

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293054

研究課題名(和文) 心筋組織修復における細胞動態の解明と新規治療標的の探索

研究課題名(英文) The molecular and cellular mechanism of myocardial repair/regeneration

研究代表者

藤尾 慈 (FUJIO, Yasushi)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20359839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の心筋細胞は生直後に増殖能を大きく失うことから、心臓は再生能が低い臓器とされている。しかし、心筋炎の臨床症例の多くは心機能が回復することから、哺乳類成体心臓においても何らかの修復・再生機構が存在する可能性を着想した。本研究では、マウス実験的自己免疫性心筋炎(EAM)モデルを用いて、EAMからの回復過程において心筋細胞が発現するタンパク質の変化という定性的観点と、心筋細胞数の変化という定量観点から、心臓の修復再生能を検討した。その結果、定性的には細胞骨格タンパク質であるモエシンの発現が増強され細胞が形態変化を起こすこと、定量的には従来信じられていた以上に心筋細胞が増殖することを見出した。

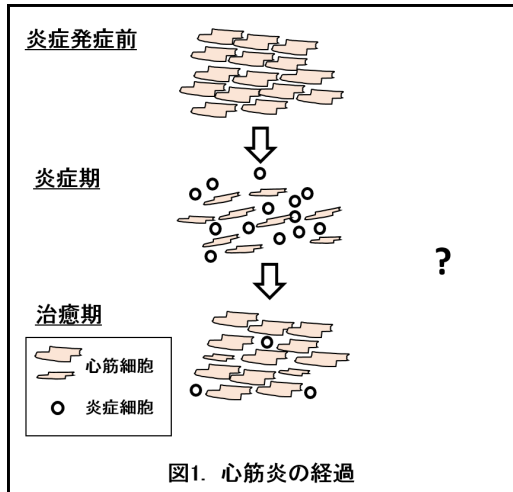
研究成果の概要(英文)：As mammalian cardiomyocytes substantially cease to proliferate immediately after birth, it has been believed that adult mammalian hearts show only limited regenerative capacities. However, clinically, most cases of acute myocarditis are self-limiting with myocardial recovery. Thus, we hypothesized that adult cardiomyocytes might restore regenerative activities during the healing process of myocarditis. In this study, using experimental autoimmune myocarditis (EAM) model, we addressed this hypothesis from two viewpoints; One is phenotypic modulation of cardiomyocytes and the other is cardiomyocyte proliferation. As for phenotypic modulation, proteomics analysis revealed that the expression of moesin, a cytoskeletal protein, was upregulated in cardiomyocytes, leading to the protrusion formation. As for cell proliferation, we detected cell cycle marker-positive cardiomyocytes at the beginning of the myocardial recovery, proposing the unexpected adult cardiomyocyte proliferation.

研究分野：循環薬理学

キーワード：心臓 組織修復・再生 心筋細胞増殖 細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の心筋細胞は生直後に実質的に分裂能を失うため、心臓は修復・再生能が低い臓器と考えられてきた。しかしながら、臨床において、ウイルス性心筋炎の症例の多くは、一旦は心機能が低下しても回復することを考えると、心筋炎の回復期には、心筋細胞が何らかの修復・再生能を発揮しているものと考えられるが、詳細は不明である(図1)。



2. 研究の目的

本研究では、マウス実験的自己免疫性心筋炎(EAM)モデルを用いて、心筋炎により傷害を受けた心筋組織が回復するメカニズムを解明することを目的とした。特に、

- (1) 心筋細胞の形質の変化
 - (2) 心筋細胞数の変化
- という2点から検討を行った。

3. 研究の方法

EAMは、雄性BALB/cマウスをミオシン重鎖ペプチドで1週間間隔で2回免疫することで誘導した。

(1) 心筋細胞の形質の変化

プロテオミクス解析

EAM発症前、炎症期における心臓から心筋細胞を調整し、ショットガンプロテオミクスにより、発現しているタンパク質の差異を検討した。

アデノウイルスベクターの作製

モエシンおよびその変異体のcDNAをpACCMVpLpAベクターにクローニングした。それらのベクターをpJM17ベクターとともにA293細胞にコトランスフェクションし、homologous recombinationを起こさせた。産生されたアデノウイルスをクローニング後増殖させ、CsCl存在下超遠心により精製した。

