

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06764

研究課題名(和文) 心臓弁形成における力学応答性シグナル変換機構の解明

研究課題名(英文) To elucidate the mechanisms of mechano-transduction for the cardiac lumen morphogenesis

研究代表者

福井 一 (FUKUI, Hajime)

徳島大学・先端酵素学研究所・准教授

研究者番号：80551506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心臓管腔を構成する心内膜内皮細胞は拍動・血流から生じる物理的ストレスを受け、当課題ではゼブラフィッシュ胚を用い、心臓の力学応答シグナルを正確に定義するための生物学的アプローチかつ、生物物理学的アプローチを行った。研究成果として、まず心臓腔面から生じる力学特性が、心内膜内皮細胞の力学応答を誘導することを見出した。次に、心臓腔内への磁生体操作法の開発により、垂直応力ではなく接線応力の特性が有意に力学応答を誘導することを見出した。そして、接線応力を発生する血流のイメージング解析から、心内膜内皮細胞は双方向性の血流に応答して細胞内シグナルが活性化することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓での力学応答の重要性は明らかであるものの、生体の中で実際におこる直接的な力学応答機構と、形態形成における明確な力学作用機序についてはほとんど示されていない。本研究は、独自に開発した生物学応答と物理学情報を直接的に関連付ける分野融合アプローチ：「生体心臓に対して人為的に力を操作することで出力される化学シグナル変動の定量的解析」によって、これまで理解することができなかった機構を明らかにする意義をもつ。本成果より、弁形成における「流れ」と「拍動」の力学情報の違いを明確に区別する研究への展開が期待できる。また、他の恒常的刺激を感受する臓器、骨格や筋肉についての研究への波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cardiac lumen is constituted by endocardial cells. Endocardial cells are constantly sensed physical stress, such as pulsation and blood flow. In this project, we applied zebrafish embryos and performed both biological and biophysical approaches to accurately define the mechanical response in the heart.

We first found that (1) forces-dependent signal is triggered from the cardiac luminal side in endocardial cells. Next, (2) we developed a magnetic manipulation method into the cardiac lumen and then found that the properties of tangential stress (e.g. shear stress), not vertical stress, are a main regulator for the mechanical signal in endocardial cells. We also discovered that (3) intracellular signals are activated in endocardial cells in response to bidirectional blood flow. Further investigation will allow us to define the force effects that occur within the cardiac lumen.

研究分野：心臓発生学

キーワード：心臓管腔形成 ゼブラフィッシュ 力学応答 血流

## 1. 研究開始当初の背景

心臓がポンプとしての機能を果たすには、逆流を防ぐための弁形成が必須となる。遺伝学的因子による調節だけでなく、ゲノムには書き込まれない物理作用を介した力学応答も弁形成に関与する。初期弁形成時、心臓弁は心臓の管腔に面する心内膜(心内膜内皮)細胞で構成され、強い力学的刺激に曝露される(Heckel et al., *Curr. Biol.*, 2015)。これまでに血流で誘導される転写因子 Klf2(Krüppel-like factor 2)、Egr1(Early growth response 1)などが力を介した弁形成制御因子として同定されてきた(Vermot et al., *Plos Biol.*, 2009, Banjo et al., *Nat. Commun.*, 2013)ことから、弁形成過程の全容理解にはメカトランスダクション機構の解明が必須である。しかし、力学刺激がどのように転写因子を調節するのか、制御機構は未だに解明されていない。大きな要因は、主な心臓研究が固定サンプルまたは培養細胞を対象として解析されているためである。この状態では細胞に作用する外力が0になってしまうため、力学応答機構の理解を進めることができない。また、得られたデータが直接的に力学応答に由来するかどうか検証する系も確立していない。力学刺激を与えることができるデバイスを用いた培養条件下での解析も行われているが、形態形成が行われる環境を再現することは容易でない。ゆえに、拍動する心臓の生体ライブイメージングを行うことが、心臓の発生と形態維持機構の問題解決に不可欠である。

研究代表者はゼブラフィッシュ胚を用い、拍動心臓イメージングと独自に開発した手法から直接的な物理刺激作用を検証した。その結果、心内膜内皮細胞において細胞外 ATP(アデノシン-3-リン酸)の受容体:P2XR(プリン受容体)活性化を介した  $Ca^{2+}$ 流入が弁領域特異的かつ形成期特異的におこることを見出した(図1)。さらに直接的な物理刺激が  $Ca^{2+}$ 流入誘因となり、異所性の弁構造を構築しうることを見出した。ただし、心臓弁形成過程における力学応答を理解するためには、未だに複数の課題が存在する。まず、「細胞外 ATP を介した  $Ca^{2+}$ 流入が管腔面と間質面のどちらに起因するのか」明らかでない。そして、なぜ「継続して拍動し続ける心臓において、力学応答シグナルが弁領域の弁形成時期に特異的におきるのか」明らかでない。これらの課題を解決することは、力を感じ取る機構の全容理解における重要な知見となる。

