

細胞核の力学特性から迫る心筋細胞の分裂能喪失のメカニズム

氏原嘉洋

名古屋工業大学 大学院工学研究科

【研究の背景】

哺乳類の心筋細胞は、胎児期には活発に分裂するが、成体期ではほとんど分裂しないため、心臓の再生能力は著しく低い(Porrello et al, *Science*, 2011)。哺乳類の心筋細胞が分裂能を喪失するメカニズムの詳細は不明だが、幹細胞やマウスの胎仔心筋細胞の *in vitro* 研究の成果(Pajerowski et al, *PNAS*, 2007; Hashimoto et al, *Sci Rep*, 2018)に基づくと、心筋細胞は核の硬化によって分裂能を喪失した可能性がある。一方、哺乳類よりも進化的に先行して出現した両生類や魚類の心筋細胞は、哺乳類とは異なり、成長後も分裂することが知られている(Jopling et al, *Nature*, 2010)。しかしながら、これらの生物における心筋細胞の核の硬さに関する知見はほとんどない。

【目 的】

本研究では、核の硬化によって心筋細胞の分裂能が喪失したとの仮説を検証することを目的とし、両生類の中でも特に分裂能の高いアホロートル(ウーパールーパー)と分裂能を失った哺乳類の成体ラットの心筋細胞の核の力学特性を比較した。

【方 法】

本研究では、生後10週程度の成体ラット(分裂能喪失)と生後1年程度のアホロートル(分裂能あり)の心室心筋細胞から単離した細胞核を使用した。分裂能の高い細胞として、マウス悪性黒色腫細胞から単離した核も使用した。単離核の力学特性を計測するために、自作の細胞引張試験装置(Ujihara et al, *Cell Mol Bioeng*, 2021)を改良した。核の把持と引張は、ばね定数が高く核に変形を与えるための引張ニードルと、ばね定数が低く核への荷重を求めるための力感知用ニードルを3次元電動マイクロマニピュレータで操作することで行った。ひずみは引張前のニードル間距離でその変化量を除することで、荷重は力感知用ニードルのばね定数にたわみ量を乗算して求めた。大きさの異なる核の硬さを比較するため、核の断面積で荷重を除いて応力(単位断面積あたりの荷重)を求めた。硬さの指標として、小変形領域(ひずみ 0-0.3)と大変形領域(ひずみ 0.3-)の範囲における応力-ひずみ曲線を線形一次近似したときの傾き(縦弾性係数)を算出した。核の硬さを担うLamin A/Cとクロマチンを染色することで、核の硬さの違いを生み出す要因を検討した。

【結 果】

核の把持と引張用のガラスニードルの先端を1-3 μm に加工し、力感知ニードルのばね定数を低くすることで、nNオーダーの力を検出することに成功した。成体ラットの核の縦弾性係数は、大変形領域の方が小変形領域よりも有意に高かった。一方、アホロートルの核の縦弾性係数は、小変形領域と大変形領域で同程度であった。小変形領域と大変形領域のどちらにおいても、アホロートルの単離核の縦弾性係数は、成体ラットよりも有意に低く、その差は大変形領域でより顕著であった。分裂能が非常に高いマウス悪性黒色腫細胞の縦弾性係数は、アホロートルの単離核と同程度であった。アホロートルの核は、成体ラットよりもLamin A/Cの輝度値が低く、クロマチンの凝集度も低かった。

【考 察】

分裂能を有するアホロートルと分裂能を喪失した成体ラットの心筋細胞の単離核の引張試験結果に基づくと、分裂能を有する心筋細胞の核は、軟らかい可能性が示唆された。小変形領域にはクロマチンが、大変形領域には Lamin A/C が核の硬さに大きな影響を及ぼすと報告されている (Stephens et al, *Curr Opin Cell Biol*, 2019)。本研究で求めた縦弾性係数によると、アホロートルの核は、クロマチンも Lamin A/C も成体ラットよりも未発達であることが示唆された。このことは、クロマチンと Lamin A/C の観察結果でも裏付けされた。核は、内部の DNA を力学的なダメージから保護するために、力学負荷の増大によって硬化すると報告されている (Guilluy et al, *Nat Cell Biol*, 2014)。我々哺乳類は、高いポンプ機能を獲得したトレードオフとして、Lamin A/C の発現量増加やクロマチン凝集によって核を硬化させたことにより、進化の過程で分裂能を喪失したのではないかと考えている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

心不全パンデミックの到来が予想され、その対策は喫緊の課題である。重篤な心不全が致死的である最大の要因は、我々哺乳類の心筋細胞は生後間もなく分裂能を失うため、心臓に再生能がないことである。胎児期の心筋細胞は活発に分裂することから、成体心筋細胞を胎児化することで心臓再生を目指す研究が精力的に行われているが (Mohamed et al, *Cell*, 2018)、心筋細胞が分裂能を失うメカニズムの詳細は不明である。本研究の成果は、心筋細胞の分裂能喪失のメカニズム解明の一助となると考えられ、心臓の再生医療実現に貢献すると考えられる。今後は、異なる生物種の心筋細胞核や計測法を用いて核の硬さと分裂能の関係を明らかにしていく。続いて、核を軟化させることで分裂能を再獲得できるのかを検証していきたいと考えている。

【参考・引用文献】

1. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*. 2011 Feb 25;331(6020):1078-80. doi: 10.1126/science.1200708.
2. Pajerowski JD, Dahl KN, Zhong FL, Sammak PJ, Discher DE. Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 2;104(40):15619-24. doi: 10.1073/pnas.0702576104.
3. Hashimoto K, Kodama A, Sugino M, Yobimoto T, Honda T, Hanashima A, Ujihara Y, Mohri S. Nuclear connectin novex-3 promotes proliferation of hypoxic foetal cardiomyocytes. *Sci Rep*. 2018 Aug 17;8(1):12337. doi: 10.1038/s41598-018-30886-9.
4. Jopling C, Sleep E, Raya M, Martí M, Raya A, Izpisua Belmonte JC. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*. 2010 Mar 25;464(7288):606-9. doi: 10.1038/nature08899.
5. Ujihara Y, Ono D, Nishitsuji K, Ito M, Sugita S, Nakamura M. B16 Melanoma Cancer Cells with Higher Metastatic Potential are More Deformable at a Whole-Cell Level. *Cell Mol Bioeng*. 2021 May 27;14(4):309-320. doi: 10.1007/s12195-021-00677-w.
6. Stephens AD, Banigan EJ, Marko JF. Chromatin's physical properties shape the nucleus and its functions. *Curr Opin Cell Biol*. 2019 Jun;58:76-84. doi: 10.1016/j.ceb.2019.02.006.
7. Guilluy C, Osborne LD, Van Landeghem L, Sharek L, Superfine R, Garcia-Mata R, Burrridge K. Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat Cell Biol*. 2014 Apr;16(4):376-81. doi: 10.1038/ncb2927.
8. Mohamed TMA, Ang YS, Radzinsky E, Zhou P, Huang Y, Elfenbein A, Foley A, Magnitsky S, Srivastava D. Regulation of Cell Cycle to Stimulate Adult Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Regeneration. *Cell*. 2018 Mar 22;173(1):104-116.e12. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.014.