

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07313

研究課題名(和文) 心臓機能におけるTRIC-Bの生理的役割の解明

研究課題名(英文) Physiological role of TRIC-B in heart function

研究代表者

山崎 大樹 (Yamazaki, Daiju)

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長

研究者番号：40467428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では心臓特異的なTRIC-B-KO (cKO) マウスを作製し、心臓におけるTRIC-Bの機能を検討した。cKOマウスは生後30～60週で死亡することがわかった。12～40週齢で種々の解析を実施したところ、12週齢以上で血中トロポニン濃度が有意に高く、また20週齢以上で著しい心筋線維化を示し、30週齢以上で心重量が増加した。さらに、40週齢で体重の減少、心筋細胞の変性、心房血栓を示した。心収縮機能を心エコー計測で調べたところ、30週齢以降で心機能の低下が観察された。以上の結果は、12週齢の段階ですでにcKO心筋細胞において何らかの異常が生じているものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、小胞体カウターイオンチャネルであるTRIC-Bの生物学的意義の解明にとどまらず、TRIC-Bが原因となる疾患の発症機序解明や治療薬開発など臨床的な応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：We generated cardiac-specific TRIC-B-KO (cKO) mice and investigated the function of TRIC-B in the heart. We found that cKO mice die 30-60 weeks of age. To confirm changes over time in the heart, we performed histopathological analysis at 12-40 weeks of age. We found that cKO mice had significantly higher blood troponin levels than wild-type mice > 12 weeks of age. cKO mice also showed marked cardiac fibrosis > 20 weeks of age and increased heart and lung weight > 30 weeks of age. Moreover, cKO mice showed decreased body weight, cardiomyocyte degeneration, and atrial thrombus at 40 weeks of age. Since these findings indicated heart failure-like pathology, echocardiographic examination of cardiac contractile function revealed a decrease in cardiac function after 30 weeks of age. These results suggest that at 12 weeks of age, there is already some abnormality in cKO cardiomyocytes.

研究分野：生理学

キーワード：TRICチャネル 心臓 心機能 Caトランジェント

1. 研究開始当初の背景

細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は小胞体からの Ca^{2+} 放出と細胞外からの Ca^{2+} 流入により構成されており、筋収縮、神経伝達物質の放出、膜電位調節など様々な細胞機能を制御している。細胞内小器官の1つである小胞体には、リアノジン受容体 (RyR) とイノシトール三リン酸受容体 (IP_3R) の2つの Ca^{2+} 放出チャネルの存在が知られている。 IP_3R はリン脂質代謝の亢進で生成される IP_3 により活性化する。一方で、RyR はサブタイプによって電位変化や細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇、NO などによって活性化することが知られており、臓器によって異なる制御機構が存在する。微小閉鎖空間である小胞体から RyR や IP_3R を介して Ca^{2+} が放出されると、小胞体内腔に負電荷が発生する (Coronado & Miller, *Nature*, 1980)。負電荷の存在下では、陽イオンである Ca^{2+} の放出が阻害されることが推測される。そのため持続的な Ca^{2+} 放出が効率良く機能するための機構として、発生した負電荷を中和するためのイオンを透過するカウンターイオンチャネルが必要であると推測されてきた (Meissner et al., *Mol Cell Biochem.*, 1983; Kourie et al., *Biophys. J.*, 1996)。しかしながら、カウンターイオンチャネルの実体については最近まで不明であった。

2007年、小胞体及び核膜に局在し主に K^+ 透過性チャネルとして機能するカウンターイオンチャネルである TRIC (trimeric intracellular cation) チャネルが同定された (Yazawa et al., *Nature*, 2007)。動物組織には TRIC-A 及び-B の2種類のサブタイプが分布しており、骨格筋、心筋、神経細胞、平滑筋細胞などで両者の共発現が観察される。また、上述の通り、電気生理学的解析により細胞内膜系において主に K^+ 透過性チャネルとして機能することが示された。研究代表者はこれまで TRIC チャネルの遺伝子改変マウスを用いた機能解析を精力的に行っており、TRIC チャネルが小胞体からの Ca^{2+} 放出に連動して機能するカウンターイオンチャネルであることを複数の細胞・臓器で示してきた (表 1)。しかしながら、TRIC チャネルに A と B の2つのサブタイプが存在する理由や、サブタイプ間の機能的差異の有無、また心筋細胞や神経細胞などにおける働きなど不明な点が多く残されている。そこで本研究では、TRIC チャネルに焦点を当てた小胞体 Ca^{2+} シグナリングメカニズムの解明により上記の問題解決を目指した。

