

令和 2 年 1 月 9 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 30 年

受付番号 2018630

氏 名 廣瀬 健太郎

(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：カリフォルニア州サンフランシスコ市（国名：米国）

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。

ホルモン経路に着目した脊椎動物の心臓再生能力を決定する分子メカニズムの解析

3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 1 月 2 日

4. 受入機関名及び部局名

カリフォルニア大学サンフランシスコ校 Cardiovascular research institute

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。

研究の概要

本研究の目的は、動物種間、そして発生期間の違いによって生じる再生能力の違いを引き起こす根本的な分子メカニズムを明らかにすることである。興味深いことに、ゼブラフィッシュやイモリは、心臓や四肢(ヒレ)などの器官の一部を失った際も、再生可能である。一方、マウス心臓再生能力は非常に限定的であり、生後 1 日目では非常に高く損傷した心臓組織の再生が可能であるが、生後 7 日目以内にその再生能力は消失する。同様の再生能力の消失は、ヒトにも生じていると予想されている。つまり、動物種間および発生期間によって、心臓の再生能力に多様性が存在しているのである。私は、このマウスの生後 7 日の間に生じる再生能力の低下に着目することで、再生能力を制御するメカニズムの正体を明らかにできると考えた。近年の研究から、心臓の再生能力の消失は、心臓を構成する主な細胞種である心筋細胞が、多核化および 4 倍体化を引き起こし、それこそが細胞の増殖能力を失う要因だと報告されている。実際、ゼブラフィッシュのような心臓に高い再生能力を持つ動物の心筋細胞は、ほとんどが 2 倍体の単核である。しかし、動物種間や発生期間で、心筋細胞の多核化を制御するメカニズムに関しては、ほとんど分かっていなかった。

派遣期間開始前の予備実験結果

これまでに私達は、マウスにおける再生能力が消失する期間に、*in vivo* 薬剤スクリーニングを実施することで、甲状腺ホルモン経路の阻害剤が、心筋細胞の多核化を抑制する、つまり単核 2 倍体心筋細胞が増加することを明らかにしていた。また、甲状腺ホ

ルモン受容体のドミナントネガティブ型 (TR α -DN) を心筋細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを解析し、このマウスが顕著に高い割合で単核 2 倍体の心筋細胞を持つことを明らかにしていた。つまり、甲状腺ホルモンが心筋細胞の多核化を制御する新規因子であることを初めて同定していた。さらに、心臓再生実験の結果、TR α -DN マウスはより高い心臓再生能力を有していることも明らかにしていた。しかし、甲状腺ホルモン経路が心臓再生を制御する詳細なメカニズム、そして甲状腺ホルモン経路が動物種間の再生能力の違いに関与する因子であるか否かは依然不明であった。

研究の進捗状況における詳細

以下の A と B は、研究計画に挙げた研究目標である。さらに C と D は研究の過程で、想起した新たなアイデアの基に実施した研究である。これらの研究結果を以下に記す。

- A. 甲状腺ホルモンが心筋細胞の多核化や増殖能を制御する分子メカニズムの解明
- B. 低い甲状腺ホルモン量を有する動物種における心臓再生能力の解析
- C. 動物種間における再生能力の差異と甲状腺ホルモンの関係性
- D. 新規タンパク質 Coq10a の心臓における機能解析

A. 甲状腺ホルモンが心筋細胞の多核化や増殖能を制御する分子メカニズムの解明

これまでの研究で、核内受容体である甲状腺ホルモン受容体が、心筋細胞の多核化や増殖能力を制御することを明らかにしているが、甲状腺ホルモン経路の直接的な標的因子は明らかになっていなかった。そこで、甲状腺ホルモン経路の下流で、心筋細胞の多核化および増殖能を制御するメカニズムを明らかにすることで、詳細な分子メカニズムの解明に迫った。

