

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461128

研究課題名(和文) マウス単核心筋細胞に注目した心筋再生メカニズム解明への試み

研究課題名(英文) The effects of left ventricular unloading on cardiomyocyte regeneration

研究代表者

海野 一雅 (UNNO, Kazumasa)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40709119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類心筋細胞にも分裂能があると最近報告された。しかし、その詳細は不明であるため本研究ではそのメカニズムを検討した。

上行大動脈結紮モデルを作成し、更に圧除去モデルとして結紮解除も行い、心筋細胞分裂を観察した。心筋分裂マーカーを用いた観察では、すべての心筋細胞ではなく、比較的小型の単核心筋細胞が有意に多く分裂マーカーが陽性となった。さらに遠隔期にそれらの細胞は成熟心筋へと分化した。遺伝子発現解析でも、単核心筋細胞のみが心筋分裂能を有していることがわかった。圧解除によりその頻度は増加した。以上より、単核心筋細胞は外的なストレスにより分裂・分化する心筋前駆細胞としての機能を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Over the last decade, increasing evidence has suggested that the adult mammalian heart exhibits regenerative capacity due to proliferation of existing cardiomyocytes. It is unclear, however, if external stress may reactivate or upregulate the endogenous cardiac regenerative capacity. Acute left ventricle pressure overload was produced by constriction of ascending aorta (AAC) in adult mouse hearts. One week following AAC, ventricular afterload was normalized in a subset of animal through removal of the aortic constriction (de-AAC). Interestingly, acute decrease in ventricular overload with de-AAC was marked by an increase in cardiomyocyte proliferation. Those cardiomyocytes positive for thymidine analog labeling were characteristic of newly generated cardiomyocytes, with smaller size and single diploid nuclei. Moreover, newly generated cardiomyocytes were found to reside in close proximity to one another, consistent with regional stimulation of cellular proliferation.

研究分野：再生医療

キーワード：心筋細胞 細胞分裂 多倍体細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳類の心臓は再生しないと長い間考えられてきた。しかし、免疫組織学的手法 (*Circ.Res.*2010)、遺伝子改変技術による fate-mapping 法 (*Nat.Med.*2007)、放射同位元素の解析を利用した C^{14} dating 法 (*Science* 2009) などの新しい技術を用いた研究は、心臓も再性能を有する臓器であることを示唆している。このような内因性心筋再生のメカニズムを明らかにすることは、単なる生物学的な好奇心を充足するのみならず、より生理的で効率的な心筋再生医療を実現するという意味で、社会的に大きな意義をもつと思われる。

現在、哺乳類の成体心筋の再生機構については、心筋幹細胞が存在し、それらが分化・誘導され新生心筋を形成するとするものと、魚類や両性類及び新生児マウスがそうであるように、あらかじめ存在する心筋細胞が分裂するという考え方がある。最近の genetic fate-mapping 法を用いた報告では、心筋梗塞後に起こる心筋再生では後者、つまりあらかじめ存在する心筋細胞が分裂することにより新生心筋が作られると結論している (*Nature* 2013)。それでは、すべての心筋細胞が分裂能を有しているのだろうか。成体マウス心筋細胞の約 80%は二核細胞で、約 10%が単核細胞、残りの 10%が三核以上を持つ細胞である。また、マウス心筋細胞は neuregulin1 や FGF1 などのサイトカイン刺激により分裂することが報告されている (*Cell* 2009)、そのうち単核心筋細胞のみが分裂能を有するとされている。新生児マウスの心筋再生でもこの考え方があてはまる。つまり、生後一週間以内のマウス心筋はほとんどすべてが単核細胞であるが、それ以降になると多核化がおり、心筋自体も肥大していく。心臓が単核心筋細胞で構成される生後一週間は旺盛な心筋再生能を有することが心尖部切除実験で証明されている (*Science* 2011) ことから、単核心筋細胞であることは、心筋細胞の分裂・再性能の必要条件であるように見える。

