

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号	10101
研究種目	挑戦的萌芽研究
研究期間	2012～2012
課題番号	24650245
研究課題名（和文）	心筋細胞増殖能喪失の個体発生と系統発生：遺伝子発現正帰還制御ループの進化論
研究課題名（英文）	Ontogenetic and phylogenetic mechanisms involved in the loss of proliferation activity in mammalian cardiomyocytes after birth.
研究代表者	
	河原 剛一（KAWAHARA KOICHI）
	北海道大学・名誉教授
	研究者番号：20125397

研究成果の概要（和文）：一般的に我々ヒトを含む哺乳動物の心筋細胞は終末分化細胞と考えられ、生まれた直後に分裂能を失い、出生後は増殖しないものとして理解されてきた。そこで本研究では、心筋再生能を有しているイモリおよび生後心筋再生能を喪失しているラット心筋細胞を実験対象として、ヒトを含む哺乳類における心筋再生能喪失メカニズムを、個体発生学および系統発生学的観点から解明することを目的とし、研究を実施した。その結果、イモリでは心筋損傷によって周囲残存心筋の増殖能を増加させる何らかの因子が放出されており、その因子は系統発生学的に保存されていること、その因子が哺乳動物心筋の生後分裂能喪失に関与している ROS-p38 MAPK 活性化-Cx43 発現の正帰還制御ループを開放することでラット心筋細胞の増殖能を亢進させる可能性を明らかに出来た。

研究成果の概要（英文）：Shortly after birth, mammalian cardiomyocytes irreversibly exit from the cell cycle and become terminally differentiated. In contrast, a newt's heart can be completely repaired and the organ's function can be completely restored following damage. The genetic cues for the irreversible exit from the cell cycle in mammalian cardiomyocytes soon after birth remain largely unknown. This study aims at elucidating ontogenetic and phylogenetic mechanisms involved in the loss of proliferation activity in mammalian cardiomyocytes soon after birth. To investigate the causes underlying the lack of proliferation activity in mammalian cardiomyocytes, I examined the effect of an extract derived from newt regenerating hearts on terminally differentiated rat cardiomyocytes. This study has demonstrated that the exposure of rat cardiomyocytes to the protein extract derived from newt regenerating hearts resulted in an increase in the proliferation activity of rat cardiomyocytes, suggesting that the unknown protein(s) involved in the newt extract possibly opened a positive-feedback loop of ROS-p38 MAPK-Cx43 contributing to the loss of proliferation activity in mammalian cardiomyocytes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：細胞情報工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：心筋細胞増殖，イモリ心筋，ラット心筋，正帰還制御ループ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢化, 生活習慣の変化などにより, 虚血性心疾患による心不全患者が増加している。重症患者は薬物療法で効果がない場合, 治療法としては心臓移植しかないのが現状である。わが国においても臓器移植が開始されたが, ドナー数は不足しており, また, 患者と異なるドナーの臓器を移植するために拒絶反応の問題が生じる。したがって, 今後臓器移植が一般的な治療法として確立されていくかどうかは疑問である。そこで今までとは異なる新しい心不全の治療法の開発が望まれる。

(2) 一般的に我々ヒトを含む哺乳動物の心筋細胞は終末分化細胞と考えられ, 生まれた直後に分裂能を失い, 出生後は増殖しないものとして理解されてきた。したがって心筋梗塞や拡張型心筋症によって心筋細胞に壊死が起こった場合, 心筋細胞は再生されずに心不全になって死亡する。成人の心筋細胞が生後の分化によって, 細胞周期から抜け出して分裂能を喪失するメカニズムは, これまでにも, その重要性から, 様々な観点から膨大な研究が行われてきたが, 未だ「謎」として残されている。心筋の分化過程において, 胎児心筋細胞は分裂能を維持しているが, 出生後胎児型から成人型へと遺伝子発現パターンが変化し, 分裂能を喪失する。しかし, いったん終末分化した成人・心筋細胞は虚血などの様々な細胞ストレスによって脱分化 (dedifferentiation) を起こし, 胎児型タンパクを再発現して肥大化するが, 細胞分裂はしない (Komuro et al. *Annu. Rev. Physiol.* 1993)。このとき心筋細胞の多くは, 細胞周期に再突入 (reentry) することが知られており, DNA の複製, そして核分裂 (karyokinesis) を起こして多核化 (polyploid) する 경우가多い (Meckert et al. *Cardiovasc. Res.* 2005) が, 細胞質分裂 (cytokinesis) はほとんど認められない。ヒトを含む哺乳動物の出生後における心筋細胞の増殖能喪失のメカニズムは, 自己心筋を利用した究極のヒト心筋再生療法の開発において, 解決すべき本源的な問題である。

