

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15338

研究課題名（和文）機械受容チャネルによる動的心筋バイオメカニクス制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the regulation mechanism of cardiac biomechanics by focusing on TRPC channels

研究代表者

山口 陽平（Yamaguchi, Yohei）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：40831912

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：心臓の収縮・弛緩に伴うメカニカルストレスは、心筋の動的バイオメカニクスを大きく変化させるが、その制御機構の全容は未だ明らかではない。本研究では、機械受容チャネルであるTRPC6に着目し、マウス心臓から単離した心筋細胞への伸展負荷実験やマウス生体を用いた容量負荷心臓モデル実験でのTRPC6の欠損による影響を調べ、急性伸展刺激により心筋で誘発される収縮力増加反応（フランク・スターリング現象）の分子メカニズムの解明を目指した。心筋細胞レベルと個体レベルの実験を組み合わせた結果、TRPC6が細胞内亜鉛濃度を一定レベルに保ち、フランク・スターリング現象の制御に関わっていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生理的な心臓において、TRPC6は細胞内亜鉛濃度を制御し、心筋の収縮力増大機構を抑制的に制御していると考えられる。そのため、TRPC6に対する特異性が高く心毒性が少ない阻害剤が開発できれば、TRPC6の阻害により心筋の細胞内亜鉛濃度を増大させ、収縮力を増大する新規作用機序の強心薬開発につながる可能性がある。これまでの強心薬では成し遂げられなかった心不全の生命予後を大きく改善する強心薬開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Mechanical stress during cardiac contraction alters the dynamic biomechanics of the heart, but the regulatory mechanisms are not fully understood. In the present study, we focused on the mechanosensitive ion channel TRPC6 and investigated the molecular mechanisms of the stretch-induced cardiac contractile response (Frank-Starling mechanism). Our data show that TRPC6 contributes to the regulation of the Frank-Starling mechanism by controlling intracellular zinc concentration using isolated cardiomyocytes and volume-loaded mouse models.

研究分野：生理学

キーワード：メカノバイオロジー フランク・スターリング機構 TRPCチャネル 心筋細胞 亜鉛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓はその一生を通じて収縮・弛緩を繰り返しており、心筋には常にダイナミックな変化に伴う伸展や圧力といったメカニカルストレスが生じている。心筋細胞のカルシウムハンドリングと収縮タンパク機能の両者をメカニカルストレスは修飾し、そのバイオメカニクスを動的に変化させる(参考文献 1-3)。心筋細胞に急激な伸展ストレスが加わると、発生張力は二相性の変化を示す(図 1)。急性伸展により心筋のミオシン調節軽鎖のリン酸化が亢進し、収縮力の急激な増大であるフランク・スターリング現象(Frank-Starling mechanism: FSM)を認める。その伸展が数分間持続するとカルシウムトランジェントの増大を伴う収縮力の増加である伸展誘発遅発性収縮力増加現象(slow force response: SFR)が生じる。このようなメカニカルストレスによる心筋収縮機構へのフィードバックは動的な心筋バイオメカニクスの統合的理解という観点からは非常に重要であり、これまで多くの研究が行われているにもかかわらず、そのメカニズムの全容は未だ明らかではない。

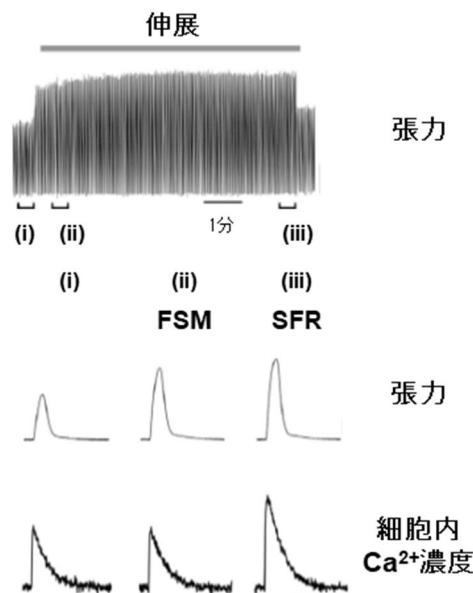


図 1 心筋細胞のフランク・スターリング現象(FSM)と伸展誘発遅発性収縮力増加現象(SFR) (引用文献 3 より)

