly, mammalian cardiomyocytes are mainly diploid cells at birth; however, the frequency of tetraploid cardiomyocytes increases afterwards. Therefore, adult mammalian cardiomyocytes are not homogenous. Though it was reported that the adult hearts that are abundant in diploid cardiomyocytes exhibit remarkable reparative/regenerative capacity, the difference between diploid and tetraploid cardiomyocytes remains to be elucidated. In the present study, we characterized adult murine cardiomyocytes by using single cell analysis. And we found that diploid cardiomyocytes have tendency to show juvenile nature, compared with tetraploid cells, though there are no clear differences between them.

研究分野：循環薬理学

キーワード：心筋細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化や食生活の高カロリー化により循環器疾患が増加し、その結果、多くの循環器疾患の終末像である心不全患者も急増している。循環器疾患により傷害を受けた心臓が心不全にいたる根本的な原因は、ヒトを含め哺乳類成体(Adult)の心筋細胞の増殖能が極めて低いことにあると考えられている。すなわち、傷害により心筋細胞死が惹起され、心筋細胞数が減少しても、すでに分化した成体心筋細胞の増殖能が低く、また、心筋細胞へと分化する幹細胞も極めて少ない(もしくは存在しない)ため、心筋細胞は補充されず、従って、心機能が低下するものと考えられている。

心筋細胞の再生能と染色体の倍数性との間に相関があるという仮説がある。哺乳類の心筋細胞は、生直後には2倍体細胞が大部分を占めるが、その後4倍体心筋細胞の比率が上昇し、成体においては、4倍体細胞が全心筋細胞の80-90%を占めるようになる。非常に興味深いことに、生直後のマウスの心臓においては、傷害に反応して心筋細胞が増殖を開始し組織が修復するのに対し、成体マウスの心臓においては、心筋細胞の増殖頻度は極めて低い。また、イモリやゼブラフィッシュにおいては、成体においても心筋細胞は、2倍体細胞であり、心臓の傷害に反応して増殖をはじめ、組織修復に寄与することが知られている。しかしながら、哺乳類成体における2倍体心筋細胞と4倍体心筋細胞の性質を直接的に比較した研究はなく、両者の違いは分子レベルでは説明されていない。

2. 研究の目的

マウスでは、2倍体心筋細胞は単核細胞であり、4倍体細胞は2核細胞であるため、両者は形態学的に判別可能である。本研究では、成体マウスの心筋細胞を用いて、2倍体心筋細胞(単核心筋細胞)と4倍体心筋細胞(2核心筋細胞)との遺伝子発現の違いを解析し、それぞれの性質の違いを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

[心筋細胞の調整] ヘパリンを投与後、マウスを安楽死させ、心臓を摘出した。ランゲンドルフ灌流装置を用いて蛋白分解酵素を含む溶液を灌流させたのち、ピペッティングにより心筋細胞を解離させた。フィルターにより単離心筋細胞を粗調整したのち、Percoll法による密度勾配法で、心筋細胞を調製した。

[1細胞ハンドリング装置] 単離した心筋細胞の核をHoechstにより染色した。1細胞操作装置(ヨダカ技研)を用いて、核数を顕微鏡下で観察して、単核心筋細胞と2核心筋細胞の区別をしながら、細胞をピックアップし、それぞれ100細胞ずつQiazol液中に収集した。

[RNAseq解析] RNAは単離した細胞からmiRNeasy Mini kitを用いて精製した。次に、Clontech SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kitを用いて逆転写し、cDNAとした。cDNAはCovaris S220により200-500bpに切断した後、KAPA Library Preparation Kitsを使って、75bpでシングルエンドシーケンスを行った(Illumina HiSeq 2500 platformの75-base single-end modeを使用)。

[1細胞RNAseq解析] Percoll法により調製した心筋細胞をCell Trackerにより、核をHoechst 33342により染色した。1細胞RNAseq解析にはICELL8(タカラバイオ株式会社)を用いた。このシステムは、細胞懸濁液をNanodispensorにより5184個のwellに分注することで1細胞/wellの分離を実現し1細胞解析を行うものである。特に、各well内の細胞を顕微鏡下で観察することが可能であり、本研究では、wellごとに心筋細胞が、単核心筋細胞か多核心筋細胞かを顕微鏡下で確認したのち、RNAseq解析へと解析を進めた。

