

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19933

研究課題名（和文）心臓再生医療の実現に向けた胎児酸素制御機構のパラダイムシフト

研究課題名（英文）A paradigm shift in fetal oxygen regulation implicated in heart regeneration.

研究代表者

橋本 謙（HASHIMOTO, Ken）

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80341080

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類の心筋細胞は低酸素下の胎生期にのみ分裂再生能を持つ為、低酸素ベースの心臓再生医療が期待されている。一方、進化的観点から他の動物種の心臓再生研究も進んでいる。中でも両生類は成体期においても強い心臓再生能を持つことが知られているが、酸素動態との関連は不明である。本研究では、酸素動態の評価手法として、1)採取血液によるヘモグロビン酸素親和曲線、2)ポルフィリンによるin vivo酸素分圧計測を組み合わせた新規実験系を構築し、これを種々の両生類（アホロートル、イベリアトゲイモリ、アフリカツメガエル）に適用すると共に、ラット臍帯血管での計測に成功し、胎児循環の酸素動態の理解への一歩を踏み出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の心筋細胞は低酸素下の胎生期にのみ分裂再生能を持つ為、低酸素ベースの心臓再生医療が期待されている。一方、一部の両生類は成体期においても強い心臓再生能を持つが、酸素動態との関連は不明である。動物体内において、酸素はヘモグロビン[Hb]との結合解離により血管から組織への供給が調節されている為、酸素動態を正確に評価するには、1)Hbの酸素飽和度、2)酸素分圧の両方の情報が必要である。本研究ではこれらを組み合わせた新規実験系を構築し、種々の両生類（アホロートル、イベリアトゲイモリ、アフリカツメガエル）やラット胎児に適用することで、心臓再生能を有する動物種の酸素動態を評価可能な実験系を構築した。

研究成果の概要（英文）：Low oxygen-based cardiac regeneration is a promising strategy, as mammalian cardiomyocytes only proliferate under hypoxic intrauterine conditions. Meanwhile, cardiac regeneration in broad range of animal species has been extensively studied from an evolutionary perspective. Of note, some amphibians retain regenerative capacity throughout their lifespan, but its association with oxygen environment is unclear. In this study, we established a novel system to analyze oxygen dynamics in animal bodies using 1) an oxygen dissociation curve of hemoglobin and 2) porphyrin-based in vivo oxygen partial pressure measurement system. We applied this system to several amphibians (Neotenic Axolotls, Pleurodeles waltl, and Xenopus laevis) as well as to umbilical arteries and veins in rats, which will contribute to the understanding of the oxygen dynamics in feto-maternal circulation.

研究分野：心臓進化生理学

キーワード：心筋 分裂 再生 酸素環境

### 1. 研究開始当初の背景

我々哺乳類の心筋細胞は胎生期子宮内では活発に分裂して原始心臓を形成するが、出生後は細胞周期から離脱し、分裂を停止する。従って、成体では心筋梗塞や心不全等の虚血性心疾患で失われた心筋細胞を分裂・再生することは出来ず、故に本疾患は致死的であり、治療戦略の開発が急務である。我々は最近、心筋分裂には胎生期の低酸素環境が必須であり、出生後の肺呼吸開始による酸素の増加が心筋分裂を止めることを突き止めた (Hashimoto *Sci Rep* 2017)。一方、近年、進化学的観点から哺乳類以外の広範な動物種についての心再生研究が精力的に進められている。中でも一部の両生類は成体期においても強い心再生能を有していることから注目を集めているが、その体内酸素動態については殆ど不明である。呼吸器を介して外部から取り込まれた酸素は血液中のヘモグロビン (Hb) との結合解離により血管から標的の組織・細胞への供給が調節されている為、その体内動態は非常に複雑であり、一口に低酸素環境と言ってもどの区画 (外部環境、呼吸器、血液、組織、細胞内など) にどれだけの酸素 (Hb 結合型, 自由溶存型) が含まれているのかを正確に評価するのは極めて困難である。本研究では、このような複雑な系における重要な二つの因子として、1) Hb の酸素飽和度、及び、2) 酸素分圧 (PO<sub>2</sub>) に着目し、これらを計測可能な実験系を構築し、種々の両生類 (アホロートル、イベリアトゲイモリ、アフリカツメガエル) やラット胎児に適用することで、心再生能を有する動物種の酸素動態を評価した。

