

心筋細胞における多倍数体形成メカニズムの解明

海野一雅

名古屋大学医学部 循環器内科

【研究の背景】

最近の報告により、哺乳類の心臓も自己再性能を有することが示されたが、そのメカニズムは明らかにされていない。申請者が行ったマウスの左室圧負荷モデルを使った予備実験の結果は、心筋細胞のうち約 10%を占める単核心筋細胞が、分裂能および自己再性能を有し、二核以上の機能的な心筋細胞に分化する能力があることを示唆していた。

【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。

【方 法】

第一段階:分裂能、形態、生理学的機能の違いを検討する。

- 1) それぞれの心筋の分裂能について評価し、直接比較する(thymidine アナログを用い、サイトカイン刺激による分裂能を直接比較する)。
- 2) 心筋細胞内微小器官の形態的および分子生物学的違いについて経時的に評価する(電子顕微鏡を用いた微小器官の形態観察および、サルコメア構成タンパクやエネルギー代謝などに関係する遺伝子およびタンパク発現を検討する)。

第二段階:候補遺伝子のスクリーニングと絞込み。

- 1) 単核心筋細胞と多核心筋細胞に発現する分子をマイクロアレイにより網羅的に解析する。
- 2) 1)により候補遺伝子となった分子を培養単核心筋細胞において、siRNA により遺伝子欠損させ、単核心筋細胞の特徴である「増殖能」、「多核心筋細胞への成熟化」への影響を評価し、候補遺伝子を絞り込む。
- 3) 候補遺伝子をタンパク質として精製し、pull down assay 法により結合タンパク質を集め、質量分析法により結合タンパク質を同定する。

第三段階:遺伝子改変マウスの作成と生理機能変化についての解析。

- 1) **単核心筋細胞マウス:**単核心筋細胞から多核心筋細胞への成熟化に関係する遺伝子を心筋特異的にノックアウトする。標的遺伝子を遺伝子欠損させることにより単核心筋細胞が主な構成細胞となる心臓を作製し、単核心筋細胞の生体での機能を検討する。
- 2) **多核心筋細胞マウス:**単核心筋細胞特異的分子のプロモーター領域にジフテリアトキシン(DTA)遺伝子を導入し(Nature 2013)、1)とは逆に、単核心筋細胞を除去することにより多核心筋細胞マウスを作製する。単核心筋細胞欠損時の生理機能を解析し、単核心筋細胞の機能を検討する。

【結 果】

一核心筋細胞は、マウス成体心筋細胞の約 10%を占めており、多核心筋細胞と比較して、長径が短く小型の心筋細胞である。直視下に心筋細胞の核数により細胞を分別し、遺伝子発現を網羅的に解析すると、一核心筋細胞だけが外的ストレスにより、サルコメアタンパク関連遺伝子の発現が有意に上昇していた。また、PCNA 遺伝子などの分裂細胞に特徴的な遺伝

子群の発現の上昇が一核心筋細胞で観察された。

【考 察】

今回の我々が行った検討では、一核心筋細胞は心筋細胞でありながら心筋前駆細胞様の性質を有していることが確認された。つまり、圧負荷などの外的刺激が心臓に加わると、分裂細胞が有する遺伝子が発現し、またサルコメアタンパク遺伝子の発現が上昇する。心筋細胞はこれまで分裂能を有しないと考えられてきたが、一核心筋細胞は分裂能が保存されており、分裂後、機能心筋へ分化する能力があることが示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

心筋梗塞や心筋症では多くの心筋細胞が失われることにより、心機能が低下し心不全に至る。心筋再生治療は ES や iPS など心筋外細胞を用いる方法で臨床応用されようとしている。我々が検討している内因性心筋再生のメカニズムが明らかにできれば、その応用範囲は広いと考えられる。

【参考・引用文献】

Porrello, E. R. *et al.* Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* **331**, 1078–1080, doi:10.1126/science.1200708 (2011).

Patterson, M. *et al.* Frequency of mononuclear diploid cardiomyocytes underlies natural variation in heart regeneration. *Nat Genet* **49**, 1346–1353, doi:10.1038/ng.3929 (2017).