しかし、これまでに単核心筋細胞に着目し、系統立てて研究された報告は無い。また、内因性心筋再生のメカニズムに関する研究も数報あるのみで、今後更なる検討を要する。

2. 研究の目的

単核心筋細胞に注目し、その違いを二核心筋細胞と分子レベルで比較することでその特性を浮き彫りにし、内因性心筋再生のメカニズムを明らかにすることである。具体的には、(1)遺伝子発現レベルとエピジェネティック修飾を網羅的に評価する、(2)可能性のある分子機構を絞り込み、実際に心筋再生を増強

するか心筋細胞を使ったスクリーニングをする、(3) *in vivo* 実験で心筋再生を証明することである。

3. 研究の方法

(1) 心臓左室圧負荷モデルを用いて心筋細胞のうち、どのような形状の心筋細胞が分裂能を有するのか検討する。具体的には thymidine analog を用いて分裂心筋細胞をラベルし、経時的な形態変化を観察する。

(2) genetic fate-mapping 法を用いて分裂心筋が、前駆細胞由来なのか、心筋細胞由来(心筋分裂による)であるのか検証する。

(3) 単核心筋細胞を核の数により分別し、それぞれの細胞の遺伝子発現解析を行う。

(4) 単核心筋細胞に特有な発現遺伝子を網羅的に NGS で解析する。

(5) 上記にて発見した遺伝子のレポーターマウスを作成し、より効率的に単核心筋細胞を収集できるマウスを作成する。

(6) 単核及び多核心筋細胞を大量に分別・収集し、エピゲノム解析などより複雑な解析を行い、単核心筋細胞の働きを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 上行大動脈結紮 (ascending aortic constriction : AAC) モデルを作成すると心筋細胞は肥大化するが、同時に小型の心筋細胞も増加した。これら小型の心筋細胞は thymidine analog の陽性率が高く、経時的に大型化することがわかった。さらに圧負荷を解除するとさらに thymidine analog 陽性細胞の割合が増加した(図 1)。このような小型

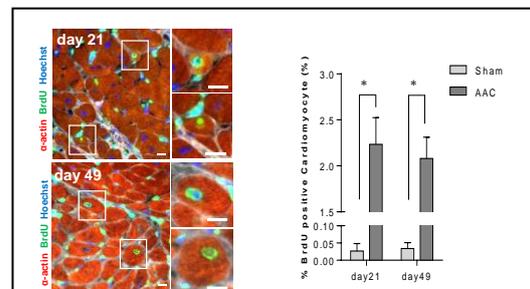


図 1

左室圧負荷により、心筋細胞分裂が誘発される。Sham 群に比べ約 50 倍の分裂マーカー陽性細胞がみられる。Thymidine analog が陽性の心筋細胞は、早期には小型であるが、時間とともに成熟心筋になる。

心筋細胞は AAC 作成後早期には単核細胞のであるが、経時的に多核細胞に変化した。

(2) また、genetic fate-mapping の結果からは、あらかじめ存在する心筋細胞が分裂したことが示唆された。さらに thymidine analog 陽性細胞は高頻度に互いに隣り合って存在していた(図 2)。これらの結果から、比較的小型の単核心筋細胞が圧負荷または圧除去という外的刺激に反応して分裂したことが