### 2. 研究の目的

先述したように、心筋細胞の分裂・再生には低酸素環境が重要であることが広く認識されてきており、様々な動物種の酸素動態を評価できる実験系の構築が求められている。酸素調節機構は極めて複雑であるが、本研究では、1) Hb の酸素飽和度、及び、2) 酸素分圧 (PO<sub>2</sub>) に着目し、これらを計測可能な実験系を構築し、心再生能を有する種々の動物種にこれを適用し、酸素動態の理解に貢献することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) Hb 酸素飽和度 (酸素親和曲線) の計測

以下の二つの計測装置を試作した。

- PO<sub>2</sub> 調整可能な恒温機内にポータブル型吸光度計を設置し、PO<sub>2</sub> を 0 ~ 100mmHg の間で変化させ、570nm 吸光度の連続計測により Hb 酸素飽和度を計算し、酸素親和曲線を得た。
- 別の吸光度計内の計測部を改造し、流量調整済みの窒素・酸素ガスを別々に導入することで計測部内の PO<sub>2</sub> を任意に変化させ、570nm 吸光度の連続計測により Hb 酸素飽和度を計算し、酸素親和曲線を得た。

#### (2) 心再生能を有する両生類アホロートルの酸素環境と各呼吸器の機能解析

両生類アホロートル (通称: ウーパールーパー) は成体期においても強い心筋再生能を有しており、医療応用が期待されている。しかし、アホロートルの生態・生理には不明点が多く、多くの再生研究はこの点を無視して進められている。また、アホロートルは通常、水中で鰓・皮膚・肺の3つの呼吸様式を用いて酸素を取り込む水中型として生活し、変態することなく成長・成熟するが (幼形成熟)、甲状腺ホルモン投与により1~2ヶ月で体内構造が劇変する変態を起こし、鰓は退縮、皮膚は硬化する一方、肺が成長・巨大化することで肺呼吸のみに依存する陸上型となる (図1)。このことは、肺呼吸を行う我々

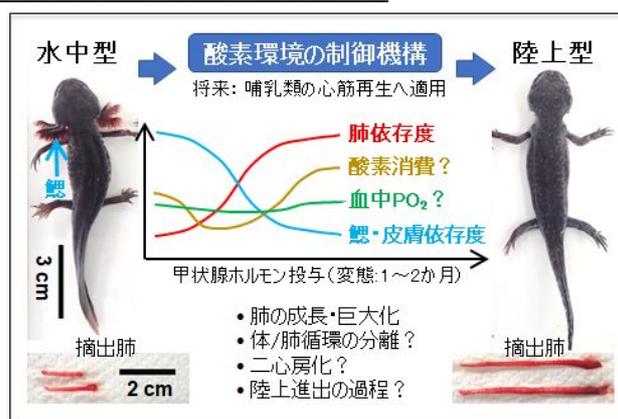


図1 両生類アホロートルの酸素動態

哺乳類に近い環境下での酸素制御機構の検討が可能であると共に、進化学的観点からは、生物の陸上進出の過程を単一個体レベルで評価可能であることを示唆しており、アホロートルの生態・生理の解明は非常に重要である。そこで本研究では、我々が独自に構築したポルフィリン in vivo PO<sub>2</sub> 計測系 (図2) を水中型 (幼形成熟型) アホロートルに適用し、各呼吸様式 (鰓・皮膚・肺) の活性や酸素摂取に対する貢献度 (依存度) を明らかにすると共に、肺の組織構造の観察、及び、両肺切除個体の表現型解析を行い、肺呼吸の重要性を検討した。