4. 研究成果

(1) これまで FACS を用いて、単核心筋細胞と 2 核心筋細胞とを分離しようという試みはなされてきたが、成功していない。そこで、1 細胞ハンドリング装置を用いて、単核心筋細胞と 2 核心筋細胞とを分離した。その結果、時間を要するものの、単核心筋細胞と 2 核心筋細胞とに心筋細胞を分離することに成功した (図 1)。

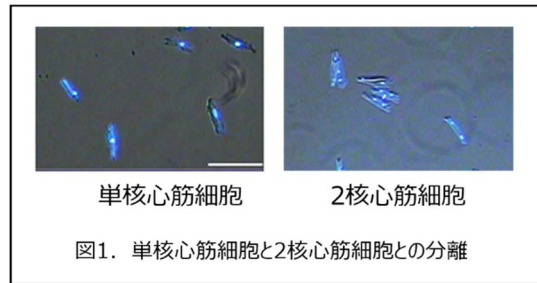


図1. 単核心筋細胞と2核心筋細胞との分離

(2) 上記の方法を用いて単核心筋細胞と 2 核心筋細胞をそれぞれ 100 細胞ピックアップして RNA seq 解析を行った。約 480 個の遺伝子が単核で 5 倍以上発現上昇した (図 2)。特に、○で囲んだ 4 遺伝子には、Nppa、sarcolipin をはじめとする胎生期の心筋細胞で発現がみられる遺伝子で、2 回の RNA seq 解析で再現性良く発現上昇が認められた。しかしながら、一方で、成体マウスの心臓について、これらの遺伝子の発現を、蛍光免疫染色法により検討したところ、陽性細胞頻度は高く見積もっても数%程度であった。生体マウス心臓における単核心筋細胞の比率が 10%程度であることを考えると、これら 4 遺伝子はすべての単核心筋細胞において高発現しているわけではないと考えられた。このことは、

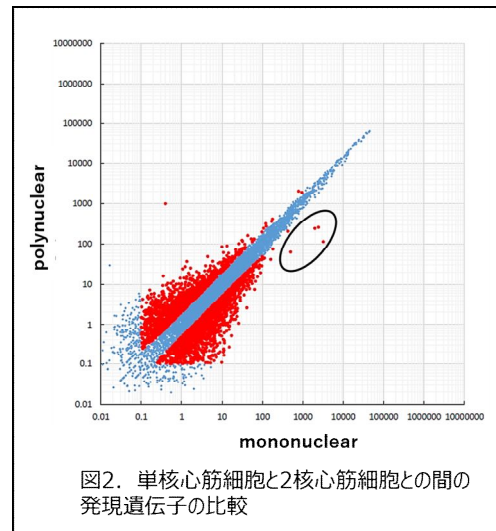


図2. 単核心筋細胞と2核心筋細胞との間の発現遺伝子の比較

単核心筋細胞も必ずしも均一な細胞集団ではないことを示唆している。

(3) Tnni3k が心筋細胞の多倍数体化を促進し心筋細胞の再生能を低下させるという報告がある (Nat. Genet. 49. 1346-53 (2017))。しかし、単核心筋細胞と 2 核心筋細胞間で Tnni3k の発現に差は認められなかった。また、心筋細胞の生存性に関与という報告がある遺伝子については、単核心筋細胞と 2 核心筋細胞との間で発現量に差がある遺伝子は見いだせなかった。事実、成体マウス心筋細胞を培養し、培養液中から血清を除去し細胞死を誘導したが、生存性に有意な差は認められなかった。

(4) 上記(2)より、マウス 2 倍体単核心筋細胞が必ずしも均一な集団ではないということが示唆された。そこで、2 倍体単核心筋細胞に共通した 2 倍体心筋細胞特異的なマーカー遺伝子を、ICELL8 を用いた 1 細胞 RNA seq 解析により探索した。このシステムでは、RNA seq 前に各 well の細胞の形状を顕微鏡下で確認できる (図 3)。そこで 2 人の研究者が独立して単核心筋細胞か 2 核心筋細胞かを判定し、共通の結果を得た単核心筋細胞 96 細胞、2 核心筋細胞 220 細胞について解析を行った。

