

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08500

研究課題名(和文)胎仔心筋細胞増殖機構Hippo-Yap経路に着目した心不全治療応用への基盤研究

研究課題名(英文)Hippo-Yap contributes to cardiomyocyte proliferation in the fetal rat heart with antenatal glucocorticoid administration.

研究代表者

松本 直樹 (Matsumoto, Naoki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80239110

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)：胎児～新生児期では心筋細胞増殖能を有し、成人はその能力は消失する。本研究では、ラットの胎仔期から新生仔期の細胞増殖機構の変化に伴う因子としてHippo-Yap経路の役割を明らかにすることを目的とした。ラットの胎仔～新生仔において、胎仔では心筋細胞のYapの活性化に伴い心筋細胞が増殖し、また出前前グルココルチコイド(GC)投与でも細胞増殖がさらに誘導された。また心筋外層で核内Yap発現が多く認められた。Yapの活性にアグリンの関与が一部示唆された。胎児期の心筋細胞増殖機構を、成人心筋に誘導できれば心筋梗塞などの心筋修復への治療につながると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児から新生児期の心筋は、細胞増殖能を有し、成人ではその能力は消失する。胎児期の心筋細胞増殖機構を解明し、胎児期の能力を成人心筋に誘導できれば心筋梗塞などの心筋修復に応用できると考えた。胎児～新生児期の心筋細胞増殖に関与するHippo-Yap経路の機能に着目し、ラット胎仔心筋での発現と、出生前グルココルチコイド(GC)投与後の胎仔での影響を検討した。胎仔および新生仔期の心筋細胞におけるYapの活性化は心筋細胞増殖能に重要な役割を担っていることを明らかにし、GC投与でもその能力が増強することを確認した。これらの機構が、成人心筋に誘導することが可能になれば心筋細胞修復に利用できると考える。

研究成果の概要(英文)：Although cardiomyocytes can proliferate in the fetal heart, this ability is lost after birth. It is almost impossible for the adult heart to regenerate after injury due to myocardial infarction. The transcriptional co-activator Yes-associated protein (Yap) is required for cardiomyocyte proliferation during the newborn stage. We investigated where Yap activation has occurred in the fetal heart and whether antenatal GC administration affects Yap on cardiomyocyte proliferation. The cell proliferation in the epicardium was greater than that in the endocardium and myocardium in the fetuses. Furthermore, antenatal GC administration promoted cell proliferation. Our results suggested that both cell cycle progression and Yap activation are among the mechanisms involved in fetal cardiomyocyte proliferation in the epicardium. Understanding the proliferative mechanisms of fetal heart might be applicable to regenerative therapeutic strategies.

研究分野：循環器学

キーワード：出生前グルココルチコイド療法 Hippo-Yap 心筋細胞 胎仔

1. 研究開始当初の背景

胎仔期および新生児期の限られた期間、心臓の心筋細胞は増殖能力を持ち、この特性は成熟とともに急速に失われる。心筋細胞は再生増殖能を持たず、虚血性心疾患等により壊死した心筋は再生しない。壊死心筋を修復するアプローチは、ドナー移植、iPS細胞や心筋シート移植による再生医療が期待されているが、ドナー不足や臨床研究段階の状況である。近年、新たな心不全治療のアプローチとして、胎児期の心筋細胞の増殖能力に着目し、成熟心筋に心筋細胞増殖能を誘導させる手法が考えられている。この手法を確立するためには胎児期の心筋細胞の増殖機構能力を明らかにする必要がある。以前より我々は、早産児の未熟心臓に着目し早産児モデル動物を用いて、心筋収縮蛋白の発現やエネルギー産生能、さらには心筋の形態学的評価について報告した。またラットの妊娠母体に対する出生前GC投与が、早産仔の心筋細胞増殖と血管新生を促進し未熟心筋を成長させることを報告している (Sakurai K, et al. *Pediatr Int* 61(1):31-42, 2019. 長田洋資他, 聖マリアンナ医大誌 43:61-70, 2015.)。

