

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659131

研究課題名(和文) TRIC-A欠損によるイソプレナリン誘発性心筋線維化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Isoprenaline-induced cardiac fibrosis in Tric-a-knockout mice

研究代表者

山崎 大樹 (Yamazaki, Daiju)

京都大学・生理化学ユニット・講師

研究者番号：40467428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：興奮性組織に豊富に発現するTRIC-Aを欠損したTric-a欠損マウスにおいて アドレナリン受容体刺激薬であるイソプロテレノールの持続刺激は顕著な心臓線維化を引き起こした。本研究ではその発症機序の解明を目指し、心筋細胞死に着目した。心筋梗塞の際に検出される血清トロポニンT濃度の上昇及びネクローシスを意味するエバンスブルー色素の膜透過性上昇がTric-a欠損心筋において観察され、電子顕微鏡観察の結果からこれはミトコンドリアの変性によるものと判明した。従って、イソプロテレノール誘発性心臓線維化は少なくとも顕著な心筋細胞死が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：TRIC-A is abundantly expressed in excitable tissues. Cardiac fibrosis was significantly induced by chronic beta-adrenergic receptor stimulation (Isoproterenol, Iso) in Tric-a-knockout mice. In this study, to investigate the underlying mechanisms, we focused on cardiomyocyte death. Elevated serum troponin T level and increased membrane permeability of Evans blue dye which means cardiomyocyte necrosis is induced by isoproterenol stimulation were detected in Tric-a-knockout mice. Moreover mitochondrial dysfunction was observed in Iso-stimulated Tric-a-knockout heart under electron microscopic examination. Thus, it is suggested that remarkable cardiomyocyte necrosis is at least in part related to Iso-induced cardiac fibrosis in Tric-a-knockout mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：TRICチャンネル 心臓線維化 イソプロテレノール 心筋細胞死 ネクローシス

1. 研究開始当初の背景

心不全とは、心臓のポンプ機能が低下することで体組織の代謝に見合う十分な血液を供給できない状態である。心臓のポンプ機能低下の一因として心筋の線維化が挙げられるが、これは心肥大や心筋梗塞、虚血・再灌流の際にも観察される。従って、心臓線維化メカニズムを明らかにすることは様々な心疾患に対して効果的な予防・治療法の確立へと繋がる可能性を秘めている。

申請者のグループは、小胞体からの Ca^{2+} 放出に同調して機能するカウンターイオンチャネル TRIC (trimeric intracellular cation) チャネルを数年前に同定した。TRIC には A と B の 2 つのサブタイプが存在し、TRIC-A は脳や心臓、骨格筋などの興奮性組織に高発現する一方で、TRIC-B は普遍的な組織分布を示す。これまで、遺伝子欠損マウスを用いた機能解析を精力的に行っており、TRIC 両サブタイプ完全欠損マウスにおける胎生致死 (Yazawa et al., *Nature*, 2007)、TRIC-B 欠損マウスにおける肺胞形成不全による新生致死 (Yamazaki et al., *Development*, 2009)、TRIC-A 欠損マウス骨格筋及び平滑筋における収縮異常 (Zhao et al., *J Biol Chem*, 2010; Yamazaki et al., *Cell Metab*, 2011) を明らかにしてきた。最近、申請者は TRIC-A が豊富に発現する心臓に着目し、イソプロテレノール (ISO) を 2 週間持続負荷した際に TRIC-A 欠損マウス心筋において顕著な線維化が生じることを見出した (未発表データ)。心筋細胞に対するイソプロテレノールの作用には、肥大と心筋細胞死の 2 つがあり、線維化はアポトーシス・ネクローシスによる心筋細胞脱落后、周囲の線維芽細胞が増殖することによるものと推定されるが、詳細なメカニズムは不明である。さらには TRIC-A 欠損による線維化の増悪が心不全などの心疾患と密接に関係するかどうか不明である。

2. 研究の目的

心臓の線維化は心肥大や心不全などの病態時に観察される現象であり、心筋細胞死、線維芽細胞機能の亢進あるいはマクロファージ・サイトカインの関与の可能性が考えられる。分裂能を有さない心筋細胞においてアポトーシス・ネクローシスによる脱落は、心筋のポンプ機能低下へと繋がるため、心筋線維化を予防または治療することは生命予後の観点から非常に重要である。申請者は心臓に豊富に発現する TRIC-A に着目し、TRIC-A 欠損マウスにおいてイソプロテレノールの持続刺激によって観察された顕著な線維化メカニズムの解明を目指した。本申請研究では、TRIC-A 欠損マウスにおけるイソプロテレノール誘発性心筋線維化メカニズムを解明し、基礎生物学的な貢献を目指すとともに、心筋線維化に対して TRIC-A を標的とした医学・薬学的貢献を目指した。

