終末分化心筋細胞の増殖とシグナル伝達機構に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景】 心筋細胞は、ヒトで生後1カ月、ラットでは生後2日で最終分化に入り増殖を停止するとされている。その後の心臓の成長は、心筋細胞の大きさの増加(肥大)と非心筋細胞(主として線維芽細胞)の増殖によるものであり、心筋自体は分裂能を喪失する。このため、近年、高齢化社会、生活習慣の欧米化などが原因となって、虚血性心疾患による心筋傷害が生じた場合には、心臓の一部は収縮能をもたない間質細胞に置き換わってしまい心収縮力の低下をきたし、結果として心不全にいたる患者が増加しているが、従来の薬物療法で効果がない場合、最終的な治療法として心臓移植以外に根治療法が存在しないのが現状である。

近年、成体幹細胞の心筋細胞を含めた各種の細胞への分化つまり、「細胞の可塑性」が多く報告されている。骨髄細胞は、傷害心へ遊走し、心筋特異的タンパクを発現する。また、幹細胞のような未分化な細胞だけでなく、血管内皮細胞をはじめとした分化した細胞に関しても、心筋細胞と共培養することにより心筋細胞への分化が報告されている。また、ES細胞が神経幹細胞や造血幹細胞を含む骨髄細胞と共培養することにより両者が自発的に融合し、ES細胞の特性を引き継ぐことが報告され、細胞の可塑性のメカニズムの1つとしての細胞融合の可能性が示唆された。一方で、傷害心筋では、梗塞周縁部において数パーセントの有糸分裂が起こり、心筋がある程度増殖することが報告されている。また、多くの細胞にはギャップ結合を介した細胞間情報伝達が存在するが、その構成タンパクであるコネキシンが細胞間の情報伝達以外に、腫瘍細胞におけるコネキシン遺伝子導入による増殖抑制、また、心臓におけるコネキシン43の発現レベル上昇と心筋細胞増殖能喪失との相関性、そして心筋梗塞後の梗塞周縁部におけるコネキシン43の発現消失、といった細胞機能制御に関与しているとの報告がなされている。

【目的】 本研究では、終末分化細胞である心筋細胞の増殖メカニズムを解明するために、まず、増殖能を有する細胞と有しない心筋細胞との細胞融合は可能であるか、そして細胞融合後も心筋細胞としての形質を維持し、再度増殖能を獲得することができるのか検討を行なった。さらに、心筋細胞自体の増殖メカニズムを解明するために、ギャップ結合タンパクであるコネキシン43が心筋細胞の増殖能を制御する働きの担っているのではないかと推定し、コネキシン43の発現を抑制した時に心筋細胞が増殖するのか、そしてもしそうであるならその細胞増殖メカニズムには何らかの細胞内シグナル伝達の変化、増殖因子の発現増加・減少が関与しているか、などを解明することを研究目的とした。

こうした心筋細胞自体を増殖させる「心筋分裂再生治療」を目指した研究は、心筋細胞がなぜ増

殖しないのか、その抑制メカニズムを解明し、それを乗り越えて増殖させようとする研究であり、この方法では、自己の心筋細胞の増殖により再生させるため、拒絶反応の問題や倫理的、社会的な問題は生じないことから、有効な心筋再生医療であると期待される。

【結果・考察】 以下に、本研究で得られた成果の概要をまとめる。

i) 細胞融合による増殖能獲得

生後 2-3 日目の Wistar 系ラット新生児より摘出した心臓から酵素処理によって作製した培養心筋細胞と心線維芽細胞を、ポリエチレングリコール (PEG) 法、HVJ 法によって細胞融合し、免疫染色、拍動リズム計測を行うことで、融合細胞の心筋細胞としての形質維持、増殖能獲得の可能性を検証した。その結果、増殖能を有する心線維芽細胞と増殖能を有しない心筋細胞は融合し、免疫染色の結果から、細胞分裂に至るかどうかは明確ではないものの細胞周期に再突入し、増殖能を再獲得する可能性が明らかとなった。さらに、拍動解析の結果から、拍動能を有しない線維芽細胞との細胞融合によっても、心筋細胞は通常の培養心筋細胞と変わらない拍動能を維持することが明らかとなった。これらのことから、線維芽細胞由来の何らかの因子が心筋細胞を刺激し、増殖能獲得に影響を与えた可能性が示唆された。

ii) コネキシン 43 ノックダウンによる増殖能獲得

生後 2-3 日目の Wistar 系ラット新生児より摘出した心臓から酵素処理によって心筋細胞培養系を作製し、コネキシン 43 siRNA によるコネキシン 43 発現抑制 (ノックダウン) が心筋細胞増殖能に及ぼす影響を解析した。その結果、心筋細胞間のギャップ結合を構成するコネキシン 43 の発現抑制によって、心筋細胞が細胞周期に再突入して細胞分裂により増殖した。その増殖メカニズムを明らかにするために、ノックダウン時の MAP キナーゼの活性の変化を Western blot により解析を行なった結果、p38 MAP キナーゼの活性が減少することが明らかとなった。さらに、p38 MAP キナーゼ活性を阻害することによって、心筋細胞を有意に増加させることも明らかとなった。また、ノックダウン時に細胞内の線維芽細胞増殖因子 FGF1 の発現が有意に増加したことから、p38 MAP キナーゼの活性阻害と同時に FGF1 も付加したところ、p38 MAP キナーゼ活性阻害時のみと比較して、有意な心筋細胞数の増加が認められた。コネキシン 43 の発現レベルと、p38 MAP キナーゼの活性および FGF1 の発現との機能連関を介したシグナル伝達機構が終末分化心筋細胞の増殖制御に関与している可能性が明らかとなった。

