

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16488

研究課題名(和文) アデノ随伴ウイルスを用いた心臓特異的遺伝子抑制による心筋細胞成熟化因子の同定

研究課題名(英文) Factors inducing final cardiomyocyte maturation in newborn mice

研究代表者

川岸 裕幸 (KAWAGISHI, Hiroyuki)

信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・助教

研究者番号：30819082

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)：哺乳類の心筋細胞は、生後直後では未成熟な状態にある。マウスの場合、生後一週間程度のみ、生理的な細胞分裂が生じるが、心臓の発達におけるその意義は不明である。研究代表者は、心筋細胞の生理的分裂におけるインターロイキン-6ファミリーの受容体gp130の役割について解析を行った。薬理的、遺伝学的にgp130を抑制したところ、左心室の心筋細胞の分裂増殖が抑制された。そのようなマウスでは、左心室の心筋細胞総数が有意に減少しており、心収縮力も低下していた。したがって、生後の心筋細胞の生理的分裂増殖は、正常な心臓発達に重要であることが判明し、gp130シグナルがその制御機構の一つであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、哺乳類の生後に起こる心筋細胞の表現型変化について研究を行い、生理的分裂増殖におけるgp130シグナルの役割を明らかにした。近年、成人においても心筋細胞はわずかながら分裂増殖していることが知られており、この分裂増殖能の制御は心筋再生医療における重要な知見であると考えられる。また、乳幼児期の心筋細胞分裂を阻害すると、心機能の低下が引き起こされることを明らかにした。これは、たとえば乳幼児期に抗腫瘍薬治療を受けた患者では心筋細胞の分裂増殖が阻害されることで将来の心機能が低下する(心筋障害)という懸念を示しており、小児がんサバイバーにとって循環器領域のフォローアップの重要性が改めて示された。

研究成果の概要(英文)：Mammalian ventricular cardiomyocytes are still premature at birth and continue to differentiate by weaning. Mouse ventricular cardiomyocytes also undergo physiological cell division several times within approximately one week after birth, it is, however, still unclear what roles this proliferation plays in the postnatal cardiac maturation. Here, we examined a role of gp130, a main subunit of receptors for the interleukin-6 family of cytokines in this process. Pharmacological and genetic ablation of gp130 dramatically impaired physiological proliferation of cardiomyocytes in the left ventricle. These mice have the smaller number of the left ventricular cardiomyocytes and indicated significant weak contractility of the left ventricle. Taken together, we found that gp130 played a crucial role in the physiological proliferation of ventricle cardiomyocytes in postnatal developing stage, which is important for the functional development of mammalian heart.

研究分野：分子薬理学

キーワード：心筋細胞 分裂増殖 gp130 新生児

1. 研究開始当初の背景

マウスの心筋細胞は、出生直後には未成熟な状態にあり、その収縮力は弱い。個体の成長に伴い、心筋細胞は肥大化し、細胞内にある筋小胞体は多量の Ca^{2+} を蓄積するようになる。さらに、T管とよばれる、細胞膜が細胞内側に陥入した構造が形成される。そのT管に集積するL型 Ca^{2+} チャンネルや、発達した筋小胞体のはたらきによって、心筋細胞は強く収縮するようになる。また近年では、出生後も心筋細胞は一定回数分裂増殖することもわかってきており、マウスの場合そのピークは生後1~5日に訪れる。このような心筋細胞の表現型の変化(成熟化)は、マウスでは離乳期(生後20~30日程度)までに生じる。心筋細胞の成熟に伴う具体的な表現型変化については複数の報告があるが、その分子メカニズムは不明な点が多い。

出生後の心臓内では、様々な成長因子やホルモン、サイトカインの濃度が変化することが知られている。研究代表者はそれらの中で、心筋細胞の成熟化に重要な因子があるかについて薬物スクリーニングを行った。新生児マウスにそれぞれの因子の受容体に対する阻害剤を投与し、生後20、30日目における心臓の機能を評価した。その結果、SC144を投与した群では顕著な心収縮力の低下が確認された。SC144は、インターロイキン6(IL6)ファミリーをリガンドとするgp130受容体の阻害薬である。そのため、心臓の正常な機能にはgp130を介した細胞間シグナル伝達経路が必要であることが示され、出生後の心臓の発達に役割を持つことが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、出生後の心筋細胞の表現型変化におけるgp130シグナルの重要性について明らかにする。SC144によるマウス心臓への影響について、これまでに得た知見に加え、SC144の心臓および心筋細胞への作用について、詳細な解析を進める。さらに、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた心臓特異的な遺伝子ノックアウト技術を用いて、出生後の心筋細胞特異的にgp130を欠損したマウスを作製する。作製したマウス的心臓や心筋細胞の表現型を解析することで、出生後の心筋細胞成熟化の制御メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)心機能の解析