表 1 申請者が報告した TRIC チャネル欠損マウスにおける表現型と原因臓器・細胞

| 欠損マウス | 表現型 | 原因臓器・細胞 | 参考文献 |
|---|------------------|-----------|--|
| TRIC-B | 新生致死 (肺胞形成不全) | 肺 | Yamazaki et al., <i>Development</i> , 2009 |
| TRIC-A | 異常収縮 | 骨格筋 | Zhao et al., <i>J Biol Chem</i> , 2010 |
| TRIC-A | 高血圧 | 血管 平滑筋 | Yamazaki et al., <i>Cell Metab</i> , 2011 Tao et al., <i>J Biol Chem</i> , 2013 |
| TRIC-B | 骨形成不全症 | 骨 | Zhao et al., <i>Sci Signal</i> , 2016 |
| TRIC-B ^{fllox} Myh6 ^{Cre} | ??? | 心臓 | 本研究により解明を目指す |

2. 研究の目的

本研究では、心筋細胞における TRIC-B の機能的役割の解明を目的とする。心筋細胞には TRIC-B のみならず TRIC-A も発現していることから、心筋細胞における TRIC-A と TRIC-B の機能的差異についても明らかにできると考える。TRIC-B は TRIC-A に比べると組織発現は全身で普遍的であり、多くの組織・細胞において重大な機能を担っている可能性が高い。しかしながら、TRIC-B 欠損マウスが II 型肺胞上皮細胞での Ca^{2+} 放出減弱により、サーファクタントの合成・分泌が障害され呼吸不全から新生致死に至ること (Yamazaki et al., *Development*, 2009) から、成獣での解析は現状では困難である。この問題を解決するにはコンディショナル TRIC-B 欠損 (TRIC-B floxed) マウスの作製が不可避であり、研究代表者はその作製を進めてきた。心臓特異的に Cre を発現する Myh6-Cre マウスとの交配によりタモキシフェン誘導型 (タモキシフェン投与により Cre が発現) の心臓特異的 TRIC-B 欠損マウスの作製も同時に進めており、作製が完了したところである。本研究では、この心臓特異的な TRIC-B 欠損マウスを用いて心筋細胞における TRIC-B の機能的役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

マウス

図 1 のような Original EUCOMM 配列を有するマウス *Tmem38b* の Conditional potential を有する ES 細胞を EUCOMM より複数株購入した。ES 細胞を 1×10^7 細胞程度に増殖させた後にマウス受精卵(胚盤胞)にマイクロインジェクションを行い、偽妊娠レシピエントマウスへ移植した。EUCOMM 配列はエクソン 3 とエクソン 4 の間に loxP 配列を有するため、図 1 の黒矢印で示すプライマーの PCR によって、生まれてきたマウス (F0) が野生型 (+/+) かキメラマウス (+/KO) かを判定可能である(図 1A)。

その後、F0 のキメラマウスのみを用いてホモマウス (KO/KO) 作出した。EUCOMM 配列には、ES 細胞の薬剤セレクションのために NeoR 遺伝子を組み込んでいる。しかし、NeoR 遺伝子発現による影響等を考慮すると余分な遺伝子は除外することが望ましい。そのため、Flp リコンビナーゼ酵素を発現する CAG-Flp トランスジェニックマウスとホモマウス (KO/KO) を交配し、Flp リコンビナーゼ酵素により、2 つの FRT 配列で組換が起こり、間に挟まれた NeoR 遺伝子を離脱させた(図 1、Conditional allele)。遺伝子型判定では、野生型 (+/+) と Flp ヘテロ (+/Flp)、ホモ Flp (Flp/Flp) を水色の矢印部分のプライマーにて判定可能である(図 1B)。さらに、EUCOMM 配列中の lacZ 配列を認識するため、Conditional allele がヘテロ (KO/Flp) の場合にはバンドが検出され、ホモ (Flp/Flp) の場合にはバンドが検出されないようにプライマーを設計した(図 1C)。

Conditional allele をホモで有するマウスの作出後、心臓特異的に loxP 配列で挟まれた *Tmem38b* のエクソン 3 を脱落させるため、心筋細胞特異的に発現する Myh6 プロモーター制御下で Cre リコンビナーゼを発現する Myh6-Cre トランスジェニックマウス (Jackson laboratory、B6.FVB-Tg(Myh6-cre)2182Mds/J) を交配し、Flp/Flp、Myh6-Cre (cKO) マウスを作出した。このマウスの遺伝子型判定には、5'末端を水色矢印部分のプライマー、3'末端を黒色矢印部分のプライマーで遺伝子を増幅することで、野生型 (917 bp)、Conditional allele (1124 bp)、Myh6-Cre リコンビナーゼ発現 (241 bp) の判定が可能である(図 1D 上段)。なお、出生時の遺伝子型判定には指を用いており、Cre リコンビナーゼの発現はないため 241 bp のバンドは出現しない。また、Cre (350 bp) についても同時に遺伝子判定することで、マウスの遺伝子型を確定させた(図 1D 下段)。

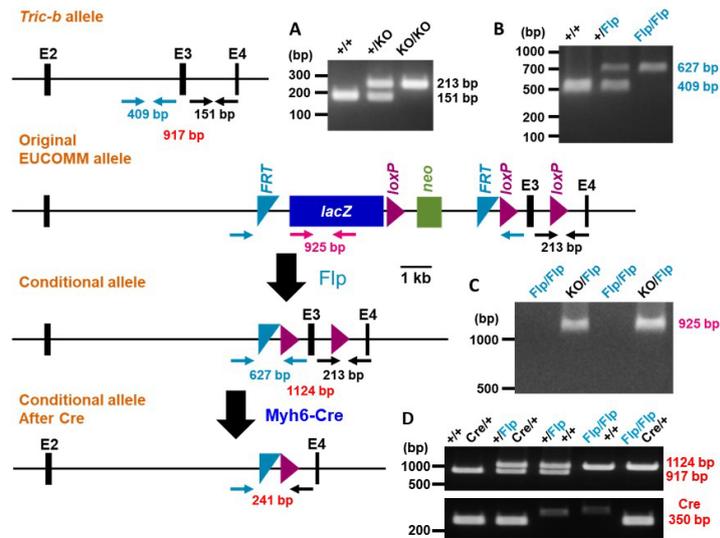
免疫組織染色

野生型 (Flp/Flp, +/+) マウスあるいは cKO マウスに三種混合麻酔(ドミツール、ミダゾラム、ベトルファール)を腹腔内投与し、不動化した。マウスを仰臥位で配置し、腹部を切開後に横隔膜から胸部を切開し、心尖部から左心室にペリスタポンプを用いて一定の流速で PBS を流した後に 4%パラホルムアルデヒドを流して心臓を固定した。固定した心臓は心室の短軸断面となるよう凍結切片を作製した。凍結切片に対して、小麦胚芽凝集素 (WGA: Wheat germ agglutinin) を反応させ、コンフォーカル顕微鏡で 1 枚の切片につき 7~10 か所の蛍光画像を取得し、心筋細胞の大きさを定量した。

組織学的解析

野生型マウスあるいは cKO マウスに吸入麻酔を導入し、不動化後に腹部を切開した。腹部大静脈から採血した後、血漿を用いて心筋トロポニン T 濃度の測定を行った (SRL に委託)。心臓、肺、肝臓を採取し重量を測定後、ホルマリン固定してパラフィン包埋後に切片を作製した。切片は HE 染色あるいはシリウスレッド染色を施し、病理解析および線維化の定量解析を行った。

図 1



心エコー計測

野生型マウスあるいは cKO マウスに吸入麻酔を導入し、不動化後に胸部を除毛した。吸入麻酔を維持した状態で M モード法にて心エコー計測を行い、心拍数(HR)、心室中隔厚(IVST)、左室拡張末期径(LVEDD)、左室収縮末期径(LVESD)、左室後壁厚(LVPWT)のパラメーターについて取得し、各パラメーターから駆出率(EF)と左室内径短縮率(FS)が算出された。

4. 研究成果

心臓特異的 TRIC-B 欠損マウスは 30 週齢を超えると死亡する

cKO マウスは 30 週齢以前には交配・繁殖が可能であり、体重増加も野生型との違いはほとんどない(図示せず)。しかしながら、30 週齢を超えると雌雄ともに一定の割合で死亡する個体が出現した(図 2)。そこで、12 週、20 週、30 週、40 週以降の 4 つのタイムポイントにて心重量を測定したところ、cKO マウスでは野生型マウスに比べて顕著に心重量/体重比が増大していることを見出した(図 3A)。特に、40 週齢以降では心耳部分に血栓が蓄積している様子が観察されたため、重量を測定したところ、顕著に増大していることが明らかとなった(図 3B)。また、40 週齢以降では 30 週齢よりも心重量/体重比の増大が大きく、心肥大の可能性が考えられたため、組織切片を用いて心筋細胞の断面積を定量化したところ、有意に心筋細胞断面積の増大が観察された(図 3C)。

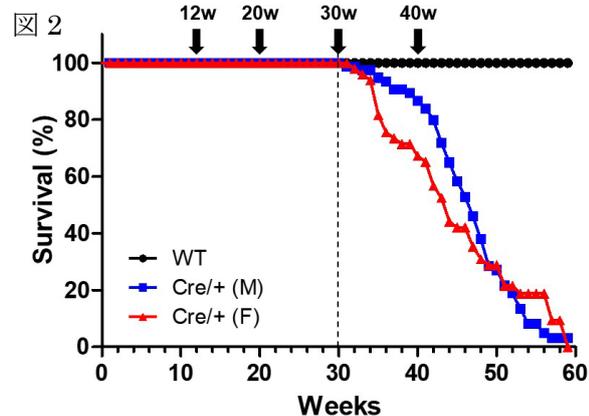


図 2

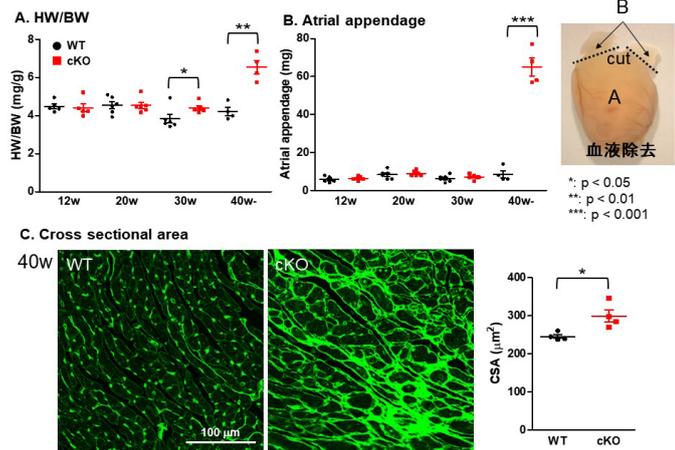


図 3

心エコー計測

40 週齢以降の cKO において心房血栓が観察されたことから、心臓におけるポンプ機能が減弱している可能性が考えられたため、心エコー計測によって心機能の測定を行った。収縮機能の指標である、駆出率(EF)と左室内径短縮率(FS)が 30 週齢以降の cKO マウスにおいて有意に低下していることを見出した。40 週齢における心エコー画像を見ると、LVESD と LVEDD の差がほとんど見られず収縮していない状況がうかがえる(図 4 および表 2)。

表 2

| | WT | | | | KO | | | |
|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|
| | 12 wks | 20 wks | 30 wks | 40 wks | 12 wks | 20 wks | 30 wks | 40 wks |
| No. of mice | 7 | 7 | 7 | 7 | 5 | 5 | 8 | 8 |
| HR, bpm | 500 ± 14.1 | 531 ± 25.1 | 537 ± 15.9 | 464 ± 14.7†† | 520 ± 16.1 | 551 ± 20.4 | 552 ± 20.4 | 534 ± 8.9** |
| IVST, d, mm | 0.99 ± 0.01 | 0.98 ± 0.02 | 1.03 ± 0.01 | 0.99 ± 0.03 | 0.99 ± 0.01 | 0.95 ± 0.04 | 0.91 ± 0.03** | 0.91 ± 0.03 |
| LVEDD, mm | 4.02 ± 0.11 | 4.19 ± 0.07 | 4.08 ± 0.06 | 4.03 ± 0.10 | 3.97 ± 0.06 | 4.34 ± 0.07† | 4.33 ± 0.08* | 4.63 ± 0.12**† |
| LVESD, mm | 2.61 ± 0.07 | 2.86 ± 0.11 | 2.73 ± 0.06 | 2.73 ± 0.11 | 2.58 ± 0.05 | 3.13 ± 0.07†† | 3.30 ± 0.10** | 3.79 ± 0.12**†† |
| LVPW, d, mm | 0.96 ± 0.01 | 0.96 ± 0.02 | 0.97 ± 0.003 | 0.98 ± 0.01 | 0.93 ± 0.004* | 0.93 ± 0.03 | 0.90 ± 0.03 | 0.89 ± 0.02** |
| FS, % | 35.0 ± 0.6 | 31.9 ± 1.5 | 33.2 ± 0.8 | 32.3 ± 1.5 | 35.2 ± 0.5 | 27.8 ± 1.4†† | 23.8 ± 1.2** | 18.3 ± 1.3**†† |
| EF, % | 64.9 ± 0.7 | 60.2 ± 2.2 | 62.2 ± 1.1 | 61.0 ± 2.3 | 65.2 ± 0.8 | 54.1 ± 2.1†† | 47.6 ± 2.0** | 37.8 ± 2.2**†† |

HR, heart rate; bpm, beats per minute; IVST, intraventricular septal wall thickness; LV, left ventricle; LVEDD, LV end-diastolic dimension; LVESD, LV end-systolic dimension; LVPWT, LV posterior wall thickness; FS, fractional shortening; EF, ejection fraction.

*p<0.05, **p<0.01 vs. age-matched wild type (unpaired t-test), †p<0.05, ††p<0.01 vs. 12wks or 30 wks (paired t-test)

心線維化

次に心臓切片に対してシリウスレッド染色を施し、線維化の定量解析を行った。その結果、20週齢から野生型に比べてcKOでは有意に線維化が亢進していることを見出した(図5)。40週齢での線維化は平均して20%を超えており、図3Cの細胞断面積の蛍光強度がcKOマウスにおいて強く観察されていることと相関していると考えられる。また、線維化の原因としては、心筋細胞死が前もって起こることが考えられるため、心筋細胞死のマーカである血中の心筋トロポニンT濃度について週齢ごとに定量した。驚いたことに、血中心筋トロポニン濃度は12週齢の段階ですでに野生型に比べてcKOで有意

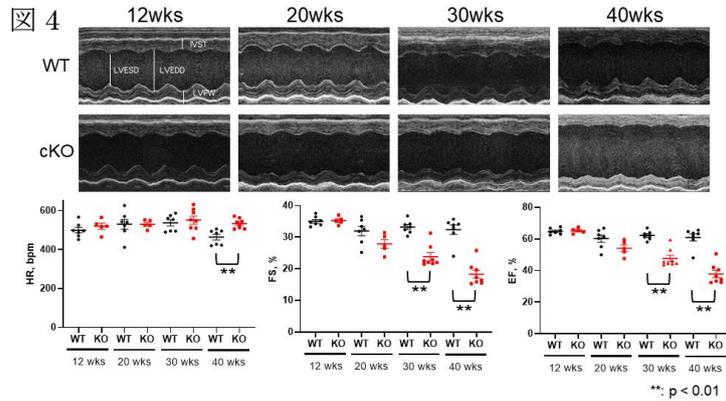
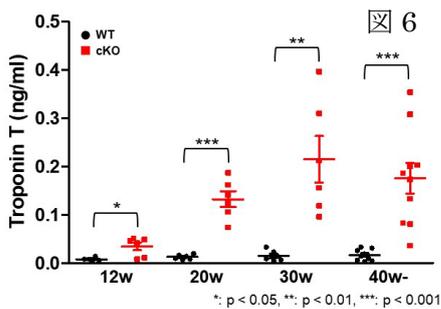
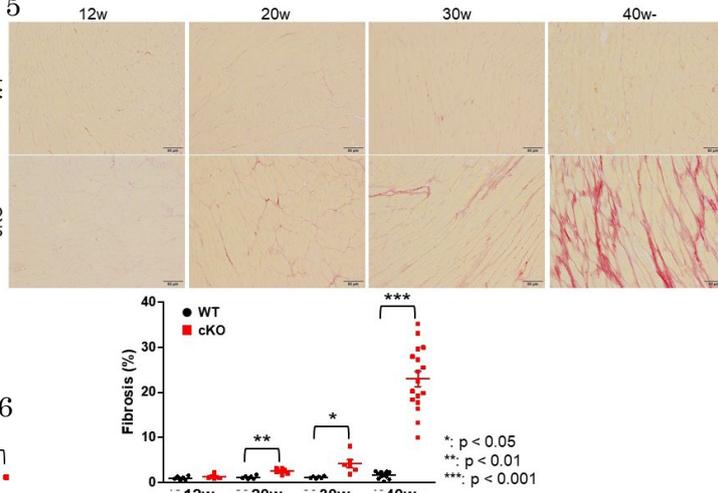


図5



に上昇しており、経時的に上昇していくことが明らかとなった(図6)。このことからcKOマウスでは12週齢の段階ですでに心筋細胞レベルで何らかの異常が生じている可能性が考えられた。

5. 引用文献

- Coronado & Miller. Decamethonium and hexamethonium block K^+ channels of sarcoplasmic reticulum. *Nature*, 288, 495-497 (1980).
- Meissner, G. Monovalent ion and calcium ion fluxes in sarcoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biochem*, 55, 65-82 (1983).
- Kourie et al., Characteristics of two types of chloride channel in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. *Biophys. J.*, 70, 202-221 (1996).
- Yazawa, M. et al. TRIC channels are essential for Ca^{2+} handling in intracellular stores. *Nature*, 448, 78-82 (2007).
- Yamazaki, D. et al. Essential role of the TRIC-B channel in Ca^{2+} handling of alveolar epithelial cells and in perinatal lung maturation. *Development*, 136, 2355-2361 (2009).
- Zhao et al., Ca^{2+} overload and sarcoplasmic reticulum instability in tric-a null skeletal muscle. *J Biol Chem*, 285, 37370-37376 (2010).
- Yamazaki et al., TRIC-A channels in vascular smooth muscle contribute to blood pressure maintenance *Cell Metab*, 14, 231-241 (2011).
- Tao et al., Facilitated hyperpolarization signaling in vascular smooth muscle-overexpressing TRIC-A channels. *J Biol Chem*, 288, 15581-15589 (2013).
- Zhao et al., Mice lacking the intracellular cation channel TRIC-B have compromised collagen production and impaired bone mineralization. *Sci Signal*, 9, ra49 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Zhou X, Park KH, Yamazaki D, Lin PH, Nishi M, Ma Z, Qiu L, Murayama T, Zou X, Takeshima H, Zhou J, Ma J. | 4. 巻 126 |
| 2. 論文標題 TRIC-A Channel Maintains Store Calcium Handling by Interacting With Type 2 Ryanodine Receptor in Cardiac Muscle | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Circulation Reserach | 6. 最初と最後の頁 417-435 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCRESAHA.119.316241. | 査読の有無 有 |
| 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 該当する |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮崎佑、市村敦彦、北山諒、山崎大樹、西美幸、竹島浩 |
| 2. 発表標題 細胞内陽イオンチャネルTRIC-B欠損マウスにおける成長板軟骨細胞の機能異常 |
| 3. 学会等名 第42回分子生物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yamazaki D, Matsushita K, Tokutake M, Chujo K |
| 2. 発表標題 Phenotypic analysis in cardiac-specific TRIC-B-deficient mice |
| 3. 学会等名 第96回日本薬理学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yamazaki D, Matsushita K, Nonaka M, Tokutake M, Chujo K, Koda N, Uezono Y, Ogawa K |
| 2. 発表標題 Pathophysiological analysis of heart failure in cardiac-specific TRIC-B-deficient mice |
| 3. 学会等名 第100回日本生理学会 |
| 4. 発表年 2023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 | 山村 寿男 (Yamamura Hisao) (80398362) | 名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授 (23903) | |

| | 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 協力者 | 松下 幸平 (Matsushita Kohei) | | |
| 研究 協力者 | 野中 美希 (Nonaka Miki) | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|