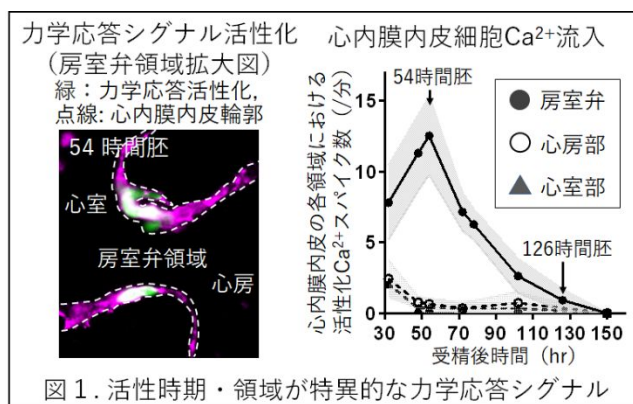


図1. 活性時期・領域が特異的な力学応答シグナル

## 2. 研究の目的

本研究目的は、心臓弁がどのようにして適切に形成されるのか機構を詳細に理解することである。そのために、代表者が見出した力学刺激による弁形成機構の全容理解を目指し、2つの達成目標を設定した。

心臓弁形成時、心内膜内皮細胞は、血流がおきる「管腔」面と、ヒアルロン酸が豊富に存在する「間質(Cardiac jelly)」面に接した1層のシート構造を形成する。目標(1)では、心内膜内皮が面する空間を区別して捉え、 $Ca^{2+}$ 流入が管腔面と間質面のどちらに起因するのか明らかにする。

循環器系、とくに心臓は常に物理的的刺激に晒されるにも関わらず、物理情報がどのようにして適切に生体機能を調節するのか、その機構は理解されていない。目標(2)では、物理的的刺激に反応した化学シグナルがどのように弁形成時に限って弁領域に限定されるのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

研究をすすめるにあたり、遺伝子改変ゼブラフィッシュの作製と高速イメージング、力操作系の開発を行った。そして力学刺激に反応した化学シグナルがどこで変換され、どのように入力されるのか明らかにすることを目指した。具体的には、(1)心内膜内皮細胞が面する“外”を区別するための細胞膜に局在する  $Ca^{2+}$ 蛍光センサーの樹立、(2)細胞外 ATP 変動を捉えるための蛍光 ATP センサーの樹立、そして(3)磁性流体と電磁石を活用した心管腔内力操作系の開発に取り組んだ。

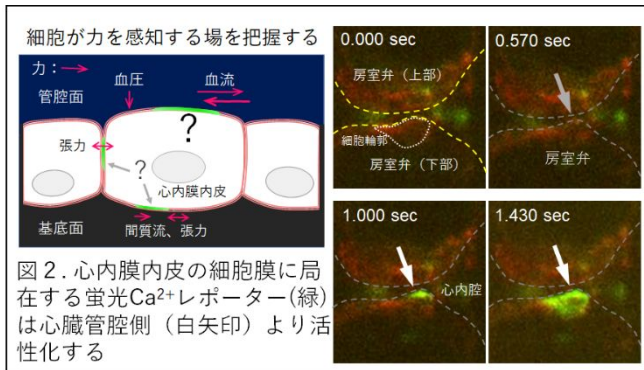
## 4. 研究成果

まず本研究課題開始後、先行研究結果を裏付けるための検討を行い、研究代表者らが見出した力

学応答シグナル経路が心臓弁形態形成に必須である心内膜内皮間葉転換 (EndoMT) を調節すること、さらに既存の力学応答シグナルとは独立した調節を行う経路であることを明らかにした。以上から、心臓の管腔面を構成する心内膜内皮細胞に対する直接的な力学応答シグナルが弁形成を調節する成果の論文発表を行った (Fukui et al., *Science*, 2021)。つづいて、研究計画の遂行から得た3つの成果を報告する。

