

心筋細胞の若返りと増殖を制御する分子機構

渡邊 裕介, 菊地 和

1. はじめに

心疾患は日本人の死因第2位を占め、その中で特に死亡率の高い心不全の罹患者数が超高齢化社会の到来とともに今後急激に増大すると予想されている。心不全に対する根治療法は心臓移植であるが、ドナー心臓の供給が心不全患者数の増加に見合う可能性は考えにくく、新たな治療法として心筋再生療法の開発が強く望まれている。

心筋再生療法のアプローチとして、iPS細胞(induced pluripotent stem cell)などの幹細胞から心筋細胞を作製し、それらを移植する細胞治療の研究が進められている。現在、培養法や分化誘導法の改善、移植後生着率の上昇など、さまざまな改良が進められており、分化レベルの高い心筋細胞を高純度で精製して移植する治療法の確立が期待されている。また、間葉系幹細胞を移植し、この細胞が分泌するパラクリン因子により間接的に心臓の機能改善を目指す細胞治療も進められている。さらに最近では、瘢痕組織に存在する繊維芽細胞を直接心筋細胞へと分化転換(リプログラミング)することで心筋再生を目指す「直接リプログラミング法」も研究されており、将来的な臨床応用が期待されている。

一方、近年の研究により、哺乳類の心臓もイモリや魚の心臓と同様に生後数日の間は再生することがわかってきた。本稿ではこの心臓自身が保持する生理的な再生機能に着目した新たな心筋再生療法のアプローチについて最新の知見を紹介する。

2. 心筋再生における心筋細胞の若返りと増殖

脊椎動物のうち魚類や両生類のなかには高い心臓再生能

を保持するものが存在する。たとえばゼブラフィッシュは心尖部切除、低温障害、細胞死誘導など、さまざまな方法により損傷した心臓をほぼ完全に再生することが知られている¹⁾。このとき損傷を免れた心筋細胞では、その収縮機能に必要なサルコメア構造が減少し、未分化な心筋細胞に発現する遺伝子群が再び発現する。この脱分化と称される現象は心筋細胞のいわば「若返り」であると考えられており、若返りに伴い細胞分裂が活性化することでゼブラフィッシュの心臓は再生することが示されている²⁾。近年の研究により、心筋細胞の若返りと増殖による心臓再生機構が、マウス、ラット、ブタなどの哺乳類の心臓においても生後数日の間は保存されていることが明らかとなっている³⁾。

哺乳類の心臓の再生能力は成長とともに減弱し、成体において心臓が生理的に再生することはない。しかし、放射性同位体を活用した高感度の解析法を用いてマウスの心臓における心筋細胞の動態を調べた研究から、成体においてもごくわずかの割合(1%以下/年)で心筋細胞が増殖し、古い心筋細胞が新しい心筋細胞と絶えず入れ替わっていることがわかってきた⁴⁾。ヒトの心臓においても同様に低い割合ながら心筋細胞が新しく生成されており、一生を通じて約半数の心筋細胞が入れ替わると推定されている⁵⁾。この低レベルで維持される心筋細胞の増殖能を飛躍的に上昇させるため、損傷を受けたゼブラフィッシュや生後間もないマウスの心臓における心筋細胞の若返りと増殖制御機構の解明が期待されている。

心筋細胞の若返りと増殖は低酸素処置⁶⁾や細胞分裂促進因子カクテルの過剰発現などによっても誘導されることが知られているが、本稿ではより分子機構の解明が進んでいるNeuregulin-1(NRG1)-ErbB2経路とHippo-Yap経路に焦点を絞り心筋細胞の増殖誘導機構について概観し、次に最近報告された若返りの誘導機構について解説したい。

3. 心筋細胞の増殖を制御する分子機構

発生過程の心臓では多くのシグナル伝達経路により心筋細胞の増殖が制御されている。再生における心筋細胞増殖を制御する分子機構の一つとして、このような発生制御シグナルの再活性化が知られている。Kühnらは成体ラットの培養心筋細胞を用いて、細胞周期再進入を誘導する細胞外因子のスクリーニングを行った実験により、発生期の