2. 研究の目的

以上のような背景に基づき、本研究では、機械受容チャネルである TRPC6 に着目し、マウス心臓から単離した心筋細胞への伸展負荷実験やマウス生体を用いた容量負荷心臓モデルでの TRPC6 欠損による影響を調べることで、急性伸展刺激により心筋で誘発される収縮力増加反応であるフランク・スターリング現象の分子制御メカニズムを解き明かすことを目的とした。

3. 研究の方法

マウス心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流下に心筋細胞を酵素的に単離した。単离心筋細胞に伸展刺激を負荷するために次に示す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(図 2)を用いた(参考文献 2)。ガラス管のマウントに固定した直径 10 μm のカーボンファイバーで心筋細胞の両端を挟んだ。カーボンファイバー

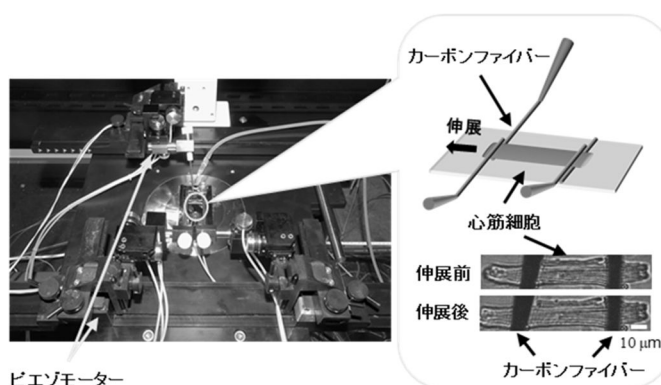


図 2 単离心筋細胞長さ張力制御技術

は静電気で細胞膜上に固定されたうえに細胞の上面と下面の 2 方向からしっかりと挟むことで、強固に細胞の両端を保持できる。カーボンファイバーをコンピュータ制御のピエゾモーターにてナノメートル精度で位置を制御することにより伸展刺激を加えた。心筋細胞の機械負荷パラメータとして細胞の長さや発生張力が重要である。そのため、長さは CCD カ

メラにより直接測定し、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算出されるファイバーのたわみ量と事前に計測してあるファイバーの弾性率を乗じて算出した。長さや張力の測定に加えて、カルシウム指示薬である Fura-4F や亜鉛指示薬である FluoZin-3 を用いた蛍光イメージングによって細胞内カルシウム濃度変化や細胞内亜鉛濃度変化などを測定した。それらに加え、マイクロアレイ法によるトランスクリプトーム解析とウエスタン・プロット法によるミオシン軽鎖 (MLC2) のリン酸化解析を実施した。また、個体レベルの実験として、マウスの尾静脈から生理食塩水を注入し、その容量負荷により心臓の収縮力がどのように変化するかを心エコーイメージングにより評価した。

4. 研究成果

(1) フランク・スターリング現象における TRPC6 の機能

129/Sv 系統の野生型と TRPC6 遺伝子欠損マウスから抽出した心臓をランゲンドルフ灌流下に酵素処理し、心筋細胞を得た。その細胞に 4 Hz の電気刺激を加え、5 段階の伸展を加え、収縮力の指標である収縮末期長さ・張力関係の傾き (最大弾性率) を計測した。野生型マウスに比べ、TRPC6 遺伝子欠損マウスでは最大弾性率が有意に増大していた (図 3)。一方、心筋において TRPC6 と共同して機能していると言われる TRPC3 の遺伝子欠損マウスでは最大弾性率の増大は認められなかった。よって、生理的な心筋では、TRPC6 がフランク・スターリング現象を抑制的に制御していることが示唆された。

