

解説

有袋類オポッサムは出生後長期間にわたって心臓再生能を維持する

木村 航

Key words: 心臓再生, 有袋類, 心筋細胞, 細胞周期, AMPK シグナル

われわれヒトを含む哺乳類の成体は、損傷を受けた心筋組織を元どおりに再生させる能力を持たない。しかし、出生直後の哺乳類の新生仔は、損傷を受けた心筋組織を心筋細胞の細胞分裂促進を介して修復できる。これは、ブタやヒトなどの大型動物から齧歯類などの小型動物まで、哺乳類が共通して持つ能力である。この新生仔の心筋再生能は、出生後数日で起こる心筋細胞の細胞分裂の停止と同調して喪失する。これまで、出生後数日以降に損傷を受けた心筋組織を再生できる哺乳類種は知られていなかった。筆者らは南米に生息する有袋類であるハイイロジネズミオポッサム (*Monodelphis domestica*, 以下単にオポッサムとする) では、出生後2週間以上もの期間にわたって心筋細胞が細胞分裂を継続することを見いだした。加えて、2週齢のオポッサム新生仔が心尖部切除や心筋梗塞などの心筋障害を再生する能力を維持していること、この心筋再生能は出生後1か月までに失われることを明らかにした。更に、オポッサムおよびマウス心臓組織の比較トランスクリプトーム解析により、5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) シグナルが出生後の心筋細胞で活性化していること、そして遺伝学的・薬理学的手法により AMPK シグナルの活性化を阻害することで、マウスおよびオポッサム両者において、出生後の心筋細胞の細胞周期停止の時期を遅

らせることが可能であることを見いだした¹⁾。

以上の研究により、有袋類オポッサムの新生仔がこれまで知られているすべての哺乳類のなかで、最長の期間にわたって心筋再生能を維持することが明らかにされ、更に哺乳類間で保存された心筋細胞の細胞周期停止の分子機構の一端が解明された。

I 哺乳類と心臓再生

心疾患は世界における人類の死因の第1位を占めており、現代における最も重大な疾患の一つとして、われわれヒトには心筋梗塞などで失われた心筋細胞を再生させる能力が備わっていないことが挙げられる。ヒトに限らず、これまでに調べられた成体の哺乳類のなかには、障害を受けた心筋組織を完全に再生できるものは存在しない。一方で成体とは対照的に、新生仔ではマウス、ラット、ウサギ、ブタなど多くの哺乳類種において、出生後数日間に限って心筋を再生する機能が備わっていることが明らかにされている²⁾。しかし、これらのいずれの種の心筋再生能も、出生後1週間以内に失われる。この心筋再生能の喪失は、心筋細胞が細胞分裂を停止する時期と同調している。心筋細胞は出生後1週間以内に細胞周期を停止し、以降の心筋組織の成長は既存の心筋細

Prolonged cardiac regenerative capacity in neonates of the marsupial opossum

Kimura Wataru: 理化学研究所生命機能科学研究センター心臓再生研究チーム (〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3)

