

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19934

研究課題名（和文）冬眠中の心筋細胞のT管膜維持機構の解明による革新的心不予防法の創出

研究課題名（英文）Study on the T-tubule System in Hibernating Mammals (Hamsters) for the Development of Innovative Heart Failure Prevention Methods

研究代表者

氏原 嘉洋 (Ujihara, Yoshihiro)

名古屋工業大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80610021

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）：心筋細胞のT管膜の崩壊は、心不全発症に直結する。非冬眠哺乳類のT管膜は生理条件下よりも低い力学負荷環境下で崩壊することが知られている一方、冬眠哺乳類の冬眠時には低力学負荷環境下でもT管膜が維持されているとの報告がある。本研究では、ハムスターに冬眠を誘導し、1か月冬眠させてもT管膜が維持されることを確認した。冬眠哺乳類のハムスターと非冬眠哺乳類のラットについて、非冬眠時のT管膜の構造、低浸透圧負荷および低力学負荷環境でのT管膜の崩壊度を比較したところ、両者のT管膜に大きな違いは見られなかった。以上のことから、冬眠哺乳類には、冬眠時にのみ発揮されるT管膜維持機構が存在す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

心不全の患者数は増加の一途を辿っており、その対策は急務です。心筋細胞のT管膜の崩壊は心不全の発症を引き起こしますが、T管膜を維持する効果的な方法は不明です。本研究では、我々のような非冬眠哺乳類ではT管膜が崩壊する状況にもかかわらず、冬眠中にT管膜を維持可能な冬眠哺乳類に注目しました。冬眠哺乳類のハムスターと非冬眠哺乳類のラットのT管膜を比較したところ、非冬眠時に両者に大きな違いは見られませんでした。したがって、冬眠哺乳類には冬眠時にのみT管膜を維持する仕組みがある可能性が示唆されました。冬眠中のT管膜を維持する仕組みを解明することで、心不全の抜本的な予防・治療対策につながることを期待されます。

研究成果の概要（英文）：The disorganization of T-tubules in cardiomyocytes is directly linked to heart failure. While it is known that T-tubules in non-hibernating mammals undergo disorganization under mechanical unloading conditions lower than physiological levels, it has been reported that T-tubules are maintained during hibernation even under such conditions. In this study, we induced hibernation in hamsters and confirmed that T-tubules were maintained even after one month of hibernation. Furthermore, we compared the structure of T-tubules, the degree of T-tubule disorganization under low osmotic load, and the degree of T-tubule disorganization under mechanical load conditions lower than physiological levels between non-hibernating hamsters and rats (the latter lacking the ability to hibernate). We found no significant differences in T-tubules between the two species. These results suggest that hibernating mammals may possess a mechanism to maintain the T-tubule membrane specifically during hibernation.

研究分野：比較バイオメカニクス

キーワード：冬眠 ハムスター 心筋細胞 T管膜 ラット 低力学負荷環境 心不全

1. 研究開始当初の背景

心臓は、全身に酸素と栄養を供給する血液ポンプである。心不全は、心臓のポンプ機能が低下し、全身に必要な血液を十分に送り出せなくなる病態である。心不全の患者数は増加の一途を辿っており、その予防や治療法の確立は急務である。

哺乳類の心筋細胞には、形質膜が細胞の長軸方向(収縮方向)に対して直角に陥入した管状の膜構造(横行小管, T管膜)が発達している。T管膜は、収縮装置であるサルコメアの間隔に沿うように、細胞内 Ca^{2+} ストアである筋小胞体と共に規則正しく配置されている。T管膜には、電位依存性 Ca^{2+} チャネル(LTCC)や細胞外への Ca^{2+} 排出系である Na^+/Ca^{2+} 交換体(NCX)が局在している。T管膜と筋小胞体の近接によって、膜電位の変化が筋小胞体からの Ca^{2+} 放出へと効率的に変換され、細胞内に一様な Ca^{2+} 濃度上昇を実現する。この均一な Ca^{2+} 上昇により、細胞内のサルコメアの収縮が同調して起こることで、細胞全体として高い収縮能力を発揮することが可能となる。正常な心臓の心筋細胞のT管膜は、細胞の端から端まで美しく並び、この特徴は収縮能力と高い相関がある。心臓のポンプ機能が著しく低下した重篤な心不全では、共通してT管膜が崩壊しているが、近年の研究成果により、T管膜の崩壊は心不全の結果ではなく、心不全発症の引き金になることが明らかになりつつある¹⁾。