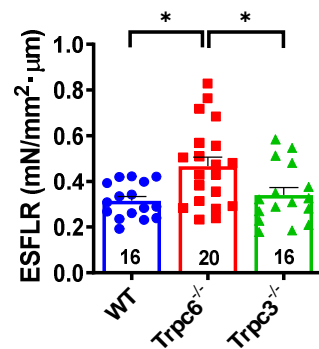


図 3 TRPC6 の最大弾性率への影響

(2) TRPC6 遺伝子欠損による亜鉛恒常性への影響

TRPC6 遺伝子欠損マウスにおいて最大弾性率が増大していた。しかし、そのメカニズムが不明であったので、マイクロアレイ法によるトランスクリプトーム解析を実施したところ、TRPC6 遺伝子欠損マウスの心筋

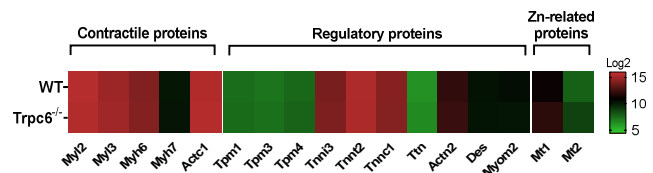


図 4 トランスクリプトーム解析

では収縮タンパク質の mRNA レベルの変化は認めなかったが、亜鉛の増大を示す指標であるメタロチオネイン 1 と 2 (Mt1, 2) の mRNA が上昇していた (図 4)。それを裏付けるように、TRPC6 遺伝子欠損マウス心筋の細胞内亜鉛濃度は野生型に比べて有意に上昇していた。また、TRPC6 遺伝子欠損マウスの心筋では、MLC2 のリン酸化が増強されていた。さらに、亜鉛を含有する灌流液により心筋細胞の収縮力は増大した。これらの結果から、TRPC6 遺伝子欠損マウスの心筋細胞の最大弾性率の増大は、TRPC6 により抑制されていた細胞内への亜鉛流入の増大による細胞内亜鉛濃度上昇で生じた MLC2 のリン酸化が関与していることが示唆された。

(3) 容量負荷モデルマウスでの心エコーイメージング

細胞レベルで観察された TRPC6 遺伝子欠損による最大弾性率の増大が個体レベルでも観察されるかを調べるため、TRPC6 遺伝子欠損マウスを用いて容量負荷モデルを作製した。

その結果、TRPC6 遺伝子欠損マウスでは、容量負荷により心臓の収縮力の指標である左室駆出率(EF)が顕著に増大しており、心筋細胞で認められた現象と同じ反応が個体レベルでも認めることが確認できた(図5)。

以上の成果から、TRPC6 は亜鉛恒常性を制御し、心筋収縮タンパク質のリン酸化を一定レベルに制御することで、フランク・スターリング機構が暴走しないように制御する重要なキーファクターであると考えられる。現状では特異性が高く心毒性の少ない TRPC6 の阻害剤はほとんどないが、TRPC6 に対する特異性が高く心毒性が少ない阻害剤開発に成功した暁には、細胞内亜鉛濃度を増大させ、心不全などで生じる心筋収縮力の低下を防ぐ、亜鉛恒常性維持に作用する新規機序の強心薬開発につながることを期待される。