3. 研究の方法

A. 浸透圧ポンプによる ISO の持続投与

生後 8 ~ 12 週齢の野生型 (WT) 及び *Tric-a* 欠損マウス (A^{-/-}) に対して、麻酔下で背部を開き、皮下に ISO (60 mg/kg/day) または溶媒の 0.02% アスコルビン酸を含む生理食塩水 (Saline) を注入した浸透圧ポンプ (Alzet, model 1003D 及び 2002) を背部皮下に留置し、クリップを用いて閉じ、1、3、7、14 日間持続投与した。

B. 心拍数及び血圧測定

Saline 群、ISO 群の野生型及び *Tric-a* 欠損マウスに対して浸透圧ポンプを留置している 14 日間、保温器中で安静後、血圧及び心拍数を測定するテールカフ法を 1 日おきに行った。

C. 心臓の組織学的検討

Saline 群、ISO 群の野生型及び *Tric-a* 欠損マウスに対して浸透圧ポンプを留置してから 1、3、7、14 日後にそれぞれのマウスより心臓を摘出し中性ホルマリンにて固定後、パラフィン切片 (4 μ m) を作製した。HE (Hematoxylin Eosin) 染色により細胞核と細胞質を標識し組織構造の全体像を染色した。また MT (Masson's Trichrome) 染色により膠原線維を標識し、線維化の定量・解析を行った。

D. 遺伝子発現解析

野生型及び *Tric-a* 欠損マウスに対して Saline、ISO を 14 日間負荷した後、左心室部分の total RNA を抽出し cDNA へ逆転写後、線維化及び心肥大関連遺伝子について RT-PCR を行った。

E. 血清心筋トロポニン T 濃度の測定

浸透圧ポンプ留置 1、3、7、14 日後に Saline 群、ISO 群の野生型及び *Tric-a* 欠損マウスより、血液を採取した。採取した血液は、室温で 30 分間静置した後、一晚 4℃ に保存し、翌日遠心 (5,100 rpm, 4℃, 30 分間) し上清を血清とした。ネクローシスマーカーである血清心筋トロポニン T 濃度の測定は SRL に依頼した。

F. 心筋細胞膜透過性の評価

浸透圧ポンプ留置 1、3、7、14 日の 24 時間前にエバンスブルーを 10 mg/ml in PBS/10 g body weight の濃度で腹腔内注射した。各日数で Saline 群、ISO 群の野生型及び *Tric-a* 欠損マウスに対して麻酔下で、左心室より PBS 及び 4% PFA をそれぞれ 5 分間灌流した。ついで、心臓の中心部分を横断し PFA により後固定した。クリオスタットにて凍結切片 (5 μ m) を作製した。エバンスブルー陽性の心筋細胞は細胞膜透過性が上昇しており、これをネクローシス細胞とした。核と細胞膜染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) と wheat germ agglutinin (WGA) を用いた。共焦点レーザー蛍光顕微鏡により 1 個体あたり 40 枚の画像をランダムに撮影し、エバンスブルー陽性細胞と全細胞数あるいは WGA 蛍光領域の細胞総面積との割合によりネクローシ

スの程度を検討した。

G. 電子顕微鏡観察

野生型及び *Tric-a* 欠損マウスへ 24 時間の ISO 負荷後、心臓を摘出し素早く 0.1 M カコジル酸緩衝液 (2.5% グルタルアルデヒド、3% パラホルムアルデヒド) により固定し、縦方向及び横方向の切片 (70 nm) を作製し、電子顕微鏡にて観察を行った。

4. 研究成果

A. ISO 負荷による心拍数と血圧の経時変化

Tric-a 欠損マウスは正常に成育・繁殖し通常の飼育条件では心臓に異常は観察されなかった。そこで、*Tric-a* 欠損マウスに対して ISO を 14 日間持続負荷させ、心臓への影響について検討を行った。最初に ISO が正常に負荷されていることを確認するため、浸透圧ポンプの留置期間において 1 日おきにテールカフ法で心拍数と血圧を測定した。野生型マウスでは ISO 負荷に伴い、心拍数は 2 日目から上昇し 14 日目まで約 700 bpm を維持した。また血圧も徐々に上昇した。一方で *Tric-a* 欠損マウスでは、ISO 負荷後 2 日目から 6 日まで顕著な徐脈、2 日目に低血圧が観察された。さらに *Tric-a* 欠損マウス ISO 負荷群では 3 日目から 4 日目にかけてテールカフ測定中あるいは測定後まもなくして突然死する個体が約半数存在した。以上より、*Tric-a* 欠損マウスでは ISO 負荷後早期に徐脈や低血圧、突然死が観察され、心臓における異常が示唆された。

