

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19924

研究課題名（和文）心筋細胞の介在板から入力するメカニカルシグナルの可視化

研究課題名（英文）Identification of mechanical signal from intercalated discs

研究代表者

片野坂 友紀（Katanosaka, Yuki）

岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：60432639

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：心臓は、血行動態の変化（メカニカルストレス）に応じて、形や機能を変容しながらポンプ機能を維持することは知られているが、そのシグナルは未だ可視化されていない。我々は、介在板部位に心筋細胞のメカノセンサー分子であるTRPV2が発現することを明らかにしている。本研究では、新生児心筋細胞が周囲の心筋細胞と、介在板を形成して同調拍動を獲得するまでの過程について、TRPV2の役割とこれを介したCa²⁺シグナルの可視化を試みた。この結果、心筋細胞の成熟課程におけるTRPV2の役割と、介在板部位に生じるCa²⁺シグナルの実験的根拠を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋細胞は、血行動態変化（メカニカルストレス）に応じて形や機能を変容させる。この際には、心筋細胞のメカニカルストレス依存的Ca²⁺シグナルを利用することが知られているが、その分子基盤は不明のままである。また、心筋細胞では、拍動ごと（収縮期）に筋小胞体由来のCa²⁺が一過的に上昇するため、収縮期に上昇するCa²⁺と混同することなく、メカのセンサーを介したCa²⁺シグナルが有効に働くためには、細胞内での『Ca²⁺波の空間やタイミング』に特性があると考えられる。本研究は、新しい心不全治療ターゲット分子を提案するために、心筋細胞のメカノセンシング機構の分子基盤を得るものである。

研究成果の概要（英文）：The heart has a dynamic compensatory mechanism for haemodynamic stress. However, the molecular detail of cardiac mechano-transduction are unclear. We have previously proposed that TRP vanilloid family type 2 channel (TRPV2) serves as a mechanoreceptor at intercalated discs of cardiomyocytes. Here, we analyzed that the mechanical-stimulation-induced Ca²⁺ change at intercalated area of neonatal cardiomyocytes. These data show that TRPV2-dependent mechanical-stimulation-induced Ca²⁺ change is critical for the development of Ca²⁺-handling of beating myocytes during the maturation process of neonatal cardiomyocytes. In addition, we show that the TRPV2-dependent mechanical-stimulation-induced Ca²⁺ change is not observed in dystrophic myocytes.

研究分野：医工学

キーワード：心不全 メカニカルストレス 血行動態負荷 心筋細胞 メカノセンサー TRPV2 トランスレーショナルリサーチ 多階層

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

心臓は、血行動態の変化(メカニカルストレス)に応じて、形や機能を変容しながらポンプ機能を維持している。例えば、エクササイズや妊娠あるいは体の成長などに対しては、心臓は肉厚に大きくなりポンプ機能を増大させる(肥大)。一方、宇宙飛行や長期にわたる寝たきり状態では、血行動態負荷が減少してしまい、心臓は萎縮する。心臓を構成する心筋細胞は、終末分化細胞であり生後すぐに分裂能を失うため、心臓の形や機能の変化は、心筋細胞のリモデリング(変容)により生じることとなる。心筋細胞の肥大現象(変容)は、伸展培養条件下の心筋細胞でも再現されるために、心筋細胞にメカノセンサー分子があることは明白であるが、その分子実体については未だ不明な点が多い。

心不全とは、心臓ポンプ機能が低下して末梢臓器に十分な血液を送れない状態である。我が国では、75歳以上の約50%が心不全患者である。発症後の5年生存率も悪く、決定的な治療法は確立されていない。心不全に至る原因や過程は一様ではないが、唯一、高血圧などのメカニカルストレスは共通の引き金である。このため、メカノセンサーを介した心不全発症機構の解明によって、画期的治療法が開発されることが期待されている。

心筋細胞の肥大応答には、細胞内 Ca^{2+} の上昇が必須であることが知られているが(引用文献、)、その Ca^{2+} 流入経路は未だ不明である。このため、心筋細胞のメカノセンサーは、機械刺激感受性 Ca^{2+} チャネルであると考えられた。心臓は、心筋細胞同士が形態的・機能的に連結した機能的合胞体である。隣り合う心筋細胞同士は、介在板と呼ばれる特殊構造で連結されており、この部位は、心拍に伴う心筋細胞の収縮・弛緩の際に唯一伸展される場所である(右下図)。我々は、この介在板部位に機械刺激感受性 Ca^{2+} チャネル TRPV2 が発現し、メカノセンサーとして働いていることを示した(引用文献、)。我々は、TRPV2・ノックアウト(KO)マウスを開発し、メカノセンサー分子による介在板部位の構造的・機能的な統合が、心形態や機能の維持に重要であることを示した(引用文献)。一方で、生体内では、介在板からどのようなシグナルが入力しているかについては、未だ不明なままである。