## 2. 研究の目的

本研究では, 心筋再生能を有しているイモリおよび生後心筋再生能を喪失しているラット心筋細胞を実験対象として, ヒトを含む哺乳類における心筋再生能喪失メカニズムを, 個体発生学および系統発生学的観点から解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

実験には, 両生類であるイモリ, および哺乳類である新生ラットの心筋細胞を実験対象とし, 以下に述べる実験計画・方法によって実験を行った。

(1) イモリ心筋損傷・再生組織の extracts を, ラット心筋細胞培養系に付加し, 心筋細胞増殖能の変化を解析する。増殖能の変化は, 心筋細胞数, PCNA など細胞周期に関連したタンパクの発現を解析することで評価する。Control として, 正常心筋組織の extracts を加えた系と比較する。

(2) イモリ心筋損傷・再生組織の extracts を, 自発的に周期的な拍動を示すラット心筋細胞培養系に付加し, 拍動リズムのゆらぎの変化を解析する。

(3) イモリ心筋損傷・再生組織の extracts を付加したことによって, ラット心筋細胞における主要なギャップ結合タンパクである Cx43 の発現の変化を解析し, Cx43 発現と拍動リズムゆらぎ変化との因果関係を明らかにする。

## 4. 研究成果

本研究で得られた研究成果は, 以下のよう

にまとめられる。

(1) イモリ心筋損傷・再生組織の extracts をラット心筋細胞培養系に付加し, 心筋細胞増殖能の変化を解析した結果, 細胞内活性酸素種 (ROS) 生成が抑制され, p38 MAPK 活性も抑制された。また, 細胞増殖のマーカータンパクである PCNA の核内発現が上昇した。

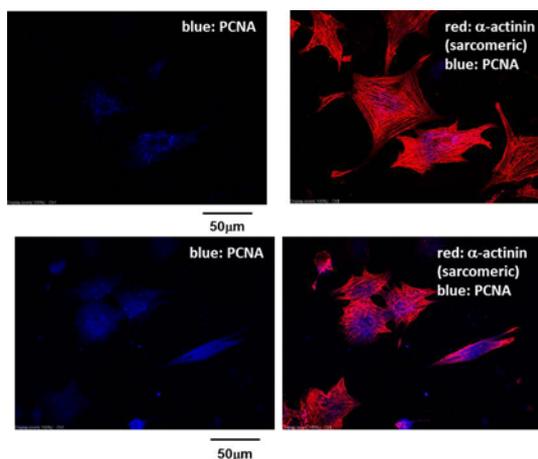


図1. イモリ心筋損傷・再生組織の extracts 付加によるラット心筋細胞における PCNA の核内発現 (上図: Control; 下図: extract 付加)

- (2) イモリ心筋損傷・再生組織の extracts をラット心筋細胞培養系に付加したところ、心筋細胞の自発的な拍動リズムのゆらぎ（拍動周期の変動係数で評価）が増加した。また心筋細胞内ギャップ結合タンパクである Cx43 発現も減少した。

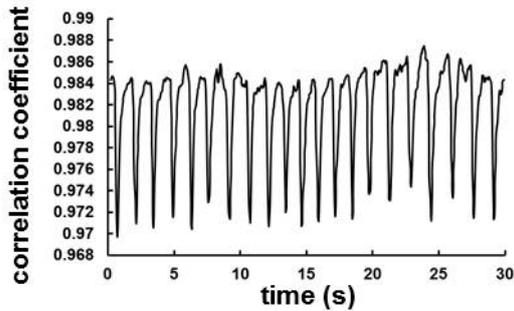


図 2. ラット心筋細胞拍動時系列 (control)