0370-9531/02/¥500/論文/JCOPY

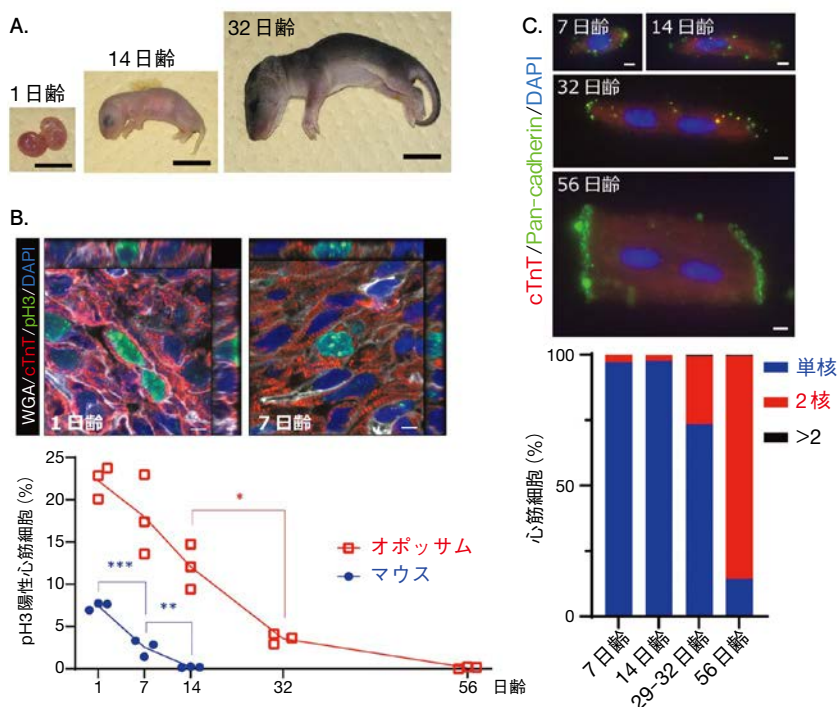


図1 新生仔オポッサムの心筋細胞増殖(文献1より改変して引用)

A. 1日齢, 14日齢, 32日齢のオポッサム。スケールバーは1 cm

B. 上: オポッサム心筋の免疫染色による細胞分裂している心筋細胞の像。白色は wheat germ agglutinin (WGA) による細胞の境界, 赤色は心筋トロポニン T (cTnT) による心筋細胞, 緑色はリン酸化ヒストン H3 (pH3) による細胞分裂, 青色は DAPI による核の可視化。スケールバーは 5 μ m。下: マウスおよびオポッサム新生仔での pH3 陽性の分裂中の心筋細胞の割合の比較。P 値は一元配置分散分析後の多重比較 (テューキー法) による算出。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

C. 上: 図中の各日齢で単離されたオポッサム心筋細胞。単離後に cTnT (赤色) およびカドヘリン (緑色) に対する抗体および DAPI で染色している。スケールバーは 5 μ m。下: 心筋細胞当たりの核数の計測

胞一つひとつのサイズが拡大することによってなされる。このような細胞分裂から細胞肥大への成長の切り替わりは、胎仔期の器官形成から出生後の器官成熟への切り替わりに対応していると考えられる。

筆者らによるものを含む幾つかの研究により、マウスにおいてこのような心筋細胞の細胞分裂停止と心筋の成長様式の切り替わりは、子宮内環境から出生後の外環境に移行することをきっかけの一つとして起こることが明らかにされている。このような心筋細胞の細胞分裂停止を誘導する外環境要因としてこれまでに知られているものは、大気中の酸素濃度や母乳中の脂肪酸濃度である³⁾。筆者らは、もし出生後に外環境下にあっても心筋細胞の細胞分裂を継続する哺乳類種が存在するの

であれば、そのメカニズムを明らかにし応用することで、成体の哺乳類でも心筋細胞の細胞分裂、そして心筋再生を誘導できるのではないかと考えた。

哺乳類のなかでも、有袋類は一般に発達した胎盤を持たず、非常に短い妊娠期間を経て未熟な状態で出生するという珍しい特徴を持つ。それゆえに、有袋類は出生後も器官形成を継続することが知られている⁴⁾。それでは有袋類では出生後も心筋細胞が細胞分裂を継続するだろうか、と考えたことがこの研究の出発点となった。幸運なことに、筆者らの所属する理化学研究所生命機能科学研究センター (BDR) の生体モデル開発チーム (清成寛チームリーダー) は有袋類であるオポッサムを飼育していた⁵⁾。そこで同チームとの共同