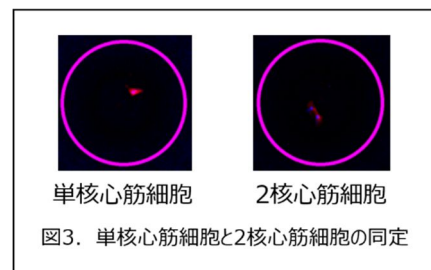
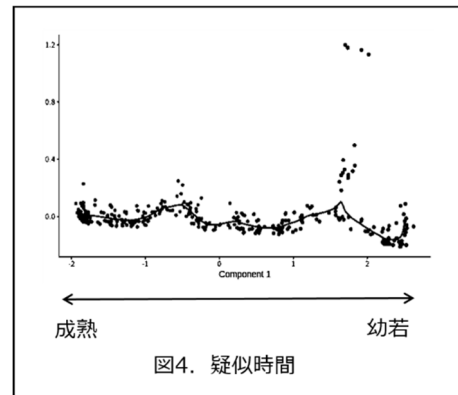


図3. 単核心筋細胞と2核心筋細胞の同定

(5) 1 細胞 RNA seq 解析で得られた単核心筋細胞、2 核心筋細胞の合計 316 細胞の遺伝子発現パ

ターンから疑似時間を設定した(図4)。その結果、心筋細胞は、均一な集団ではないが、同時に明確にクラスターに分類できないことが分かった。上述(2)に示した単核心筋細胞で高発現する幼若な心筋細胞のマーカー遺伝子は、図4の散布図の中で、右寄りに存在する細胞で発現が高かったため、図4の時間軸の右が「幼若な時間」、左が「成熟した時間」と考えられた。

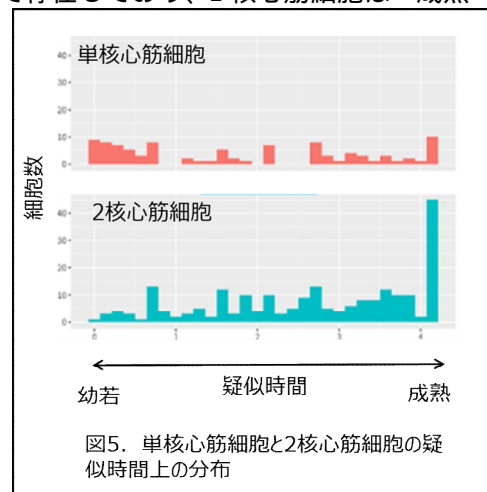


(6) 次に図4で設定した疑似時間軸上に、単核心筋細胞と

2核心筋細胞の細胞数の分布図を作成した(図5)。この図から、

- ・疑似時間軸上で単核心筋細胞と2核心筋細胞とを完全には分離できないこと
- ・しかしながら、単核心筋細胞は「幼若な時間」に偏って存在しており、2核心筋細胞は「成熟した時間」に偏って存在していることが明らかになった。