#### (3) 種々の両生類における酸素動態の変遷と進化学的考察

脊椎動物の陸上進出過程において、その途中段階を反映する両生類は教科書的には二心房一心室の心臓を持ち、酸素が豊富な動脈血と酸素に乏しい静脈血を分離できるとされている。しかし、現生の両生類は極めて多様に進化しており、種によっては鰓・皮膚・肺の3つの呼吸様式を用い

ている。この場合、皮膚由来の酸素は体静脈から右心房へ、肺由来の酸素は肺静脈から左心房に戻り、動脈側に配置された鰓に至る。体静脈と肺静脈の酸素濃度の高低は、一方の呼吸器への依存度が高くない限り、状況によって変わり得る為、これを一意に分離する必要がそもそも不明である。即ち、我々哺乳類とは異なり、両性類では動脈血 vs 静脈血の定義や解剖学的区分自体が明確でなく曖昧なのである。そこで本研究ではポルフィリン in vivo PO<sub>2</sub> 計測系 (図2) を3種の両生類 (A: 幼形成熟アホロートル、B: イベリアトゲイモリ、C: アフリカツメガエル) に適用し、動静脈血の酸素分離の実態と変遷を検討し、陸上進出過程における進化的意義を考察した。

#### (4) ラットの母胎循環酸素動態の計測系の構築

先述したように、哺乳類は低酸素下にある胎児期にのみ心再生能を有する為、胎盤を介した母胎循環における酸素動態を理解することは再生医療の観点から極めて重要である。そこで本研究では、ポルフィリン in vivo PO<sub>2</sub> 計測系 (図2) を妊娠ラットに適用し、母体側の子宮動脈と胎児側の臍帯動静脈 PO<sub>2</sub> を同時に計測可能な系の立ち上げに着手した。

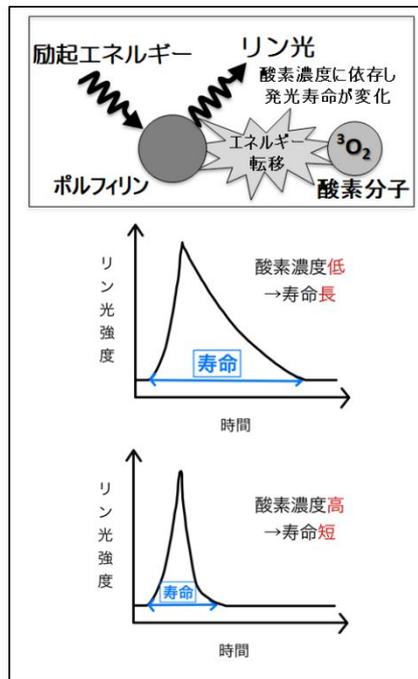


図2 ポルフィリンを用いた in vivo PO<sub>2</sub> 計測系

#### (5) ポルフィリンを用いた PO<sub>2</sub> 計測系の改良

ポルフィリン in vivo PO<sub>2</sub> 計測系 (図2) は随時改良を加えているが、本研究では以下の二つの改良を加えた。

- ステージ電動化と二次元スキャンプログラムの開発により、従来の単一スポット計測だけでなく、単一/複数ポイントでの連続タイムラプス計測、更に、一定領域の二次元スキャンが可能な系を構築した。
- 励起光レーザを連続高速照射することによるスキャンスピードの大幅な向上の実現に向けて光学系の改良に着手した。

### 4. 研究成果

#### (1) Hb 酸素飽和度 (酸素親和曲線) の計測

先述のように二種類の計測装置 (a, b) を試作したが、装置 a については、基盤計測系は完成しており、成体マウス血液の溶血サンプルでの計測が可能であることを確認した。装置 b については、成体・胎児マウス、アホロートル、及びヤツメウナギ由来の血液サンプルで概ね良好な計測データが得られている。酸素親和曲線の計測上の問題点として、計測時間が長くなると Hb の自動酸化により、正確な計測が困難となることが挙げられる。そこで、文献に従ってサンプル中に Hb 還元酵素カクテルを添加することで自動酸化を防ぐ条件を検討中である。総合的には装置 b の方が装置 a に比べて安定したデータを取得できる為、現在、チャンバー内の温度制御、酸素・窒素ガスの混合流量制御、微量溶液の自動攪拌制御などの更なるアップデートを行っており、今後はこれを用いて様々な動物の血液サンプルを計測する予定である。

