

平成 30 年 7 月 7 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度

平成 29 年度

受付番号

740

氏名

河村拓史

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: マックス・プランク心肺研究所 (国名: ドイツ)
2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
心筋細胞における細胞極性因子 aPKC の役割の解明
3. 派遣期間: 平成 29 年 9 月 1 日 ~ 平成 30 年 6 月 13 日
4. 受入機関名及び部局名
Max-Planck-Institute for Heart and Lung Research, Laboratory for Cell Polarity and Organogenesis
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入)**

も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

心不全は罹患率が高く、一般的に進行性であるため先進国の主要な死亡原因の一つとなっている。心不全に対する効果的な治療法は限られており、末期的心不全という状況に陥った場合には、心臓移植あるいは人工心臓の永久的使用以外には証明された効果的な治療がない。しかしながら、心臓移植や人工心臓といった置換型治療は、限られた患者しか受けることが出来ず、より汎用性の高い治療法の開発が急務と一般的に考えられている。筆者は、平成 17 年に大阪大学医学部医学科を卒業し医師免許を取得後、臨床医として一般市中病院、大学病院にて約 10 年間勤務し、実際に心不全患者の診療を行うなかで新たな心不全治療法の必要性を痛感し、研究を行ってきた。

一般的に、何らかの疾患に対して新規治療法を開発しようとする際のアプローチとして、基礎的な自然科学研究で得られた知見（分子メカニズム）から効果を期待できると考えられる疾患へ向かう場合と、治療する疾患の病態に基づき治療法を考案し、基礎研究による裏付けをとる場合がある。どちらのアプローチも目的は同じであるが、分子メカニズムから出発すると実臨床への現実味に欠ける可能性があり、疾患から出発すると詳細な分子メカニズムが不明確になる可能性がある。特に著明な治療効果を示すことが難しい際は、最終的に普及する治療法にするためには、治療効果の分子メカニズムを明らかにすることが必要になると考えられる。

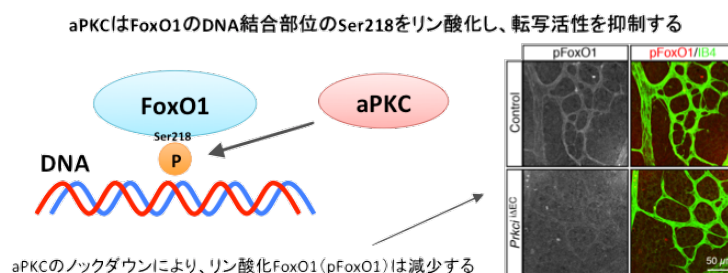
筆者は後者のアプローチ、つまり臨床現場でその必要性を実感した新たな心不全治療法の開発のため、大阪大学大学院医学系研究科博士過程にて iPS 細胞由来心筋細胞移植による心不全治療の研究を行ってきた。iPS 細胞由来心筋細胞移植は、心筋細胞が極限まで減少していることが病態の主体となっている末期的心不全において、心筋細胞数を増加させ心機能を回復させるという、末期的心不全に対する心筋再生治療を可能にすることが期待されているが、その基礎的な分子メカニズムについては明らかではない。今回筆者は前述の前者のアプローチ、つまり基礎的な知見から新たな治療方法を創出することを目標に研究を行っている研究室で、iPS 細胞由来心筋細胞移植による心不全治療の分子メカニズムの解明にもつながる可能性があると考えられる、心筋細胞における細胞極性因子の役割の解明を目的とした研究を行った。

筆者は平成 27 年 9 月に渡独後、マックス・プランク心肺研究所でポスドク研究員として研究をスタートさせ、平成 28 年 2 月にヨーロッパ言語共通参照レベルの B2（抽象的な内容に関して、当該言語で議論することができる能力）に相当する Goethe-Zertifikat B2 に合格し、ドイツ国内での医師活動許可を取得し、マックス・プランク心肺研究所に併設するケルコフクリニック心臓外科にて客員医師として、心臓外科手術を中心とした臨床業務に従事していた。その中で、平成 29 年度の海外特別研究員に採用され、研究を継続した。