生後20日のマウスについて小動物用超音波高解像度イメージングシステム Vevo[®]2100を用いて、左心室収縮能の測定を行った。マウスを、イソフルラン麻酔下で保温ステージ(37°C)に背臥位に固定し、超音波検査を行った。また、マウスを三種混合麻酔薬(メドミジン、ミダゾラム、ブトルファノール)で麻酔し、約30°Cの保温パッド上で心電図検査(第二誘導)を行った。

(2)心筋細胞の興奮収縮連関の解析

マウスから心室筋細胞を酵素還流法にて単離した。摘出した心臓の大動脈を結紮し、左心室内にコラゲナーゼ、プロテイナーゼを含む溶液をシリンジポンプにて継続注入した。30分後、心室を切り取り、ピンセット、ピペットにて組織をホモジェナイズした。遠心分離後、上澄みを除き、心室筋細胞を得た。単離した心室筋細胞について、細胞内 Ca^{2+} 動態とL型 Ca^{2+} チャンネルの活性をそれぞれ解析した。細胞内 Ca^{2+} 動態の測定は、蛍光 Ca^{2+} 指示薬 Fluo4-AM を用いた。単離した心室筋細胞に Fluo4-AM を添加し、室温で45分間培養した。その後、line-scanning 共焦点顕微鏡を用いて、蛍光シグナルを解析した。フィールド電気刺激は、0.2 Hz、1 ms 間、50 V の条件で行った。L型 Ca^{2+} チャンネルの活性については、パッチクランプ法で行った。ラミネンコートしたカバーガラスに単離心室筋細胞を貼り付け、Whole-cell モードにて Ca^{2+} チャンネル電流の測定を行った。

(3)心筋細胞の分裂増殖能の解析

生後1日目のマウスから心室筋細胞を単離し、24時間培養した。その後、低血清条件下でSC144を加え、さらに分裂細胞をマーキングする5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)を

添加した。24～48 時間後に細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、Click-iT™ EdU Alexa Fluor® Imaging kit を用いて EdU のシグナルを、cardiac troponin-T 抗体および蛍光ラベルマウス二次抗体を用いて心筋細胞を、それぞれ検出した。また、生体の心臓内の分裂増殖している細胞をラベルするために、生後 2、4 日目、ないし生後 4 日目のみに、EdU 溶液を皮下投与した。生後 5 日目に心臓を回収後、凍結切片を作成し、免疫組織染色を行うことで分裂心室筋細胞の定量解析を行った。

(4) AAV による CRISPR-Cas9 システム誘導を利用したノックアウトマウスの作製
loxP-STOP-loxP-Caspase9-GFP 配列をゲノム DNA に有するトランスジェニックマウスに、心筋トロポニン T プロモーターで駆動される Cre と gp130 標的ガイド RNA (gRNA) を含むアデノ随伴ウイルス (AAV) を感染させることで、心筋細胞特異的に gp130 遺伝子をノックアウトした (AAV gp130 KO)。生後 1 日目のトランスジェニックマウスに、AAV を 2×10^{10} virus genome/g で皮下注射し、目的の日齢において実験を行った。またマウスゲノム DNA 上に特異的な標的を持たない non-targeting gRNA を含む AAV を感染させ、コントロールマウスを作製した (AAV control)。

