



Title	STAT3/Runx1/Myom2シグナル経路は哺乳類心筋細胞増殖制御に重要な役割を果たす
Author(s)	鈴木, 翔大
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105582
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (鈴木 翔 大)	
論文題名	STAT3/Runx1/Myom2シグナル経路は哺乳類心筋細胞増殖制御に重要な役割を果たす
論文内容の要旨 [背景・目的] 心疾患は現在、世界の死因の第一位であり、あらゆる心疾患の終末像である心不全には根治療法が存在せず、新規治療法開発が喫緊の課題である。心不全は主にポンプ機能を担う心筋細胞の減少により心機能が低下した病態である。哺乳類の心筋細胞は生後間もなく増殖能を失う終末分化細胞であるため、心臓はほとんど再性能を持たない。従って、心筋細胞の増殖制御メカニズムを解明し、その増殖を誘導することが心不全への効果的な治療戦略になると考えられている。 他方、ゼブラフィッシュの心筋細胞は成体においても増殖能を持ち、増殖前にはサルコメア構造の分解や心筋前駆マーカーの発現を特徴とする脱分化を起こすことが報告されている。哺乳類心筋細胞においても、成体の心筋細胞が脱分化した後に増殖したという報告がなされており、増殖における脱分化の重要性が明らかになりつつある。このことから、増殖制御メカニズムの解明に向けて脱分化に着目した。哺乳類心筋細胞の脱分化時にはマーカー遺伝子としてRUNX family transcription factor 1 (Runx1)が発現上昇することが報告されているものの、その増殖への関与は明らかになっていない。 そこで本研究は、Runx1の心筋細胞増殖における生物学的意義を評価し、その下流で働く増殖制御因子を複数の網羅的解析によって明らかにすることを目的とした。 [方法・結果] 1. 新生仔ラット心筋細胞の増殖におけるRunx1の発現・機能検討 まず、心筋細胞増殖時のRunx1の発現変化を検討するため、単離・培養した新生仔ラット心筋細胞(NRCM)に増殖性の刺激であるウシ胎児血清(FBS)を処置し、Runx1の発現を経時的に評価した。その結果、Runx1のmRNA、タンパク質発現は血清刺激によって上昇したことから、Runx1が心筋細胞の増殖時に発現上昇し、増殖に関与することが示唆された。 次に、Runx1の発現を制御する因子の同定を試みた。STAT3を活性化することが知られているIL-6ファミリーサイトカインのメンバーであるOncostatin Mを心筋細胞に処置すると、Runx1の発現を伴う脱分化が生じることが報告されていることから、STAT3に着目して検討を行った。その結果、NRCMにおいてSTAT3のノックダウンはRunx1の発現を有意に抑制したことから、STAT3がRunx1の発現を制御していることが明らかとなった。 さらに、Runx1の心筋細胞増殖における関与を検討するため、Runx1をノックダウン・過剰発現させた際の細胞周期進行中の心筋細胞割合を計測した。その結果、Runx1のノックダウンにより細胞周期進行中の心筋細胞割合が有意に減少し、Runx1の過剰発現により細胞周期進行中の心筋細胞割合が有意に上昇した。これらの結果から、Runx1は心筋細胞の増殖に必要かつ十分であることが示唆された。 2. Runx1の下流標的の探索 Runx1が心筋細胞の増殖を促進する際の下流標的を探索するため、Runx1を過剰発現したNRCMを用いてRNA-sequencing(RNA-seq)解析を行った。その結果、Runx1過剰発現群では、コントロール群と比較して414個の遺伝子が発現上昇し、553個の遺伝子が発現減少していた。Runx1過剰発現群では幼若な心筋細胞で高発現する遺伝子の発現が上昇し、成熟した心筋細胞で高発現する遺伝子の発現が減少していたことから、Runx1が心筋細胞の幼若化を誘導することで心筋細胞増殖を促進することが示唆された。 3. 増殖心筋細胞で発現変動する遺伝子の解析 Runx1過剰発現心筋細胞で発現変動した遺伝子の中から増殖に関わる因子を抽出するために、増殖中の心筋細胞を分取し遺伝子発現を解析した。増殖細胞の標識には、S/G2/M期に発現するGemininを蛍光標識することで、細胞周期を可視化するプローブであるFucci-S/G2/M Greenを用いた。NRCMにFucci-S/G2/M Greenを発現するアデノウイルス	

ベクターを感染させ血清存在下で培養し、蛍光標識された細胞をFACSにより回収した。解析の結果、増殖中の心筋細胞では、181個の遺伝子が発現上昇し、137個の遺伝子が発現減少していた。発現上昇した遺伝子についてGene Ontology解析を行った結果、染色体分離や核分裂などの細胞周期に関わるプロセスが濃縮されており、増殖心筋細胞における発現変動遺伝子群を取得できていることが示された。