B. 心臓の組織学的検討

心拍数及び血圧測定、生存率の検討により *Tric-a* 欠損マウスにおける ISO 負荷が心臓に対して何らかの影響を与えることが予想されたため、また持続的な ISO 負荷により心肥大や線維化が誘発されることが知られているため、ISO 負荷 14 日後の心臓を摘出し、HE 染色及び MT 染色により心肥大及び線維化について検討した。

HE 染色の結果、野生型及び *Tric-a* 欠損心臓のいずれにおいても ISO 負荷により顕著な心肥大を誘発したが、野生型と *Tric-a* 欠損マウスの間に差は見られなかった。線維化について、14 日に加えて 1、3、7 日においても定量・解析したところ、Saline 群ではいずれの日数においても線維化は観察されなかった

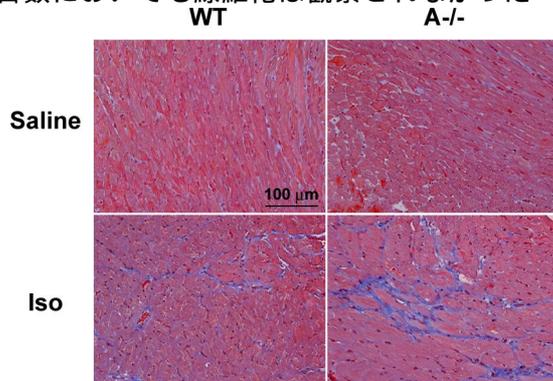


図 1 ISO 負荷 14 日後の心臓マッソントリクローム染色像

が、ISO 群では経時的な線維化率の上昇が観察され、さらに野生型に比べ *Tric-a* 欠損マウスにおいて線維化率は顕著に上昇することが明らかとなった (図 1)。

C. 遺伝子発現解析

ISO 負荷による心肥大及び線維化の組織学的検討結果を確認するため、ISO 負荷 14 日後の心臓を用いて心肥大及び線維化関連遺伝子の mRNA 発現について比較した。その結果、*Anp* (心房性ナトリウム利尿ペプチド)、*Bnp* (脳性ナトリウム利尿ペプチド)、*Myh7* (β ミオシン重鎖) などの心肥大関連遺伝子については、顕著な差は観察されなかった。一方で、*Colla1* 及び 2 (I 型コラーゲン)、*Mmp2* 及び 3 (マトリックスメタロプロテアーゼ)、*Postn* (ペリオスチン)、*Ctgf* (結合組織増殖因子) などの線維化関連遺伝子の発現は ISO 負荷により野生型に比べ *Tric-a* 欠損心臓において顕著に増大した。以上より、*Tric-a* 欠損マウスに対する持続的な ISO 負荷は線維化を誘導することが明らかとなった。

D. 血清心筋トロポニン T 濃度の測定

線維化が誘導されるメカニズムには主に以下の 3 つがある。1 つ目は線維芽細胞機能亢進、2 つ目は心筋細胞死が亢進した結果、2 次的に線維芽細胞が増殖する場合、3 つ目はマクロファージ・炎症性サイトカインの関与である。初めに ISO 負荷及び *Tric-a* 欠損により線維芽細胞の増殖が亢進するかを検討するため、それぞれの成獣マウス心臓より線維芽細胞を単離・培養した。ISO 負荷による増殖速度について検討したところ、*Tric-a* 欠損線維芽細胞の増殖速度は野生型線維芽細胞に比べて差はなかった。さらに線維芽細胞において *Tric-a* RNA 発現量は非常に少なく、タンパクレベルでは検出されなかったことから線維芽細胞自身が ISO 負荷による線維化の亢進に関わる可能性は低いことが示唆された。また、血中カテコラミン濃度の上昇は、細胞内及びミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、ミトコンドリア変性を生じさせた結果、ネクローシスを引き起こすことが報告されている。そこで ISO 負荷が *Tric-a* 欠損マウスにおいて心筋細胞死を惹起するか検討した。心筋トロポニン T は心筋の筋原線維を構成するタンパク質の一部であり、血中に漏出した心筋トロポニン T はネクローシスの指標として知られている。そこで血清心筋トロポニン T 濃度を測定したところ、7 日目及び 14 日目ではすでに正常値に戻っていたが、1 日及び 3 日間の ISO 負荷により心筋トロポニン T 濃度は野生型に比べて *Tric-a* 欠損マウスで有意に増加した。つまり *Tric-a* 欠損心臓において ISO 負荷によりネクローシスが誘導されることが示唆された。