(1) 力学刺激に応答した細胞内  $Ca^{2+}$  は管腔面から供給される。

心内膜内皮細胞がどのように力を感じて  $Ca^{2+}$  流入を誘導するのか、まず「力を感じる場」の理解を目指した。ミリスチル化脂質修飾タグを付加した蛍光  $Ca^{2+}$  センサー: myr-GCaMP7a を心内膜内皮細胞/血管内皮細胞特異的プロモーター下で発現するゼブラフィッシュ系統を樹立し、細胞膜上の  $Ca^{2+}$  変動を検証した。スピニングディスク型共焦点顕微鏡 (Dragonfly) を用いて高速かつ高解像度で拍動する心臓を撮影した結果、 $Ca^{2+}$  は心臓管腔側を起点として認められ、その後 400 msec 以内に全体へと伝播することが明らかとなった (図2)。これは心臓管腔側で発生する力学刺激を感じて生じる現象を捉えた結果である可能性が考えられた。また、ミトコンドリア外膜に局在する蛍光  $Ca^{2+}$  センサーも樹立し、細胞膜局在レポーターと同時に発現する胚を観察した結果、まず細胞膜の  $Ca^{2+}$  レポーター活性が認められることを確認した。当初、心内膜内皮細胞を挟んで管腔の反対側である間質より力作用がおきる可能性を考えたが、以降の検討では管腔側に着目した。



(2) ゼブラフィッシュ生体内 ATP 変動計測にはセンサーの感度を最適化する必要がある。

細胞外 ATP を感知するプリン受容体を介して  $Ca^{2+}$  流入が誘導される先行検討を基に、心内膜内皮細胞における細胞膜上 ATP 量変動と  $Ca^{2+}$  流入変動の関係動態を明らかにすることを目指した。 $F_0F_1$ -ATPase のドメイン構造と sfGFP を活用した 1 波長 ATP 蛍光レポーター: iATPSnFR1 (Lobas et al., *Nat. Commun.*, 2019) を発現する個体樹立が完了し、Lightsheet 顕微鏡解析を行ったが、蛍光発現変動を認めることはできなかった。その理由として、既報の条件は HEK293 細胞を用いた検討であり、ゼブラフィッシュ個体での条件ではセンサーの感度 (結合定数、解離定数) が至適ではなかった可能性が挙げられた。最近 ATP 感度が亢進した改変型 ATP センサー: iATPSnFR2 が報告されており (Marvin et al., *PNAS*, 2024)、今後も様々な検証を継続する。

(3) 双方向性血流に由来する接線応力が  $Ca^{2+}$  流入を誘導する。

心臓管腔に作用する力学特性の理解を目指して、磁力を活用した力操作法を開発してきた。先行研究では磁気ビーズを用いてきたが、新たに磁力により変形する特徴をもつ磁性流体を活用した。管腔内に打ち込んだ磁性流体に対して、胚体外に設置した電磁石型磁気プローブより磁力が入ると、主に垂直方向の力を入力できる。一方で、磁力をなくして流体がもとに戻る際、隙間に血液が侵入して水平方向の力が優位に働く。磁力操作時の細胞内  $Ca^{2+}$  流入を観察したところ、磁力がない状態、管腔面に対して並行 (接線方向) に作用するせん断応力が生体シグナル ( $Ca^{2+}$  流入) を誘導することを見出した。他方で、垂直に力を作用させた際、細胞膜張力が増加するにも関わらず  $Ca^{2+}$  流入が認められなかった。先行検討での膜張力センサー (Piezo 受容体) の変異体、そして伸展刺激応答の阻害剤 ( $Gd^{3+}$  イオン) が心臓管腔における力- $Ca^{2+}$  流入-Nfat シグナルに影響しなかった結果は本成果に整合している。管腔内の接線応力は血流により生じることから、つづく検討では血流動態を高速イメージングで詳細に解析した。その結果、力学応答性シグナル活性領域・時期と双方向性の血流発生が相関することが明らかとなった。実際にビーズによる血流閉塞を行い、人為的に双方向性血流を作り出すことで、心臓管腔に力学応答シグナルを誘導できることを確認した。

心臓管腔では力の違いを明確に区別する機構が存在すると考えられ、今後の研究では、生体内で生じる血液流動が引き起こすせん断応力の本質に迫る仮説を検証する計画である。そして心臓管腔組織形成機構の解明を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroyuki Nakajima, Hiroyuki Ishikawa, Takuya Yamamoto, Ayano Chiba, Hajime Fukui, Keisuke Sako, Moe Fukumoto, Kenny Mattonet, Hyouk-Bum Kwon, Subhra P Hui, Gergana D Dobрева, Kazu Kikuchi, Christian S M Helker, Didier Y R Stainier, Naoki Mochizuki	4. 巻 58
2. 論文標題 Endoderm-derived islet1-expressing cells differentiate into endothelial cells to function as the vascular HSPC niche in zebrafish	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 224-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2022.12.013.	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 該当する

