

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12640

研究課題名（和文）心筋機械感受性制御におけるROSシグナリングの役割とその心不全治療への展開

研究課題名（英文）The Role of ROS Signaling in Regulating Myocardial Mechanosensitive Responses and Its Application to Heart Failure Therapy

研究代表者

入部 玄太郎 (Iribe, Gentaro)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90284885

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：心筋細胞から伸展刺激誘発性に産生される活性酸素（Reactive Oxygen Species: ROS）は生理的に必要なROSと思われるがその役割はよくわかっていない。今回の研究では心筋の伸展からROS産生に至るシグナル伝達系が明らかとなり、また、伸展誘発性ROSが心筋伸展時に筋小胞体リアノジン受容体からのカルシウム放出を促進することで伸展時の心筋収縮性を維持していることが明らかとなった。さらには、慢性的な圧負荷による心不全に伴う過剰なROS産生（酸化ストレス）は生理的な伸展誘発性ROSが変化したものである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性酸素（ROS）は酸化ストレスとして心不全を含めた様々な病態に関わっているが、生理的に必要な生理活性物質でもある。本研究によって心臓における生理的ROS（伸展誘発性ROS）の役割およびその産生経路が初めて明らかとなった。さらに、心臓における病的なROS発生の最初のステップが生理的な伸展誘発性ROSの増強であることが示唆された。これまで心不全の抗酸化療法は臨床的に効果がなかったが、その理由として抗酸化が生理的に必要なROSをも抑制してしまうことが考えられる。本研究結果は、生理的に必要な伸展誘発性ROSに干渉しない新しい心臓抗酸化療法の開発の基盤となる知見であり、今後の展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：Myocardial stretch-induced ROS production is thought to be physiological ROS, but their role is not well understood. In this study, the signaling pathway from myocardial stretch to ROS production was clarified, and it was shown that stretch-induced ROS maintains myocardial contractility during stretch by promoting calcium release from ryanodine receptors during myocardial stretch. Furthermore, our results suggest that the excessive ROS production (oxidative stress) associated with chronic pressure overload-induced heart failure may be initiated by an enhancement of physiological stretch-induced ROS production.

研究分野：心臓生理学

キーワード：機械感受性 活性酸素 機械的負荷 酸化ストレス メカノトランスダクション 心筋力学

1. 研究開始当初の背景

高血圧症や弁膜症などにより長期間、圧負荷・容量負荷などの機械的負荷が与え続けられると、様々なメカノトランスダクションを介して細胞形態・機能の不可逆的変化（構造的・機能的リモデリング）が生じ、これが心不全の病態基盤となる。その増悪因子として過剰な ROS による酸化ストレスが注目されており、関連研究が多いにもかかわらず、現在のところ抗酸化剤による心不全の治療効果は認められていない。これは、ROS が細胞のシグナル伝達に関わる重要な生理活性物質でもあるため、抗酸化剤によるグローバルな酸化ストレス抑制はこれらも含めてすべて抑制してしまうからだと考えられている。よって心不全の抗酸化療法を確立するためには心筋の生理的な ROS シグナリングに影響を与えない新しいアプローチが必要である。しかしながら、心筋細胞においてはその肝心の生理的な ROS シグナリングの役割がよくわかっていない。

最近になって正常心筋におけるいくつかの伸展感受性現象に ROS が関わっていることが明らかとなってきた。例えば研究代表者は、心筋細胞を伸展すると即座にカルシウムスパーク（筋小胞体の Ca^{2+} 放出チャネルであるリアノジン受容体からの局所的で自発的な Ca^{2+} 放出現象）が増加することを見出したが、これは伸展誘発性に活性化された NADPH オキシダーゼ (NOX) 2 由来の ROS がリアノジン受容体を刺激することによって起こる現象であることが現在明らかになっている。心臓は刻一刻と変化する力学的負荷環境に対応して適正な血液を拍出するという負荷適応性を持っているが、上記の研究結果から我々は、心筋細胞における生理的な ROS シグナリングは伸展などの機械的負荷に即座に対応するための細胞機能制御を担っているのではないかと、そしてこれを抑えてしまう抗酸化療法は心臓の負荷適応性を損なうのではないかと考えた。本研究課題によってこれらを解明することができれば生理的な ROS シグナリングに干渉しない心不全の抗酸化療法の可能性が見えてくる。