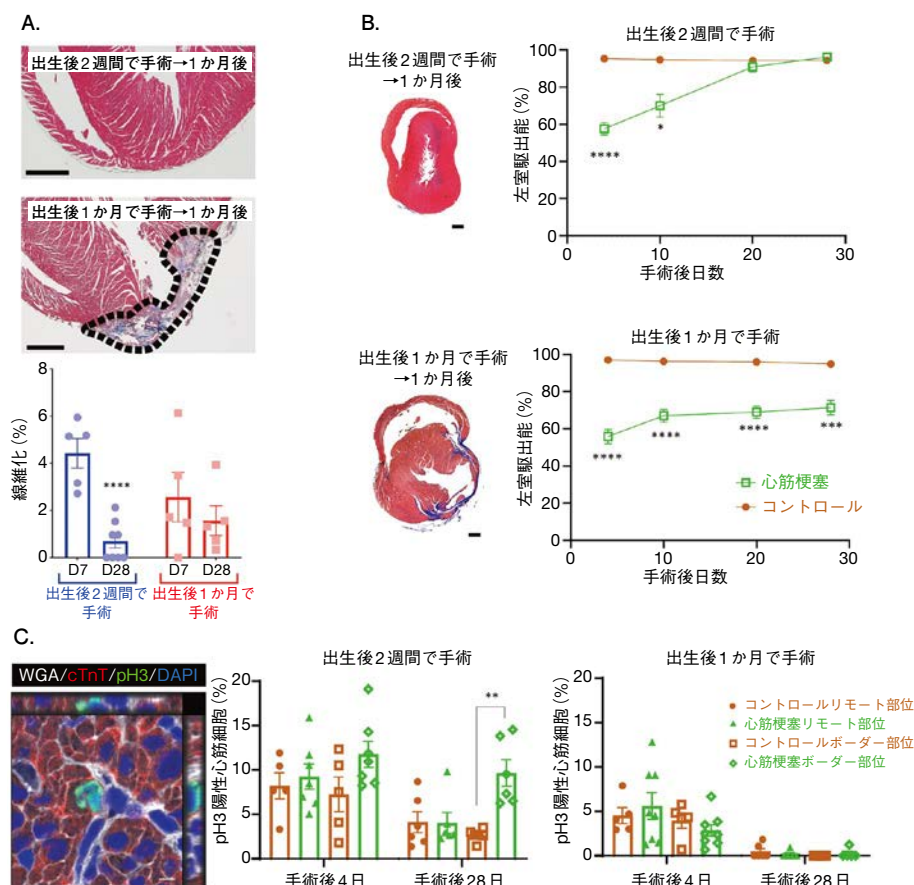


図 2 オポッサム新生仔の心筋再生 (文献 1 より改変して引用)

- A. 心尖部切除後の心筋再生。上: オポッサム心臓のトリクローム染色。出生後 2 週間で心尖部切除では 1 か月後にはほぼ完全に切除部が再生したのに対し, 出生後 1 か月での心尖部切除は切除部位が再生せず, 線維化した (点線)。下: 手術後 7 日 (D7), 28 日 (D28) での線維化の定量。P 値は t 検定による算出。**** $P < 0.0001$
- B. 左冠動脈下行枝の結紮による心筋梗塞導入後の心筋再生。左: トリクローム染色による線維化の同定。スケールバーは 500 μm 。右: 心筋梗塞後の心エコーによる左室駆出能の計測。P 値は二元配置反復測定分散分析後の多重比較 (ボンフェローニ法) による算出。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$
- C. オポッサム心筋組織の免疫染色による pH3 陽性の分裂中の心筋細胞の割合の比較。P 値は t 検定による算出。** $P < 0.01$

研究で, オポッサムを使用した研究を開始した。

II 有袋類オポッサム新生仔は出生後 2 週間以上にわたって心臓再生能を維持する

オポッサムはわずか 14 日間の妊娠期間ののちに出生する。出生直後のオポッサム新生仔は, 解剖学的にはマウス胚 E11.5 から E13.5 に相当するとされている (図 1A)。この時期から生後 2 か月まで, 心筋細胞の細胞分裂について検討し, マウス新生仔のそれと比較した。すると, 出生後 2 週

間の時点でのオポッサム新生仔の心筋細胞増殖率は, 出生後 1 日のマウス新生仔のそれとほぼ変わらないということがわかった (図 1B)。また, 齧歯類の心筋細胞は出生直後には多くのものが単核であり, その後の細胞周期停止に伴って 2 核化することが知られていたため, オポッサムの心筋細胞の核数を検討したところ, 出生後 2 週間までは大多数の心筋細胞は単核であり, その後徐々に 2 核化していくことが明らかになった (図 1C)。これらの結果と, マウスにおいて出生後 1 日の新生仔は心筋再生能を持つことを併せて考えると, オ