国立循環器病研究センター研究所、心臓再生制御部(〒564-8565 大阪府吹田市岸部新町6-1)

Molecular mechanisms regulating cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation

Yusuke Watanabe and Kazu Kikuchi (Department of Cardiac Regeneration Biology, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, 6-1 Kishibe-Shimmachi, Suita, Osaka 564-8565, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940901

© 2022 公益社団法人日本生化学会

心臓形成に必須な分泌因子として知られるNRG1を同定した⁷⁾。NRG1は膜受容体ErbB2およびErbB4を介して心筋細胞増殖を制御する。Tzahorらはマウスの心臓において再生能が消失する生後7日でErbB2の発現も消失していることを観察し、この受容体の発現の変化がマウス心臓の再生能に影響する可能性について着目した。そこで、恒常的活性化型ErbB2を心筋細胞特異的に強制発現するマウスを作製したところ、心筋梗塞後の成体心臓において心筋細胞増殖の亢進がみられ、瘢痕形成の抑制および心機能の改善が誘導された⁸⁾。また、前述のKühnらはリコンビナントNRG1がヒトの心筋細胞に対しても細胞分裂促進効果を持つことを示しており⁹⁾、NRG1-ErbB経路は心筋再生療法の開発を目指す上で有望なシグナル経路であると考えられている。

出生後の個体の成長に見合う血液供給量を維持するため、心臓は顕著に肥大し、その過程で心筋細胞の増殖能は失われる。この心臓の成長を制御する分子機構の抑制により再生能を誘導できることが知られている。TALEファミリーホメオボックス転写因子であるMeis1は血球系細胞の分化を制御する転写因子として知られていたが、Sadekらはこの転写因子が出生後の心筋細胞特異的に発現することを見いだした¹⁰⁾。Meis1は出生後の心筋細胞において核内に移行し、細胞周期進入に関わる遺伝子など増殖に関与する遺伝子群の発現を制御する。また、ホメオボックス転写因子Hoxb13も同様に出生後の心筋細胞で発現しMeis1と複合体を形成すること、さらに、この複合体の核移行が心肥大の形成に関与するカルシニューリンにより制御されていることが明らかとなった¹¹⁾。Meis1、Hoxb13、カルシニューリンを心筋細胞特異的に欠失したマウスでは心筋梗塞後の心臓において心筋細胞増殖が亢進し、心機能の改善が誘導されることから¹¹⁾、カルシニューリン-Hoxb13-Meis1経路の抑制が心筋再生を誘導する標的の一つとして注目されている。

個体の成長に伴う臓器サイズの調節に必須なシグナル伝達経路として、Hippo-Yap経路が知られている。ショウジョウバエの順遺伝学的スクリーニングにより同定されたこのシグナル伝達経路は広くヒトやマウスにおいても保存されており、Hippoからリン酸化を介して伝達されたシグナルは転写共役因子であるYapの核内移行へと変換され、細胞増殖遺伝子を含むさまざまな成長制御遺伝子群の発現を制御する。Hippoシグナル伝達経路の構成因子SalvadorはYapの核内移行を負に制御しており、MartinらはSalvadorを心筋特異的に欠失した心臓は心筋細胞増殖の亢進により顕著に肥大化することを見いだした¹²⁾。この心筋でのSalvadorの欠損マウスに加えて、Yapの核内移行を負に制御するLats1/2を心筋特異的に欠失したマウス、および核移行を促進するYap変異体を心筋特異的に過剰発現したマ

ウスにおいて、心筋細胞増殖を介した心筋再生誘導がみられた。

上述したNRG1-ErbB2経路が活性化した心筋細胞ではYapの核移行が検出される¹³⁾。また、再生能を有する生後数日のマウス心臓に高発現する細胞外マトリックス分子として同定されたAgrinがYapの核移行を介して心筋細胞増殖を誘導することも報告されている。これらの結果から、Hippo-Yap経路は心筋再生を制御するさまざまなシグナル伝達経路とクロストークする重要な再生誘導経路であることが示唆される。