(5) 二次元画像情報を基にした三次元構造シミュレーションによる心臓内心筋細胞数の推定

生後 20 日目の AAV control、AAV gp130 KO マウスの心臓を回収し、凍結ブロックを作製した。心尖部から大動脈基部まで、一定間隔で $40\mu\text{m}$ の切片を作成した。作成切片の連続切片として、 $20\mu\text{m}$ の切片を 7 枚回収した。 $40\mu\text{m}$ 切片について、心筋細胞の核マーカーである PCM-1 抗体で染色を行った。共焦点顕微鏡下で撮影した左心室の Z 軸方向連続画像について解析し、単位体積 ($50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$) あたりの心筋細胞の核数を定量した。続いて、左心室筋一個当たりの体積を計算するために、 $20\mu\text{m}$ 切片をトルイジンブルー染色した。これらの切片の左心室部位の面積を測定し、以下の数式を用いてその体積を計算した。

$$V_1 = h_1 \times (S_1 + S_2 + (S_1 \times S_2)^{1/2}) / 3$$

$$V_{LV} = V_1 + V_2 + V_3 + V_4 + V_5 + V_6$$

($h_1 = 1$ 枚目と 2 枚目の切片間隔、 $S_1 = 1$ 枚目の切片の面積、 $V_{LV} =$ 左心室の体積)
これらの数値から、一左心室当たりの心筋細胞総数(N)は、以下の計算により推定した。

$$N = N_{CMNUC} / \text{unit volume} / N_{NUC} \times V_{LV}$$

($N_{CMNUC} =$ 単位体積当たりの心筋細胞核数、 $N_{NUC} =$ 一心筋細胞当たりの核の数)

4. 研究成果

(1) 薬理的 gp130 の阻害は、心臓収縮力の低下を引き起こした。

はじめに、gp130 受容体の特異的阻害薬 SC144 の、心臓における作用について検討を行った。生後 1 日目に、偽薬、20 mg/kg SC144 を皮下注射した。生後 19 日まで投与を続け、20 日目に心エコーを行った。その結果、SC144 を投与したマウスでは左心室収縮力が有意に低下していた (図 1)。一方で、心電図検査の結果、心拍数や心電図波形について大きな影響は見られなかった。続いて、この心臓収縮力の低下が、心筋細胞の興奮収縮連関への影響であるかを確認するために、生後 20 日の偽薬、

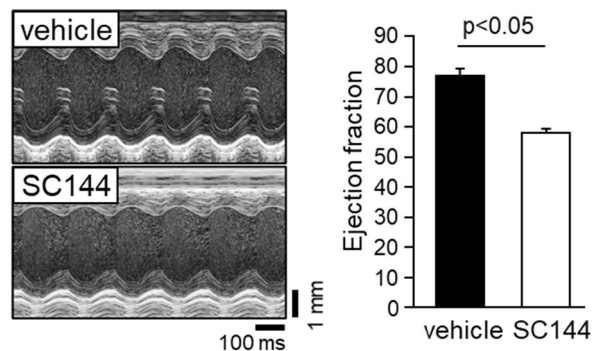


図1 SC144投与により、心収縮力が低下した。

SC144 投与マウスから心室筋細胞を単離した。それぞれの心室筋細胞について、細胞内 Ca^{2+} イメージングを行うことで、活動電位刺激による細胞内の Ca^{2+} 動態について調べたが、有意な差は認められなかった。また、興奮収縮連関の要である L 型 Ca^{2+} チャネルの活性についてパッチクランプ法にて解析を行ったが、こちらも顕著な差は見られなかった。以上のことから、SC144 によって引き起こされた心臓収縮力の低下は、心筋細胞の興奮収縮連関への作用ではないことが判明した。

(2) SC144 投与マウスでは、心室筋細胞の分裂増殖阻害による左心室筋の薄化が起っていた。

SC144 投与マウスの心臓形態を確認するために、病理組織解析を行った。生後 20 日の偽葉、SC144 投与マウスから心臓を回収し、横断面の連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。組織切片を解析したところ、SC144 投与マウスの心臓では左心室筋が特異的に薄くなっていることが判明した。この原因について、まずは心筋細胞の大きさを比較検討したが、有意ではあるものの、大きな差は確認できなかった。続いて心筋細胞の生理的分裂増殖への影響について検討を行った。生後 1 日目から 4 日目まで偽葉、SC144 を継続的に皮下投与し、生後 2、4 日目に、分裂増殖細胞をラベルする EdU を注射した。生後 5 日目に心臓を回収し、免疫組織染色を行ったところ、SC144 を投与したマウスの心臓では左心室の心筋細胞の分裂増殖が著しく低下していることが確認された (図 2)。このことから、生後の心室筋細胞の分裂増殖に gp130 受容体が重要なはたらきを持つことが示唆された。