4. 生後1日・7日の心臓におけるsingle cell RNA-sequencing (scRNA-seq) 解析

哺乳類の心筋細胞はおおよそ生後7日で増殖能を失うことが報告されている。そこで、増殖能を持つ出生直後と、増殖能を失った生後7日の間の遺伝子発現の比較により、分化や増殖に関わる因子を明らかにできると考えた。scRNA-seqの解析データは既報論文に公開されているものを取得し再解析した。scRNA-seqにより検出された細胞の内、心筋細胞は11のクラスターを形成していた。疑似時間解析を行った結果、生後1日ではG1期からS期、G2/M期に向かう軌道が確認され、細胞周期の進行が示唆された。一方、生後7日ではS期で軌道が途切れており、細胞周期の停止が示唆された。そこで、細胞周期進行に差があったクラスターの遺伝子発現変化を解析したところ、生後7日の心筋細胞と比べて、生後1日の心筋細胞で335個の遺伝子が高発現し、389個の遺伝子が低発現していた。

5. 2～4の解析の統合解析

上記2～4で行った解析において、増殖条件下で共通して発現減少している遺伝子としてMyomesin 2 (Myom2)を見出した。実際に、Myom2のmRNA発現は、NRCMにおいて血清の刺激やRunx1の過剰発現により減少した。また生直後に比べて生後7日の心臓においてMyom2タンパク質発現が増加した。Myom2はサルコメアのMバンドの構成要素であり、サルコメアの安定性維持に重要な役割を果たすことが知られている。しかし、心筋細胞の脱分化や増殖におけるMyom2の関与については報告されていない。そこでMyom2を過剰発現するアデノウイルスベクターをNRCMに感染させ細胞周期進行中の心筋細胞割合を計測した。その結果、Myom2の過剰発現は細胞周期進行中の心筋細胞割合を有意に減少させたことから、Myom2が心筋細胞の増殖を抑制することが明らかになった。

[結論]

Runx1はSTAT3によって発現が正に制御され、心筋細胞増殖を促進することが明らかとなった。さらに、複数の網羅的解析の統合解析の結果、Runx1が発現を抑制する因子としてMyom2を同定し、Myom2の発現誘導が心筋細胞の増殖を抑制することを明らかにした。以上より、STAT3/Runx1/Myom2が心筋細胞増殖を機序とする心不全治療法開発に寄与する可能性が示された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (鈴木 翔大)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤尾 慈
	副 査	教授	岡田 欣晃
	副 査	教授	橋本 均

論文審査の結果の要旨

哺乳類の心筋細胞は、生後間もなく増殖能を大きく失うことは広く知られているが、心筋細胞が細胞周期を離脱するメカニズムについては十分に解明されているわけではない。しかしながら、成体哺乳類心筋細胞も培養条件によっては一部増殖することが知られるようになっており、増殖前にはサルコメア構造の分解や心筋前駆マーカーの発現を特徴とする脱分化を起こすことが観察されている。哺乳類心筋細胞の脱分化時にはマーカー遺伝子としてRUNX family transcription factor 1 (Runx1)が発現上昇することが報告されているものの、心筋細胞増殖におけるRunx1の機能は不明であった。本論文は、Runx1の機能解明を行うとともに発現制御機構を明らかにした。さらに、複数の網羅的解析の結果を統合し、心筋細胞の細胞周期離脱機構を追究した。

心筋細胞の増殖制御機構に関する研究は、古くから行われてきたが、解決困難な課題である。本論文は、このような難解なテーマに取り組む、極めて挑戦的な研究であると高く評価できる。

まず著者は、新生仔ラット心筋細胞(NRCM)を増殖条件で培養するとRunx1の発現が上昇すること、Runx1のノックダウンや過剰発現は、それぞれ、NRCMの増殖を抑制、促進することを見出した。また、NRCMを増殖条件におくと、STAT3が活性化されるが、STAT3の活性化はRunx1の発現増強に必須であることを明らかにした。これらのことから、著者は、Runx1が、単なる脱分化マーカーではなく、心筋細胞の増殖促進因子であると結論付けた。

また、著者は、3つの網羅的解析 (Runx1を強制発現したNRCMのRNA-seq解析、FUCCIシステムを用いて調整した増殖心筋細胞のRNA-seq解析、データベースから得た生後1日・7日の心臓におけるsingle-cell RNA-seq (scRNA-seq) 解析)の結果を統合し、細胞周期離脱とともに発現増強する遺伝子としてMyomesin 2(Myom2)を見出した。さらに、Myom2の過剰発現は、細胞周期活性を有する心筋細胞の割合を有意に減少させたことから、Myom2は心筋細胞の増殖を抑制すると結論付けている。Myom2はサルコメアのMバンドの構成要素であり、サルコメアの安定性維持に重要な役割を果たすことが知られているが、心筋細胞の増殖制御におけるMyom2の関与については報告されておらず、本研究の成果は極めて新規性が高い。

以上、本論文は、心筋細胞が生直後に細胞周期を離脱する新規分子メカニズムの一端を解明したものであることから、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。