#### (2) 心再生能を有する両生類アホロートルの酸素環境と各呼吸器の機能解析

幼形成熟型 (水中型) アホロートルの肺組織観察では、個々の肺胞の大きさはヒトより若干大きく、肺胞中隔は 20 倍以上厚く、肺胞密度は疎であり、酸素摂取能力は哺乳類より低いと考えられた。ポルフィリン in vivo PO<sub>2</sub> 計測系による計測では、動脈血酸素分圧 [PaO<sub>2</sub>] は約 25mmHg (哺乳類成体期の約 1/4) であった。これは哺乳類胎児と同等の低酸素環境であり、心再生能との関連が強く示唆された。一方、各呼吸器からの単独酸素投与に対する PO<sub>2</sub> 上昇反応 (酸素摂取活性、観測点: 背側大動脈) については、鰓、皮膚に比べて肺で迅速・強力であったことか

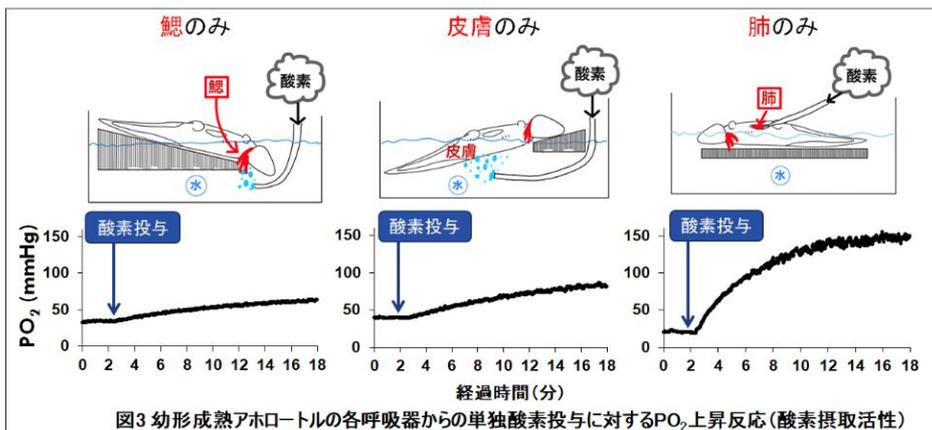


図3 幼形成熟アホロートルの各呼吸器からの単独酸素投与に対する PO<sub>2</sub> 上昇反応 (酸素摂取活性)

ら、水中で生活する幼形成熟型においても肺は鰓や皮膚と比べて十分な呼吸予備能力を持つと考えられた(図3)。一方、両肺を切除した個体の表現型を解析したところ、術後2週までは鰓収縮回数の増加等の異常が見られたが、以後は改善し、6か月経過時点で殆どの個体が生存していた。以上より、幼形成熟型アホロートルは低酸素環境下で生きており、肺呼吸を完全に阻害しても鰓・皮膚の呼吸予備能、及び酸素消費の低減により適応生存が可能であり、この段階での肺への依存度は低いと考えられた。一方、肺は十分な呼吸予備能力を有しており、これは肺依存度が増す変態後の陸上適応の為の準備なのかもしれない。今後は、甲状腺ホルモン投与による陸上型への変遷過程における呼吸系、循環系の変化を検討する予定である。循環系については、ほぼ全ての血液が鰓を通る水中型循環から陸上型循環(体/肺循環の分離、二心房化)への変遷過程を明らかにする。更に、これらの呼吸・循環変化により規定される体内酸素動態を評価し、変態期アホロートルの酸素環境の制御機構を明らかにする。以上より、将来的な哺乳類での低酸素ベースの心筋再生に応用可能な基盤知見を得る。