高血圧などの過大な力学負荷によってT管膜が崩壊することが知られていたが、生理条件下よりも力学負荷が減弱した場合(低力学負荷環境)でも、T管膜は崩壊する²⁾。また、心筋細胞のメカノセンサーを欠損すると、正常な力学負荷環境下でもT管膜が崩壊する³⁾。これらのことから、T管膜の維持には、正常範囲の力学負荷が作用すること、および力学負荷に対する応答機構が必須であると考えられる。

一部の哺乳類は、意図的に体温・代謝を低下させ、エネルギー消費を最小限にする冬眠を行う。非冬眠時に活発に拍動する心臓は、冬眠時には血圧も心拍数も著しく低下し、低力学負荷状態に移行する⁴⁾。マウスやラットなどの非冬眠哺乳類で得られた知見に基づけば、冬眠中にT管膜は崩壊すると考えられる。しかし驚くべきことに、冬眠を終えると心臓は直ちに正常な拍動に戻る⁵⁾。このことは、冬眠哺乳類には独自のT管膜維持機構、あるいは回復機構が存在することを強く示唆している。

2. 研究の目的

そこで本研究では、冬眠哺乳類が冬眠中の低力学負荷環境においても心筋細胞のT管膜を維持する仕組み、あるいは冬眠後に崩壊したT管膜を回復させる仕組みの解明を目指し、冬眠哺乳類の心筋細胞に関する基礎的な知見を得ることを目的とする。T管膜の維持あるいは回復による革新的な心不全対策の創出に貢献する知見の提供を目指す。

3. 研究の方法

3.1 実験動物

冬眠哺乳類のモデルとして、季節に関係なく人工的に冬眠を誘導可能なハムスターを用いた。比較対象の非冬眠哺乳類のモデルとして、ラットを用いた。ハムスターを非冬眠時の実験に用いる場合は、ラットと同じ通常飼育用の餌を与えて飼育した。実験は、名古屋工業大学の動物実験委員会の許可の下、実施した。

3.2 ハムスターの人工冬眠の誘導

先行研究⁶⁾を参考にして、ハムスターの冬眠を誘導した。はじめに、ハムスターを環境気温 24-25°C、一日当たりの日照時間 16 時間、消灯時間 8 時間の条件で、体重が 110 g 前後になるまで飼育した。その後、冬眠を誘導するために冷凍・照明機能付きインキュベーター内にハムスターを移動させ、環境気温 5°C、一日当たりの日照時間 8 時間、消灯時間 16 時間の冬期を模擬した条件で飼育した。その際、餌は冬眠誘導用の脂質の高い餌を用いた。

3.3 心筋細胞の単離

T管膜構造の詳細な解析には、単離した心筋細胞を用いた。ラットの心筋細胞の単離法⁷⁾をハムスターにも適用した。まず、摘出した心臓の大動脈に逆行性にカニューレーションを行い、Cell Isolation Buffer で血液を洗い流した。その後、コラゲナーゼ、トリプシン、プロテアーゼを含む酵素液を用いて心筋細胞を単離した。

3.4 低浸透圧負荷によるT管膜の崩壊度の比較

細胞内よりも低浸透圧の溶液に曝されると、細胞は膨張し、細胞膜には伸展負荷が作用する。本研究では、単離した心筋細胞を低浸透圧溶液中に入れたときのT管膜を解析し、崩壊度を比較した。

3.5 静置培養による低力学負荷環境でのT管膜崩壊度の比較

Medium199 に 10%Fetal bovine serum と 1%Penicilin-Streptomysin と なるように加えた溶液を培養液として使用した。37°C, 5%CO²-95%air 環境下で単離心筋細胞を 24 時間インキュベートし、拍動や血圧の作用しない低力学負荷環境での T 管膜の崩壊度を比較した。

