

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590832

研究課題名(和文) 小型魚類を用いた心筋再生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Genetic screening of cardiac regeneration in zebrafish and medakafish

研究代表者

牧野 伸司 (MAKINO SHINJI)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：20306707

研究成果の概要：

小型魚類は哺乳動物には認められない再生能力がある。化学変異剤により作製した変異体を使って、再生現象を担う遺伝子を発見するためのスクリーニングにおいて、心室形成不能メダカ変異体を得た。この変異体は発生過程において心室筋細胞増殖能力を失っており、心室形成ができずに胎生致死であった。この変異体のポジショナルクローニングをおこなった結果、心筋特異的な細胞外マトリックスに遺伝子変異が存在することを発見した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心筋再生、小型魚類、順遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

イモリを代表とする有尾両生類は、際立った組織再生力を有しており一世紀以上に渡って再生研究の代表的なモデル動物であった。イモリは手、足切断後のパターン再形成をはじめとして、心臓、脊椎、レンズ等のヒトでは再生できない臓器、組織を再生することが可能である。このような優れた再生能力を保

持している理由や分子機構は理解されていない。その一方で硬骨魚類に属するゼブラフィッシュにもイモリと同様に、ヒレ、心臓、脊椎、レンズなど我々ヒトをはじめとする哺乳動物に認められない強い再生能力があることがわかってきた。ゼブラフィッシュはゲノムプロジェクトがほぼ完了しており、トランスジェニック技術に加えて順遺伝学的ア

アプローチ(ある表現形より原因遺伝子を探ること)が容易になったことより、近年、再生医学研究の有用なモデル生物としての地位を確立した。

## 2. 研究の目的

研究代表者の牧野はゼブラフィッシュでは心筋傷害に対して心筋細胞分裂により心臓を再生できることに注目してきた。そして哺乳類の心臓と再生できるゼブラフィッシュの心臓の違いは、幹細胞の差異だけではなく幹細胞を新たに生み出す脱分化因子の違いにより生じるという結果を得てきた。そして Heat shock protein60 というストレス応答蛋白質は、心筋傷害時に哺乳類心筋ではストレス応答に、ゼブラフィッシュでは心筋細胞の分裂に必須であることを証明してきた。このようにゼブラフィッシュのような小型魚類を使った遺伝学的アプローチを使うことによって、心臓再生の分子メカニズムの理解がもたらせると考えられる。このような進歩はヒトにおける心臓再生医療を現実のものとする基盤になると考えられる。最終的にはヒトの心臓における再生能力を高める治療の開発まで発展させることを本研究の目標とする。

## 3. 研究の方法

心筋再生できないゼブラフィッシュ変異体動物より心筋再生に重要な分子の同定をポジショナルクローニング法、候補遺伝子スクリーニングにより進めるとともに、すでに遺伝子まで同定されている変異体動物をつかってゼブラフィッシュの心筋再生を修飾する分子のクローニングも行う。

## 4. 研究成果

小型魚類は心臓や脊椎など哺乳動物には認められない再生能力があることを研究申請者はこれまで示してきた。小型魚類ゲノムプロジェクトは完了しており、順遺伝学的アプローチが容易なこと、組織再生に要する時間が短いことなどより、再生研究の有用なモデル生物として使用されるようになってきている。本研究は化学変異剤により作製した変異体を使って、再生という現象の開始を担う遺伝子を発見することを目的として行われた。

再生現象は大きく分けて、組織・細胞の脱分化で始まる再生芽形成過程とパターン形成をはじめとした再分化過程の2過程に分けられる。後者は胚発生の繰り返しであるという証拠が得られている。全く異なる組織、細

胞による四肢やレンズの再生、心臓の再生が、実は共通の分子メカニズムによってその再生開始を引き起こしていることを、マイクロアレイの解析により明らかとした。小型魚類が強い再生力を有するのは分化した組織から、脱分化という過程を通して未分化な幹細胞を形成することができるからであるという証拠を得た。