### (3) 種々の両生類における酸素動態の変遷と進化的考察

先述のように、ポルフィリン in vivo PO<sub>2</sub> 計測系(図2)を3種の両生類(A: 幼形成熟アホロートル、B: イベリアトゲイモリ、C: アフリカツメガエル)に適用し、動静脈血の酸素分離の実態を検討した。Aは鰓・皮膚・肺の3様式を用い、体循環と肺循環を繋ぐ動脈管を

表1 陸上進出過程における酸素動態の変遷と動静脈血分離過程

	呼吸様式			心臓中隔		動脈血圧 (mmHg)	活動性	PO <sub>2</sub> (mmHg)	動静脈血分離
	鰓	皮膚	肺	心房	心室				
魚類	↑	↑				10	低		×
両生類	↓	↑	↑	↑		10~15	↑	20	×
		↑	↑	↑		15~25		40~60	△
		↑	↑	↑		35~45			○
爬虫類			↑	↑	↑	40~80			○
鳥類・哺乳類			↓	↓	↓	100	高	90	◎

有していた。B、Cでは鰓が消失し、更にCでは動脈管も消失し、体循環と肺循環が独立していた。A、Bは不完全な心房中隔を有していた(Cは完全な心房中隔を持つ)。動脈の血圧や酸素分圧はA<B<Cの順に増加し、動静脈血の酸素は、Aでは分離されず、B<Cの順に分離が進んでいた。以上より、陸上進出による重力の影響や活動性の増大に伴って血圧や酸素レベルを増加させる必要が生じ、これを実現する為に肺呼吸への依存と動静脈血の分離が進んだと推測できる(表1)。即ち、Aは祖先形質の魚類の鰓・皮膚呼吸に肺呼吸が新たに加わった初期段階であり、B、Cの順に上記の変化が進み、これが爬虫類・鳥類・哺乳類に受け継がれたと考えられる。

### (4) ラットの母胎循環酸素動態の計測系の構築

子宮から露出した胎児は非常に脆弱であり、低体温、乾燥、出血、血流不全等による死亡リスクが高い。実際、ポルフィリン系を用いて哺乳類胎児PO<sub>2</sub>を正確に計測した報告はない。これらの問題を克服する為、体温維持用の温湯循環システムや計測系に影響しない遠赤外線ヒーターによる保温、乾燥防止用の生理緩衝液や増粘剤の使用等の様々な検討を行ってきた。また、ポルフィリンは胎盤を通過しない為、極細の胎児血管へのポルフィリンの直接注射技術を習得した。依然として、母体呼吸や胎児の体動によるノイズ、血圧の弱い胎児の血流・体温保持や乾燥防止などの課題は残されているが、データは徐々に安定してきており、短時間であるが、臍帯動静脈のPO<sub>2</sub>を計測することに成功した(図4)。更に、母体側のPO<sub>2</sub>を大きく変動させても胎児側PO<sub>2</sub>の変動は相対的に小さいという傾向を認めている。このことは胎盤を介した特殊な母胎環境では、外乱の影響を最小化し(緩衝能)、心筋分裂に必要な低酸素環境を強固に維持するシステムが存在することを示唆している。今後は、上記の技術的課題を克服し、長時間の安定した計測が可能なシステムの構築を目指す。

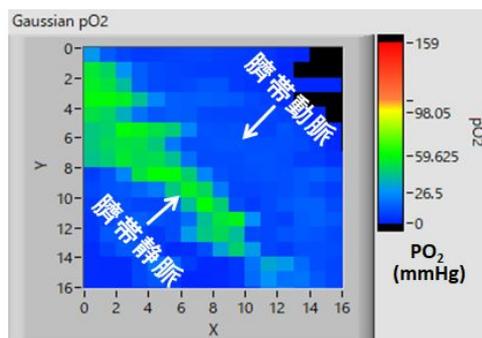


図4 ラット胎児臍帯動静脈のPO<sub>2</sub>マッピング

図4) 更に、母体側のPO<sub>2</sub>を大きく変動させても胎児側PO<sub>2</sub>の変動は相対的に小さいという傾向を認めている。このことは胎盤を介した特殊な母胎環境では、外乱の影響を最小化し(緩衝能)、心筋分裂に必要な低酸素環境を強固に維持するシステムが存在することを示唆している。今後は、上記の技術的課題を克服し、長時間の安定した計測が可能なシステムの構築を目指す。