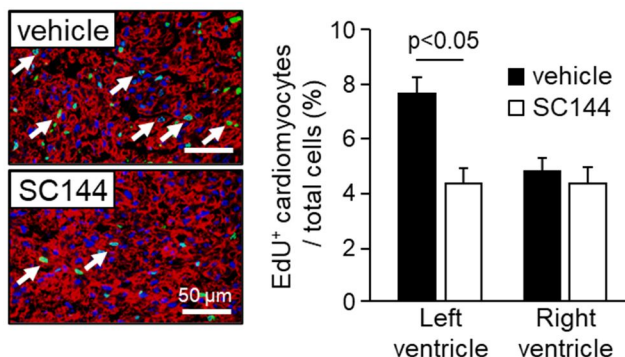


図2 左心室心筋細胞の生理的分裂増殖が、SC144投与により阻害された。

(3)生後心筋細胞特異的 gp130 ノックマウス(gp130 KO)マウスでは、心収縮力および心筋細胞生理的分裂増殖の低下が確認された。

SC144 投与によって見られた現象が、心筋細胞の gp130 受容体を介しているかについて、AAV による CRISPR-Cas9 誘導マウスモデルを用いた検証を行った。生後 1 日目のマウスに、心筋細胞特異的なプロモーターで駆動される Cre と gp130 に対するガイド RNA を含む AAV を皮下注射した。AAV 投与後 20 日目のマウスにおいて、コントロールマウスと共に心エコーを行ったところ、有意な心収縮力の低下が認められ、左心室筋特異的な心筋の菲薄化も確認された。さらに、心筋細胞の分裂について解析するために、生後 1 日目に AAV を皮下注射した後、4 日目に EdU を皮下投与した。その 24 時間後に心臓を回収し、免疫組織染色を行ったところ、gp130 KO マウスでは左心室の心筋細胞の分裂頻度が有意に低下していた (図 3)。続いて、gp130 KO マウスにおいて、左心室筋細胞の分裂増殖が低下することで、左心室内の心筋細胞数が減少しているについて、二次元組織切片の情報から三次元組織構造を推定する解析技術である Stereology-like 解析を用いた検証を試みた。単位体積当たりの左心室筋細胞の数を免疫化学染色にて解析、定量し、また同時に組織化学染色にて左心室の面積を解析し、その体積を計算した。これらの数値を元に左心室にある心筋細胞の総数についてコントロールマウスと gp130 KO マウスを比較すると、gp130 KO マウスでは有意に減少していることが判明した。(図 4)

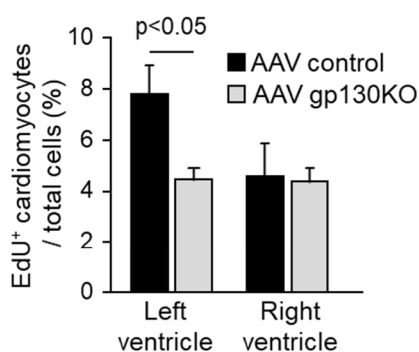


図3 心臓特異的gp130ノックアウトマウスは、左心室心筋細胞の増殖能が低下していた。

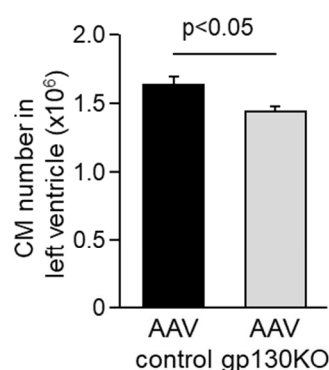


図4 gp130 KOマウスは、左心室内の心筋細胞総数が減少していた。

(4)IL6/gp130 シグナルは、出生直後の心筋細胞の生理的分裂増殖に重要である。gp130 は、IL6 ファミリーと呼ばれる複数のリガンド分子の受容体として機能することが知られている。そこで、出生直後の心筋細胞の生理的分裂増殖において、どのリガンド分子が重要であるかについて in vitro で検証を行うこととした。まず、心室筋細胞の in vitro での分裂増殖における gp130 の必要性を検証するために、生後 1 日目のマウスから単離した心筋細胞に 10 μM SC144 を添加した。その後 EdU を添加し、心室筋細胞の分裂増殖について評価したところ、SC144 添加によって顕著にその分裂増殖が抑制さ