2. 研究の目的

本研究では、以下の3項目を目的とする。

- (1) 伸展誘発性 ROS の生理的な役割を明らかにする。
- (2) 心筋における生理的 ROS シグナリングであると思われる伸展誘発性 ROS 産生におけるメカノトランスダクションの全容を明らかにする。
- (3) 大動脈縮窄術 (transverse aortic constriction : TAC) を施した慢性圧負荷モデルマウスを用い、生理的伸展誘発性 ROS と慢性圧負荷による心不全における過剰な酸化ストレスとの関連を明らかにする。

3. 研究の方法

マウス心筋細胞をランゲンドルフ灌流下に酵素灌流し、心筋細胞を単離する。単离心筋細胞に以下に述べるカーボンファイバーによる単离心筋細胞長さ張力制御技術を用いて伸展刺激を付与した。ピエゾモーターに固定した径 $10\mu m$ のカーボンファイバーを心筋細胞両端に装着する。カーボンファイバー位置をナノメートル精度でコンピュータ制御することにより伸展刺激を加える (図1)。心筋細胞の機械負荷パラメータとして重要なものは細胞の長さ及び発生張力であるが、長さは CCD カメラより直接測定する。張力はカーボンファイバーのマウント位置と先端位置の差から求められるファイバーのたわみ量と、あらかじめ測定してあるファイバーの弾性率を乗じて計算する。

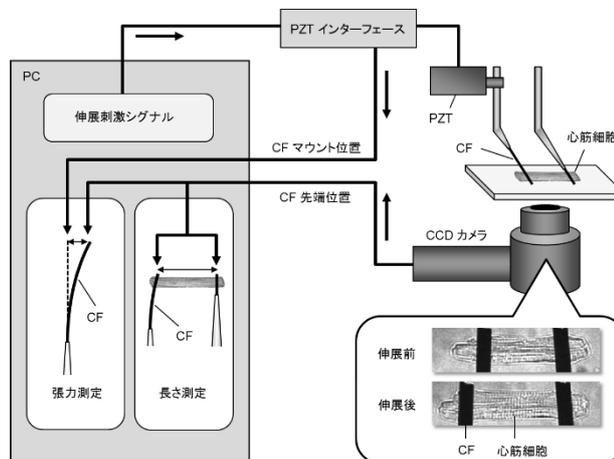


図1: 心筋細胞長さ張力制御/測定システム

このシステムを用いて、単离心筋細胞に伸展刺激を加え、その際の細胞内 ROS 産生量（伸展誘発性 ROS）および各種力学パラメータを測定した。

4. 研究成果

(1) 伸展誘発性 ROS の生理的な役割

① 心筋収縮性に及ぼす影響

NOX2 由来である伸展誘発性 ROS の役割を明らかにするために、野生型及び NOX2 欠損マウスにおける心筋収縮性を比較した。負荷非依存性の心筋収縮性の指標として収縮期末長さ張力関係 (end-systolic force-length relation: ESFLR) の傾きである最大弾性率を比較したところ、NOX2 欠損マウスは野生型に比して有意に心筋収縮性が低かった。

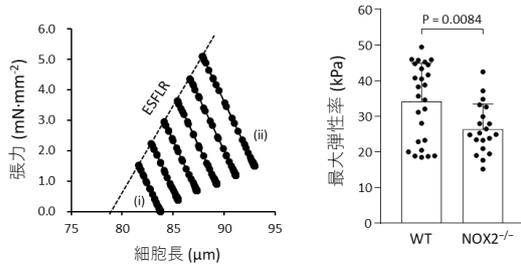


図2: (左) 6段階の細胞伸展と、その時の長さ張力関係。ESFLR (end-systolic force-length relation) の傾きは最大弾性率を表し、収縮性の指標となる。

② カルシウムハンドリングに及ぼす影響

野生型及びNOX2欠損マウスにおいて、心筋伸展前後のカルシウムトランジェント波形を比較したところ、野生型においては伸展前後でカルシウムトランジェント波形に変化はなかったが、NOX2欠損マウスでは伸展によりカルシウムトランジェントの立ち上がりは遅れることが分かった(図3下、矢印部分)。

以上①及び②より、伸展誘発性ROSは伸展時にリアノジン受容体の活性化を促進、同期を改善することで収縮性が増加することが考えられた。このメカニズムを確認するために数理モデルによるシミュレーションを行ったところ、ROSの刺激により予想されるリアノジン受容体の活性化によりカルシウムトランジェントの立ち上がりは速くなり、そのために収縮力が増加することが再現された(図4) [1]。