出生前GC投与による心筋細胞増殖は、複雑な因子がネットワークを形成しているが、近年、心筋細胞の再生や増殖に関与するHippo- Yapシグナル経路も重要な役割を果たしていると注目されている。

Hippo- Yap 経路は、胎児心筋細胞ではスイッチオフ状態で、核内に YAP/TAZ が移行することで心筋細胞増殖の遺伝子が誘導される。しかし生後まもなくこの経路がスイッチオンの状態になり YAP/TAZ がリン酸化され細胞質内で分解されるため増殖能力を失うとされる (図1)。しかしこの機能の性質転換が行われる時期は不明であった。

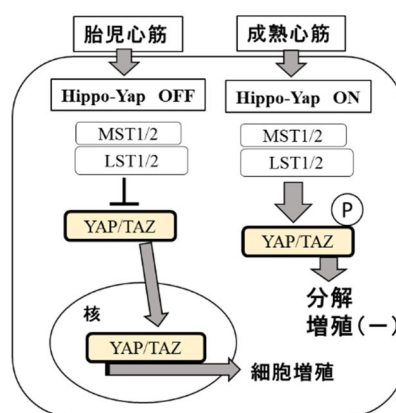


図1 心筋細胞の Hippo- Yap 経路

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 胎児～新生児～成熟心筋の成長過程での心筋細胞増殖機構を明らかにすること (2) グルココルチコイド (GC) が細胞増殖能の促進に寄与するならば、GCによる細胞増殖の作用機序についても明らかにすることであった。具体的には、胎児期～新生児～成熟期の過程での Hippo- Yap がどのような役割を担っているのか。また、出生前 GC 投与が胎仔心筋において Hippo- Yap を介して細胞増殖に影響するか、この点について実証することとした。

3. 研究の方法

(1) 早産仔および新生仔モデル作成

Wistar 系妊娠ラットの在胎 19 日および 21 日目に、全身麻酔下で帝王切開し、取り出した胎仔の心臓を摘出した (胎仔群)。また自然分娩させた新生仔ラット (1 日、3 日、5 日) の心臓も同様に摘出した。比較対象として 8 週令の成熟ラットの心臓も実験試料とした。

(2) 出生前 DEX 投与群の作成

妊娠ラットの在胎 17 日および 19 日目に、デキサメサゾン (DEX) を 2 日間連続で皮下投与し、在胎 19 日および 21 日目に帝王切開し、胎仔を取り出し心臓を摘出した。非投与群は DEX 溶媒のごま油を同等量投与した。同様に在胎 19 日および 21 日目に帝王切開し胎仔の心臓を摘出した。

(3) 胎仔～新生仔～成熟期のラット心筋での Hippo-Yap の発現

Hippo 経路下流の主要なエフェクターである Yap が脱リン酸化されると核内に移行することから、胎仔および新生仔の心臓組織の心筋細胞で、細胞質内と核内で Yap 蛋白の発現率を検討した。核内 Yap の定量化は、鏡検下で目視のカウントまたは画像ソフト"image J"で行った。またウエスタンブロット法でも検討した。心筋細胞増殖の指標として増殖マーカーの Ki-67 および細胞周期関連因子 Cyclin D1 の発現を検討した。心筋組織は内層、中間層、外層と 3 層においてそれぞれ成長度の違いがあると考え、これらの発現は 3 層をそれぞれ解析した。DEX による Yap の発現が GC 受容体を介する作用が明らかにするため、新生仔 1 日目のラットの心筋培養細胞に GC 受容体阻害薬 (RN486) を前投与し、DEX を添加した時の心筋の Yap の発現を検討した。心筋細胞をチャンバーで培養し、拍動を確認した後に DEX を 1 μ M 添加し、24 時間培養後 Yap 蛋白の発現を免疫細胞染色にて評価した。また DEX が GC 受容体を介した作用かを検証するために、GC 受容体阻害薬 (RN486) を前投与した Yap 発現も検討した。