(2) 心筋細胞数の変化

遺伝子改変マウスを用いた実験では、いずれもBALB/cマウスに8代以上バッククロスして用いた。

細胞周期マーカーの解析

細胞増殖マーカーとしてKi-67、S期マ-

ーカーとしてBrdU取り込み、M期マーカーとしてAurora Bを用いた。

Cell fate mapping

-Myosin heavy chain (MHC)-MerCreMerマウスとRosa26-STOP-eYFPとのダブルトランスジェニックマウスを作製し、タモキシフェンを投与することにより既存の心筋細胞をラベルした。その後、EAMを誘導して、心筋細胞のcell fateを追跡した。

STAT3 CKOマウスの作製

-MHC-MerCreMer x STAT3 flox/floxマウスにタモキシフェンを投与し、心筋特異的なSTAT3 CKOマウスを作製した。

4. 研究成果

(1) 心筋細胞の形質の変化

組織学的検討からEAMの炎症期では、心筋細胞がprotrusion構造を示すことが明らかになった。protrusion構造は、組織再生に関連しているとの報告があり、EAMの炎症期には、炎症による傷害からの修復・再生が始まっているものと考えられた。

EAM炎症期のマウスとコントロールマウスの心臓から心筋細胞を調整し、ショットガンプロテオミクスを行った。その結果、炎症期の心筋細胞では、細胞骨格タンパク質群の発現が増強していることが明らかになった。そこで、発現増強している細胞骨格タンパク質群の中で、最も発現増強が顕著なモエシンに注目した。

モエシンはリン酸化により活性化することが知られていることから、リン酸化特異的抗体を用いて検討したところ、EAM炎症期の心筋細胞では、総モエシンのみならず、リン酸化モエシンのタンパク量が増加していることが明らかになった。

モエシンの局在を組織化学的に検討したところ、EAM炎症期において心筋細胞のprotrusion構造に局在していることが明らかになった。

野生型モエシン、活性型モエシン、不活性型モエシンを発現するアデノウイルスベクターを作製し、ラット培養心筋細胞に感染させたところ、野生型および活性型モエシンを過剰発現した心筋細胞でprotrusion構造が形成されたが、不活性型では形態変化は生じなかった。

【小括】EAMによる組織傷害から回復期において、心筋細胞では細胞骨格タンパク質群の発現増強が認められる。中でも、モエシンは、組織再生に重要とされているprotrusion構造の形成を担っている。

(2) 心筋細胞数の変化

EAMの発症前から、炎症期、治癒期にかけて、光学顕微鏡上、単位面積あたりの細胞数を計測したところ、細胞数は炎症期に一旦減少するものの、治癒期では回復した。また、TUNEL染色により、炎症期にはTUNEL陽性の心筋細胞が出現することが明らかになり、発

症前から炎症期にかけての細胞数減少を裏付ける結果となった。

炎症期において、各種細胞周期マーカー陽性細胞の頻度を検討した。その結果、何れのマーカーに関しても、炎症期に陽性細胞の頻度が上昇した(表1)。

	発症前	炎症期
Ki-67陽性	0.05 ± 0.04	3.09 ± 1.24
BrdU取込	0.05 ± 0.04	2.73 ± 0.93
Aurora B陽性	undetectable	0.94 ± 0.35

細胞周期マーカー陽性の増殖活性を有する心筋細胞の由来を明らかにするために、cell fate mapping を行った。その結果、細胞周期マーカー陽性の細胞は、pre-existing な心筋細胞由来であることが明らかになった。

心筋細胞増殖を担うシグナルを明らかにするために、心筋細胞増殖に関係するとの報告がある様々なシグナル伝達系が活性化されているかどうか検討した。その結果、ERK、Akt は活性化されていなかったが、STAT3 は活性化されていた。そこで、心筋特異的 STAT3 コンディショナルノックアウトマウス(STAT3CKO マウス)を作製、EAM を誘導してその修復過程を検討した。その結果、以下のことが明らかになった。

