

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22500365

研究課題名（和文） 胎生期における心拍動開始機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of mechanisms of heartbeat initiation in embryonic stage

研究代表者

當瀬 規嗣（TOHSE NORITSUGU）

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：80192657

研究成果の概要（和文）：ラット胎仔の心拍動開始時期に、心臓原基から得た心筋細胞でカルシウムチャンネル電流を観察した。この電流はペースメーカー電位の範囲で活性化するので、自動能を形成すると思われた。さらに心拍動開始前後に、該当チャンネルの遺伝子の発現が増大し、タンパク分子の生成が確認されたことから、このカルシウムチャンネル（Cav1.3）が心拍動開始の決定権を握っていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In early embryonic stage, rat heart primordium begins the heartbeat. In cardiomyocytes from the early primordium, calcium current was observed. The calcium current was activated in pacemaker potential, and may be related to automaticity of heart. During this embryonic stage, gene expression and construction of protein molecule for the calcium channel (Cav 1.3) were observed. The Cav 1.3 channels may be determinant for initiation of heart beat.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：心臓・自動能・発生分化・カルシウムチャンネル・興奮収縮連関

1. 研究開始当初の背景

「心臓はいつ・どのように動き出すのか？」。この疑問に対する過去の研究としては「心臓原基の一部分から収縮が始まり、成長と共にその範囲を拡大する」と報告している。しかし、心臓が動き出す“瞬間”を捉えている報告は過去には無かった。我々は心臓が動き出す“瞬間”を捉える為に、心拍動開始前のラット胎仔を顕微鏡下で“継続的”観

察を行った。胎生 10.00～10.15 日目の間に、心臓原基の一部分から収縮が始まり、そして時間と共に収縮範囲が拡大していくことが判明した。（Kobayashi et al. J Physiol Sci 2011; 61:141-149）

「活動電位も心臓原基の一部分から始まり、成長と共にその範囲を拡大する」と報告しており、おそらくカルシウムトランジェントも活動電位と同様に心臓原基の一部分で

始まり、その範囲は成長と共に拡大して行くことが推測された。その検証のため我々は、“カルシウムトランジェント”をFluo3-AMの蛍光にて、“収縮”を可視光にて同時に観察を行ったところ、胎生 10.00~10.15 日目の心臓原基においては、まずカルシウムトランジェントが心臓原基全体で観察され、その後しばらく経過した後、収縮が心臓原基の一部から始まり、そして時間と共に収縮範囲が拡大していくという知見を得た。

心拍動開始時のメカニズムを我々は次のように考えた。

(1) 自動能獲得前期：心臓原基全体は電気的合胞体になっている。また、ライアノジンレセプター(RyR)等の筋小胞体膜上に存在するカルシウム関連蛋白も十分量発現している。しかし、ペースメーカー細胞に自動能が無い。

(2) 自動能獲得期：ペースメーカー細胞が自動能を獲得。これが心臓原基全体に興奮が伝播し、カルシウムトランジェントが生じる。しかし、収縮関連蛋白の発現量不足等のため、収縮が起らない。

(3) 収縮開始期：収縮関連蛋白の発現量増大に伴う収縮の発生。ただし、収縮関連蛋白の成長に伴う発現量増大は細胞によって差があるため、初期の収縮は心臓原基の一部でしか生じない。

(4) 収縮範囲拡大期：収縮関連蛋白の発現量が増大するに従い収縮範囲は拡大し、最終的には心臓原基全体が収縮する。

上記心拍動開始機序仮説の中核となる事象は、ペースメーカー細胞の自動能獲得による“興奮の開始”、および、収縮関連蛋白の発現量増大による“収縮の開始”である。

2. 研究の目的

ペースメーカー細胞の活動電位を構成するイオンチャンネルは電位依存性カルシウムチャンネル、遷延性内向きナトリウムチャンネル、遅延整流外向きカリウムチャンネル、である。自動能獲得時にはこれらの電流量が同時に増大するよりも、どれかひとつのチャンネル(キーチャンネル)が増大することにより、ペースメーカー細胞で活動電位が生じ始めるのではないかと想定される。そのため本研究では、興奮の開始のしくみを明らかにするために、自動能獲得前後のペースメーカー細胞を単離しパッチクランプ法にて電流量の変化を測定することで“キーチャンネル”を特定する。そして、特定した“キーチャンネル”が自動能獲得時期の決定因子であることを確認するため、キーチャンネルの物質的特性を分子生物学的分析により解明する。