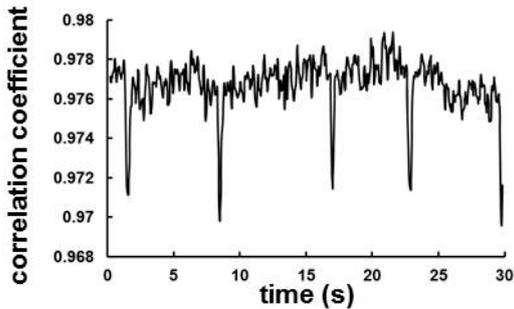


図 3. ラット心筋細胞拍動時系列 (extract 付加)

- (3) 以上の結果から、イモリでは心筋損傷によって周囲残存心筋の増殖能を増加させる何らかの因子が放出されており、その因子は系統発生的に保存されていること、その因子が哺乳動物心筋の生後分裂能喪失に関与している ROS-p38 MAPK 活性化-Cx43 発現の正帰還制御ループを開放することでラット心筋細胞の増殖能を亢進させる可能性を明らかにした。イモリ心筋損傷・再生組織の extracts に含まれる、増殖能増加に関与している鍵分子の解明が今後に残された課題である。

#### p-p38/p38

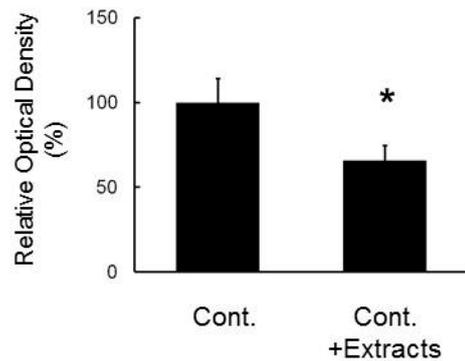


図 4. イモリ心筋損傷・再生組織の extracts 付加によるラット心筋細胞 p38 MAPK 活性の抑制

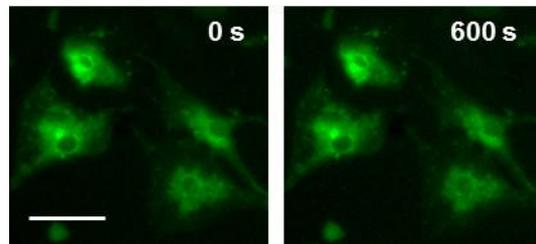


図 5. イモリ心筋損傷・再生組織の extracts 付加によるラット心筋細胞内活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) 生成の抑制 (Control) H<sub>2</sub>DCF-DA 蛍光強度不変

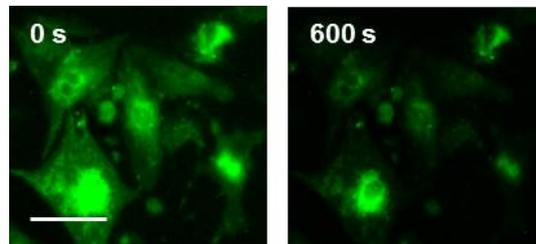


図 6. イモリ心筋損傷・再生組織の extracts 付加によるラット心筋細胞内活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) 生成の抑制 (Extract 付加) H<sub>2</sub>DCF-DA 蛍光強度が Extract の付加で減少

#### 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 1 件)

- ① Iwabuchi, S., Watanabe, T. and Kawahara, K., Spatio-temporal spread of neuronal death after focal photolysis of caged glutamate in neuron/astrocyte co-cultures. Neurochemistry

International, 62:1020-1027, 2013.  
DOI:10.1016/j.neuint.2013.03.010

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① Kawahara, K., Kunugi, S, Matsuyama, D. and Iwabuchi, S., Negative-feedback regulation of ATP release during ischemia in cardiac myocytes., World Congress on Medical Physics & Biomedical Engineering, 2012 年 5 月 28 日, Beijing (China), Beijing International Conference Center.

〔図書〕（計 1 件）

- ① Kawahara, K., Kunugi, S, Matsuyama, D. and Iwabuchi, S., Negative-feedback regulation of ATP release during ischemia in cardiac myocytes. In: Proceedings of the IFMBE 39, Long, M. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp.2196-2199, 2012.

〔その他〕

ホームページ等

<http://cell-c.ist.hokudai.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河原 剛一 (KAWAHARA KOICHI)

北海道大学・名誉教授

研究者番号：20125397