4. 研究成果

胎仔、新生仔および成熟ラットの心筋組織を免疫組織染色し、Ki-67, Cyclin D1 および Yap について心筋細胞の核内陽性率を計測した。Ki-67 および Cyclin D1 の発現は胎仔期で多く、新生仔の日齢 3 日から徐々に減少した。また心筋外膜層で発現率が多く、2 つの因子は良く相関していた。内膜層と中間層の心筋細胞は、妊娠後期の胎仔ラットではその発現が低下しており、心筋細胞の増殖能は、より早い段階で始まり後期での増殖能はすでに低下していると考えられた。核内 Yap 陽性細胞も胎仔期 (19 日、21 日) での発現が多く、日齢 3 日から徐々に減少した。Yap 陽性細胞も外膜層に多かったが、Ki-67 および Cyclin D1 の発現率との相関は得られなかった。今回の結果は、妊娠後期の胎仔の心筋細胞増殖能は外膜側に多いことが明らかになった。Yap の発現は細胞増殖だけでなく、細胞の分化などに関与する可能性も示唆された。(Nakamura et al. J St. Marianna Univ 13(2) 1-14 2020)。また培養心筋細胞を用いて DEX が GC 受容体を介した作用かどうか検証した結果、DEX 投与では核内 Yap の発現は増加したが、GC 受容体阻害薬 (RN486) の前投与では DEX による Yap の発現は増加しなかったことから、DEX は心筋の GC 受容体を介して Yap に影響することが解った。以上より、胎児心筋の細胞増殖機構に Yap の活性化が深く関与することが明らかとなった。Yap 経路のトリガー因子の解明までは至らなかったが、細胞増殖能を失う成人心筋細胞に、GC 投与が引き金となり胎仔期の特性に性質転換させることが可能であれば、将来心不全の心筋修復の治療アプローチとして発展性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kobayashi T, Takeba Y, Ohta Y, Ootaki M, Kida K, Watanabe M, Iiri T, Matsumoto N.	4. 巻 48
2. 論文標題 Prenatal glucocorticoid administration enhances bilirubin metabolic capacity and increases Ugt1a and Abcc2 gene expression via glucocorticoid receptor and PXR in rat fetal liver.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 1591-1606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.15235.	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 Kobayashi T, Takeba Y, Ohta Y, Ootaki M, Kida K, Watanabe M, Iiri T, Matsumoto N.	4. 巻 49
2. 論文標題 Prenatal glucocorticoid administration accelerates the maturation of fetal rat hepatocytes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Biol Rep.	6. 最初と最後の頁 5831-5842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-022-07358-5.	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 Takeba Y, Ohta Y, Ootaki M, Kobayashi T, Kida K, Watanabe M, Koizumi S, Otsubo T, Iiri T, Matsumoto N.	4. 巻 43
2. 論文標題 Identification of interleukin-16 production on tumor aggravation in hepatocellular carcinoma by a proteomics approach.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tumour Biol	6. 最初と最後の頁 309-325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/TUB-211507	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 Nakamura Y, Takeba Y, Kobayashi T, Ootaki M, Ohta Y, Kida K, Sakurai K, Gen K, Watanabe M, Iiri T, Matsumoto N	4. 巻 11
2. 論文標題 Yap contributes to cardiomyocyte proliferation in the fetal rat heart epicardium with antenatal glucocorticoid administration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J St. Marianna Univ	6. 最初と最後の頁 109-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17264/stmarieng.11.109	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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林司, 武半優子, 大滝正訓, 太田有紀, 木田圭亮, 渡辺実, 飯利太郎, 松本直樹
2. 発表標題 ジヒドロミリセチンのヒト肝細胞癌細胞へのERK1/2を介した細胞増殖抑制効果
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武半優子, 小林司, 大滝正訓, 太田有紀, 木田圭亮, 原雅樹, 渡辺実, 飯利太郎, 松本直樹
2. 発表標題 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) の肝細胞癌のがん増殖抑制
3. 学会等名 第42回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大滝正訓, 太田有紀, 武半優子, 渡辺実, 小林司, 木田圭亮, 飯利太郎, 松本直樹
2. 発表標題 薬理学の教科書と医薬品副作用データベースにおける高頻度出現医薬品の検討
3. 学会等名 第42回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林司, 武半優子, 木田圭亮, 大滝正訓, 太田有紀, 桜井研三, 渡辺実, 飯利太郎, 松本直樹
2. 発表標題 出生前グルココルチコイド投与がラット胎仔心臓のアクチンおよびミオシンに与える影響
3. 学会等名 第42回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大滝正訓, 廣井朋子, 太田有紀, 武半優子, 渡辺実, 小林司, 木田圭亮, 飯利太郎, 佐藤知雄, 松本直樹
2. 発表標題 トリチウム水を用いた蒸気拡散法における水分子の定量的評価
3. 学会等名 第3回日本放射線安全管理学会 日本保健物理学会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木田圭亮, 小林司, 大滝正訓, 太田有紀, 武半優子, 飯利太郎, 松本直樹
2. 発表標題 腫瘍循環器外来開設から3年間で見えてきた新たな役割と課題
3. 学会等名 第5回日本臨床薬理学会 関東・甲信越地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林司, 武半優子, 太田有紀, 大滝正訓, 元圭史, 中村悠城, 渡辺実, 木田圭亮, 飯利太郎, 松本直樹
2. 発表標題 出生前デキサメタゾンが胎仔ラット肝臓並びに正常肝RLN-B2細胞の増殖と成熟因子に及ぼす影響
3. 学会等名 聖マリアンナ医科大学 医学会 第79回学術集会(オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田有紀, 小林司, 武半優子, 大滝正訓, 木田圭亮, 渡辺実, 飯利太郎, 武永美津子, 松本直樹
2. 発表標題 座骨神経障害誘発萎縮筋組織に対する脂肪組織由来幹細胞の効果
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohta Yuki, Kobayashi Tsukasa, Takeba Yuko, Ootaki Masanori, Kida Keisuke, Watanabe Minoru, Iiri Taroh, Takenaga Mitsuko, Matsumoto Naoki
2. 発表標題 Effect of adipose tissue-derived stem/stromal cells on muscle atrophy.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kobayashi Tsukasa, Takeba Yuko, Ootaki Masanori, Kida Keisuke, Watanabe Minoru, Iiri Taroh, Matsumoto Naoki
2. 発表標題 Expression of the growth -related factors in the liver of fetal rats.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ootaki Masanori, Hiroi Tomoko, Ohta Yuki, Takeba Yuko, Kida Keisuke, Matsui Hiroaki, Naoki Matsumoto
2. 発表標題 Structure prediction of the N-terminal regulatory domain of the human tryptophan hydroxylase 2
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeba Yuko, Kobayashi Tsukasa, Ootaki Masanori, Ohta Yuki, Kida Keisuke, Watanabe Minoru, Iiri Taroh, Matsumoto Naoki
2. 発表標題 Prenatal glucocorticoid administration accelerates glomeruli and renal tubules development in the fetal rats.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林司、武半優子、太田有紀、大滝正訓、渡辺実、桜井研三、元圭史、中村悠城、木田圭亮、飯利太郎、松本直樹
2. 発表標題 出生前グルココルチコイド投与におけるラット胎仔肝臓の成熟並びに細胞増殖への影響
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武半優子、中村悠城、小林司、大滝正訓、太田有紀、木田圭亮、桜井研三、長田洋資、渡辺実、飯利太郎、松本直樹
2. 発表標題 出生前グルココルチコイド投与におけるラット心外膜の心筋細胞増殖に関わるYapの役割
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術集会
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
研究分担者	武半 優子 (Takeba Yuko) (50367348)	聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授 (32713)	
研究分担者	小林 司 (Kobayashi Tsukasa) (20822589)	聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員 (32713)	

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
---------	---------