STAT3CKO マウスは、コントロールマウスと比してEAM 炎症による傷害からの回復に異常が生じた。

炎症期に細胞周期マーカー陽性心筋細胞の比率を検討したところ、STAT3CKO マウスで陽性細胞の比率が低下していた(表2)。

	fl/fl	STAT3CKO
Ki-67陽性	3.10 ± 0.91	1.80 ± 1.07
BrdU取込	3.50 ± 1.47	1.44 ± 0.58
Aurora B陽性	1.39 ± 1.14	0.41 ± 0.33

炎症期の STAT3CKO マウス由来の心筋細胞と野生型マウス由来の心筋細胞での発現遺伝子を比較したところ、STAT3CKO マウスでメタロチオネイン、クラスタリンの発現が低下していた。

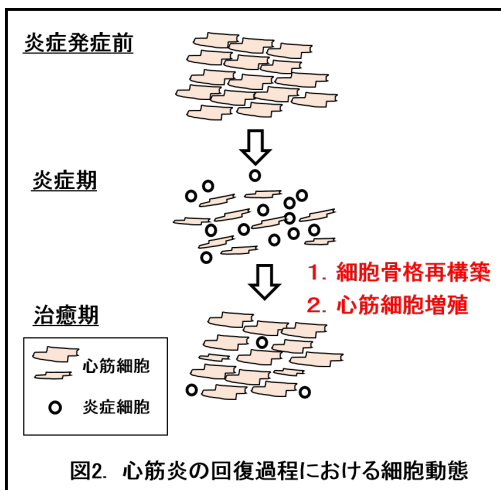
【小括】EAM からの回復期において、既存の心筋細胞がSTAT3 依存性に増殖することが示された。

【結論】実験的自己免疫性心筋炎モデルを用いて、心臓が炎症による傷害を受けてから回復する過程を検討した。その結果、心筋組織の回復過程で、

(1) 心筋細胞の細胞骨格に再構築がおこること

(2) 既存の心筋細胞が増殖することが明らかになった(図2)。これまで哺乳類成体において心筋細胞は、実質的には増殖しないとされていた。本研究結果は、哺乳類成体

の心筋細胞が EAM 炎症の環境下においては、再生・増殖能を回復することを示している。EAM で心筋細胞が増殖能を回復するメカニズムを明らかにすることで、既存の心筋細胞に増殖を開始させる新規再生医療技術が開発されると期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

1. Miyawaki, A., Obana, M., Mitsuhashi, Y., Orimoto, A., Nakayasu, Y., Yamashita, T., Fukada, S., Maeda, M., Nakayama, H., Fujio, Y. Adult murine cardiomyocytes exhibit regenerative activity with cell cycle reentry through STAT3 in the healing process of myocarditis. *Sci. Rep.* in press

2. Minamitani, T., Ma, Y., Zhou, H., Kida, H., Tsai, C.-Y., Obana, M., Okuzaki, D., Fujio, Y., Kumanogoh, A., Kikutani, H., Zhao, B., Kieff, E., Gewuz, B. E., Yasui, T. A mouse model of Epstein-Barr virus LMP1 and LMP2A driven germinal center B-cell lymphoproliferative disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* In press

3. Tonegawa, K., Otsuka, W., Kumagai, S., Matsunami, S., Hayamizu, N., Tanaka, S., Moriwaki, K., Obana, M., Maeda, M., Asahi, M., Kiyonari, H., Fujio, Y., Nakayama, H. Caveolae-specific activation loop between CaMKII and L-type Ca²⁺ channel aggravates cardiac hypertrophy in 1 adrenergic stimulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2017; 312:H501-514

4. Morihara, H., Yamamoto, T., Oiwa, H., Tonegawa, K., Tsuchiyama, D., Kawakatsu, I., Obana, M., Maeda, M., Mohri, T., Obika, S., Fujio, Y., Nakayama, H. Phospholamban inhibition by a single dose administration of locked nucleic acid antisense oligonucleotide improves cardiac contractility in pressure overload-induced systolic dysfunction in mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* In press

5. Kumagai, S., Nakayama, H., Fujiimoto, M., Honda, H., Serada, S., Ishibashi-Ueda,

H., Kasai, A., Obana, M., Sawa, Y., Fujio, Y., Naka, T. Myeloid cell-derived LRG attenuates adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 2016; 109: 272-282

