

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590204

研究課題名（和文） 新しく同定された非定型心筋細胞の機能と生理的意義の検討

研究課題名（英文） Characterization of novel resident heart cells identified as atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs)

研究代表者

尾松 万里子 (Omatsu-Kanbe Mariko)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80161397

研究成果の概要（和文）：

成体マウス心室筋細胞単離の最終段階で得られた「心筋細胞を含まない分画」を集めて培養したところ、特徴ある形態に変化するとともに自動的に拍動する細胞が出現することを見出し、atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs)として新規に同定した。ACMsの細胞数は、新生仔期に一番多く、その後減少したが、成体になると老齢にいたるまで数は変わらなかった。また、老齢マウスから単離したACMsでも、心筋胎児型遺伝子産物を発現していた。心筋細胞を含まない分画を致死的な低酸素状態に曝露した後に培養すると、約50%のACMsは生き延びて成長し拍動を開始した。また、正常条件の培養においてもACMsは恒常的にオートファジーが活性化していることがわかった。これらの結果から、成体マウスの心臓において、ACMsが一定数存在し、細胞の周辺環境条件によっては、大きく成長して自発的に拍動を開始する可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We have investigated the presence of resident heart cells that are distinct from cardiomyocytes in adult mice. The heart was coronary perfused with enzymes and both ventricles were excised and further digested. After spinning the ventricular myocytes down, the supernatant fraction (cardiac myocyte-depleted fraction, CMDF) was cultured in methylcellulose-based semisolid culture medium. Three to five days after plating, some of the small cells adhered to the bottom of the dishes gradually developed their shapes and started beating spontaneously. These cells were mostly multinucleated, well sarcomeric-organized and expressed cardiac specific proteins, defined as a novel type of heart cells, atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs). The cell population of ACMs was highest at neonatal period and significantly decreased within the first 5 weeks and reached a plateau in the adult stage. The ACMs obtained from both newborn and aged mice express the fetal cardiac gene products, such as atrial natriuretic peptide (ANP) and voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel  $Cav3.2$ . We examined whether CMDF cells, including ACMs, that underwent simulated lethal ischemia could develop into beating cells. When CMDF cells pre-exposed to ischemia were cultured for 6 days, the cell number of beating ACMs was ~50% of normoxic preparations. Electron microscopic analyses of ACMs displayed constitutively active autophagy during the culture even in the normoxic conditions. The results suggest the possibility that the development of beating ACMs could occur in injured heart, even if the surviving cell population is small.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：ACMs, novel heart cells, self-beating, atypically-shaped cardiomyocytes, cardiomyocytes, autophagy, ischemia, calcium transients

1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓は、心筋細胞、内皮細胞、血管平滑筋細胞など種々の細胞から構成されている。近年では cardiac progenitor cells および side population cells に分類される心筋幹細胞が組織内に存在することが明らかになってきている。またこれらの幹細胞を培養し、5'-azacytidine, oxytocin, trichostatin A 等を添加することによって心筋細胞に分化させる方法が報告されている。

(2) 申請者らは、ランゲンドルフ灌流による成体マウス心室筋細胞単離の最終過程において、遠心によって取り除かれた上清分画（心筋細胞を含まない分画）にどのような細胞が存在するかを調べたところ、培養3~5日後の接着細胞群の中に、丸い細胞本体の端が長く伸長し枝分かれた形態に変化するとともに自動的に拍動する細胞が出現することを見出した。これらの細胞は、その後、枝分かれや突起が増え、一定の形態を示すことはなかったものの、他の細胞群とは全く異なる細胞に成長した。この細胞には幹細胞マーカーとして知られる細胞表面抗原の発現が見られなかった。ほとんどの細胞は多核であり、自動能を有し、心室筋の主要なギャップ結合タンパク質である connexin-43 および洞房結節細胞の自動性に係わるチャンネルとして知られる hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4 (HCN4)の発

現を確認された。また、パッチクランプ法により、洞房結節細胞に類似した自発的行動電位が記録された。

(3) 以上のことから、心室筋細胞と洞房結節細胞の特徴の両方を併せ持ったこの細胞を「非定型心筋細胞 atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs)」として2009年に新規に同定した<sup>1</sup>。