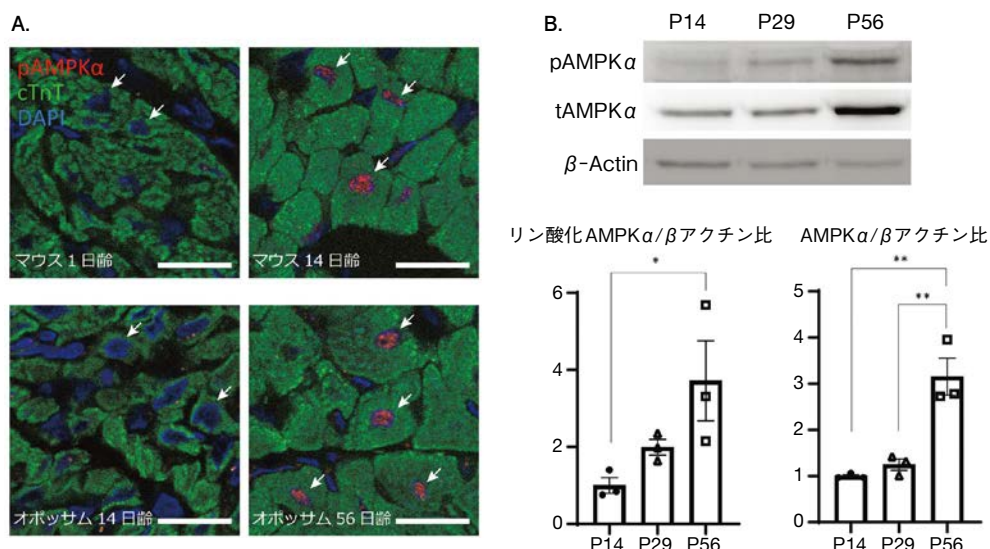


図 3 新生仔の心臓での AMPK シグナルの活性化 (文献 1 より改変して引用)

- A. マウス新生仔およびオポッサム新生仔での活性化型 AMPK (赤色, リン酸化 AMPKαサブユニット) の局在。スケールバーは 20 μm
- B. ウェスタンブロットによるオポッサム新生仔心筋組織での活性化型 AMPK (pAMPKα) および総 AMPKα (tAMPKα) 量の, 出生後 14 日 (P14), 29 日 (P29), 56 日 (P56) での比較。P 値は t 検定による算出。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

ポッサム新生仔は出生後 2 週間程度は心筋再生能を維持しているのではないかと予想された。

そこで, 続いてオポッサム新生仔の心筋再生能について検討するため, 出生後 2 週間および 1 か月の時点で心尖部切除による障害を加えた。手術後 1 か月で両者の心臓の組織学的解析を行ったところ, 出生後 2 週間で心尖部切除を行ったものは切除部位が完全に再生し新たな心筋組織が形成されているか, もしくはごく小さな線維性瘢痕が残るのみであり, 切除した心筋組織が再生していることが示唆された (図 2A)。その一方で, 出生後 1 か月で心尖部切除を行ったものは, すべての例で心尖部に線維化が認められ, 再生反応が起こっていないことが示唆された (図 2A)。また, 心筋梗塞後の応答を出生後 2 週間および 1 か月のオポッサム新生仔で検討したところ, 同様に出生後 2 週間での虚血性障害は再生でき, 出生後 1 か月では再生できないことが示された (図 2B)。更に, 心筋梗塞後に心筋細胞増殖について検討したところ, 出生後 2 週間での心筋梗塞導入ではコントロールと比較して心筋細胞増殖が増加していたのに対して, 出生後 1 か月での心筋梗塞導入では心

筋細胞増殖は変化していなかった (図 2C)。これらの結果は, 出生後 2 週間のオポッサム新生仔が心筋再生能を維持しているのに対し, 出生後 1 か月ではそれが失われることを示唆するものであった。