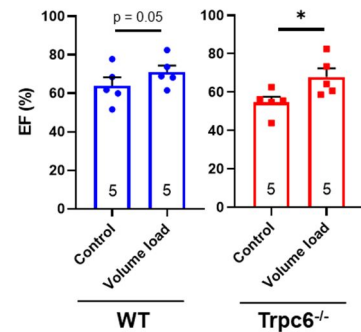


図5 容量負荷モデルでのTRPC6 欠損の影響

<引用文献>

- 1) Yamaguchi, Y., Nishiyama, M., Kai, H., Kaneko, T., Kaihara, K., Iribe, G., Takai, A., Naruse, K., Morimatsu, M. 2022. High hydrostatic pressure induces slow contraction in mouse cardiomyocytes. *Biophys J.* 121(17) 3286-3294
- 2) Yamaguchi, Y., G. Iribe, T. Kaneko, K. Takahashi, T. Numaga-Tomita, M. Nishida, L. Birnbaumer, and K. Naruse. 2018. TRPC3 participates in angiotensin II type 1 receptor-dependent stress-induced slow increase in intracellular Ca²⁺ concentration in mouse cardiomyocytes. *J. Physiol. Sci.* 68:153-164.
- 3) Yamaguchi, Y., G. Iribe, M. Nishida, and K. Naruse. 2017. Role of TRPC3 and TRPC6 channels in the myocardial response to stretch: Linking physiology and pathophysiology. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 130:264-272.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 西山雅祥, 山口陽平, 金子智之, 森松賢順 | 4. 巻 55 |
| 2. 論文標題 高圧力顕微鏡による心筋細胞の収縮イメージング | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 月刊 細胞 | 6. 最初と最後の頁 1134 ~ 1136 |
| 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 YAMAGUCHI Yohei, MORIMATSU Masatoshi | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 高静水圧で誘発される心筋細胞の緩やかな収縮現象 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri | 6. 最初と最後の頁 261 ~ 262 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.63.261 | 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 山口陽平 | 4. 巻 85 |
| 2. 論文標題 Afterコロナ, After北海道【AFTERNOON TEA】 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 日本生理学雑誌 | 6. 最初と最後の頁 64 ~ 65 |
| 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yamaguchi Yohei, Nishiyama Masayoshi, Kai Hiroaki, Kaneko Toshiyuki, Kaihara Keiko, Iribe Gentaro, Takai Akira, Naruse Keiji, Morimatsu Masatoshi | 4. 巻 122 |
| 2. 論文標題 High hydrostatic pressure induces slow contraction in mouse cardiomyocytes | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Biophysical Journal | 6. 最初と最後の頁 267 ~ 267 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2022.11.2940 | 査読の有無 無 |
| 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 Oda Sayaka, Nishiyama Kazuhiro, Furumoto Yuka, Yamaguchi Yohei, Nishimura Akiyuki, Tang Xiaokang, Kato Yuri, Numaga-Tomita Takuro, Kaneko Toshiyuki, Mangmool Supachoke, Kuroda Takuya, Okubo Reishin, Sanbo Makoto, Hirabayashi Masumi, Sato Yoji, Nakagawa Yasuaki, Kuwahara Koichiro, Nagata Ryu, Iribe Gentaro, Mori Yasuo, Nishida Motohiro | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Myocardial TRPC6-mediated Zn ²⁺ influx induces beneficial positive inotropy through α -adrenoceptors | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 6374 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34194-9 | 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 Yamaguchi Yohei, Nishiyama Masayoshi, Kai Hiroaki, Kaneko Toshiyuki, Kaihara Keiko, Iribe Gentaro, Takai Akira, Naruse Keiji, Morimatsu Masatoshi | 4. 巻 121 |
| 2. 論文標題 High hydrostatic pressure induces slow contraction in mouse cardiomyocytes | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biophysical Journal | 6. 最初と最後の頁 3286 ~ 3294 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2022.07.016 | 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 Yohei Yamaguchi, Benoit Allegrini, Raphael Rapetti-Mauss, Veronique Picard, Loic Garcon, Peter Kohl, Olivier Soriani, Remi Peyronnet, Helene Guizouarn | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Hereditary Xerocytosis: Differential Behavior of PIEZO1 Mutations in the N-Terminal Extracellular Domain Between Red Blood Cells and HEK Cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in 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) 10.3389/fphys.2021.736585 | 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 |