(4) 非定型心筋細胞は、健全な心臓組織内に存在している時には、自動性は発現せず、心筋細胞の間隙（ニッチ）に存在する多くの小型細胞の1つとして生存していると考えられる。従って、通常、心臓内における非定型心筋細胞はニッチの環境等によって静止状態に保たれている、しかし、心筋組織の壊死等によってニッチ環境が崩壊すると、非定型心筋細胞に対する機能抑制が解除される可能性が高い。抑制が解かれた非定型心筋細胞は成長して自動性を発現し、異所性不整脈発生の一因となる可能性があると考えられた。

文献

1. Omatsu-Kanbe & Matsuura (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381: 361-366

2. 研究の目的

本研究課題は、申請者らが、成体マウス心室筋組織内に今までに知られていなかった

新しい種類の細胞である「非定型心筋細胞 (atypically-shaped cardiomyocytes, ACMs)」を見出したことから、この細胞の機能の特徴を調べ、生理的意義の解明をおこなうことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 非定型心筋細胞 (ACMs) の培養法の確立 :

マウスから心臓を取り出してランゲンドルフ灌流装置に取り付け、コラゲナーゼ灌流により心室筋組織を消化したのち、両心室を心尖部から2/3の場所で切り取り (心房を含まない心室組織)、さらにピペティングしながら酵素液中で消化した。細胞塊がほぼ見えなくなる程度に消化した後、酵素反応液を300回転、3分間遠心で洗浄し、心室筋細胞を沈殿させた。心室筋細胞を除いた分画である上清を1,000回転、5分間遠心し、得られた沈殿物を「心筋細胞を含まない分画 cardiac myocyte-depleted fraction (CMDF)として methylcellulose 含有の半固形状培地 (MethoCult) 中に浮遊させ、CO<sub>2</sub> インキュベータ内に置き、37°Cで培養した。

#### (2) 免疫染色法による非定型心筋細胞 (ACMs) における発現タンパク質の確認 :

固定した培養細胞を界面活性剤およびウシ血清アルブミンで処理し、一次抗体と反応させた後、蛍光二次抗体で標識してレーザー走査型共焦点顕微鏡で観察した。

#### (3) 非定型心筋細胞 (ACMs) における活動電位の記録 :

拍動する細胞にホールセルパッチクランプ法を用いて活動電位を測定した。

#### (4) 非定型心筋細胞 (ACMs) における細胞内カルシウム濃度の記録 :

拍動する細胞に蛍光カルシウム指示薬 Fluo4 AM を取り込ませ、レーザー走査型共焦点顕微鏡のラインスキャンモードを用いて細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。

#### (5) 電子顕微鏡による非定型心筋細胞 (ACMs) の観察 :

電子顕微鏡標本用に固定した培養細胞を樹脂に包埋して薄切し、透過型電子顕微鏡で観察した。また、固定した細胞の表面構造を走査型電子顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) 非定型心筋細胞 (ACMs) の調整・培養法の確立 :

ランゲンドルフ灌流による成体マウス心室筋細胞単離の最終段階で得られた「心筋細胞を含まない分画」である cardiac myocyte-depleted fraction (CMDF)をさらに遠心して集めた細胞を培養したところ、枝分かれした突起のある形態に変化するとともに自動的に拍動する細胞が出現することを見出し、atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs)として新規に同定した。この拍動する細胞は実験に供したすべてのマウス心臓に見出された。

#### (2) 非定型心筋細胞 (ACMs) の機能の特徴 :

これらの拍動する ACMs に、通常的心筋細胞を同様のタンパク質が発現しているかを検討した。筋原線維において actin filament を Z 膜に結合させる  $\alpha$ -actinin、心室筋型 gap junction 構成タンパク質である connexin-43 およびペースメーカーチャネルタンパク質である hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4 (HCN4) の発現が確認された。しかし、最長2週間の観察においても分裂・増殖は観察されなかった。また、幹細胞マーカーとして知られる細胞表面抗原である Stem cell antigen 1 (Sca-1), leukocyte

common antigen (CD45), muscle stem cell marker (CD34), platelet-endothelial adhesion molecule (CD31), vascular endothelial cell growth factor receptor 2 (Flk-1) の発現も見られなかった。

パッチクランプ法を用いてこれらの細胞から洞房結節細胞に類似した自発的活動電位が記録し、acetylcholine 投与によりこれらの活動電位が抑制されることがわかった。また、ラインスキャンによる細胞内カルシウム濃度変化の測定により、自発的なカルシウムトランジェントを記録し、isoproterenol 投与により、そのピーク間隔が短縮することも確認された。これらの結果から、ACMs が洞房結節細胞によく似た機能的特徴を持つことが示唆された。