4. 心筋細胞の若返りを制御する分子機構

サルコメア構造の減少と未分化マーカーの発現を伴う心筋細胞の若返りはゼブラフィッシュ²⁾、新生仔マウス³⁾どちらの心臓再生においても共通する再生機構である。近年、我々は再生中のゼブラフィッシュ心臓で発現が上昇する遺伝子としてKrüppel-likeファミリー転写因子Klf1を同定した¹⁴⁾。Klf1は赤血球の発生に必須の機能を持つことが知られている転写因子であり、その欠損は致死性の貧血を誘導するため、造血器以外での機能解析はまったく報告がない。ゼブラフィッシュにおいてKlf1は損傷により心筋細胞特異的に発現し、その発現を心筋細胞特異的に欠失した心臓は再生不全を呈する。逆に非損傷下の心臓で心筋細胞特異的にKlf1を強制発現すると、心筋細胞においてサルコメア構造が消失し、未分化マーカーが発現するとともに、細胞増殖が劇的に上昇する。Klf1の発現を1週間誘導した後、30日間経過した心臓の心筋細胞の形態と細胞数を解析すると、正常なサルコメアを有する成熟心筋細胞が約5倍に増加していることが明らかとなった。

心筋細胞に発現するKlf1は主にエンハンサーに結合し、周囲のクロマチン構造およびヒストン修飾を転写抑制の方向に変化させる。解析の結果、Klf1が抑制するゲノム領域には心筋細胞の分化・成熟制御の核となる心臓特異的転写因子(Gata4, Mef2, Nkx2-5)のDNA結合領域が多く含まれることが明らかとなった。Gata4, Mef2, Nkx2-5が構築する遺伝子ネットワークはサルコメア構成分子を始めとする心筋細胞の成熟化、機能維持に働く多くの遺伝子の発現を制御する。Klf1によるこれら心臓特異的転写因子のDNA結合の抑制が心筋細胞の若返りを引き起こす上で重要な分子機構であることが示唆された。

Klf1の発現により心筋細胞増殖も誘導され、サイクリン遺伝子をはじめとする多くの細胞周期関連遺伝子の発現が上昇する。しかし、上述のようにKlf1が結合するエンハンサーの解析からは心臓特異的転写因子が制御する遺伝子ネットワークへの関与が明らかとなったものの、細胞周期遺伝子の発現制御への関与は検出できなかった。例外とし

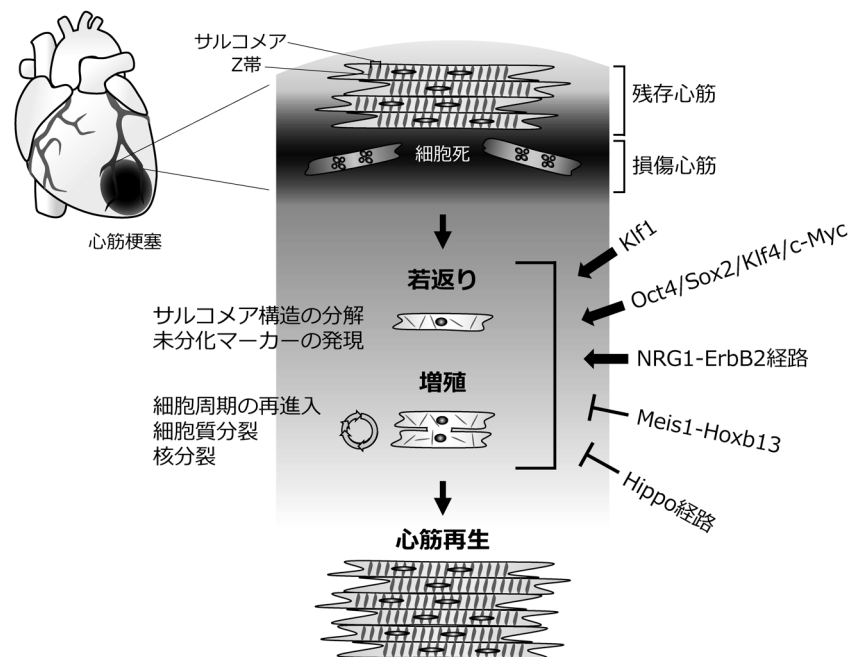


図1 心筋再生を制御する分子機構

ゼブラフィッシュや新生仔マウスでは心筋細胞の若返りと増殖により心臓が再生する。この機構に介入し、損傷部位近傍の残存心筋細胞に人為的な若返りと増殖を誘導する新たな心臓再生医療の開発が期待されている。ゼブラフィッシュや新生仔マウスの研究から転写因子Klf1やOSKM因子の発現誘導、NRG1-ErbB2経路の活性化、転写因子複合体Meis1-Hoxb13の発現抑制、Hippo経路の不活性化（Yapの核移行）などの分子機構が介入標的として注目されている。