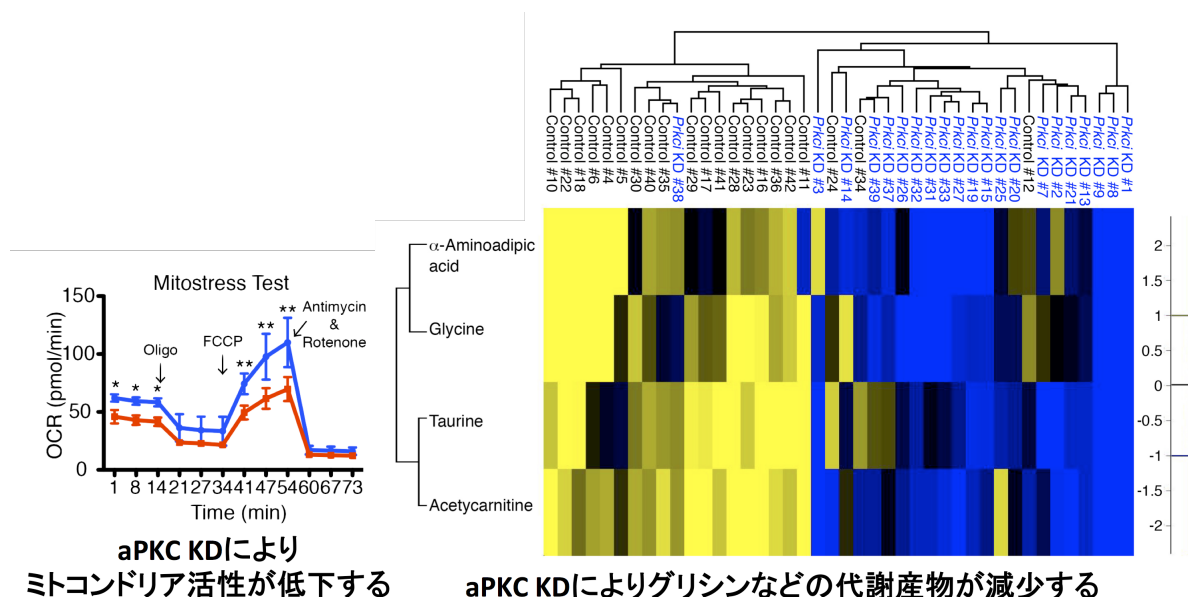
まず筆者らは、内皮細胞における aPKC の働きを内皮細胞特異的 aPKC ノックアウトマウスの解析から詳細に検討した結果、細胞極性因子である aPKC が、細胞増殖に関わる転写因子である FoxO1 の DNA 結合ドメインをリン酸化し、その機能を負に制御していることを見出した（右図）。

転写因子 FoxO は、がん遺伝子としても知られる転写因子 Myc とのバランスで細胞増殖を制御していることが知られており、FoxO の転写活性抑制により細胞増殖

をもたらす可能性がある。実際に、血管内皮細胞の悪性腫瘍として知られる血管肉腫の臨床検体を用いて検討したところ、aPKC の高発現により転写因子 FoxO のリン酸化が進み、その転写活性が低下していることが明らかになった。乳癌、前立腺癌など他の癌腫でも aPKC



の発現量と悪性度が正に相関するという報告があることから、aPKC が FoxO を介して Myc を制御するシステムは、内皮細胞だけでなく他の細胞でも起きている可能性が高いと考えられる。また、同時に申請者らは aPKC ノックダウンにより細胞内の代謝産物であるグリシンをはじめとするアミノ酸が減少し、ミトコンドリア活性が抑制されることも見出した(下図)。細胞極性因子である aPKC がミトコンドリア代謝を制御しているという発見は大変興味深く、疾患との関連を含めて今後この分野に大きなインパクトをもたらす結果になると考えられる。



また、臨床的に血管内皮細胞の悪性化による腫瘍と考えられ、好発部位である皮膚原発血管肉腫 (Angiosarcoma) の臨床検体を、ペプチド抗原投与によりウサギ体内で作成した aPKC による FoXO1 のリン酸化を特異的に検出する pFoXO1 抗体を用いて染色し、pFoXO1 陽性の Angiosarcoma は、陰性と比べて有意に予後が不良であることを見出した。これらの所見をまとめて、現在論文再投稿中である。