心筋細胞では、拍動ごと(収縮期)に筋小胞体由来の Ca^{2+} が一過的に上昇する。収縮期に上昇する Ca^{2+} と混同することなく、メカノセンサーを介した Ca^{2+} シグナルが有効に働くためには、細胞内での『 Ca^{2+} 波の空間やタイミング』に特性があるに違いない。しかしながら、現在までに、メカノセンサーを介した Ca^{2+} 波は可視化されておらず、シグナル発生のミクロな場が証明されていない。

2. 研究の目的

我々の研究から、心筋細胞の『形や機能を変容しながらポンプ機能を維持する』性質は、心筋メカノセンサーを介した Ca^{2+} シグナルに支えられていることが明らかとなってきた(Katanosaka et al., *Nature Communications*, 2014)。しかしながら、これまでに、心筋メカノセンサーを介した Ca^{2+} シグナルを可視化した実験的な証拠は皆無である。本研究では、生理状態および病態発症時に、介在板の TRPV2 を介して入力するメカニカルシグナルを可視化し、心機能を支えるメカノトランスダクションのトリガーポイントの分子基盤を明らかにする。また、臨床的治療効果を目指して、メカノセンサーをターゲットした新しく画期的な心不全治療を提案することを目指す。

3. 研究の方法

心筋細胞が、介在板において、拍動や血行動態変化に伴う『生理的な力(メカニカルストレス)』を感知している実験的証拠を得る。また、このメカニカルシグナルを、細胞のリモデリング(変容)に反映させているという実験的証拠を得る。

(1) 収縮期および弛緩期の心臓における TRPV2 の立体構造の変化の有無を解明

マウス心臓を、ランゲンドルフ還流して、buffer 組成に依存して、収縮期および弛緩期で固定する。既に作成した TRPV2 抗体を用いて、収縮期および弛緩期の介在板の TRPV2 抗体染色像を観察し、拍動に伴う TRPV2 の立体構造変化をモニターする。

(2) 心筋細胞の細胞間連絡部位からのメカニカルストレス依存的な Ca^{2+} の可視化

生体内では、TRPV2 を介した Ca^{2+} が介在板から入力していることが予想されるが、収縮期に上昇する筋小胞体 Ca^{2+} が邪魔をして直接観察できない。このため、タブシガルギン処理によって筋小胞体機能を低下させた細胞を用いて、伸展や低浸透圧依存的に介在板から入力する Ca^{2+} を高速カメラでモニターする。さらに、同様の実験を TRPV2KO 心筋細胞で行い、正常心筋細胞から得られた Ca^{2+} 画像を比較する。

(3) 介在板 TRPV2 を介した転写因子の活性化が肥大シグナルのキーとなるか検証

既に、マイクロアレイ実験から明らかとなった TRPV2 依存的に発現変化する転写因子の発現の変化や核内移行を解析する。

4. 研究成果

(1) 収縮期および弛緩期の心臓における TRPV2 の立体構造の変化の有無を解明

マウス心臓を、ランゲンドルフ還流して、buffer 組成に依存して、収縮期および弛緩期で固定した。既に作成した TRPV2 抗体を用いて、収縮期および弛緩期の介在板の TRPV2 抗体染色像を観察したところ、TRPV2 の染色像が異なった。このことは、拍動に伴い TRPV2 の立体構造変化が変化していることを示唆している。また、TRPV2 結合因子 X について、収縮期および弛緩期における染色性が異なることが明らかとなった。現在、生化学的根拠を得るために、収縮期および弛緩期の心臓の可溶性産物において、TRPV2 と結合因子 X の相互作用を確認しているところである。

(2) 心筋細胞の細胞間連絡部位からのメカニカルストレス依存的な Ca^{2+} の可視化

新生児心筋培養細胞では、細胞を培養することが可能であり、単離後から 72 時間にわたって心筋細胞同士が互いに相互作用して同調拍動を始めるまでの過程を観察することができる。本研究では、細胞の性質は、単離から時間経過と共に変化していくために、細胞のメカニカルストレス依存的 Ca^{2+} 応答も変化していくことが明らかとなった。細胞が心筋細胞としての特性が未発達である状態と、隣り合う細胞が介在板を形成している成熟した心筋細胞では、メカニカルストレス依存的 Ca^{2+} 応答の起点が異なることを示唆する実験結果が得られた。