6. Nakagawa, M., Owada Y., Izumi, Y., Nonin, S., Sugioka, K., Nakatani, D., Iwata, S., Mizutani, K., Nishimura, S., It, A., Fujita, S., Daimon, T., Sawa, Y., Asakura, M., Maeda, M., Fujio, Y., Yoshiyama, M. Four cases of investigational therapy with interleukin-11 against acute myocardial infarction. *Heart and Vessels* 2016; 31:1574-1578

7. Miyawaki, A., Mitsuhashi, Y., Orimoto, A., Nakayasu, Y., Tsunoda, S-I., Obana, M., Maeda, M., Nakayama, H., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y., Fujio, Y. Moesin is activated in cardiomyocytes in experimental autoimmune myocarditis and mediates cytoskeletal reorganization with protrusion formation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2016; 311:H478-486.

8. Enomoto, D., Obana, M., Miyawaki, A., Maeda, M., Nakayama, H., Fujio, Y. Cardiac specific ablation of *STAT3* gene in subacute phase of myocardial infarction exacerbated cardiac remodeling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2015; 309: H471-480

9. Tanaka, T., Obana, M., Mohri, T., Maeda, M., Fujio, Y. Interleukin-27 induces the endothelial differentiation in Sca-1+ cardiac resident stem cells. *Cytokine* 2015; 75: 365-372

10. Kobayashi, M., Takemoto, Y., Norioka, N., Iguchi, Y., Shimada, K., Maeda, M., Morimura, M., Fujio, Y., Azuma, ., Yoshiyama, M., Hirohashi, K., Shuto, T. Vascular functional and morphological alteration in smokers during varenicline therapy. *Osaka City Med. J.* 2015; 61: 19-30

11. Matsuo, R., Morihara, H., Mohri, T., Murasawa, S., Takewaki, K., Nakayama, H., Maeda, M., Fujio, Y. The inhibition of N-glycosylation of glycoprotein 130 molecule abolishes STAT3 activation by IL-6 family cytokines in cultured cardiac myocytes. *PLoS One* 2014; 9: e111097.

[学会発表](計 31 件)

1. Enomoto, D., Obana, M., Matsumoto, K., Sakata, Y., Maeda, M., Nakayama, H., Fujio, Y. Heterozygous ablation of *ROR γ t* gene deteriorates adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. American Heart Association Scientific Sessions 2016 (2016. 11. 15) New Orleans. USA.

2. Ashizuka, M., Kumagai, S., Yanase, E., Obana, M., Maeda, M., Sakata, Y., Nakayama, H., Fujio, Y. Myeloid cell-specific Runx2 deficiency exacerbates adverse cardiac remodeling

after myocardial infarction. American Heart Association Scientific Sessions 2016 (2016. 11. 15) New Orleans. USA.

3. Tonegawa, K., Tanaka, S., Takahashi, M., Fuchigami, S., Obana, M., Maeda, M., Sakata, Y., Fujio, Y., Nakayama, H. Fibroblast-specific beta2 adrenergic receptor signaling regulates cardiac hypertrophy in mice. American Heart Association Scientific Sessions 2016 (2016. 11. 15) New Orleans. USA.

4. Miyawaki, A., Obana, M., Mitsuhashi, Y., Orimoto, A., Nakayasu, Y., Yamashita, T., Fukada, S., Maeda, M., Sakata, Y., Nakayama, H., Fujio, Y. Adult mammalian hearts restore intrinsic regenerative capacity through signal transducer and activator of transcription 3 in the resolution phase of myocarditis. American Heart Association Scientific Sessions 2016 (2016. 11. 15) New Orleans. USA.