(3) 非定型心筋細胞 (ACMs) の出生後のマウスの成長に伴う変化：

ACMs の細胞数は、新生仔期に一番多く、その後急激に減少したが、成体になると一定数となり、老齢にいたるまで数は変わらなかった。また、老齢マウスから単離した ACMs でも、新生仔から単離した細胞と同様、atrial natriuretic peptide (ANP) や T 型  $Ca^{2+}$  チャネル (Cav3.2) などの心筋胎児型遺伝子産物を発現していた。

(4) 非定型心筋細胞 (ACMs) の虚血耐性：

単離した心室筋細胞を致死的な低酸素状態に  $37^{\circ}\text{C}$  で 90 分間曝露すると、生き残った細胞は約 10% であった。一方、調整した「心筋細胞を含まない分画」を同様に致死的な低酸素状態に曝露した後に培養すると、約 50% の ACMs は成長して拍動を開始した。低酸素に曝した ACMs の自発的カルシウムトランジェントは、正常状態で培養した細胞と同様であった。

(5) 非定型心筋細胞 (ACMs) のオートファジー活性：

電子顕微鏡を用いて ACMs の微細構造

を観察したところ、細胞内に自食胞 (autophagosome) が多数存在し、細胞膜には autophagosome 内残存物の細胞外への放出に伴う乳頭状突起 (papillae) が重なるように存在していることが観察された。また、生細胞を用いてリソソームの分布を調べたところ、autophagosome と同様、核の周囲に多く、細胞膜、細胞質に瀰漫性に存在していることが明らかとなり、オートファジーが恒常的に活性化していることが示唆された。

(6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト：

心臓組織内に存在する細胞は、心筋細胞以外に、内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞など種々の細胞が知られており、近年では cardiac progenitor cells および side population cells に分類される心筋幹細胞の存在も明らかになっている。

非定型心筋細胞 (ACMs) は、心室組織から単離され、「洞房結節細胞および心室筋細胞の両方の特徴を有し、特徴的な形態と自動性をもつ心筋細胞」として我々が発見した細胞である<sup>1</sup>。単離直後は直径約  $10\ \mu\text{m}$  の小型の細胞であるが、培養することによって  $200\ \mu\text{m}$  以上の長さを有し自動的に拍動する細胞に成長する。ACMs は、健常な心臓組織内に存在している時には、自動性は発現せず、心筋細胞の間隙 (ニッチ) に存在する多くの小型細胞の 1 つとして生存していると考えられる。従って、通常、心臓内における非定型心筋細胞はニッチの環境等によって静止状態に保たれている、即ち「心筋組織のニッチ環境が ACMs の機能発現を抑制している」と推察される。しかし、心筋組織の壊死等によってニッチ環境が崩壊すると、ACMs に対する機能抑制が解除される可能性が高い。抑制が解かれた ACMs は成長して自動性を発現し、異所性不整脈発生の一因となる可能性があると考えられる。

(7) 今後の展望：

非定型心筋細胞 (ACMs) はこれまでの培養方法では分裂・増殖が観察されていない。この細胞の細胞周期がどのような条件で開始するかを検討することによって、生体内におけるこの細胞の役割を推察することが可能になると思われる。

一方、ACMs に発現している発現タンパク質は、現在のところ通常の心筋細胞と同じであるため、この細胞を均一細胞集団として分離することや、心臓組織内での局在を明らかにすることは困難である。

従って、今後の最も重要な課題の1つは、ACMs のマーカーとなるタンパク質を探索し、この細胞の心臓組織内での局在を明らかにし、さらに均一あるいは均一に近い細胞集団として単離する方法を探索することであると思われる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Omatsu-Kanbe M, Matsuura H. Ischemic survival and constitutively active autophagy in self-beating atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs): Characterization of a new subpopulation of heart cells. *J Physiol Sci* 63:17-29, 2013. 査読有. DOI:10.1007/s12576-012-0236-5
- ② Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S. (2012) Inhibitory effects of sevoflurane on pacemaking activity of sinoatrial node cells in guinea-pig heart. *Br J Pharmacol* 166(7):2117-35, 2012. 査読有. DOI:10.1111/j.1476-5381.2012.01914.x
- ③ Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S. Presence of store-operated  $Ca^{2+}$  entry in C57BL/6J mouse ventricular myocytes and its suppression by sevoflurane. *Br J Anaesth* 109(3):352-60, 2012. 査読有. DOI:10.1093/bja/aes212aes212 [pii]
- ④ Hoshino S, Omatsu-Kanbe M, Nakagawa M, Matsuura H. Postnatal