示唆された。

(3) 単核と多核心筋細胞をそれぞれ分離する方法も本研究期間内に幾つか試みた。まず、核染色の信号をもとに FACS ソーティングを

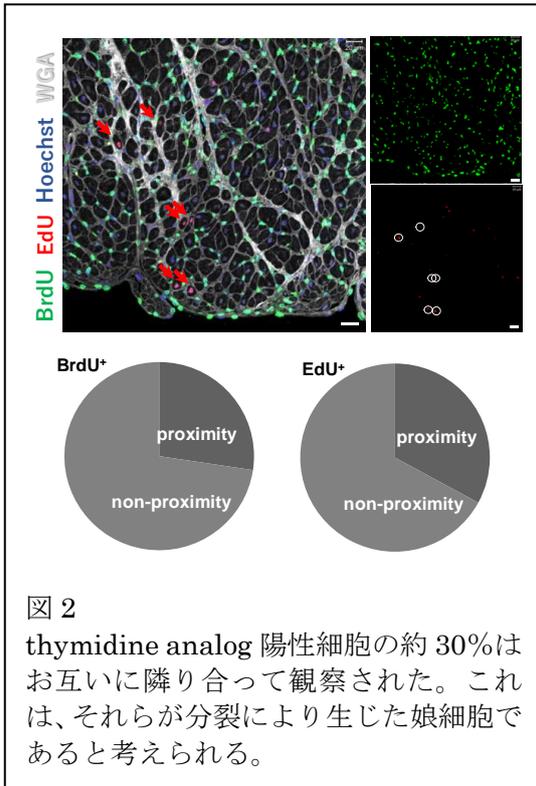


図 2
thymidine analog 陽性細胞の約 30%はお互いに隣り合って観察された。これは、それらが分裂により生じた娘細胞であると考えられる。

試みたが上手くいかず、マイクロガラス管とマニピレータを用い、直視下に細胞の分別を行った。この方法は顕微鏡を用いてマニュアルにて細胞を一つ一つすくい上げるので、約 100 細胞を採取するのが精一杯であったが、きれいに細胞を分別採取できた(図 3)。

(4) 採取細胞から RNA を抽出し、ランダムプライマーにて増幅した後、NGS にてシーケンスをおこなった。その結果、単核心筋細胞は多核心筋細胞に比べ、圧負荷ストレス後に分裂し、さらにサルコメア構成タンパク遺伝子の発現が有意に亢進していることが観察

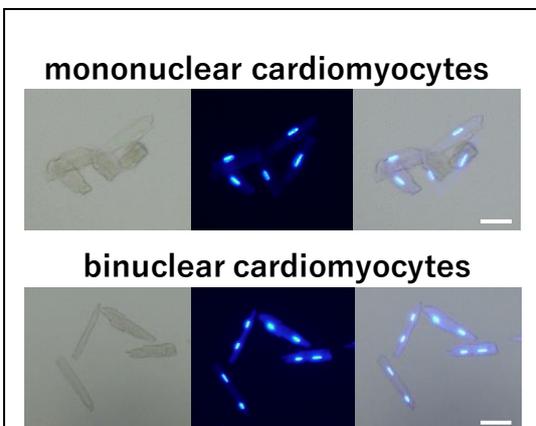


図 3
Hoechst による核染色し、核数により心筋細胞を分別した。

された(図 4)。

(5) 当初の予定では NGS データから単核心筋

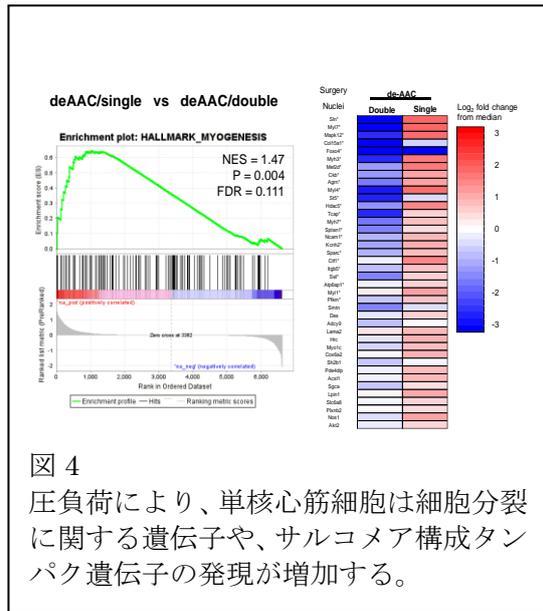


図 4
圧負荷により、単核心筋細胞は細胞分裂に関する遺伝子や、サルコメア構成タンパク遺伝子の発現が増加する。

細胞に特有の発現遺伝子を特定し、レポーターマウスを作成する予定であった。しかし、NGS データから、明らかにこの二つを分別できる可能性がある遺伝子の同定は困難であった。

(6) 直視下に収取できる心筋細胞は限られるので、増幅のプロセスを必要とするが、この方法だと測定誤差や感度が低下する。そこで、表面抗原の違いから、抗体および磁気ビーズを用いて収集する方法を検索した。その結果 ATP binding channel の一つが有意に一核細胞に発現していることを見出した。今後この方法を用いてより大量に細胞を分別することが可能になり、さらに複雑な検討を行っていきたい。