また、Angiosarcoma は心臓原発の悪性腫瘍の中では、最も高頻度に認められ、非常に予後が不良であることから、その増殖や悪性度に aPKC が関与していることを示すことで、循環器領域においても Angiosarcoma に対する悪性度予測のための診断や治療介入の可能性があると考え、心臓原発の Angiosarcoma に焦点を絞った研究も開始した。具体的には、筆者の前所属である大阪大学医学系研究科心臓血管外科と共同研究を行い、大阪大学で外科的切除を行った心臓原発 Angiosarcoma の臨床検体、臨床検査情報を入手し、解析を行った。その結果、皮膚原発 Angiosarcoma と同様に心臓原発 Angiosarcoma でも pFoXO1 陽性腫瘍の予後は不良であり、その他の臨床的な悪性度の予測検査と考えられる FDG-PET の SUVmax との相関も認められた。FDG-PET はグルコースの取り込みを反映する検査として知られており、aPKC 活性が亢進することでグルコースの取り込みが亢進することが示唆された。実際に、in vitro の血管内皮細胞の培養細胞を用いた検討でも、aPKC ノックダウンにより複数のグルコース代謝酵素の発現低下が認められた。これらの所見から、aPKC は血管内皮細胞において細胞増殖とそれに伴うグルコース代謝の制御を行っていることが明らかとなった。これらの所見をまとめ、現在論文投稿準備中である。

心筋細胞における細胞極性因子の研究に関しては、同様に筆者の前所属である大阪大学医学系研究科心臓血管外科と共同研究を行い、心臓の臨床検体を用いた検討を行った。具体的には、臨床的に植込み型補助人工心臓を必要とする心不全心の、補助人工心臓植込み時と、心臓移植時の心筋組織の検体を比較し、心不全心の機械的補助による機能的回復のメカニズムの検討を行った。現時点での所見として、心不全の心筋細胞における pFoXO1 は、補助人工心臓による機械的補助により発現量が亢進することが明らかとなった。また同時に、

c-Myc の発現量も機械的補助により上昇するが、FoXO1 の発現量は変化しないことが明らかとなった。

心不全心に対する機械的補助は、心筋細胞への外的な力学的作用として、進展刺激の減少、圧負荷の減少を行い、結果として心筋細胞の仕事量を減少していると考えられている。そこで、心筋細胞における外的な力学的作用と細胞極性因子の働きをより詳細に解析するために、マウス新生仔心から単離した心筋細胞を培養し、ストレッチチャンバーを用いた進展刺激による影響を解析した。現在までに得られている結果として、心筋細胞への進展刺激により、pFoXO1、c-Myc の発現の上昇は認められるが、FoXO1 の発現量は変化しないことが明らかとなった。

また、心筋細胞特異的 aPKC ノックアウトマウスおよび過剰発現マウスの作成を Cre-LoxP system を用いて作成するため、研究所内で保持している α MHC-Cre ER^{T2} マウスと、aPKC floxed マウスの交配を進めるとともに、aPKC 過剰発現マウスの作成のため、マウス ES 細胞に対し Cre-LoxP system を用いて誘導可能な aPKC 過剰発現 ES 細胞株の作成を行った。現在のところ、Cre により誘導可能な aPKC 過剰発現のコンストラクトをマウス ES 細胞株である G4mESC の Rosa26 座に、Cas9/CRISPR システムを併用した相同組み替えを用いて導入したマウス ES 細胞株を作成した。

今回筆者は、大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座 心臓血管外科学教室 助教のポストへの就職内定を受け、またドイツでの研究を帰国後も継続可能という条件が認められたため、派遣期間の短縮（短縮前：平成 29 年 9 月 1 日から平成 31 年 8 月 31 日、短縮後：平成 29 年 9 月 1 日から平成 30 年 6 月 13 日）を申請、承認され平成 30 年 6 月 13 日に帰国した。研究の実施状況としては、計画していた予定の途中となったが、帰国後に研究を継続して仕上げる予定である。