【結論】 本研究の結果、および先行研究の報告から、梗塞心において、心筋細胞が周囲の線維芽細胞といった増殖能を有する非心筋細胞と融合し、細胞周期に再突入する可能性、および梗塞周縁部の脱分化した心筋細胞が、Cx43 の発現の減少時に、結果として p38 MAPK の活性の減少と FGF1 の発現増大を介して、細胞分裂期に再突入するという増殖能再獲得の可能性が示唆された。Cx43 の発現変化と心筋細胞の増殖能との機能的連関を明らかにすることは、自己心筋による心筋再生を亢進させる新たな治療法の開発につながる事が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 河 原 剛 一
副 査 教 授 遠 藤 俊 徳
副 査 准教授 村 林 俊

学 位 論 文 題 名

終末分化心筋細胞の増殖とシグナル伝達機構に関する研究

心筋細胞は、ヒトで生後1カ月、ラットでは生後2~3日で最終分化に入り増殖を停止するとされている。その後の心臓の成長は、心筋細胞の大きさの増加(肥大)と非心筋細胞(主として線維芽細胞)の増殖によるものであり、心筋自体は分裂能を喪失する。このため、近年、高齢化社会、生活習慣の欧米化などが原因となって、虚血性心疾患による心筋傷害が生じた場合には、心臓の一部は収縮能をもたない間質細胞に置き換わってしまい心収縮力の低下をきたし、結果として心不全にいたる患者が増加しているが、従来の薬物療法で効果がない場合、最終的な治療法として心臓移植以外に根治療法が存在しないのが現状である。

近年、成体幹細胞の心筋細胞を含めた各種の細胞への分化つまり、「細胞の可塑性」が多く報告されている。ES細胞が神経幹細胞や造血幹細胞を含む骨髄細胞と共培養することにより両者が自発的に融合し、ES細胞の特性を引き継ぐことが報告され、細胞の可塑性のメカニズムの1つとしての細胞融合の可能性が示唆された。一方で、傷害心筋では、梗塞周縁部において数

本研究では、終末分化細胞である心筋細胞の増殖メカニズムを解明するために、まず、増殖能を有する細胞と有しない心筋細胞との細胞融合は可能であるか、そして細胞融合後も心筋細胞としての形質を維持し、再度増殖能を獲得することができるのか検討を行なった。さらに、心筋細胞自体の増殖メカニズムを解明するために、コネキシン43が心筋細胞の増殖能を制御している可能性を仮定し、コネキシン43の発現を抑制した時に心筋細胞が増殖するのか、もし増殖するならばその分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

まず、細胞融合による心筋細胞の増殖能再獲得に関する研究では、生後2-3日目のWistar系ラット新生児より摘出した心臓から酵素処理によって作製した培養心筋細胞と心線維芽細胞を、ポリエチレングリコール(PEG)法、HVJ法によって細胞融合し、免疫染色、拍動リズム計測を行うことで、融合細胞の心筋細胞としての形質維持、増殖能獲得の可能性を検証した。その結果、増殖能を有する心線維芽細胞と増殖能を有しない心筋細胞は融合し、融合細胞は免疫染色の結果から増殖能を有していることが明らかとなった。さらに、拍動解析の結果から、拍動能を有しない線維芽細胞との細胞融合によっても、心筋細胞は通常の培養心筋細胞と変わらない拍動能を維持することが明らかとなった。このことから、線維芽細胞由来の何らかの因子が心筋細胞を刺激し、融合細胞の増殖能獲得に影響した可能性が示唆された。

次に、コネキシン43ノックダウンによる増殖能再獲得に関する研究では、生後2-3日目のWistar系ラット新生児より摘出した心臓から酵素処理によって心筋細胞培養系を作製し、コネキシン43

siRNA によるコネキシン 43 発現抑制 (ノックダウン) が及ぼす心筋細胞増殖能の変化を解析した。その結果、心筋細胞間のギャップ結合の主要構成タンパクであるコネキシン 43 の発現抑制によって、心筋細胞が増殖能を再獲得した。その増殖メカニズムを明らかにするために、ノックダウン時の MAP キナーゼの活性の変化を Western blot により解析を行った結果、p38 MAP キナーゼの活性が減少することが明らかとなった。さらに、p38 MAP キナーゼ活性を阻害することによって、心筋細胞の増殖を有意に増加させることも明らかとなった。また、ノックダウン時に細胞内の線維芽細胞増殖因子 FGF1 の発現が有意に増加したことから、p38 MAP キナーゼの活性阻害と同時に FGF1 も付加したところ、p38 MAP キナーゼ活性阻害時のみと比較して、有意に心筋細胞増殖能が増加した。コネキシン 43 の発現レベルと、p38 MAP キナーゼの活性と FGF1 の発現との機能連関を介したシグナル伝達機構が心筋細胞の増殖制御に関与している可能性が明らかとなった。

これを要するに、著者は梗塞心において心筋細胞が周囲の線維芽細胞といった増殖能を有する非心筋細胞と融合し、心筋細胞が細胞周期に再突入する可能性、および梗塞周縁部の心筋細胞におけるコネキシン 43 の発現減少に伴い、p38 MAP キナーゼ活性の減少と FGF1 の発現が増大することによって、心筋細胞が細胞分裂周期に再突入する可能性を明らかにできたことなど多くの新知見を得たものであり、細胞情報科学および再生医療工学に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (情報科学) の学位を授与される資格あるものと認める。