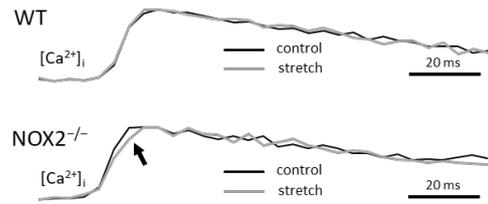


図3: 伸展によるカルシウムトランジェント波形変化

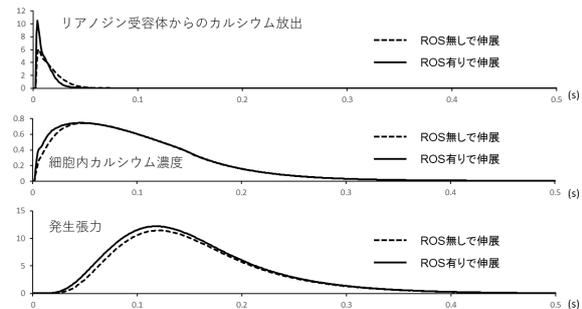


図4: 伸展誘発性ROSの影響のシミュレーション結果

(2) 伸展誘発性ROS産生のメカノトランスダクション経路

伸展刺激からNOX2活性化に至るシグナル伝達として図5のような経路を予想した。この仮説を検証するために、図1の心筋細胞伸展システムとROS指示薬のDCFを用いて以下を検討した。

① 伸展刺激によってパネキシン1ヘミチャネルから放出されるATPの関与

まず、パネキシン1ヘミチャネルを阻害するCarbenoxolone (CBX) 存在下では伸展誘発性ROS産生が消失した。また、伸展の代替刺激として心筋にATPを急性灌流させるとROSが産生された。さらにCBX存在下でATPを灌流させてもROSは産生された(図6)。以上の結果より、伸展刺激によるパネキシン1からのATP放出によって伸展誘発性ROSが産生されることが明らかとなった。

② ATP放出に続くプリン作動性シグナリングの関与

プリン受容体であるP2Y受容体の阻害薬(PPADS)存在下では伸展刺激によるROS産生は観察されなかった。また、P2Y下流のホスホリパーゼC (PLC) の阻害薬(U73122)存在下でも伸展刺激もしくはATP刺激によるROS産生は観察されなかった(図6)。以上の結果より、伸展刺激により放出されたATPがP2Y受容体を介してPLCを活性化することで伸展誘発性ROSが産生されることが明らかとなった。

③ TRPC3チャンネルの関与

TRPC3チャンネルはPLCにより産生されるジアシルグリセロール(DAG)により活性化される。さらにTRPC3チャンネルとNOX2は複合体を形成し、TRPC3がNOX2を安定化させていることが知られている。TRPC3欠損マウス心か

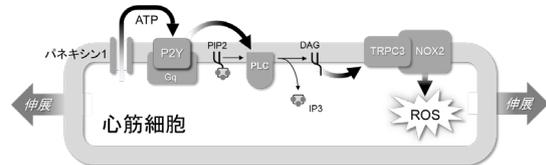


図5: 予想された心筋伸展誘発性ROSのシグナル伝達経路

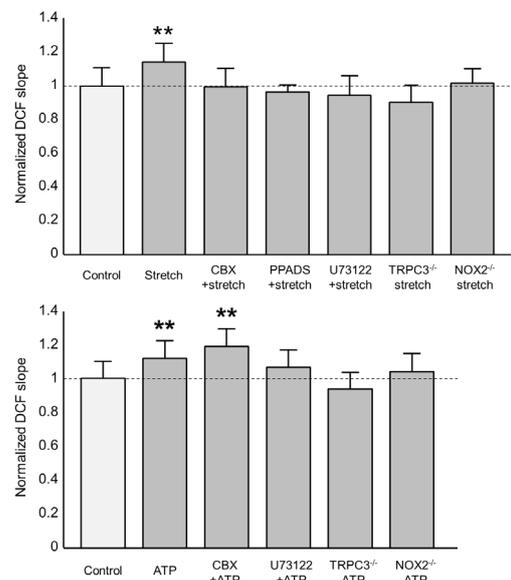


図6: 伸展(上)およびATP投与(下)によるROS産生

ら単離した心筋細胞を用いたところ、伸展刺激もしくは ATP 刺激による ROS 産生は観察されなかった。また、NOX2 欠損マウス心から単離した心筋細胞でも伸展刺激もしくは ATP 刺激による ROS 産生は観察されなかった (図 6)。以上の結果より、DAG により活性化した TRPC3 が NOX2 を活性化することで伸展誘発性 ROS が産生されることが明らかとなった。

