

心不全治療に向けた成熟心筋細胞の増殖制御の試み

平井希俊

関西医科大学 薬理学講座

【研究の背景】

生後しばらくすると、心筋細胞は細胞周期の休止期に入り、その後増殖しないため、一度傷害された心筋は再生されることがない。そのため、心筋梗塞・心不全といった心疾患に対する再生医療が待ち望まれている。iPS 細胞由来の心筋細胞の細胞移植がもっとも注目を浴びているが、これらの細胞は未熟で、成熟心筋細胞の形質とは異なる。本研究では、成熟心筋細胞の細胞増殖活性を活性化し、これまで不可能と考えられてきた成熟心筋細胞の増殖を誘導できないかどうかを検討した。

【目 的】

最近、ErbB 受容体を活性化することにより、成熟心筋細胞の増殖を誘導しうる可能性が示唆された。本研究では、ErbB 受容体を活性化させ、成熟心筋細胞の増殖を誘導できるかどうかを 1 細胞レベルで直接可視化することにより検証する。

【方 法】

マウスの心臓では ErbB 受容体が発現しているが、生後 10 日ほどでその発現は著明に減弱し、それと同時に細胞周期活性が消失する。そのため心筋細胞を増殖させたい時期に心筋細胞で ErbB2/4 受容体を発現させる必要がある。そこで、時空間特異的に ErbB 受容体の発現を誘導できるように、Rosa 遺伝子座に、loxP ではさまれた polyA 配列の後に ErbB 受容体の cDNA をノックインしたマウスを作製する。この際、cDNA の後にヒストン融合 mCherry の cDNA を置き、ErbB 受容体を過剰発現させた細胞では核が赤く光るようにする。

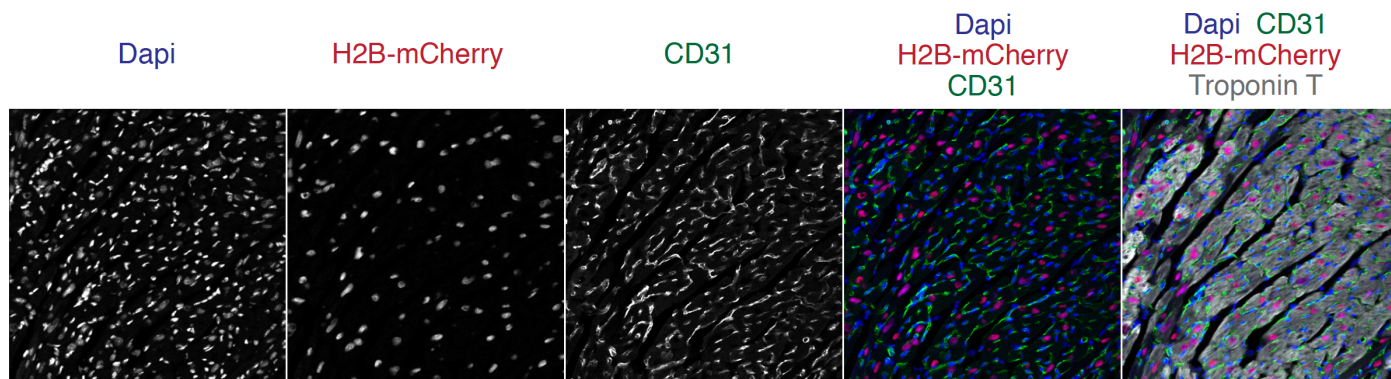
この ErbB ノックインマウスと、心筋細胞特異的に発現するトロポニンT遺伝子座に Cre-ERT2 をノックインしたマウスと掛け合わせ、8 週齢でタモキシフェンの投与により Cre を活性化させ、心筋細胞で ErbB2 受容体の過剰発現を誘導する。