て、サイクリンD遺伝子の発現制御領域へのKlf1の結合が検出されたものの、この結合だけでKlf1の強制発現と連動する広範な細胞周期遺伝子の発現上昇は説明できない。Klf1により誘導された心筋細胞の若返りの結果として増殖が誘導されるのか、Klf1が未同定の下流因子を介して若返りと同時に増殖も制御するのか、今後の研究により解明されることを期待したい。

ゼブラフィッシュや新生仔マウスの心臓再生における心筋細胞の若返りは、iPS細胞の作製に使用されるリプログラミング因子の強制導入によっても誘導できる。Braunらのグループは山中4因子として知られる転写因子Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc (OSKM因子) を成体マウスの心筋細胞で強制発現し、成体心筋細胞の遺伝子発現プロファイルが胎仔期および新生仔期型へと変換されることを見いだした¹⁵⁾。成体マウスの心筋梗塞モデルにおいてOSKM因子の発現による瘢痕形成の減少と心機能の改善がみられており、将来的な治療法開発への応用が期待される。

哺乳類の心筋細胞では成長に従いDNAが倍加する。マウスでは成体心筋細胞のほとんどが二核化しており、このことが再生能の消失と密接に関係すると考えられている。BraunらはOSKM因子を発現した成体マウスの心筋細胞を培養し、二核化心筋細胞のうち増殖を経て単核化する細胞が存在することを示した¹⁵⁾。この結果は、成体心筋細胞

において若返り機構を適切に制御することで倍数性の減少 (ploidy reduction) を誘導できる可能性を示しており大変興味深い。

5. 今後の課題・展望

今回は心筋細胞の若返りと増殖について、それぞれ直接的な関与が示唆されている主な分子機構について解説した。今後、これらの分子機構を操作し、自己の残存心筋から直接心筋を作り出す新たな心臓再生療法が開発期待される (図1)。心筋細胞の若返りは細胞分裂の進行に重要な役割を果たしていると考えられている。すなわち、若返りによりサルコメアが減少することで細胞質の構造が単純化され、心筋細胞は細胞分裂に適した状態に整備されている可能性がある。そして、未分化な遺伝子プログラムの発動は増殖関連遺伝子の発現上昇につながる。このように、直感的には心筋細胞の若返りは細胞周期再進入に先んじた状態変化と考えるのが自然であるように思えるが、実際には若返りと増殖の順序や関連性はまだまだ明らかではない。本稿で述べたように、Klf1は心臓特異的転写因子が制御する遺伝子ネットワークを抑制し、心筋細胞の若返りを直接的に制御するが、Klf1を強制発現した心筋細胞では同時に増殖も誘導される。同様に、NRG1-ErbB2経路、Hippo-Yap

経路を操作し、活発に増殖している心筋細胞では若返りを反映する遺伝子発現が観察される。心筋細胞の若返りは細胞周期再進入に必須な前段階であるのか、それとも若返りと増殖は互いに分離不可能な現象であるのかについていまだ明確な結論は存在しない。今後の研究の発展により、心筋細胞の若返りと増殖の機序が深く理解され、心筋再生誘導療法への実現へとつながっていくことを期待したい。