また、成体マウスの心筋細胞を単離した実験では、収縮期に上昇する筋小胞体 Ca^{2+} が邪魔をして、介在板からの Ca^{2+} 流入は直接観察できないため、タブシガルギン処理によって筋小胞体機能を低下させた細胞を用いて、伸展や低浸透圧依存的に介在板から入力する Ca^{2+} を高速カメラでモニターした。さらに、同様の実験を TRPV2KO 心筋細胞で行い、正常心筋細胞から得られた Ca^{2+} 画像を比較した。介在板からの Ca^{2+} が微弱であるために、定量的な解析にもちこめないことが問題となった。このため、介在板領域の微弱な変化をモニターするためには、直接計測ではなく、 Ca^{2+} インディケーターを導入した遺伝子改変マウスを作成する必要があることが明らかとなった。本研究により、予備データが得られたため、今後は、マウスを作成して、生体内の介在板の Ca^{2+} 変化をモニターしたいと考えている。

(3) 介在板 TRPV2 を介した転写因子の活性化が肥大シグナルのキーとなるか検証

既に、マイクロアレイ実験から明らかとなった TRPV2 依存的に発現変化する転写因子の発現の変化や核内移行を解析した。正常マウスと心臓特異的 TRPV2 欠損マウスより新生児心筋細胞を単離し、TRPV2 発現依存的に、対象の転写因子の局在および発現が変化するか明らかにした。この結果、TRPV2 を介した転写因子の活性化機構が存在すること、またこの機構は、肥大誘導においても利用されていることが明らかとなった。さらに、心臓特異的 TRPV2 欠損マウスに血行動態負荷を与えて、肥大が生じないことを示す実験結果も得られた。また、本結果から派生して、筋ジストロフィー症由来心筋症を発症するモデルマウスの血行動態負荷依存的な転写因子の変化も明らかにした(参考文献)。

引用文献

Molkentin J.D., et al., A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. 1998, Cell, 93:215-228.

Olson E.N., Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. 2006, Science, 313:1922-1927.

Iwata Y., Katanosaka Y., et al., A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca^{2+} -permeable growth factor-regulated channel. 2003, J Cell Biol. 161:957-967. (Yuko Iwata and Yuki Katanosaka contributed equally to this work.)

Muraki K, Iwata Y., Katanosaka Y., et al., TRPV2 is component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. Cir. Res. 2003, 93: 829-838.

Katanosaka Y*, et al., TRPV2 is critical for cardiac function and compensatory hypertrophic response to hemodynamic stress. 2014, Nature Communications DOI:10.1038/ncomms4932. *corresponding author

Ujihara Y., Katanosaka Y*. et al., Elimination of fukutin reveals cellular and molecular pathomechanisms in muscular dystrophy-associated heart failure. Nature Communications DOI:10.1038/s41467-019-13623-2. *corresponding author

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Katanosaka K., Takatsu S., Mizumura K., Naruse K., Katanosaka Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 TRPV2 is required for mechanical nociception and the stretch-evoked response of primary sensory neurons.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 16782
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-35049-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ujihara Y, Kaangawa M, Mohri S, Takatsu S, Kobayashi K, Toda T, Naruse K, Katanosaka Y	4. 巻 10
2. 論文標題 Elimination of fukutin reveals cellular and molecular pathomechanisms in muscular dystrophy-associated heart failure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5754
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13623-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 片野坂友紀	4. 巻 270
2. 論文標題 TRPV2を核とした心臓のメカノバイオロジー研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 904-909
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 片野坂友紀
2. 発表標題 心臓の分化・成熟およびストレス応答におけるメカノセンサーTRPV2の役割
3. 学会等名 第57回日本生体医工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片野坂友紀
2. 発表標題 Fukutin-KO心筋細胞から探る筋ジストロフィー関連心筋症の病態発症メカニズム
3. 学会等名 第4回 日本筋学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片野坂友紀
2. 発表標題 心臓の可塑性や生理機能を支える膜輸送体：メカノセンサーTRPV2
3. 学会等名 第91回 日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澁谷慎、日比野雄平、片野坂公明、片野坂友紀
2. 発表標題 骨格筋特異的TRPV2ノックアウトマウスを用いたメカニカルストレス応答の解析
3. 学会等名 第6回 若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Katanosaka
2. 発表標題 TRPV2 is crucial for the development of intercalated discs in mouse hearts.
3. 学会等名 63rd annual meeting of biophysical society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片野坂友紀
2. 発表標題 心臓のメカノバイオロジー ~ 心筋細胞のTRPV2の役割を中心に ~
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katanosaka Y, Ujihara Y, Katanosaka K, Naruse K.
2. 発表標題 The role of TRPV2 during the development of excitation-contraction coupling in neonatal cardiomyocytes.
3. 学会等名 Gordon Conference muscle E-C coupling (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	片野坂 公明 (Katanosaka Kimiaki) (50335006)	中部大学・生命健康科学部・准教授 (33910)	
研究 分担者	氏原 嘉洋 (Ujihara Yoshihiro) (80610021)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (13903)	