5. 藤尾 慈、前田真貴子、大門貴志、中谷大作、杉岡憲一、岩田真一、澤芳樹、朝倉正紀、泉康雄、葭山稔 急性心筋梗塞に対するヒト IL-11 製剤を用いた心筋保護治療 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月 15 日 ~ 17 日 長崎県長崎市

6. 横山由加里 松本浩太郎 木下真希 尾花理徳 前田真貴子 中山博之 藤尾 慈 eIF4B は、Pim-1 キナーゼの下流における心筋細胞保護因子である 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月 15 日 ~ 17 日 長崎県長崎市

7. 榎本大智 尾花理徳 松本浩太郎 前田真貴子 中山博之 藤尾慈 ROR γ t のヘテロ欠損は心筋梗塞後の心筋リモデリングを悪化させる 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月 15 日 ~ 17 日 長崎県長崎市

8. 芦塚萌 熊谷渉平 柳瀬絵美子 松本浩太郎 尾花理徳 前田真貴子 中山博之 藤尾慈 骨髓細胞特異的 Runx2 の欠損は心筋梗塞後の心筋リモデリングを悪化させる 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月 15 日 ~ 17 日 長崎県長崎市

9. 密原佑介 宮脇昭光 折本彩 中安祐介 角田慎一 尾花理徳 前田真貴子 中山博之 吉岡靖雄 堤康央 藤尾慈 Moesin は実験的自己免疫性心筋炎モデルにおいて活性化し、仮足形成を伴う組織修復に關与する 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月 15 日 ~ 17 日 長崎県長崎市

10. Kumagai, S. Nakayama, H., Fujiomoto, M., Honda, H., Serada, S., Kasai, A. Obana, M., Sakata, Y., Sawa, Y., Naka, T., Fujio, Y. Myeloid cell derived Leucine Rich Glycoprotein attenuates adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. American Heart Association Scientific Sessions 2015 (2015. 11. 7-11) Orlando, USA.

11. Matsumoto, K., Obana, M., Hashizume, R., Yokoyama, Y., Miyagawa, S., Mohri T.,

Maeda, M., Sakata, Y., Nakayama, H., Sawa, Y., Fujio, Y. Blockade of NKG2D/NKG2D ligands interaction attenuated cardiac remodeling after myocardial infarction. American Heart Association Scientific Sessions 2015 (2015. 11. 7-11) Orlando, USA.

12. Enomoto, D., Obana, M., Miyawaki, A., Maeda, M., Nakayama, H., Fujio, Y. Cardiac STAT3 activation in subacute phase of myocardial infarction was required for the suppression of adverse cardiac remodeling. American Heart Association Scientific Sessions 2015 (2015. 11. 7-11) Orlando, USA.

13. Tonegawa, K., Nakayama, H., Igarashi, H., Matsunami, S., Hayamizu, N., Obana, M., Maeda, M., Sakata, Y., Fujio, Y. Adrenergic receptors 2 and 3 transduce differential signals in cardiac fibroblasts. American Heart Association Scientific Sessions 2015 (2015. 11. 7-11) Orlando, USA.

14. 藤尾 慈、前田真貴子、朝倉正紀、中谷大作、泉 康雄、葭山 稔 Gp130 サイトカインと心血管病 第1回国際心血管薬物療法学会日本部会 2015年6月20-21日 京都ハイアットリージェンシー京都

15. 藤尾 慈 個別化医療におけるゲノム薬理学の成果と課題 第21回国際個別化医療学会学術集会 2015年10月17日 大阪グランフロント大阪

16. 前田真貴子、藤尾 慈、大和田康子、藤井比佐子、大門貴志、中谷大作、朝倉正紀、泉 康雄、葭山 稔 血小板減少症治療薬IL-11から心筋保護薬IL-11へ 第36回日本臨床薬理学会学術総会 2015年12月9日-12月11日 東京 京王プラザホテル

17. 宮脇昭光、高家圭紀、密原佑介、山下朋美、尾花理徳、前田真貴子、中山博之、藤尾慈 心筋炎病態下におけるSTAT3を介した成体心筋細胞増殖 第89回日本薬理学会年会 2016年3月9日~11日 横浜 パシフィコ横浜 【特記事項】年会優秀発表賞受賞

18. 中山博之、熊谷渉平、尾花理徳、藤本穰、本田宏美、世良田聡、笠井淳司、仲 哲治、藤尾 慈 骨髄由来のLeucine Rich 2 Glycoprotein(LRG)は、心筋梗塞後リモデリングを抑制する 第25回日本循環薬理学会 2015年12月4日 奈良 東大寺総合文化センター