れた。この結果は、siRNA を用いた gp130 ノックダウン細胞によっても再現性が確認された。続いて、単離心室筋細胞に gp130 リガンドのリコンビナントタンパクを添加し、その分裂増殖能への作用を調べた。その結果、IL6 を添加すると顕著に心室筋細胞の分裂増殖が亢進することがわかった。以上のことから、IL6/gp130 シグナルは、出生直後の心室筋細胞の分裂増殖を正に制御していることが示された。

(5)考察

以上の研究結果から、出生直後に生じる心筋細胞の生理的分裂において、IL6/gp130 シグナルが重要なはたらきをしていることが明らかになった。これを阻害したところ心臓の収縮力の低下が引き起こされたことから、この時期の心筋細胞の生理的分裂増殖は心臓の発達において重要な役割を有していることが示唆された。これまでに、成人の心筋細胞もわずかながら分裂していることが報告されている。本研究による心筋細胞の分裂増殖能の新たな制御メカニズムの解明は、成人慢性心不全における心筋再生医療による治療戦略の創設につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 *Kashihara Toshihide, *Kawagishi Hiroyuki, Nakada Tsutomu, Numaga-Tomita Takuro, Kadota Shin, Wolf Elena E., Du Cheng-Kun, Shiba Yuji, Morimoto Sachio, Yamada Mitsuhiko (*contributed equally)	4. 巻 5
2. 論文標題 -Arrestin-Biased AT1 Agonist TRV027 Causes a Neonatal-Specific Sustained Positive Inotropic Effect Without Increasing Heart Rate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 1057 ~ 1069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2020.08.011	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 川岸裕幸, 山田充彦	4. 巻 276
2. 論文標題 アレスチンバイアスAT1受容体アゴニストは新しい乳幼児心不全治療薬の有力候補である。	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1137 ~ 1138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroyuki KAWAGISHI, Tsutomu NAKADA, Takuro NUMAGA-TOMITA, Mitsuhiko YAMADA
2. 発表標題 Physiological role of gp130 receptor in newborn mouse cardiomyocyte development
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会(誌上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川岸裕幸, Maite LARRA AGA, 冨田(沼賀)拓郎, 中田勉, 山田充彦
2. 発表標題 新生児マウスにおける、gp130受容体を介した心筋細胞の発達機構
3. 学会等名 筋生理の集い
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Kawagishi, Tsutomu Nakada, Takuro Numaga-Tomita, Mitsuhiko Yamada
2. 発表標題 Physiological role of gp130 receptor in newborn mouse cardiomyocyte development
3. 学会等名 The 50th NIPS International Symposium 'MIRACLES' in Cardiovascular Physiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川岸裕幸、中田勉、富田(沼賀)拓郎、山田充彦
2. 発表標題 マウス心筋細胞の生下後の機能的最終分化の分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川岸裕幸、富田(沼賀)拓郎、中田勉、柏原俊英、山田充彦
2. 発表標題 新たなAT1アンジオテンシン受容体修飾法による小児心不全治療法の開発
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroyuki Kawagishi, Tsutomu Nakada, Takuro Numaga-Tomita, Mitsuhiko Yamada
2. 発表標題 Postnatal loss of gp130 caused impaired cardiac contractility accompanied by inhibition of physiological proliferation of cardiomyocytes
3. 学会等名 生理研心血管国際集会2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川岸裕幸、柏原俊英、富田(沼賀)拓郎、中田勉、山田充彦
2. 発表標題 アンジオテンシンII 1型受容体ー アレスチン経路を活性化する小児心不全治療薬の開発
3. 学会等名 第30回日本循環薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川岸裕幸、富田(沼賀)拓郎、中田勉、山田充彦
2. 発表標題 新たな方法でAT1受容体を利用した小児心不全治療薬の開発
3. 学会等名 第143回日本薬理学会関東部会シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川岸裕幸、柏原俊英、富田(沼賀)拓郎、中田勉、山田充彦
2. 発表標題 アレスチンバイアスアンジオテンシン1型受容体アゴニストは、新生児特有の持続性陽性変力作用を示す
3. 学会等名 第142回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------