Ⅲ AMPK シグナルの活性化による哺乳類新生仔の出生後の心筋細胞増殖停止

次に, 出生後の哺乳類における心筋細胞の, 細胞周期停止の分子メカニズムについて検討するため, 比較トランスクリプトーム解析を行った。オポッサムだけでなくヒトやマウスまで含む, 心臓その他の臓器のバルクのトランスクリプトームデータが 2019 年に公開されたため⁶⁾, このデータセットを用いてオポッサム心臓のトランスクリプトームデータから KEGG パスウェイ解析を行った。その結果, オポッサム心臓ではインスリンシグナル, AMPK シグナル, 甲状腺ホルモンなどのシグナル伝達系が出生後に活性化していることが明らかになった。これらのうち, AMPK シグナル以外は時期に応じて活性化だけでなく抑制もされていたのに対して, AMPK シグナルは

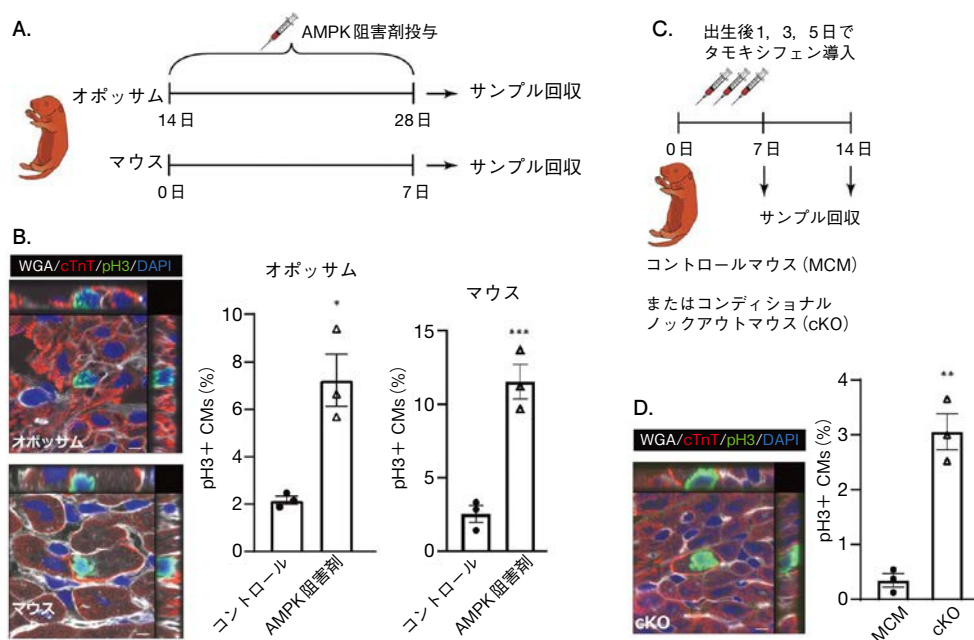


図 4 AMPK シグナルは心筋細胞増殖を制御する (文献 1 より改変して引用)

- A. AMPK シグナル阻害剤 Dorsomorphin のオポッサムおよびマウス新生仔に対する投与のプロトコル
- B. AMPK シグナル阻害剤投与後のオポッサムおよびマウス心筋組織の免疫染色による pH3 陽性の分裂中の心筋細胞の割合の比較。スケールバーは 5 μ m。P 値は t 検定による算出。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$
- C. コントロール (α MHC-MerCreMer, MCM) および AMPK $\alpha 2$ のタモキシフェン依存性かつ心筋細胞特異的ノックアウト (α MHC-MerCreMer; *Prkaa2*^{flox/flox}) マウスに対するタモキシフェン投与のプロトコル
- D. タモキシフェン投与後のオポッサムおよびマウス心筋組織の免疫染色による pH3 陽性の分裂中の心筋細胞の割合の比較。スケールバーは 5 μ m。P 値は t 検定による算出。** $P < 0.01$

出生後に継続して活性化されていた。そのため AMPK シグナルが心筋細胞の細胞周期を停止させている分子実態なのではないかと考えた。実際に、活性化型 AMPK $\alpha 1/2$ は、出生後 2 週間のオポッサム心筋および出生後 1 日のマウス心筋ではほとんど検出されず、オポッサムでは出生後 1 か月から 2 か月にかけて、マウスでは出生後 7 日から 14 日にかけて、それぞれ徐々に増強していくことが明らかになった (図 3A, B)。したがって AMPK シグナルの活性化は、心筋細胞の細胞周期停止と同調して起こることが示された。