### (5) ポルフィリンを用いたPO<sub>2</sub>計測系の改良

先述のように二つの改良(a, b)を行った。改良aについては、電動ステージの導入とスキャンプログラムの開発を行い、想定通り、単一/複数ポイントでの連続タイムラプス計測、更に、一定領域の二次元スキャンが可能となった。改良bについては、必要な光学機器の選定に着手したばかりであるが、予備検討においては5倍程度のスキャンスピードの向上が見込まれている。これにより、麻酔下動物の実験に要する時間が短縮され、より信頼性の高いデータが得られることが期待できる。

以上のように、本研究では、極めて複雑な酸素動態において、1) Hbの酸素飽和度、及び、2) 酸

素分圧 ( $PO_2$ ) に着目し、これらの計測系を構築・改良して種々の動物に適用することで、酸素動態の理解に貢献してきた。現在、本研究を含めて殆どの研究ではこれらの二つの要素を独立に計測しているが、現在のポルフィリン *in vivo*  $PO_2$  計測系に光学系を 1 本増設し、570nm 吸光度の測定系を追加することで、理論的には両者の *in vivo* 同時計測が可能であり、将来的には挑戦したいと考えている。これが完成すれば、実際の *in vivo* 生体内環境の各部位において血液から組織への酸素供給動態をリアルタイムで見積もることが可能となり、低酸素ベースの心筋再生の実現に大いに貢献することが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hashimoto K, Kodama A, Ohira M, Kimoto M, Nakagawa R, Usui Y, Ujihara Y, Hanashima A, Mohri S	4. 巻 25(5)
2. 論文標題 Postnatal expression of cell cycle promoter Fam64a causes heart dysfunction by inhibiting cardiomyocyte differentiation through repression of Klf15	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.104337.	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 橋本 謙, 臼居 優, 花島 章, 氏原嘉洋, 塚田孝祐, 毛利 聡	4. 巻 48(10)
2. 論文標題 酸素環境と心臓再生 (Oxygen environment and cardiac regeneration)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 30(494)-33(497)
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 Usui Y, Hanashima A, Hashimoto K, Kimoto M, Ohira M, Mohri S.	4. 巻 12(8)
2. 論文標題 Comparative analysis of ventricular stiffness across species.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Physiol Rep	6. 最初と最後の頁 e16013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.16013	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 -

〔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 橋本 謙
2. 発表標題 心筋細胞分裂促進因子Fam64aの長期強制発現は Klf15の抑制により心不全を誘発する
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 Ken Hashimoto
2. 発表標題 Evolutionary significance of low oxygen environments in utero: Implications for heart regeneration.
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本 謙
2. 発表標題 コネクチンnovex-3は胎児心筋細胞の核を軟らかくすることで分裂を促進する
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医大・生理学1オリジナルホームページ <a href="https://physiology1kawasaki.wixsite.com/website-2">https://physiology1kawasaki.wixsite.com/website-2</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
研究分担者	毛利 聡  (Mohri Satoshi)  (00294413)	川崎医科大学・医学部・教授    (35303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	塚田 孝祐 (Tsukada Kosuke)  (00351883)	慶應義塾大学・理工学部（矢上）・教授  (32612)	
研究分担者	臼居 優 (Usui Yuu)  (10868615)	川崎医科大学・医学部・助教  (35303)	
研究分担者	花島 章 (Hanashima Akira)  (70572981)	川崎医科大学・医学部・講師  (35303)	

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