甲状腺ホルモン受容体の標的候補遺伝子の特定

本研究では、心臓における甲状腺受容体の標的遺伝子を明らかにし、その中から心筋細胞の多核化と増殖の制御に重要な遺伝子を特定することが目的である。甲状腺ホルモン受容体に GS タグを融合させたタンパク質を発現するトランスジェニックマウスを利用し、心臓組織を用いてクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)解析を実施することで、甲状腺受容体の DNA 結合配列の網羅的解析を実施した。その結果と、TR α -DN とコントロールの心臓による RNA-seq のデータを比較解析することで、甲状腺ホルモン受容体が直接的に結合し、TR α -DN 心臓で遺伝子発現の変化している遺伝子、つまり心臓における甲状腺ホルモン経路の直接的な標的遺伝子の可能性のある遺伝子を炙り出すことができた。

甲状腺ホルモン受容体の下流遺伝子の特定

現在は、これらの候補遺伝子の中から、心臓再生能力の制御に関与する遺伝子のスクリーニングを行なっている。候補遺伝子の中から、変異体・トランスジェニックマウスが作製されており、利用可能である場合、そのマウスの心臓組織を採取し、解析を行っている。それ以外の場合は、CRSIPR-Cas9 システムとアデノウィルスを組み合わせた遺伝子編集技術を利用し、目的の遺伝子のノックアウトをすることで、解析を実施している。解析の手法としては、生後 1 日の Cas9-GFP を発現するマウスの心臓に、外科的手術により CRISPR 配列を保有するアデノウィルスを直接顕微注入し、生後 14 日目に心臓を採取し、感染した細胞の単核心筋細胞の割合と心筋細胞の細胞増殖マーカーの発現を指標した。単核の心筋細胞の割合が増加している場合は、甲状腺ホルモン経路の下流として、心臓再生能力の制御に関与している可能性が高い。

特定した下流遺伝子の一つである *Cpt2*

スクリーニング実験は現在実施中であり、未だ一部の遺伝子の解析しか完了していないが、解析した遺伝子の中でも最も表現型が顕著であった *Cpt2* 遺伝子における結果を報告する。*Cpt2* タンパク質の検出を目的としたウェスタンブロットの結果によると、*Cpt2* タンパク質は、TR α -DN マウスの心臓において、発現量が約 60%までに減少していた。そこで、Cre 依存的に *Cpt2* 遺伝子をノックアウト可能な *Cpt2 flox* マウスに、心臓特異的に Cre を発現する *Myh6-Cre* マウスを掛け合わせることで、染色体上の *Cpt2* 遺伝子の一对のみを欠損させた *Myh6-Cre; Cpt2 flox/+* マウス（ヘテロ接合体）を作製した。このマウスにおける *Cpt2* タンパク質量をウェスタンブロットにより解析したところ、約 60%にまで減少しており、TR α -DN マウスと同量のタンパク質量であることが分かった。そこで、生後 14 日目に、心臓の単核心筋細胞の割合を解析したところ、コントロールの約 3%と比較し、*Myh6-Cre; Cpt2 flox/+* マウスでは約 5.3%にまで増加していた。さらに、*Myh6-Cre; Cpt2 flox/+* マウスにおいて、細胞増殖マーカー（pHH3, Ki67, AuroraB kinase）が発現する心筋細胞の割合は約 2 倍増加していた。これらの結果から、*Cpt2* 遺伝子は甲状腺ホルモン経路の直接的な下流遺伝子として、心臓の再生能力の制御に関与していることを示唆している。

B. 低い甲状腺ホルモン量を有する動物種における心臓再生能力の解析

本研究では、マウスのように生後直後から甲状腺ホルモン量の上昇が生じ、甲状腺ホルモン経路の活性化が生じる動物とは異なり、元よりマウスより低い値の甲状腺ホルモン量を持つ動物を用いた解析を行うことで、動物種間における心臓再生能力の違いが生じる原因として、甲状腺ホルモン経路が関与するかを明らかにすることを目的としている。