【結 果】

まず、Rosa 遺伝子座に、loxP ではさまれたネオマイシン耐性遺伝子の cDNA および polyA 配列の後に ErbB 受容体の cDNA をノックインした ES 細胞を作成した。CMV プロモーターから目的の遺伝子の発現が駆動するように、Rosa 遺伝子座に内因性に存在する ncRNA の転写開始点をすべて除去した。また、予定外の領域での ErbB 受容体の過剰発現を避けるため、ネオマイシン耐性遺伝子の cDNA のあとに、bGH polyA 配列および、triplicate した SV40 polyA 配列を配置し、転写を確実に止まるように設計した。さらに、ErbB 受容体の cDNA の後に 2A 配列を置き、その後にヒストン融合 mCherry (H2B-mCherry) cDNA を置いて、ErbB 受容体を過剰発現させた細胞では核が赤く光るようにした。

ノックインするカセットが 9~10 kbp と非常に長いので、組換えのための homologous arm を左右それぞれ 2kb とし、ES 細胞には Crispr/Cas9 を用いてターゲティングを行った。リポフェクションにより遺伝子を導入し、32 クローンのうち 2 クローンは positive であった。この ES 細胞を 8 細胞期胚にインジェクションし、偽妊娠マウスの子宮内に移植、生まれてきたキメラから germline transmission を得ることに成功した。

トロポニン T-Cre とかけ合わせ、2ヶ月齢のマウスの心臓を採取し、凍結切片を作成、内皮細胞に発現する CD31、心筋細胞に特異的なトロポニン T の抗体を用いて、免疫蛍光染色を行った(下図)。ヒストン融合 mCherry が心筋細胞特異的に発現していることを確認した。つまり、トロポニン T-Cre が発現する心筋細胞のみで、ErbB 受容体と H2B-mCherry が強制発現するマウスの作製に成功したことを確認できた。もちろん内皮細胞に発現する Tie2-Cre とかけ合わせれば、内皮細胞特異的に ErbB 受容体を強制発現させることができるし、線維芽細胞に発現する PDGFRa-Cre とかけ合わせれば、線維芽細胞特異的に ErbB 受容体を強制発現させることができる。現在、心筋細胞で ErbB 受容体を強制発現させたマウスに EdU を用いて細胞周期活性の変化を検討中である。



(図)トロポニン T-Cre と ErbB コンディショナルノックインから得た心臓切片の免疫染色 (Dapi, CD31, Troponin-T) トロポニン T が発現する心筋細胞でのみ ErbB 受容体および H2B-mCherry が発現する。心臓の心筋細胞以外の線維芽細胞や内皮細胞では発現せず、心筋細胞でのみ発現するため、Dapi による核染色と比較し、H2B-mCherry でラベルされる核の数は少ない。

【考 察】

心筋細胞特異的に ErbB 受容体、およびヒストン融合 mCherry を強発現するマウスの作製に成功した。今後は、トロポニン T-Cre-ERT2 とかけ合わせて、タモキシフェンによりモザイクに transgene の発現を誘導し、ErbB 受容体を強発現している心筋細胞と強発現していない心筋細胞で細胞周期活性がどのように変化するかを EdU の取り込みにより検討する。成仔では細胞周期活性は完全にないため、まず新生仔期で検討し、増殖誘導活性の有無を決定する。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

心疾患に対する再生治療として、iPS 細胞由来の心筋細胞の細胞移植があるが、これらの細胞は未熟な細胞で、成熟心筋細胞と同様の機能を持っていない。本研究で示したように、ErbB 受容体の強発現により既存の心筋細胞の増殖を誘導できれば、周囲の細胞との結合も自然に形成され、心機能が改善することが期待できる。心疾患に対する非侵襲的な再生治療の選択肢に、新規軸を打ち出すことになるだろう。

【参考・引用文献】

“Tissue-Specific Cell Cycle Indicator Reveals Unexpected Findings for Cardiac Myocyte Proliferation.”

Hirai M, Chen J, Evans SM.

Circulation Research, Vol. 118, No. 1, 20-28: Jan 8, 2016