3. 6 T 管膜の観察・解析方法

単離心筋細胞の T 管膜の可視化には FM4-64 を、心筋スライスサンプルの T 管膜の可視化には蛍光標識した小麦胚芽凝集素を使用した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて取得した画像を用いて、細胞内の T 管膜の面積割合の算出や高速フーリエ変換を用いた周波数解析により、T 管膜を解析した。核内には T 管膜は存在しないため、Hoechst を用いて核を可視化し、核の領域は解析対象外とした。

4. 研究成果

まず、冬眠中の心筋細胞において、T 管膜が維持されているのかどうかを明らかにするため、ハムスターを冬眠誘導した。環境気温 5°C、一日当たりの日照時間 8 時間、消灯時間 16 時間の冬期を模擬した条件において、3 か月程度で冬眠するものが現れた。デジタル聴診器を用いて心拍数が劇的に低下しているのを確認し、その後さらに 1 か月ほど冬眠させて低力学負荷環境を維持した。小麦胚芽凝集素を用いて心臓の薄切りスライスの細胞膜を可視化した。その結果、細胞の長軸方向に直交する方向に周期的な膜構造、すなわち T 管膜が存在していた。1 か月に及ぶ長期間の低力学負荷環境下においても、T 管膜の顕著な崩壊は起こらず、冬眠中は T 管膜が維持されることがわかった。これまでの報告⁵⁾では、冬眠期間が短期間である場合や、電子顕微鏡による局所範囲での T 管膜の観察に限られていたが、本研究により冬眠時に T 管膜が維持されることがわかった。

ハムスターのような冬眠哺乳類の心筋細胞について、T 管膜に関する知見は冬眠時だけではなく非冬眠時においてもほとんどない。そのため、低力学負荷環境に耐えうる冬眠哺乳類の T 管膜構造は、冬眠前から非冬眠動物と異なるのか、それとも冬眠時にのみ発揮される独自の維持機構を備えるのか不明であった。そこで、ハムスターの非冬眠時における T 管膜の構造は、非冬眠哺乳類ラットと異なるのか検証した。まず、通常飼育した非冬眠時のハムスターとラットの心臓から心筋細胞を単離した。心筋細胞の膜を FM4-64 で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。取得した画像を周波数解析し、T 管膜の周期性を定量化したところ、両動物間の T 管膜の周期性や存在する間隔に大きな違いはみられなかった。

次に、非冬眠時における冬眠哺乳類と非冬眠哺乳類の T 管膜の壊れにくさ(頑丈さ)の違いを明らかにするために、単離した心筋細胞を低浸透圧環境下に置くことで細胞膜に瞬間的な伸展負荷を与え、T 管膜の破壊を試みた。破壊後に FM4-64 で T 管膜を染色して解析した結果、ハムスターとラットの T 管膜の崩壊度に顕著な差は認められなかった。したがって、非冬眠時において、冬眠哺乳類と非冬眠哺乳類の T 管膜には、構造的・力学的に大きな差異はないことが示唆された。以上より、冬眠哺乳類の心筋細胞の T 管膜は、非冬眠時から壊れにくい頑丈な特性を有するわけではないことが示唆された。

最後に、低力学負荷耐性が冬眠時にのみ発揮されるのか、それとも冬眠前からハムスターは低力学負荷耐性を持つのかを明らかにすることを試みた。生理条件下において、心筋細胞には拍動や血圧などの力学負荷が絶えず作用しているため、単離した心筋細胞を静置培養することで、拍動や血圧などの力学負荷のない低力学負荷環境を模擬した。その結果、非冬眠時のハムスターの心筋細胞の T 管膜は顕著に崩壊しており、ラットよりも低力学負荷環境に強いという結果は得られなかった。したがって、低力学負荷耐性に関しても、冬眠時にのみ発揮される可能性が示唆された。

一連の結果を踏まえると、冬眠哺乳類には冬眠時にのみ発揮される T 管膜の維持機構が存在する可能性が高いことがわかった。一方で、非冬眠時におけるハムスターの低温耐性を調べた研究では、通常飼育用の餌を摂取した場合には低温耐性を示さないが、冬眠誘導用の餌を摂取した場合には低温耐性を示すと報告されている⁸⁾。本研究では、非冬眠時のハムスターには通常飼育用の餌を与えており、その影響が結果に反映されている可能性がある。今後検証を進める必要はあるものの、本研究で得られた成果を基にして、T 管膜の維持機構の解明を進めることで、将来的には T 管膜崩壊の予防による心不全対策の開発につながることを期待される。