上記①～③の結果から、伸展誘発性 ROS 産生のメカノトランスダクションは、心筋への伸展刺激によってパネキシン 1 から放出された ATP が P2Y 受容体を介して PLC~TRPC3~NOX2 を活性化することで ROS が産生される、という経路をとることが明らかとなった。

(3) 生理的伸展誘発性 ROS と病的酸化ストレスの関係

TAC による慢性的な圧負荷は過剰な酸化ストレスを惹起し、心リモデリングを経て最終的に心不全を発症することはよく知られている。我々は TAC 後早期の心臓では伸展誘発性の ROS を増大させて収縮性を上げることで TAC による圧負荷増大を代償しており、この時期には器質的なリモデリング変化はまだ起こっていない、との仮説を立て、これを検証するために以下を検討した。

① TAC による伸展誘発性 ROS の挙動変化

Sham 手術を行ったマウス心筋細胞 (コントロール) はこれまでと同様に、急性伸展刺激により DCF 蛍光カーブの傾き (ROS 産生の指標) は 10% 弱の増加を示したが、TAC 後 2 週間のマウスでは 30% 近い増加を示し、有意に伸展誘発性 ROS 産生が増強していることがわかった。これに対して NOX2 欠損マウスでは TAC 後 2 週間の伸展誘発性 ROS 産生は見られなかった (図 7)。

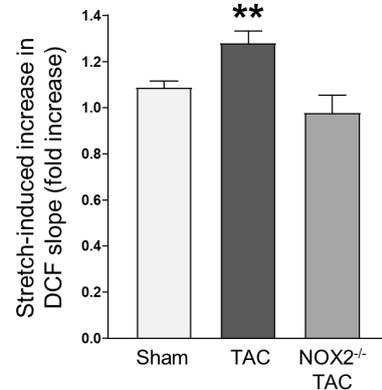


図 7: TAC 後 (2 週間) の伸展誘発性 ROS 産生の変化

② TAC 後早期 (2 週間) の心機能変化 (心エコーによる検討)

Sham 手術マウス心 (コントロール: 図 8 左) に対して TAC マウス心 (図 8 中) は後負荷が上昇しているにもかかわらず駆出率が維持されており、恐らくは増加している伸展誘発性 ROS のために収縮性が増加していることが予想される。先行研究では NOX2 欠損マウスでは TAC 後 5 週以降の心リモデリングが抑えられているという結果が多くみられることから、野生型マウスでは TAC 後早期の亢進した伸展誘発性 ROS が病的酸化ストレスとなっていくことが示唆された。

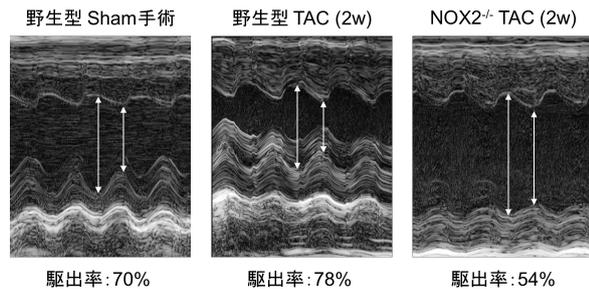


図 8: TAC 後 (2 週間) の M モード心エコー

一方、NOX2 欠損マウス心 (図 8 右) では TAC 後 2 週間の時点での駆出率がコントロール心に比して著しく低い。これは伸展誘発性 ROS が欠如しているために収縮性が短期的に維持できず、TAC による後負荷増加を代償できていないことを示している。本結果は生理的な ROS も含めて抑制する抗酸化処置が有害であることを示唆しているものと考えられた。

<引用文献>

- [1]. Kaihara K, Kai H, Chiba Y, Naruse K, Iribe G. Stretch-induced reactive oxygen species contribute to the Frank-Starling mechanism. *The Journal of Physiology*, 2023. doi: 10.1113/JP284283.

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaihara Keiko, Kai Hiroaki, Chiba Yumiko, Naruse Keiji, Iribe Gentaro	4. 巻 -
2. 論文標題 Stretch induced reactive oxygen species contribute to the Frank-Starling mechanism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	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） 10.1113/JP284283	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	山口 陽平 (Yamaguchi Yohei) (40831912)	旭川医科大学・医学部・助教 (10107)	
研究分担者	貝原 恵子 (Kaihara Keiko) (60638641)	岡山大学・医学部・技術専門職員 (15301)	
研究分担者	金子 智之 (Kaneko Toshiyuki) (80638643)	旭川医科大学・医学部・助教 (10107)	
研究分担者	千葉 弓子 (Chiba Yumiko) (70835777)	旭川医科大学・医学部・助教 (10107)	

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