19. 榎本 大智、尾花 理徳、宮脇 昭光、毛利 友美、前田 真貴子、中山 博之、藤尾 慈 心筋梗塞慢性期における心筋特異的 STAT3の欠損は心筋リモデリングを悪化させる 第1回国際心血管薬物療法学会日本部会 2015年6月20-21日 京都 ハイアットリージェンシー京都

20. 熊谷渉平、松井一樹、尾花理徳、中山博之、藤尾 慈 心筋梗塞後リモデリングにおけるP2X7受容体の病態生理学的意義の検討 第1回国際心血管薬物療法学会日本部会 2015年6月20-21日 京都 ハイアットリージェンシー京都

21. 榎原正貴、松原由実、宮脇昭光、関谷有紀子、尾花理徳、前田真貴子、中山博之、藤尾 慈 心筋炎病態においてSca-1陽性心筋組織幹細胞は心保護の性質へと変化する 日本薬学会136回 2016年3月26日~29日 横浜 パシフィコ横浜

22. 大谷勇太、横山由加里、尾花理徳、前田真貴子、中山博之、藤尾 慈 Pim-1を介したSTAT3による新規細胞保護機構の解明 日本薬学会136回 2016年3月26日~29日 横浜 パシフィコ横浜

23. Nakayama, H., Kumagai, S., Matsunami, S., Hayamizu, N., Tonegawa, K., Otsuka, W., Fujio, Y. Caveolae-specific phosphorylation of L-type calcium channel b2a subunit exaggerates cardiac hypertrophic responses after a1 adrenergic stimulation in mice. Council on Basic Cardiovascular Sciences 2014. American Heart Association (2014.7.13-18) Las Vegas. USA.

24. Kumagai, S., Nakayama, H., Hayamizu, N., Matsunami, S., Otsuka, W., Sakata, Y., Fujio, Y. Caveolae-Specific Phosphorylation of L-type Calcium Channel 2a Subunit Exacerbates Cardiac Hypertrophy. American Heart Association Scientific Sessions 2014 (2014.11.15-19) Chicago. USA

25. 榎本 大智 尾花 理徳 宮脇 昭光 毛利 友美 前田 真貴子 中山 博之 藤尾 慈 心筋梗塞慢性期における心筋特異的 STAT3 の欠損は心筋リモデリングを悪化させる 生体機能と創薬シンポジウム 2014年8月28, 29日 大阪府東大阪市

26. 大谷 勇太 竹脇 佳那 宮本 香織 尾花 理徳 中山 博之 藤尾 慈 the overexpression of CD93 in myeloid cells attenuated the cardiac fibrosis after myocardial infarction 第18回日本心不全学会学術集会 2014年10月10日,12日 大阪府大阪市

27. 松原由実 宮脇昭光 榎原正貴 尾花理徳 前田真貴子 中山博之 藤尾 慈 The properties of cardiac Sca-1+ resident stem cells are altered in response to myocardial inflammation. 第88回日本薬理学会年会 2015年3月18日~20日 愛知県名古屋市

28. 五十嵐裕美 中山博之 松浪佐知 早水菜穂 舎川洸太 尾花理徳 前田真貴子 藤尾 慈 Adrenergic receptors 2 and 3 transduce differential signals in cardiac fibroblasts. 第88回日本薬理学会年会 2015年3月18日~20日 愛知県名古屋市

29. 古谷知佳 宮脇昭光 大谷勇太 尾花理徳 前田真貴子 中山博之 藤尾 慈 IL-27 negatively regulates murine experimental autoimmune myocarditis (EAM). 第88回日本薬理学会年会 2015年3月18日~20日 愛知県名古屋市

30. 田中智大 尾花理徳 前田真貴子 中山博之 藤尾 慈 Interleukin 27 induces endothelial differentiation in murine cardiac stem cells. 第88回日本薬理学会年会 2015年3月18日~20日 愛知県名古屋市

31. 熊谷渉平 松井一樹 中山博之 尾花理徳 藤尾 慈 P2X7 受容体シグナルの阻害は心線維芽細胞の遊走を促進することにより、心筋梗塞後の心不全病態を増悪させる 第88回日本薬理学会年会 2015年3月18日~20日 愛知県名古屋市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b014/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤尾 慈 (FUJIO Yasushi)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：20359839

(2) 研究分担者

中山博之 (NAKAYAMA Hiroyuki)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：40581062