また、発現遺伝子の解析では、疑似時間軸上「幼若な時間」に位置する単核心筋細胞では細胞骨格関連遺伝子、ユビキチン蛋白質分解系関連遺伝子、「成熟した時間」に位置する2核心筋細胞ではミトコンドリア遺伝子、イオン輸送体遺伝子が多く発現していた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Imaeda, A., Tanaka, S., Tonegawa, K., Fuchigami, S., Igarashi, Y., Takahashi, M., Enomoto, D., Obana, M., Maeda, M., Kihara, M., Kiyonari, H., Conway, S., Fujio, Y., Nakayama, H.	4. 巻 510
2. 論文標題 Myofibroblast 2 adrenergic signaling amplifies cardiac hypertrophy in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 149-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.01.070.	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 Matsumoto, K., Obana, M., Kobayashi, A., Miyagawa, S., Maeda, M., Sakata, Y., Nakayama, H., Sawa, Y., Fujio, Y.	4. 巻 115
2. 論文標題 Blockade of NKG2D/NKG2D ligand interaction attenuated cardiac remodeling after myocardial infarction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cardiovasc. Res.	6. 最初と最後の頁 765-775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cvr/cvy254.	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 Tanaka, S., Fujio, Y., Nakayama, H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Caveolae-specific CaMKII signaling in the regulation of voltage-dependent calcium channel and cardiac hypertrophy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Physiol.	6. 最初と最後の頁 1081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2018.01081.	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 Zhang, L., Noguchi, Y., Nakayama, H., Kaji, T., Tsujikawa, K., Ikemoto-Uezumi, M., Uezumi, A., Okada, Y., Doi, T., Watanabe, S., Braun, T., Fujio, Y., Fukada, S-I.	4. 巻 29
2. 論文標題 The CalcR-PKA-Yap1 Axis Is Critical for Maintaining Quiescence in Muscle Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2154 ~ 2163.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.10.057	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 Shirakura, K., Ishiba, R., Kashio, T., Funatsu, R., Tanaka, T., Fukada, S-I., Ishimoto, K., Hino, N., Kondoh, M., Ago, Y., Fujio, Y., Yano, K., Doi, T., Aird, WC., Okada, Y.	4. 巻 132
2. 論文標題 The Robo4-TRAF7 complex suppresses endothelial hyperpermeability in inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs220228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.220228	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 Tanaka, S., Imaeda, A., Matsumoto, K., Maeda, M., Obana, M., Fujio, Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 2 adrenergic stimulation induces interleukin 6 by increasing Arid5a, a stabilizer of mRNA, through cAMP/PKA/CREB pathway in cardiac fibroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 e00590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prp2.590	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 -

[学会発表] 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Matsumoto, K., Obana, M., Kobayashi, A., Kihara, M., Shioi, G., Miyagawa, S., Maeda, M., Sakata, Y., Nakayama, H., Sawa, Y., Fujio, Y.
2. 発表標題 Blockade of NKG2D / NKG2D Ligand Interaction Attenuated Post-Infarct Myocardial Injury.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木下真希、尾花理徳、前田真貴子、中山博之、藤尾慈
2. 発表標題 CGRRF1の過剰発現は培養心筋細胞の肥大を誘導する
3. 学会等名 日本薬理学会92回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中安佑介、松井理紗、福山尚希、亀谷祐介、和田祐理子、尾花理徳、前田真貴子、中山博之、藤尾慈
2. 発表標題 成体マウスにおける単核心筋細胞の特性解析
3. 学会等名 日本薬理学会92回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujio, Y., Miyawaki, A., Matsumoto, K., Tanaka, S., Maeda, M., Obana, M.
2. 発表標題 Adult murine cardiomyocytes exhibit reparative/regenerative activities in the healing process of myocarditis
3. 学会等名 4th Annual 2020 International Hawaii Cardiovascular Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤尾 慈、宮脇昭光、尾花理徳、松本浩太郎、前田真貴子
2. 発表標題 細胞死が惹起する心筋炎症と組織修復：新たな心不全治療を目指して
3. 学会等名 日本薬学会第140年会 (web開催) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井 理紗、福山 尚希、亀谷 祐介、和田 祐理子、松本 浩太郎、前田 真貴子、尾花 理徳、藤尾 慈
2. 発表標題 哺乳類心筋細胞の細胞周期活性誘導化合物のスクリーニング系の構築
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今枝 厚貴、田中 翔大、松本 浩太郎、前田 真貴子、尾花 理徳、藤尾 慈
2. 発表標題 心線維芽細胞 2アドレナリン受容体シグナルはバラクラインを介して心臓の肥大を惹起する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中翔大、今枝厚貴、松本浩太郎、前田真貴子、尾花理徳、藤尾慈
2. 発表標題 アドレナリン 2受容体刺激は c A M P /PKA/CREB経路を介したArid5a発現誘導によりIL-6の産生を亢進させる
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

臨床薬効解析学分野 http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b014/
--

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