我々はスクリーニングにおいて心室形成不能メダカ変異体を得た。この変異体は発生過程において心室筋細胞のみ増殖能力を失っており、ホモの変異体は心室形成ができずに胎生致死であった。この変異体のポジショナルクローニングをおこなった結果、パーシカンという心筋特異的な細胞外マトリックスに遺伝子変異が存在することを発見した。小型魚類の再生の研究、特に再生芽形成過程、脱分化の研究によりヒト組織の修復、幹細胞移植、tissue engineering の基盤となる成果が得られた。小型魚類などの再生能力の強い生物において、どのように心臓再生現象が繰り広げられているのかを分子レベルで理解する事ができて、心臓再生ができないヒトとの違いを分子生物学的に説明できれば、ヒトにおける再生医療の進歩が望めると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Sampetreaan O, Iida S, Makino S, Matsuzaki Y, Ohno K, Saya H. Reversible whole-organism cell cycle arrest in a living vertebrate. *Cell Cycle*. 2009 Feb 15;8(4):620-7. 査読有

Hyodo M, Makino S, Awaji Y, Sakurada Y, Ohkubo T, Murata M, Fukuda K, Tsuda M. A novel in vitro system for studying cardiomyocyte differentiation with medaka embryonic cells. *Int J Dev Biol*. 2009 Jan 23. 査読有

Chen H, Hattori F, Murata M, Li W,

Yuasa S, Onizuka T, Shimoji K, Ohno Y, Sasaki E, Kimura K, Hakuno D, Sano M, Makino S, Ogawa S, Fukuda K. Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into cardiomyocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** 2008;369(3):801-806. 査読有

Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. **Biochem Biophys Res Commun.** 2008;373(1):30-35. 査読有

Ieda M, Kanazawa H, Kimura K, Hattori F, Ieda Y, Taniguchi M, Lee JK, Matsumura K, Tomita Y, Miyoshi S, Shimoda K, Makino S, Sano M, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K. Sema3a maintains normal heart rhythm through sympathetic innervation patterning. **Nat Med.** 2007;13:604-612. 査読有

Sano M, Tokudome S, Shimizu N, Yoshikawa N, Ogawa C, Shirakawa K, Endo J, Katayama T, Yuasa S, Ieda M, Makino S, Hattori F, Tanaka H, Fukuda K. Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. **J Biol Chem.** 2007;282(35):25970-25980. 査読

有

Endo J, Sano M, Fujita J, Hayashida K, Yuasa S, Aoyama N, Takehara Y, Kato O, Makino S, Ogawa S, Fukuda K. Bone marrow derived cells are involved in the pathogenesis of cardiac hypertrophy in response to pressure overload. **Circulation.** 2007;116(10):1176-1184. 査読有

[学会発表](計 5 件)

Toshimi Kageyama, Shinji Makino, Tomoyuki Tokunaga, Tomohiro Kono, Keiichi Fukuda. Cardiomyocytes Derived from Bimaternal Parthenogenetic ES Cells by Epigenetic Modification have a Different Property and Genetic Presentation in Cardiogenesis. 日本循環器学会 2009.3.22 大阪

Sung Han Yoon, Shinji Makino, Satoshi Ogawa. Versican is Essential for ventricular Trabeculation and outflow Tract Formation in Medaka Heart. 日本循環器学会 2009.3.21 大阪

Yuta Higashikuse, Shinji Makino, Keiichi Fukuda. Yes-associated Protein (YAP) is Essential for the Linear Heart Tube Formation in Cardiac Development. 日本循環器学会 2009.3.20 大阪

Shinji Makino. Genetic approach for cardiac regeneration using zebrafish & medakafish. The 6th Korea-Japan

Joint Symposium on Vascular Biology  
and Medicine. 2008.12.8 金沢  
Toshimi Kageyama, Shinji Makino,  
Keiichi Fukuda. Imprinting  
gene modified parthenogenic ES cells  
can be a novel autologous cell source  
for generating regenerative  
cardiomyocytes. American Heart  
Association 2008.11.8 -12 New  
Orleans(U.S.A.)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
牧野伸司(MAKINO SHINJI)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号:20306707

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし