

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21487

研究課題名(和文) 心臓の病態生理学的な性差形成に対する性染色体由来の役割の統合的解析

研究課題名(英文) Roles of sex chromosomes in pathophysiological sex difference formation in the heart

研究代表者

黒川 洵子(Kurokawa, Junko)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：40396982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：心臓の病態生理学的な性差形成に対する性染色体由来の役割を理解するために、胎児期マウス心臓の形態機能学的解析および二卵性双生児男女の血液からiPS細胞の樹立によるヒト細胞試験系構築を行った。胎生後期マウスから摘出した心臓においては、独自の冠血管造影法を開発することにより冠血管径および薬物反応に雌雄差があることを見出した。遺伝子発現の雌雄差解析からはX染色体不活性化機構からescapeする遺伝子が同定されているので、当該研究により見出した形態機能学的性差との関わりが示唆された。さらに、性差に関するメカニズムの理解につなげるため、遺伝子背景が近い同年齢の男女の血液からiPS細胞を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は発生期心臓の性差の一端を明らかにしたことから、心血管病の発症・病態における理解が進んだ点が学術的意義である。また、ヒトiPS細胞を用いて、実験動物で得られた仮説をヒトで検証することを目指している点も特徴である。なお、心血管病は更年期以降に患者数が爆増し、性ホルモンだけではない性差のメカニズムを理解することは、超高齢化社会における人々の疾患予防・健康対策を考える際の情報基盤となると期待できる。

研究成果の概要(英文)：To understand the roles of sex chromosome in the sex differences pathogenesis of cardiovascular diseases, we performed morphofunctional analysis of fetal mouse hearts and establishment of human iPS cell lines from the blood of male and female dizygotic twins. In hearts removed from embryonic mice in late gestation, we developed an original coronary angiography technique and revealed sex differences in coronary artery vessel diameter and drug responsiveness. Analysis of gene expression in male and female embryonic murine hearts identified genes that escape the X chromosome inactivation mechanism, suggesting a link to the morphofunctional sex differences found in this study. To further elucidate the mechanism of sex differences, iPS cells were established from blood of males and females of the same age with similar genetic backgrounds.

研究分野：薬理学

キーワード：性差 心臓 血管 性決定遺伝子 iPS細胞 2卵性双生児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

男女共通の臓器にも形態機能に男女差があり、一生を通じて、疾患の予防・発症・進展・治療に影響することが分かり、性差を考慮した医療に注目が集まっている。循環器領域の疾患では多くの発症性差が報告されており、性ホルモンだけでなく、遺伝子や環境も性差形成に影響することが分かってきたが、その分子基盤は全く解明されていない。特に、心毒性など医薬品の有害事象は女性でより多いことが報告され、薬物療法における安全性担保において喫緊の課題である。これまで研究代表者らは、げっ歯類心臓から単離した心室筋細胞が、各種性ホルモンに作用して心筋イオンチャネル機能が調節され、心電図における男女差や心毒性など医薬品の有害事象が女性でより多いことに関連しているのではないかという説を提唱してきた。一方、超未熟児における循環不全の重症度における性差や更年期以降の微小血管狭心症の発症性差など、特に冠血管の機能・病態における性差については、臨床的にも性ホルモンの関与が示されていないものも報告されている。

そこで、当該研究において、これまで詳細に研究されてきた性ホルモン由来の性差を切り分けて、性染色体由来の性差に焦点を当てた解析を行うことで、循環器領域における男女別の薬物療法戦略に貢献することが可能となるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

性決定遺伝子 Sry の複合型遺伝子改変マウスと男女 iPS 細胞を利用した統合的解析法を構築して、心臓の性差形成に対する X 染色体由来の遺伝子発現調節の関連を解明することを研究目的とした。

3. 研究の方法

従来のモデルでは内分泌や環境の影響を切り分けられない点に着目し、発達初期に注目した独自の統合解析システムを立案した。

(1) 胎生マウス心臓における冠血管の形態機能学的性差の解析

性腺の未発達な発生・発達早期のマウス心臓について、胎児心臓の冠血管にインクを定圧で灌流して造影する方法を改良し、冠血管径および NOC7、ベラパミル、Y-27632 の作用を雌雄で比較解析した。野生型および Sry 遺伝子改変マウスの雌雄差を比較することにより、性染色体由来の遺伝子の関連について調べた。

(2) 男女 iPS 細胞株の樹立

遺伝的背景に近い 20 代アジア人の二卵性双生児男女の血液から iPS 細胞を樹立して、分化心筋細胞を作製し、性差決定因子の影響について検証するための実験系を構築した。

4. 研究成果

(1) 胎生マウス心臓における冠血管の形態機能学的性差の解析

胎生 17.5 日マウスの心臓は心室長軸長が長い群と短い群に分かれたが、いずれの群でも雌雄差はみられなかった。一方、冠血管径については、心室長軸が長い群のみで有意な差があることを見出した。生理的条件下では雄の冠血管径の方が長い血管拡張薬 (NOC7) 存在下では雌の方が長くなった。この結果は、雌の方で血管収縮機構がより発達していることを示唆する。そこで、分子機構の理解を目指し、胎生 17.5 日心臓にて発現に雌雄差がある遺伝子を探索したところ、X 染色体から escape する遺伝子を含め 59 遺伝子が同定された。本研究により、胎生期マウス心臓の機能形態および遺伝子発現の性差を実験的に示すことに成功した。また、Sry 遺伝子改変マウスを用いた雌雄差の比較実験については、病態モデルなどの刺激のない状態では内分泌由来の性差に比べ性染色体由来の性差は小さいという結果となったことから、今後の病態モデルを中心とした解析にシフトするための根拠を得ることができた。

(2) 男女 iPS 細胞株の樹立

各被験者から採血し、A・B と記号をふりランダム化した。血液から調整した活性化 T 細胞にセンダイウイルスベクターを用いて山中 4 因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) を導入して、iPS 候補細胞株 (検体 A : 13 株、検体 B : 19 株) のクローンを作成した。iPS 細胞株の多分化能については、NANOG, OCT3/4 の発現量を RT-qPCR で検証した後、免疫染色で確認した。RT-qPCR による質的検証により、NANOG および OCT 3/4 のいずれも陽性を示した株は検体 A より 3 株、検体 B より 9 株であった。さらに、三胚葉分化能を RT-qPCR により株ごとに検証し、

A 3 株、B 3 株を分化誘導の対象として選別した。なお、採血前の問診と臨床検査の結果、被験者はともに健常であり、男女共通の基準値である検査項目については類似の値を示し、心電図 QTc 間隔や赤血球数などでは性別ごとの基準値を反映する値を示した。また、既存の iPS 細胞株を用いて、心筋に分化誘導する実験系の構築にも成功したことから、今回樹立した双子男女 iPS 細胞由来分化心筋細胞を用いた実験の基盤を構築するという当初の研究目的は達成したと考えられる。

新型コロナウイルス感染症による影響について、最後に述べる。研究開始当初は緊急事態宣言もしくは蔓延防止対策の期間であり、県をまたいだ往来が規制されていた。そこで、被験者からの採血する臨床研究が開始年度の 3 月まで延期された。しかし、採血を行う前の段階で、実験者となる学生の実験技術の向上を目指して、細胞培養・免疫染色・遺伝子解析の予備実験を行っていたため、ひとまず実験が開始した後は大きな失敗はなく円滑に計画を進めることができ、何とか当初の目的を達成できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Kernik Divya C., Yang Pei-Chi, Kurokawa Junko, Wu Joseph C., Clancy Colleen E.	4. 巻 16
2. 論文標題 A computational model of induced pluripotent stem-cell derived cardiomyocytes for high throughput risk stratification of KCNQ1 genetic variants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Computational Biology	6. 最初と最後の頁 e1008109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pcbi.1008109	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

1. 著者名 黒川 洵子	4. 巻 262
2. 論文標題 性差医学に基づく薬の研究と安全性の追求	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ヘルシスト	6. 最初と最後の頁 6-9
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 -

1. 著者名 Kurokawa Junko	4. 巻 Special Issue
2. 論文標題 Involvement of sex hormonal regulation of K ⁺ channels in electrophysiological and contractile functions of muscle tissues electrophysiological and contractile functions of muscle tissues.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Healthist	6. 最初と最後の頁 30-33
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29件（うち招待講演 1件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 杉本真太郎、田村文弥、岡貴之、家田真樹、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 hERGチャネル内腔における阻害薬と合成エストロゲンの相互作用
3. 学会等名 第142回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本真菜、杉本真太郎、岡貴之、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 hERGスクリーニングにおける内因性エストロゲンの影響
3. 学会等名 第142回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口賢彦、中川桃夏、五十嵐弦、坂本多穂、諫田泰成、黒川洵子
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞の収縮機能に対する品質評価
3. 学会等名 第6回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒川洵子
2. 発表標題 男女差を考慮した薬物治療の実現へ
3. 学会等名 静岡テックプランター
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Gen Igarashi, Momoka Nakagawa, Masahiko Yamaguchi, Makoto Inai, Toshiyuki Kan, Kazuho Sakamoto, Junko Kurokawa
2. 発表標題 Evaluation of cardiotoxicity of doxorubicin on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte by using field motion imaging.
3. 学会等名 The 25th Shizuoka forum on health and longevity (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wataru Kunii, Masahiko Yamaguchi, Kazuho Sakamoto, Junko Kurokawa
2. 発表標題 Cardiac tissue-specific evaluation for contractile function of murine cardiomyocytes.
3. 学会等名 The 25th Shizuoka forum on health and longevity (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rin Watanabe, Masahiko Yamaguchi, Kazuho Sakamoto, Junko Kurokawa
2. 発表標題 Morphological and functional maturation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte by continuous electrical pacing.
3. 学会等名 The 25th Shizuoka forum on health and longevity (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shion Nagasawa, Masami Kodama, Masahiko Yamaguchi, Kazuho Sakamoto, Junko Kurokawa
2. 発表標題 Sex differences in embryonic murine coronary arteries.
3. 学会等名 The 25th Shizuoka forum on health and longevity (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本真菜、杉本真太郎、岡貴之、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 hERGスクリーニングにおけるエストロゲン類の影響
3. 学会等名 第250回生理学東京談話会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長沢思音、児玉昌美、長谷川歩惟、山口賢彦、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 マウス冠血管の発生・発達段階における性差の研究
3. 学会等名 第250回生理学東京談話会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五十嵐弦、中川桃夏、渡辺倫、山口賢彦、稲井誠、菅敏幸、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞を利用したドキシソルピシンによる心毒性に対する保護薬の探索研究
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 國井渉、山口賢彦、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 新生児マウス心筋の力学的機能に対するT型カルシウムチャネルの関与
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本真太郎、田村文弥、岡貴之、杉本真菜、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 hERG阻害薬と合成エストロゲンの相互作用
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本真菜、杉本真太郎、岡貴之、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 非臨床心毒性試験（hERGアッセイ）における内因性エストロゲンの影響
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋口丈晃、Pornparn Kongpracha、Pattama Wiriyasermkul、永森収志、黒川洵子
2. 発表標題 SRY遺伝子改変マウスを用いた尿細管膜タンパク質の網羅的性差解析
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺倫、山口賢彦、西田基宏、石原博美、田中智弘、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 ヒトiPS由来心筋細胞におけるサルコメア構造発達への電気刺激の効果
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長沢思音、児玉昌美、長谷川歩惟、橋口丈晃、山口賢彦、山崎泰広、栗原裕基、西山功一、有馬勇一郎、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 胎生マウス心臓の冠血管における雌雄差の解析
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shion Nagasawa, Masami Kodama, Koichi Nishiyama, Yuichiro Arima, Kazuho Sakamoto, Junko Kurokawa
2. 発表標題 Sex differences in functional morphology of the murine fetal heart
3. 学会等名 The 50th NIPS International Meeting on Cardiovascular Physiology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒川洵子、橋口丈晃、Pornparn Kongpracha、Pattama Wiriyasermkul、永森收志
2. 発表標題 Sry遺伝子改変マウスを用いた腎臓尿管膜タンパク質の網羅的性差解析
3. 学会等名 第14回日本性差医学・医療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉本真菜、杉本真太郎、岡貴之、Igor Vorobyov、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 QT延長毒性におけるエストロゲン類の影響
3. 学会等名 第14回日本性差医学・医療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長沢思音、児玉昌美、西山功一、有馬勇一郎、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 胎生マウス冠血管の機能形態における雌雄差の解析
3. 学会等名 第14回日本性差医学・医療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	Shintaro Sugimoto, Fumiya Tamura, Mana Sugimoto, Oka Takayuki, Igor V. Vorobyov, Kazuho Sakamoto, Junko Kurokawa
2. 発表標題	EFFECTS OF ESTROGENS ON THE ACTIONS OF HERG BLOCKERS
3. 学会等名	Biophysical Society Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Shion Nagasawa, Masami Kodama, Ai Hasegawa, Takeaki Hashiguchi, Masahiko Yamaguchi, Hiroki Kurihara, Kouichi Nishiyama, Yuichiro Arima, Kazuho Sakamoto, Junko Kurokawa
2. 発表標題	Sex differences in functional morphology of embryonic murine coronary arteries.
3. 学会等名	Biophysical Society Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	長沢思音, 児玉昌美, 長谷川歩惟, 橋口丈晃, 山口賢彦, 山崎泰広, 栗原裕基, 西山功一, 有馬勇一郎, 坂本多穂, 黒川洵子
2. 発表標題	胎児マウス冠血管の形態機能に見られる性差
3. 学会等名	第94回日本薬理学会年会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	五十嵐弦, 中川桃夏, 渡辺倫, 山口賢彦, 稲井誠, 菅敏幸, 坂本多穂, 黒川洵子
2. 発表標題	ヒトiPS細胞由来心筋細胞を利用したドキシソルピシンによる心毒性に対する保護薬の探索研究
3. 学会等名	第141回日本薬学会年会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 長沢思音, 児玉昌美, 坂本多穂, 黒川洵子
2. 発表標題 胎生マウス心臓の冠血管における性差
3. 学会等名 第141回日本薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國井渉, 中川桃夏, 五十嵐弦, 山口賢彦, 坂本多穂, 黒川洵子
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞の アドレナリン受容体シグナル伝達に関する薬理学的研究
3. 学会等名 第141回日本薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Junko Kurokawa and Kazuho Sakamoto
2. 発表標題 Sex differences in the homeostatic maintenance of cardiomyocytes
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuho Sakamoto and Junko Kurokawa
2. 発表標題 Homeostatic maintenance in human iPS cell-derived cardiomyocytes
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021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	森本 達也 (Morimoto Tatsuya) (50390779)	静岡県立大学・薬学部・教授 (23803)	

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
---------	---------