3. 研究の方法

(1) ラット胎仔の調整

ウィスター種のラット()を時差照明下で2週間飼育して昼夜逆転させ、交配を行った。その後、妊娠9日から18日目の母ラットから摘出した胎仔、または出生後三日目の新生児心室筋において発現解析を行った。

(2) 自動能獲得前後でのパッチクランプ法による“キー電流”の特定

自動能獲得前後の心筋細胞での膜電流の変化について検討している報告は過去にはない。また、我々がこれまで行ってきたカルシウムトランジェントの検討から、胎生 10.00~10.15 日目の心臓原基の左端がペースメーカー領域で、そこより興奮が発生し順次非ペースメーカー細胞に伝搬している。そこで、ペースメーカー領域より心筋細胞をコラゲナーゼ処理により単離し、パッチクランプ法によりペースメーカー細胞に初めての活動電位をもたらす“キー電流”の特定をおこなう。

(3) ホールマウント *in situ* ハイブリッド法による心臓原基におけるキーチャンネル発現の観察

摘出したラット胎仔全体を固定し、In Situ チップ(アロカ)を用いて Whole-mount *in situ* hybridization を行った。

RNA プロブ:Cav1.3, Cav3.1, HCN1, HCN4, KvLQT1, MinK, ERG1, NCX1, Actc1, Tnnc1 の cDNA クローンから任意のプライマーを用いて作製し、抗ジコキシゲニン抗体を用いて酵素抗体法で検出した。

(4) 定量的 PCR 法によるキーチャンネルの発現量の経時的変化の解明

Cav1.2, Cavb2, Cav1.3, Cav3.1, Cav3.2, NCX1, ERG1, MiRP1, Actc1, Tpm1, Tnnc1, TnTemb (胎児型のみ), TnTall (胎児型・成体型両方含む), TnI, MHC6, MHC7, MLC2, GAPDH の mRNA 発現解析

(5) 収縮開始前後での微量ウエスタンブロット法による“キー収縮関連蛋白”の特定

胎生 10.00~10.15 日目の心臓原基は小さいため従来のウエスタンブロット法では発現量の僅かな差異を検出することは困難であった。しかし、最近微量の試料でも検出可能なウエスタンブロット法が開発された。この方法を用いて、収縮開始前後の心臓原基における収縮関連蛋白の発現量の変化を測定した。

4. 研究成果

(1) 自動能獲得時期でのカルシウムチャネル電流の測定

自動能開始時期の心臓原基より取り出し単離した細胞にパッチクランプ法を適用し、膜電流を観察した。検討した14個の細胞の内、5個では大きなナトリウム電流が観察された。一方、9個では小さな内向き電流が観察され、成体でみられるカルシウム電流に酷似していた。自動能に関与するのはカルシウム電流と思われるので、この小さな内向き電流を詳細に検討した。

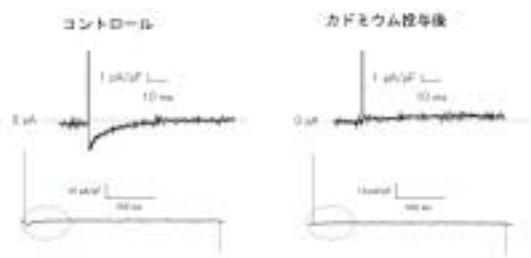


図1 心拍動開始時期にみられたカルシウム電流

図1に示すように、 -50 mV から -10 mV へ脱分極パルスを与えたときに観察される小さな内向き電流は、カルシウムチャネルの遮断作用をもつカドミウム 0.2 mM の投与により消失し、カルシウムチャネル電流であることが確認された。

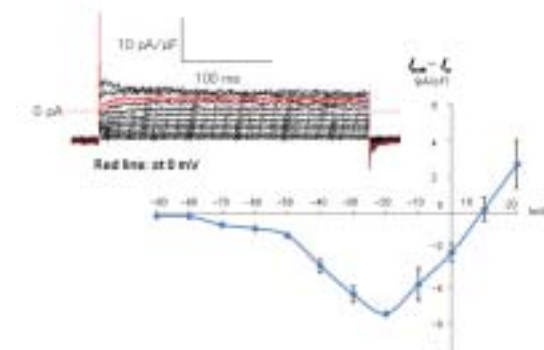


図2 観察されカルシウム電流の電流-電圧特性

図2では観察されたカルシウム電流の電流-電圧特性を示す。 -70 から -50 mV のペースメーカー電位が生じる範囲で、このカルシウム電流が流れることが確認され、心拍動開始にこのカルシウムチャネルが関わっている可能性が明らかになった。また、この電流-電圧特性は、このカルシウムチャネルがCav1.3チャネルであることを強く示唆する。

(2) ホールマウント *in situ* ハイブリ

ッド法とRT-PCR法による心臓原基におけるキーチャネルとしてのCav1.3の発現

観察されたカルシウムチャネルが心拍動開始のキー電流であるかどうかを検討するため、心拍動開始時期の胎仔全体に *in situ* ハイブリッド法を適用して観察すると、心臓発生領域に限局して、拍動開始前後でカルシウムチャネルの一種であるCav1.3チャネルの遺伝子発現が起こっていることが分かった。

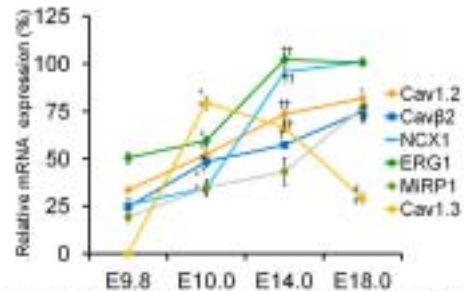


図3 ラット胎仔の心臓発生領域(E9.8, E10.0)、心室筋(E14.0, E18.0)における、Ca_v1.2, Ca_vβ2, NCX1, ERG1, MIRP1, Ca_v1.3のmRNA発現量の変化。

そこで、定量的PCR法を用いて、心臓原基での各種イオンチャネル遺伝子発現の時間経過を検討したところ、図3に示すように、心拍動が開始される胎生9.8日から胎生10.0日にかけて、Cav1.3チャネルの遺伝子のみが急激に増大していることが分かった。このことから、心拍動開始のキーチャネルはCav1.3チャネルである可能性が大きくなった。

(3) 微量ウエスタンブロット法による心拍動開始時期の心臓原基に存在するCav1.3チャネルタンパク

心拍動開始のキーチャネルがCav1.3チャネルである可能性が高まったので、当該チャネルがタンパク分子として存在しているかどうかを微量ウエスタンブロット法にて検討した。

ミリポア社のCav1.3チャネルのサブユニット(1D)に結合する抗体を1次抗体として用いて、プロットングを行った。結果を図4に示す。Cav1.3はラットの脳に豊富に存在することが分かっているのでポジティブコントロールとして用いた(右から4~2のレーン)。結果によりこの抗体は有効であることが分かった。一方、ラットの成体の心臓にもCav1.3チャネルが存在するので、その結果を右から6番目のレーン(Wister LV)に示した。Cav1.3チャネルのスポットは、脳よりやや軽い位置にみられた。これはすでにCav1.2で報告があるように、心筋細胞内で1DがC末端側を切