1. 著者名 Vignes Helene, Vagena-Pantoula Christina, Prakash Mangal, Fukui Hajime, Norden Caren, Mochizuki Naoki, Jug Florian, Vermot Julien	4. 巻 57
2. 論文標題 Extracellular mechanical forces drive endocardial cell volume decrease during zebrafish cardiac valve morphogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 598-609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2022.02.011	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 Chow Renee Wei-Yan, Fukui Hajime, Chan Wei Xuan, Tan Kok Soon Justin, Roth Stephane, Duchemin Anne-Laure, Messaddeq Nadia, Nakajima Hiroyuki, Liu Fei, Faggianelli-Conrozier Nathalie, Klymchenko Andrey S., Choon Hwai Yap, Mochizuki Naoki, Vermot Julien	4. 巻 20
2. 論文標題 Cardiac forces regulate zebrafish heart valve delamination by modulating Nfat signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3001505	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 該当する

1. 著者名 Fukui Hajime, Chow Renee Wei-Yan, Xie Jing, Foo Yoke Yin, Yap Choon Hwai, Minc Nicolas, Mochizuki Naoki, Vermot Julien	4. 巻 374
2. 論文標題 Bioelectric signaling and the control of cardiac cell identity in response to mechanical forces	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 351-354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abc6229	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14件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 福井 一
2. 発表標題 血流が規定する心臓管腔形成機構
3. 学会等名 第8回血管生物若手研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hajime Fukui, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Bidirectional flow forces instruct endocardial cell identity for the cardiac lumen morphogenesis
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福井 一
2. 発表標題 組織形成の理解に向けた力の操作とカ学生体シグナル研究
3. 学会等名 先端酵素学研究所シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福井 一
2. 発表標題 心臓弁形成を制御する「血流ベクトル」を認識した力学応答原理の解明
3. 学会等名 山内進循環器病研究助成 第4回研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福井 一
2. 発表標題 心臓形成の理解にむけた生体力学シグナル研究
3. 学会等名 第22回日本心臓血管発生研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福井 一
2. 発表標題 外力に応答する化学的シグナル可視化から観る心臓管腔形成機構
3. 学会等名 徳島大学 医光融合研究シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 福井 一
2. 発表標題 心臓管腔形成を制御する血流の力学特性を認識した力学応答機構
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hajime FUKUI, Julien VERMOT, Naoki Mochizuki
2. 発表標題 Bidirectional flow forces instruct endocardial cell identity for the cardiac valve formation
3. 学会等名 3rd Franco-Japanese Developmental biology meeting（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福井 一
2. 発表標題 心臓弁形成を調節する新たな力学応答シグナルの解明
3. 学会等名 CVMW2022 日本血管生物医学会 第7回血管生物若手研究会優秀賞・最優秀賞講演（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福井 一
2. 発表標題 Bidirectional flow forces instruct endocardial cell identity for the cardiac valve development
3. 学会等名 CVMW2022 BCVRシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hajime FUKUI
2. 発表標題 Bidirectional flow forces instruct endocardial cell identity for the cardiac valve morphogenesis
3. 学会等名 BDR symposium 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福井 一
2. 発表標題 「力」による心臓弁の造形
3. 学会等名 第7回 日本血管生物医学会 血管生物若手研究会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 福井 一, 望月 直樹, Julien VERMOT
2. 発表標題 力学刺激に依存した化学シグナル応答による心臓弁形成機構
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hajime FUKUI
2. 発表標題 Molecular control of endocardial cell fate in response to mechanical forces during cardiac valve formation
3. 学会等名 第5回 BCVR
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 福井 一	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実験医学 4月号 「力」に应答した生体電気シグナルによる心臓弁形成メカニズム	

1. 著者名 福井 一	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科9月号 機械的な力に応じた生体電気シグナル伝達は心臓弁となる細胞運命を制御する	



1. 著者名 福井 一、中嶋 洋行、望月 直樹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 5
3. 書名 医学のあゆみ12月号 メカノトランスダクションによる心臓血管発生制御	

1. 著者名 福井 一、迫 圭輔、望月 直樹	4. 発行年 2021年
2. 出版社 LIC	5. 総ページ数 10
3. 書名 循環器疾患（2021 下巻）モデル動物の作製と利用	

1. 著者名 福井 一	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実験医学2022年4月号 Current Topics	

〔産業財産権〕

〔その他〕

英国Imperial Collegeニュース記事（研究成果発表） <a href="https://www.imperial.ac.uk/news/231714/bioengineers-find-heart-valves-grow-wrong/">https://www.imperial.ac.uk/news/231714/bioengineers-find-heart-valves-grow-wrong/</a>
--

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

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			
英国	Imperial College London			
オーストラリア	Monash University			