結果のまとめ

- 圧負荷に対し心筋細胞は肥大する一方で、心筋分裂も誘発される。
- 圧負荷解除によりさらなる心筋細胞分裂が誘発される。これは LVAD 患者に起こるとされている心筋新生の機序を研究するモデルとして使用できる。
- 心筋分裂が可能な心筋細胞は、小型で単核であるが、その後成熟多核心筋細胞に分化する。
- 単核心筋と多核心筋にそれぞれ特異的に発現する候補遺伝子を見出した。それらの中には未分化細胞が持つ表面マーカー遺伝子も含まれており、今後効率よく両者を区分できる可能性がある。

自己総括

今回の研究結果は、当初の計画を 100%満足させるものではなく、一部は途中経過を報告するのみとなっている。本研究の期間中に得た結果は、現在投稿中で、revise 実験もほぼ終了している。心筋再生を治療レベルまで

引き上げるには今後さらなる基礎データを
集積していく必要があり、今後も本研究の関
連研究を行っていきたい。

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 6 件)

1. Tsuda T, Takefuji M, Wettschureck N, Kotani K, Morimoto R, Okumura T, Kaur H, Eguchi S, Sakaguchi T, Ishihama S, Kikuchi R, Unno K, Matsushita K, Ishikawa S, Offermanns S and Murohara T. Corticotropin releasing hormone receptor 2 exacerbates chronic cardiac dysfunction. *J Exp Med.* 2017;214: 1877-1888. (査読あり)
2. Hayashida R, Kondo K, Morita S, Unno K, Shintani S, Shimizu Y, Calvert JW, Shibata R and Murohara T. Diallyl Trisulfide Augments Ischemia-Induced Angiogenesis via an Endothelial Nitric Oxide Synthase-Dependent Mechanism. *Circ J.* 2017;81:870-878. (査読あり)
3. Yang Y, Cheng HW, Qiu Y, Dupee D, Noonan M, Lin YD, Fisch S, Unno K, Sereti KI and Liao R. MicroRNA-34a Plays a Key Role in Cardiac Repair and Regeneration Following Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2015;117: 450-9. (査読あり)
4. Jiang H, Cheng XW, Shi GP, Hu L, Inoue A, Yamamura Y, Wu H, Takeshita K, Li X, Huang Z, Song H, Asai M, Hao CN, Unno K, Koike T, Oshida Y, Okumura K, Murohara T and Kuzuya M. Cathepsin K-mediated Notch1 activation contributes to neovascularization in response to hypoxia. *Nat Commun.* 2014;5:3838. (査読あり)
5. Hiremath P, Bauer M, Aguirre AD, Cheng HW, Unno K, Patel RB, Harvey BW, Chang WT, Groarke JD, Liao R and Cheng S. Identifying early changes in myocardial microstructure in hypertensive heart disease. *PLoS One.* 2014;9:e97424. (査読あり)
6. Hiremath P, Bauer M, Cheng HW, Unno K, Liao R and Cheng S. Ultrasonic assessment of myocardial microstructure. *J Vis Exp.* 2014:e50850. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

1. Fujikawa Y, Unno K, Murohara T. A Transient Up-regulation of *Aldh1a2*/RARs

/Wif-1 Axis Induces Cell-cycle Arrest in Neonatal Heart. BCBR 2018 Tokyo Japan
2. Yusuke Fujikawa, Kazumasa Unno, Shingo Narita, Ryo Hayashida, Kazuhisa Kondo, Mikito Takefuji, Toyoaki Murohara. A Transient Up-regulation of Retinoic Acid Signaling induces Cell-cycle Arrest in Neonatal Mammalian Heart. *AHA Annual Meeting 2017, Anaheim USA*

[図書] (計 2 件)

1. 「心筋細胞は分裂するのか？」
海野一雅、室原豊明、
循環器内科学 Vol.76/No.5, 2014, 516
(495-499), 科学評論社
2. 「心筋再生療法の現状と将来」
海野一雅、室原豊明
Annual Review 循環器 2014, 315(98-103)
中外医学社

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
海野 一雅 (UNNO, Kazumasa)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40709119

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし