

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22707

研究課題名(和文) 心筋再生治療のための心筋細胞脱分化におけるマイトファジーの意義の解明

研究課題名(英文) Elucidating the significance of mitophagy in cardiomyocyte dedifferentiation for cardiac regeneration therapy

研究代表者

田中 翔大 (Tanaka, Shota)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：80880294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：マイトファジーが心筋細胞の増殖を促進するのかを明らかにするべく検討を行った。その結果、培養新生児ラット心筋細胞(NRCM)にマイトファジー促進因子PINK1を過剰発現させたところ、対照であるLuciferase過剰発現群と比較して、細胞周期マーカーを発現する細胞の割合が増加することを見出した。また、PINK1を過剰発現させたNRCMでは、細胞増殖促進因子であるIgf2 mRNAや心筋細胞の幼若性の指標であるMyh7/Myh6比が増加することを明らかにした。本検討結果は、PINK1がマイトファジーの活性化を介して心筋細胞の増殖を促進させる可能性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心疾患は一般的に予後不良であるが、これは心筋細胞の増殖能が極めて低く、傷害を受けた心筋組織が回復しないことに起因する。そのため、心疾患の根本的な治療を行うためには心筋細胞の増殖メカニズムの解明が求められる。本研究は、PINK1の過剰発現が心筋細胞の脱分化、ならびに細胞増殖を促進させる可能性を示した。今後、本研究をさらに発展させることにより、心疾患の新たな治療法の開発につながることを考えている。

研究成果の概要(英文)：Cardiac diseases are generally poor prognosis because cardiomyocytes rarely perform cell division and it is difficult to repair damaged heart. Therefore, to cure cardiac diseases completely, it is necessary to elucidate the mechanisms of cardiomyocytes proliferation. It remains unclear whether mitophagy promotes cardiomyocytes proliferation. PINK1 is a mitophagy promoting factor and the neonatal rat cardiomyocytes (NRCM) which induced PINK1 overexpression more expressed cell cycle markers compared with Luciferase overexpressing NRCM. Moreover, PINK1 overexpressing NRCM increased Igf2 mRNA, as a pro-proliferation factor, and Myh7/Myh6 ratio, as an immature cardiomyocytes indicator. This study suggests that PINK1 promotes cardiomyocytes proliferation through mitophagy activation.

研究分野：循環薬理学

キーワード：心筋再生 マイトファジー

1. 研究開始当初の背景

心疾患は一般的に不可逆的に進行するため、予後が悪いことが知られている。この最大の原因としては、心筋細胞の増殖能が極めて低く、損傷を受けた心臓組織が回復しないことが挙げられる。したがって、心疾患の根本的な治療を行うためには、心臓組織を再生させるために心筋細胞の増殖メカニズムを明らかにする必要がある。

成体哺乳類の心筋細胞がほとんど増殖能を持たないことに対して、ゼブラフィッシュなどの原始的な脊椎動物や生直後のげっ歯類の心筋細胞は高い増殖能を有していることが知られている。これらの増殖能を有する心筋細胞の共通点として、分化度が低いことが挙げられる。心筋細胞の成熟と細胞周期の停止には、エネルギー産生であるミトコンドリアの発達とそれに伴う酸化ストレスの増大が関わっていると考えられている。一方、ミトコンドリア選択的なオートファジーであるマイトファジーは機能低下したミトコンドリアを排除することで酸化ストレスを低減させる。

そこで、マイトファジーを活性化させることで、成体の心筋細胞の脱分化を誘導し、心筋細胞の増殖を促進させることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

マイトファジーが心筋細胞の脱分化、ならびに増殖を誘導するののかについて調べる。

3. 研究の方法

(1) 初代培養新生児ラット心筋細胞(NRCM)を用いた検討

生後 1-2 日後の Wistar 系ラットから心臓を摘出し、トリプシン・コラゲナーゼ混合液を用いて心筋細胞を単離し、培養を行った。単離・培養 24 時間後に培地交換を行うとともに、必要に応じてレンチウイルスベクターを処置した。各種解析は培養開始から 5 日後に行った。

(2) 免疫染色

細胞周期マーカーである抗 Ki67 抗体、抗 AuroraB 抗体、抗リン酸化 Histone H3 (pHH3) 抗体、ならびに心筋細胞マーカーである α -actinin 抗体を用いて免疫染色を行った。

(3) 遺伝子発現解析

リアルタイム PCR、ならびに RNA シークエンスにより遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

下記の成果については発表準備中のためデータは割愛する。

(1) PINK1 の過剰発現による細胞周期マーカー発現割合変化の解析

EF1 プロモーター下にミトファジー促進因子PINK1を過剰発現させるレンチウイルスを感染させた NRCM では、コントロールである Luciferase を過剰発現させたものと比較して、Ki67 陽性細胞割合が 4.5 倍に増加した。また、AuroraB と pHH3 の陽性細胞割合も PINK1 過剰発現群でそれぞれ有意な増加が認められた。一方で、PINK1 と協調して働くミトファジー促進因子 Parkin を過剰発現させた NRCM では、これらの細胞周期マーカーの発現割合の増加は認められなかった。

(2) PINK1 過剰発現 NRCM における遺伝子発現解析

PINK1 を過剰発現させた NRCM について RNA シークエンス解析を行った結果、Luciferase 過剰発現群と比較して、複数のサイクリン遺伝子(Ccna2、Ccnb1、Ccne1)が増加するとともに、細胞増殖を促進させることが知られている Igf2 の増加が認められた。この結果を受けてリアルタイム PCR を行ったところ、PINK1 過剰発現 NRCM において、Igf2 mRNA とともに、心筋細胞の未熟度の指標である Myh7/Myh6 比の増加が認められた。

(3) PINK1 の発現抑制条件における検討

PINK1 に対する shRNA (shPINK1)を発現するレンチウイルスベクターを用いて PINK1 の発現抑制条件での検討を行った。その結果、ある配列の shPINK1 を導入した NRCM では、shControl 群と比較して、Ki67 陽性細胞割合の減少、および Igf2 mRNA と Myh7/Myh6 比の減少が認められた。しかし別の配列の shPINK1 では同様の結果が得られなかったため、さらなる検討が必要である。

(4) 心筋特異的 PINK1 過剰発現レンチウイルスベクターを用いた検討

NRCM を単離する際、線維芽細胞を完全に除くことは不可能であり、混入した線維芽細胞が解析のノイズになってしまう。そこで線維芽細胞に対する遺伝子導入の影響を排除するために、心筋細胞特異的に遺伝子を発現させるレンチウイルスベクターを作製して解析を行った。まず心筋トロポニン(cTNT)プロモーター下に、緑色蛍光タンパクである Venus を発現するレンチウイルスベクターを作製し、抗 α -actinin 抗体を用いた免疫染色を行った結果、Venus を発現する細胞はほぼ全て NRCM である結果が得られた。次に cTNT プロモーター下に PINK1 を過剰発現するレンチウイルスベクターを用いて検討を行った結果、Luciferase 過剰発現群と比較して、Ki67 陽性細胞割合が増加していた。

以上の結果から、PINK1 を過剰発現させた NRCM は、細胞増殖が亢進することを見出した。さらにそのメカニズムの一端に、IGF2 の発現増加や心筋細胞の成熟の抑制が関わっている可能性が示された。今後はさらに詳細なメカニズムの解明を行うとともに、遺伝子改変動物等を用いて実際に心疾患の治療につなげることができるのかについて検討を行っていく予定である。

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

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