り取られたことによるものと考えられた。そして、左から3番目のレーンには、成体の心臓と同じようなスポットが確認でき、心拍動開始直後である胎生11日の心臓原基にCav1.3チャンネルのサブユニット(C1D)が存在していることが示された。

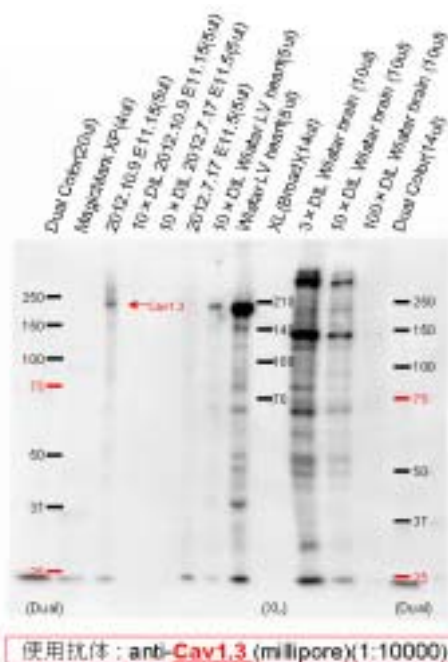


図4 心臓拍動開始直後のCav1.3チャンネル

以上の研究結果により、心拍動開始の決定権を握るキーチャンネルはCav1.3チャンネルであり、このチャンネルが発現すると、心筋細胞でペースメーカー電位が生じて自動能が発現すると考えられた。今後は、Cav1.3チャンネルのタンパク分子の量的な解析や発現制御実験などを予定しており、キーチャンネルとしてのCav1.3チャンネルの発現機序の詳しい解析を行う予定である。

なお、当初予定されていた膜電位感受性色素による検討は、色素のレスポンスタイムや震源期への導入の困難さから、研究の進行を見合わせた。ただし、キーチャンネル発見の研究が進行したので、現状としては、すでに本実験の必要性がなくなったと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

Sato T, Ichise N, Kobayashi T, Maeda S, Tohse N. Characteristics of voltage dependent inward current in the rat embryonic heart early after the initiation

of heart beat. J Physiol Sci 63:S230, 2013 (査読無)

Kobayashi T, Maeda S, Ichise N, Sato T, Miyakawa T, Yamada Y, Tohse N. High sensitivity western blotting method revealed the developmental changes in the contractile proteins of rat embryonic hearts. J Physiol Sci 63:S122, 2013 (査読無)

Maeda S, Kobayashi T, Tohse N. Developmental expression of sarcomeric-related proteins in the period of heart-beat initiation in early rat embryo. J Physiol Sci 62:S165, 2012 (査読無)

Kobayashi T, Maeda S, Ichise N, Sato T, Iwase T, Seki S, Yamada Y, Tohse N. The beginning of the calcium transient in rat embryonic heart. J Physiol Sci 61:141-149, 2011 (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

佐藤達也 心拍開始後の胎生心における電位依存性内向き電流の特徴 第90回日本生理学会、2013年3月28日 東京

小林武志 高感度ウエスタンブロット法を用いたラット胎仔の収縮関連タンパクの成長に伴う変化の検討 第90回日本生理学会大会、2013年3月27日 東京

前田佐知子 発生期心拍開始におけるサルコメア構成蛋白の発現 第89回日本生理学会大会 2012年3月30日 松本

前田佐知子 ラット初期胚の心拍動開始におけるサルコメア構成蛋白の発現 第85回日本薬理学会 2012年3月14日

前田佐知子 L-type Calcium channel Cav1.3 and sarcomeric-related proteins are initially expressed in the period of heartbeat initiation in the early rat embryo. 第88回日本生理学会大会 2011年3月 横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

當瀬 規嗣 (TOHSE NORITSUGU)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80192657

(2)研究分担者

小林 武志 (KOBAYASHI TAKESHI)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：80363688

前田 佐知子 (MAEDA SACHIKO)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：80343391

一瀬 信敏 (ICHISE NOBUTOSHI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：60448610