そこで次に、AMPK シグナルの活性化が心筋細胞の増殖を停止させているのか検討するため、マウスおよびオポッサム両者の新生仔に対して AMPK シグナルに対する阻害剤の投与を行った。その結果、いずれにおいても出生後の心筋細胞の増殖期間が延長することが明らかになった

(図 4A, B)。また、マウスでは阻害剤投与による AMPK シグナル活性化の抑制によって、心筋が再生する期間が延長されることも示された。更に、AMPK シグナルの心筋細胞特異的かつタモキシフェン依存性なノックアウトマウス (α MHC-MerCreMer; *Prkaa2*^{flox/flox}) を作製し、出生直後に AMPK シグナルの活性化を心筋細胞のみで抑制したところ、阻害剤投与と同様に心筋細胞の細胞周期停止の遅延が認められた (図 4C)。

おわりに

以上の研究により、有袋類のオポッサムが出生後少なくとも 2 週間にわたって心筋細胞増殖を継続し、心筋再生能を維持していることが明らかになった。これは、これまで調べられた哺乳類のなかで、出生後に心筋再生能を維持している期間としては最長のものである。今後の研究課題とし

て、有袋類がいかにして出生後にも心筋細胞増殖を継続するかについて明らかにすることが重要であると思われる。なぜなら、少なくともマウスにおいては、出生後の子宮外環境への移行それ自体が心筋細胞増殖停止のトリガーとなることが示されているからである³⁾。この機構は有袋類では保存されているのだろうか。マウスにおいて心筋細胞増殖停止を誘導するものは、肺呼吸の開始や胎児循環から生後循環へ移行することによる動脈血酸素濃度の上昇、および母乳を介した脂肪酸摂取である³⁾。これに対して、有袋類は一般に未熟な状態で出生するにもかかわらず、卵円孔や動脈管でのシャントはマウスやヒトなどの真獣類と同様に、出生後すぐに閉塞するとされている。したがって、胎児循環はおそらく出生後に継続しているわけではない。肺呼吸については、有袋類の新生仔は呼吸器と皮膚の発達が十分でないため、肺ではなく皮膚でのガス交換(皮膚呼吸)が優位であるとされている⁴⁾。これらの違いにより、オポッサムでは出生後の心筋細胞の酸素代謝がどのように変化しているか検討することは興味深い課題と思われる。

本研究では更に、哺乳類で保存された心筋細胞増殖の停止の分子メカニズムとして、出生後の心筋細胞における AMPK シグナルの活性化が見いだされた。AMPK は ATP/AMP 比やカルシウム

イオン濃度の変化、そして種々のストレスなどにより活性化され、心筋細胞では肥大成長や代謝を制御することが知られている。心筋細胞の細胞周期は、解糖系から酸化的リン酸化への代謝の切り替わりにより制御されていることから、AMPK シグナルはこの代謝の切り替わりを制御することで細胞周期停止を誘導している可能性が考えられる。一方で、がん細胞などでは AMPK は幾つかの転写因子を介して細胞周期を制御するということが知られていることから、心筋細胞でも代謝経路とは独立した経路での細胞周期調節が行われている可能性もある。AMPK を介した心筋細胞増殖の制御機構の詳細、および成体での心筋再生能との関わりを明らかにすることも、今後の重要な研究課題であると思われる。

●文 献

- 1) Nishiyama C, Saito Y, Sakaguchi A et al : *Circulation*. **146** : 125-139, 2022
- 2) Cutie S, Huang GN : *Cell Regen*. **10** : 6, 2021
- 3) Sakaguchi A, Kimura W : *Curr Opin Genet Dev*. **70** : 54-60, 2021
- 4) Saunders N, Hinds L eds : *Marsupial Biology ; Recent Research, New Perspectives*, UNSW Press, Sydney, 1997
- 5) Kiyonari H, Kaneko M, Abe T et al : *Curr Biol*. **31** : 3956-3963.e4, 2021
- 6) Cardoso-Moreira M, Halbert J, Vallotton D et al : *Nature*. **571** : 505-509, 2019