ゼブラフィッシュにおける甲状腺ホルモン経路の活性化

非常に高い心臓再生能力を持つゼブラフィッシュの甲状腺ホルモン（T4）量は、マウスと比較し、非常に低いことが知られている。そこで、ゼブラフィッシュの甲状腺ホルモン活性化によって、ゼブラフィッシュの心臓再生能力に変化が生じるか検証した。まず、飼育水に甲状腺ホルモンを添加することで、ゼブラフィッシュの血中の甲状腺ホルモン量が上昇するかを検証するため、5nM T3 の飼育水で飼育したゼブラフィッシュの血液を採取し、ELISA 法を用いて解析したところ、血中 T3 量が 1.5 倍上昇していた。そこで、この条件を用いて、心臓の再生実験を行なった。ゼブラフィッシュの心臓先端部を、外科的手術により切除し、24 時間後に T3 飼育水に移し、飼育することで、心臓の再生を観察した。まず、T3 処理後 7 日目から 13 日目にかけて EdU 溶液をゼブラフィッシュの腹部から注入することで、増殖細胞を EdU にて標識した。処理後 14 日目に心臓を回収し、切片作製後、免疫組織染色によって、EdU を取り込んだ心筋細胞を可視化したところ、その割合がコントロールの約 26%と比較して、T3 処理ゼブラフィッシュにおいて、約 13%にまで低下していた。さらに、手術後 30 日後の心臓切片を用いて、心臓の繊維化の指標である Fibrin と Collagen を検出するための AFOG 染色を実施したところ、甲状腺ホルモン処理心臓の線維化の割合が有為に上昇していることが分かった。これらの結果は、甲状腺ホルモン処理したゼブラフィッシュの心臓は、再生能力が低下していることを示唆している。さらに、その原因を明らかにするため、甲状腺ホルモン処理した手術後 30 日目の心臓から、心筋細胞を単離し、多核心筋細胞の割合を解析した。コントロールの多核心筋細胞の割合は、わずか 1.7%だったが、甲状腺ホルモン処理ゼブラフィッシュの割合は、6.2%にまで増加していた。つまり、甲状腺ホルモン処理による心臓の再生阻害は、心筋細胞の多核化によって生じた可能性を示唆している。また、甲状腺ホルモンの活性化が、ゼブラフィッシュの他の器官の再生現象に関与するか検証するため、甲状腺ホルモン処理したゼブラフィッシュの尾ヒレを切断し、尾ヒレの再生を観察したところ、コントロールと変わりなく正常どおり再生し

た。そのことから、甲状腺ホルモン経路による再生能力の制御は、組織特異性が存在すると考えられる。

C. 動物種間における再生能力の差異と甲状腺ホルモンの関係性

本研究の理解をさらに深めるために、動物種間の再生能力の差異に着目した。これまでにマウス、イモリ、ゼブラフィッシュ等のモデル動物以外での心臓再生能力はあまり知られていない。そこで、近年の研究より、単核心筋細胞の割合が高い動物は、高い再生能力を持つことが示唆されていることに着目し、計 35 の動物種（過去の文献に報告されているものを含む）の単核心筋細胞の割合を解析した。これらの動物の心臓組織の多くは、博物館や動物園などから取り寄せ、KOH 法を利用し、心筋細胞を単離した。その結果、興味深いことに、単核心筋細胞の割合は動物種間で大きな多様性があり、単核心筋細胞の割合が、わずか 5% 程度のマウスと比較し、アリクイ、カモノハシ、ハリネズミなどの動物種は、50% を超える単核心筋細胞を有していた。この多様性は、単純に進化に依存するものではなく、ホッキョククジラは 43% であったが、マッコウクジラはわずか 22% と低く、同じ鯨偶蹄目でも大きな差があった。そこで、この単核心筋細胞の割合と、各動物種の甲状腺ホルモン (T4) の割合を解析したところ、この 2 点で負の相関関係があることが分かった。また、甲状腺ホルモンは体温を制御することが知られるため、体温と単核心筋細胞の割合を解析したところ、両者に負の相関関係があることも分かった。つまり、この結果は、体温および甲状腺ホルモン量の増加と心臓再生能力の消失には、相関関係があることを示唆している。これらの結果を総合的に考えると、甲状腺ホルモンは、種間の心臓再生能力の差異の制御にも関与することを示唆している。