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yohei Yamaguchi, Toshiyuki Kaneko, Keiji Naruse, Gentaro Iribe, Susumu Ohya |
| 2. 発表標題 TRPC6 modulates Zinc mobilization to regulate stretch-induced increases in myocardial contractility |
| 3. 学会等名 The 2024 Biophysical Society Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yohei Yamaguchi, Toshiyuki Kaneko, Keiji Naruse, Gentaro Iribe |
| 2. 発表標題 Potential role of TRPC6 channels on single cell mechanics in mouse cardiomyocytes |
| 3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics 2022 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山口 陽平, 金子 智之, 張 夏智, 村田 影星, 入部 玄太郎, 西山 雅祥, 大矢 進 |
| 2. 発表標題 心筋細胞の収縮能への高静水圧負荷の影響 |
| 3. 学会等名 第101回日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山口 陽平, 金子 智之, 入部 玄太郎, 大矢 進 |
| 2. 発表標題 マウス心筋のTRPC6によるZn ²⁺ を介した伸展誘発性収縮力増加反応の制御 |
| 3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山口 陽平, 金子 智之, 大矢 進, 西山 雅祥 |
| 2. 発表標題 心筋細胞における生理的レベルの圧負荷のカルシウムハンドリングへの影響 |
| 3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山口 陽平, 金子 智之, 入部 玄太郎, 成瀬 恵治, 大矢 進 |
| 2. 発表標題 マウス心筋細胞におけるTRPC6による力学特性の制御機構 |
| 3. 学会等名 第17回トランスポーター研究会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山口 陽平, 金子 智之, 成瀬 恵治, 大矢 進, 入部 玄太郎 |
| 2. 発表標題 マウス心筋細胞の力学特性に対するTRPC6ノックアウトの影響 |
| 3. 学会等名 生理学研究所研究会「TRP研究会2023」 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山口陽平, 西山雅祥, 甲斐寛彬, 金子智之, 貝原恵子, 入部玄太郎, 高井章, 成瀬恵治, 森松賢順 |
| 2. 発表標題 高静水圧で誘発されるマウス心筋細胞の緩徐な収縮現象 |
| 3. 学会等名 第102回 日本生理学会北海道地方会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yohei Yamaguchi, Masayoshi Nishiyama, Hiroaki Kai, Toshiyuki Kaneko, Keiko Kaihara, Gentaro Iribe, Akira Takai, Keiji Naruse, Masatoshi Morimatsu |
| 2. 発表標題 マウス心筋細胞で認める高静水圧誘発性緩徐収縮 |
| 3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yohei Yamaguchi, Kaneko Toshiyuki, Iribe Gentaro |
| 2. 発表標題 Suppression of TRPC6 augments Frank-Starling mechanism in mouse cardiomyocyte |
| 3. 学会等名 第100回日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山口陽平, 金子智之, 入部玄太郎 |
| 2. 発表標題 マウス心筋細胞における伸展誘発性張力変化現象におけるTRPC6の役割 |
| 3. 学会等名 第99回日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山口陽平, 西山雅祥, 甲斐廣彬, 金子智之, 入部玄太郎, 成瀬恵治, 森松賢順 |
| 2. 発表標題 高静水圧で誘発される心筋細胞の緩徐な収縮現象 |
| 3. 学会等名 生体運動研究合同班会議2022 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山口陽平, 西山雅祥, 金子智之, 入部玄太郎, 成瀬恵治, 森松賢順 |
| 2. 発表標題 高圧力により誘発される心筋細胞の非典型的収縮 |
| 3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山口陽平, 西山雅祥, 金子智之, 入部玄太郎, 成瀬恵治, 森松賢順 |
| 2. 発表標題 高圧力下で誘起される心筋細胞の収縮運動 |
| 3. 学会等名 第62回高圧討論会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| 名古屋市立大学大学院医学研究科薬理学分野ホームページ http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/pharma.dir/index.html 旭川医科大学生理学講座自律機能分野ホームページ https://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/phys1/index.html |
|---|

| | | | |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 |
|---------|---------|