文 献

- 1) Poss, K.D., Wilson, L.G., & Keating, M.T. (2002) Heart regeneration in zebrafish. *Science*, **298**, 2188–2190.
- 2) Kikuchi, K., Holdway, J.E., Werdich, A.A., Anderson, R.M., Fang, Y., Egnaczyk, G.F., Evans, T., Macrae, C.A., Stainier, D.Y., & Poss, K.D. (2010) Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature*, **464**, 601–605.
- 3) Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N., & Sadek, H.A. (2011) Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*, **331**, 1078–1080.
- 4) Senyo, S.E., Steinhauser, M.L., Pizzimenti, C.L., Yang, V.K., Cai, L., Wang, M., Wu, T.D., Guerquin-Kern, J.L., Lechene, C.P., & Lee, R.T. (2013) Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*, **493**, 433–436.
- 5) Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., et al. (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, **324**, 98–102.
- 6) Nakada, Y., Canseco, D.C., Thet, S., Abdisolaam, S., Asaithamby, A., Santos, C.X., Shah, A.M., Zhang, H., Faber, J.E., Kinter, M.T., et al. (2017) Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature*, **541**, 222–227.
- 7) Bersell, K., Arab, S., Haring, B., & Kuhn, B. (2009) Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell*, **138**, 257–270.
- 8) D'Uva, G., Aharonov, A., Lauriola, M., Kain, D., Yahalom-Ronen, Y., Carvalho, S., Weisinger, K., Bassat, E., Rajchman, D., Yifa, O., et al. (2015) ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nat. Cell Biol.*, **17**, 627–638.
- 9) Polizzotti, B.D., Ganapathy, B., Walsh, S., Choudhury, S., Ammanamanchi, N., Bennett, D.G., dos Remedios, C.G., Haubner, B.J., Penninger, J.M., & Kuhn, B. (2015) Neuregulin stimulation of cardiomyocyte regeneration in mice and human myocardium reveals a therapeutic window. *Sci. Transl. Med.*, **7**, 281ra45.
- 10) Mahmoud, A.I., Kocabas, F., Muralidhar, S.A., Kimura, W., Koura, A.S., Thet, S., Porrello, E.R., & Sadek, H.A. (2013) Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature*, **497**, 249–253.
- 11) Nguyen, N.U.N., Canseco, D.C., Xiao, F., Nakada, Y., Li, S., Lam, N.T., Muralidhar, S.A., Savla, J.J., Hill, J.A., Le, V., et al. (2020) A calcineurin-Hoxb13 axis regulates growth mode of mammalian cardiomyocytes. *Nature*, **582**, 271–276.
- 12) Heallen, T., Zhang, M., Wang, J., Bonilla-Claudio, M., Klysik, E., Johnson, R.L., & Martin, J.F. (2011) Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*, **332**, 458–461.
- 13) Aharonov, A., Shakked, A., Umansky, K.B., Savidor, A., Genzelinakh, A., Kain, D., Lendengolts, D., Revach, O.Y., Morikawa, Y., Dong, J., et al. (2020) ERBB2 drives YAP activation and EMT-like processes during cardiac regeneration. *Nat. Cell Biol.*, **22**, 1346–1356.
- 14) Ogawa, M., Geng, F.S., Humphreys, D.T., Kristianto, E., Sheng, D.Z., Hui, S.P., Zhang, Y., Sugimoto, K., Nakayama, M., Zheng, D., et al. (2021) Kruppel-like factor 1 is a core cardiomyogenic trigger in zebrafish. *Science*, **372**, 201–205.
- 15) Chen, Y., Luttmann, F.F., Schoger, E., Scholer, H.R., Zelarayan, L.C., Kim, K.P., Haigh, J.J., Kim, J., & Braun, T. (2021) Reversible reprogramming of cardiomyocytes to a fetal state drives heart regeneration in mice. *Science*, **373**, 1537–1540.

著者寸描

●菊地 和 (きくち かず)

国立循環器病研究センター研究所、心臓再生制御部部長。博士(医学)。

■略歴 2003年東北大学大学院医学系研究科修了。03～11年Duke大学博士研究員。11～19年Victor Chang Cardiac Research Institute, Laboratory Head。19年より現職。

■研究テーマと抱負 これまで再生不能と考えられてきた哺乳類の心臓も生後数日の間は両生類や魚類などと同じように心筋細胞の「若返り」と増殖を経て再生することが分かってきました。私達は心筋再生の分子基盤を理解し、心筋再生療法の開発を目指します。

■ウェブサイト https://www.ncvc.go.jp/res/divisions/cardiac_regeneration/