developmental decline in  $I_{K1}$  in mouse ventricular myocytes isolated by the Langendorff perfusion method: comparison with the chunk method. *Pflugers Arch.* 463: 649-668, 2012. 査読有. DOI:10.1007/s00424-012-1084-0

- ⑤ Amagai A, Macwilliams H, Isono T, Omatsu-Kanbe M, Urano S, Yamamoto K, Maeda Y. PKC-mediated ZYG1 phosphorylation induces fusion of myoblasts as well as of Dictyostelium cells. *Int J Cell Biol* 2012:657423, 2012. 査読有. DOI: 10.1155/2012/657423
- ⑥ Omatsu-Kanbe M, Yamamoto T, Matsuura H. Autophagy is constitutively active in normal mouse sino-atrial nodal cells. *Acta Histochem Cytochem* 44: 223-231, 2011. 査読有. DOI: 10.1267/ahc.11030AHC11030 [pii]
- ⑦ Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S. Sevoflurane protects ventricular myocytes from  $Ca^{2+}$  paradox-mediated  $Ca^{2+}$  overload by blocking the activation of transient receptor potential canonical channels. *Anesthesiology.* 115:509-522, 2011. 査読有. DOI: 10.1097/ALN.0b013e31822b7901
- ⑧ Omatsu-Kanbe M, Yamamoto T, Mori Y, Matsuura H. Self-beating atypically-shaped cardiomyocytes survive a long-term postnatal development preserving expression of fetal cardiac genes in mice. *J Histochem Cytochem* 58: 543-551, 2010. 査読有. DOI: jhc.2010.955245 [pii] 10.1369/jhc.2010.955245
- ⑨ Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S.  $Ca^{2+}$  paradox injury mediated through TRPC channels in mouse ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 161:

1734-1750, 2010. 査読有. DOI:  
10.1111/j.1476-5381.2010.00986.x  
BPH986 [pii]

- ⑩ Toyoda F, Ding W-G, Zankov DP, Omatsu-Kanbe M, Isono T, Horie M, Matsuura H. Characterization of the rapidly activating delayed rectifier potassium current,  $I_{Kr}$ , in HL-1 mouse atrial myocytes. *J Membrane Biol* 235: 73-87, 2010. 査読有. DOI:  
10.1007/s00232-010-9257-2

[学会発表] (計 4 件)

#### 国内学会

- ① Omatsu-Kanbe M, Matsuura H (2013). Requirement of autophagy in the development and ischemic tolerance of self-beating atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs), a new subpopulation of heart cells. *J. Physiol. Sci.* 63: S135. 第 90 回日本生理学会大会, 2013 3 27-29, 東京.
- ② Omatsu-Kanbe M, Matsuura H. Characterization of self-beating atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs) isolated from adult mouse heart. *J. Physiol. Sci.* 62: S162, 2012. 第 89 回日本生理学会大会, 2012, 3 29-31, 松本.
- ③ Omatsu-Kanbe M, Matsuura H. Self-beating atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs) survive a long-term postnatal development while preserving the expression of fetal cardiac genes in mice. *J Physiol Sci* 61: S269, 2011. 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会 (東日本大震災のため誌上大会となった)

#### 国際シンポジウム

- ① Omatsu-Kanbe M, Matsuura H. P2X5 receptor is highly expressed in atypically-shaped cardiomyocytes

(ACMs): Characterization of a novel subpopulation of beating heart cells in adult mice. Purine 2012 in Fukuoka: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery. May 31-June 2, 2012, Fukuoka.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

尾松 万里子 (Omatsu-Kanbe Mariko)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 80161397

##### (2) 研究分担者

松浦 博 (Matsuura Hiroshi)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 60238962

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

##### (4) 研究協力者

山元 武文 (Yamamoto Takefumi)  
滋賀医科大学・医学部・技術職員  
研究者番号 : なし

森 康博 (Mori Yasuhiro)  
滋賀医科大学・医学部・技術職員  
研究者番号 : なし