引用文献

- 1) Wei S, Guo A, Chen B, et al., *Circ Res.* 2010;107:520–31.
- 2) Ibrahim M, Al Masri A, Navaratnarajah M, et al., *FASEB J.* 2010;24(9):3321–3329.
- 3) Katanosaka Y, Iwasaki K, Ujihara Y, et al., *Nat Commun.* 2014;5:3932.
- 4) Horwitz BA, Chau SM, Hamilton JS, et al., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013;305:759–768.
- 5) Yang L, Li RC, Xiang B, et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2021;118.
- 6) Chayama Y, Ando L, Sato Y, et al., *Front Physiol.* 2019;9:1973.
- 7) Ogura Y, Ito H, Sugita S, et al., *Processes.* 2022;10(3):508.
- 8) Anegawa D, Sugiura Y, Matsuoka Y, et al., *Commun Biol.* 2021;4(1):796.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 1件）

1. 著者名 氏原 嘉洋, 寺島 丈孝	4. 巻 55
2. 論文標題 冬眠中の低温・低力学負荷環境における心筋細胞のT管膜構造の維持	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 67-69
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 氏原 嘉洋, 寺島 丈孝	4. 巻 8
2. 論文標題 冬眠中の低温・低力学負荷環境における心筋細胞のT管膜構造の維持	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 アグリバイオ (月刊「細胞」, 55(14), 67-69 掲載記事の転載)	6. 最初と最後の頁 80-83
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 Takei Gen L., Ogura Yuhei, Ujihara Yoshihiro, Toyama Fubito, Hayashi Keitaro, Fujita Tomoe	4. 巻 24
2. 論文標題 Hamster Sperm Possess Functional Na ⁺ /Ca ²⁺ -Exchanger 1: Its Implication in Hyperactivation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8905 ~ 8905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24108905	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永井 陽大, 杉田 修啓, 中村 匡徳, 氏原 嘉洋
2. 発表標題 冬眠哺乳類の心筋細胞は非冬眠時から低温耐性を持つのか? ~ラットとハムスターの単離心筋細胞における低温時のT管膜崩壊度の比較~
3. 学会等名 日本機械学会 第36回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 永井 陽大, 寺島 丈壱, 杉田 修啓, 中村 匡徳, 氏原 嘉洋
2. 発表標題 冬眠哺乳類のT管膜維持機構の解明に向けたハムスターとラットの単離心筋細胞の低温時におけるT管膜構造崩壊度の比較
3. 学会等名 日本機械学会東海支部第55回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 寺島 丈壱, 杉田 修啓, 中村 匡徳, 氏原 嘉洋
2. 発表標題 冬眠時のT管膜非崩壊現象の解明に向けた非冬眠時ハムスターの単離心筋細胞の膜構造解析
3. 学会等名 第62回生体医工学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Dong Yubing, 氏原 嘉洋, Chen Yanzhu, 片野坂 公明, 成瀬 恵治, 片野坂 友紀
2. 発表標題 心臓の構造的・機能的成熟におけるTRPV2の役割
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 竹井 元, 小椋 悠平, 氏原 嘉洋, 外山 史, 林 啓太郎, 藤田 朋恵
2. 発表標題 NCX1がハムスター精子の超活性化運動を制御する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会 / 第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋工業大学 医用生体工学研究室
<http://biomech.web.nitech.ac.jp/>

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)	
研究分担者	竹井 元 (Takei Gen) (00708183)	獨協医科大学・医学部・講師 (32203)	
研究分担者	中村 匡徳 (Nakamura Masanori) (20448046)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (13903)	
研究分担者	杉田 修啓 (Sugita Shukei) (20532104)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (13903)	
研究分担者	西辻 光希 (Nishitsuji Koki) (60770823)	福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授 (23401)	

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	花島 章 (Hanashima Akira) (70572981)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	
研究分担者	伊藤 愛 (Ito Megumi) (00963464)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・助教 (13903)	

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