D. 新規タンパク質 Coq10a の心臓における機能解析

A の解析により、甲状腺ホルモン経路による直接の下流遺伝子の候補を明らかにしたが、その中でも顕著に遺伝子発現が減少し、未だに脊椎動物での機能解析が行われていない遺伝子 *Coq10a* に興味を持ち、解析を実施した。この遺伝子が、再生能力を制御する遺伝子であるか確かめるため、CRISPR-Cas9 システムを利用し、ノックアウトマウスを作製し、心臓における働きを解析した。研究の目的としては、心臓の再生能力を制御する遺伝子の特定であったが、*Coq10a* ノックアウトマウスは、残念ながら心臓再生能力の促進を示す表現型は全く見受けられなかった。しかしながら、生後 14 日目および成獣における心臓重量が有意に増加し、さらなる詳細な解析により心筋細胞サイズが拡大していることを明らかにした。心筋細胞のサイズが拡大し、心臓の肥大が生じる減少を心肥大 (Cardiac hypertrophy) と呼ぶ。これは、一般的に心臓病など疾患によって生じる場合 (Pathological hypertrophy) と、アスリートや妊娠などが生じる場合 (Physiological hypertrophy) がある。Physiological hypertrophy は、Pathological hypertrophy とは対照的に、有益な心肥大であり、心機能を向上させ、心筋梗塞などによる損傷も軽減させることが報告されている。私は、*Coq10a* ノックアウトマウスは、このどちらのタイプの心肥大を有するか区別するため、網羅的な遺伝子発現の解析 (RNA-seq 法)、ミトコンドリアの呼吸効率 (Seahorse-assay)、ミトコンドリアタンパク質量と DNA 量の測定を実施した。その結果、*Coq10a* ノックアウトマウスの心臓は、Physiological hypertrophy に非常に近い特性を有していることが明らかになった。つまり、*Coq10a* 遺伝子の欠損により、有益な心肥大を引き起こす可能性を示唆している。さらに、一般に Coq ファミリータンパク質は、ミトコンドリア電子伝達系内の電子のトランスポーターである Coenzyme Q10 の生成に必須であるため、*Coq10a* ノックアウトマウスにおける Coenzyme Q10 量を測定したところ、驚くべきことに Coenzyme Q10 量が増加していた。これは他の Coq ファミリータンパク質の変異体とは対照的であり、心臓内で Coenzyme Q10 量が増加する表現型はこれまでに報告がない。そこで私は、Coenzyme Q10 量の増加と Physiological hypertrophy の関係性に着

目し、さらなる研究を進めたいと考えている。実際に、Coenzyme Q10 処理した心筋細胞は細胞サイズの拡大が生じることが分かった。本研究成果は、biorxiv 誌に 2019 年に投稿・掲載されて、現在は査読付き雑誌に投稿中である。

研究進捗状況の総括

A-C の研究成果をまとめ、論文投稿を行い、第一著者として Science 誌に掲載された。また、D の研究成果もまた、査読なしのオンラインジャーナルではあるが、biorxiv 誌に掲載されている。本研究は査読付きの雑誌に投稿中である。さらに、本研究とは別テーマではあるが、当研究室のポスドク研究員との共著も現在論文投稿準備中である。派遣期間中は、十分に研究に集中することができ、自身でも満足の行く研究成果を出すことができたと考えている。