E. ネクローシスの評価

ネクローシスは細胞内小器官の膨潤化及び形質膜構造の破綻を伴う。ネクローシスによる形質膜構造の破綻について、エバンスブルー色素の細胞内浸潤を検討した。ネクロー

シスを生じた細胞は形質膜構造が破綻し色素が容易に透過するため、心臓を摘出する24時間前にエバンスブルーを腹腔内注射し、心臓の凍結切片を作製した後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡によりエバンスブルー陽性細胞の割合を比較・解析した。その結果、Saline群ではいずれの日数においてもエバンスブルー陽性細胞はほとんど観察されなかった。またISO負荷後7日及び14日目においてもエバンスブルー陽性細胞は観察されなかった。一方、ISO負荷後1日及び3日ではエバンスブルー陽性細胞がSaline群に比べ有意に増加した。さらに、このエバンスブルー陽性細胞は野生型に比べ *Tric-a* 欠損心臓で顕著に増加することが明らかとなった。

以上より、ISO負荷は24時間以内に心筋細胞死(ネクロシス)を誘導し、それが少なくとも3日間持続することが示唆された。さらに *Tric-a* 欠損により野生型よりも顕著に心筋細胞死が誘導されることが明らかとなった。

E. 電子顕微鏡観察

Tric-a 欠損マウスへのISO負荷による血清心筋トロポニンT濃度の上昇とエバンスブルー陽性細胞の増加は心筋細胞のネクロシスを示唆する。そこで電子顕微鏡によりネクロシスにより変性を生じやすいミトコンドリアや小胞体などの細胞小器官や細胞膜を観察した。24時間のISO負荷では野生型心筋細胞においてわずかなミトコンドリアの変性が観察されるものの、概ね正常な細胞が観察された。一方、*Tric-a* 欠損心臓では、ミトコンドリア変性による空胞(*)が散在し、ネクロシスの終末像である破裂した細胞やマクロファージの集積も観察された(図2)。アポトーシスについてTUNEL染色により検討したが、ISO負荷によるTUNEL陽性細胞の増加は観察されなかった。以上より、*Tric-a* 欠損マウスへのISO負荷はネクロシスを引き起こすことが明らかとなった。

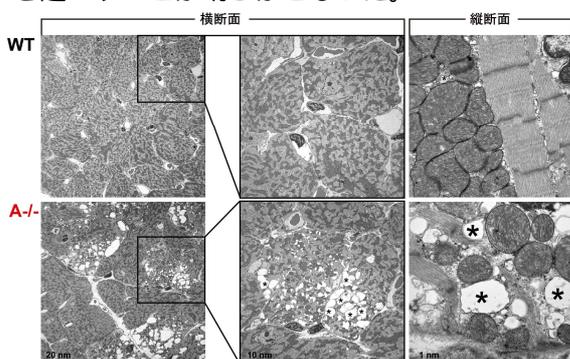


図2 ISO負荷24時間後の野生型及び *Tric-a* 欠損心臓の電子顕微鏡像

【考察】

ISOが心筋細胞に作用すると、一般的には電位依存性Ca²⁺チャンネル、リアノジン受容体、小胞体Ca²⁺ポンプであるSERCAを抑制的に制御するホスホランパンがリン酸化されることで小胞体と細胞質間のCa²⁺回転を促進さ

せCa²⁺放出量を増加させる。これは野生型マウスへのISO負荷により心拍数及び血圧の上昇が観察されたことから伺える。一方、*Tric-a* 欠損マウスへのISO負荷は、早期の徐脈や血圧低下を引き起こした。心筋細胞死がISO負荷から3日以内に顕著に誘導されることから、徐脈や血圧低下は心筋細胞死に依存している可能性が考えられる。また、電子顕微鏡によりISO負荷において *Tric-a* 欠損心筋細胞でのミトコンドリア変性が多数観察された。ISO負荷は細胞内及びミトコンドリア内のCa²⁺濃度を上昇させネクロシスを誘導するが、小胞体膜タンパク質であるTRIC-Aがこの心筋細胞死にどのように関わるかは不明である。近年、小胞体とミトコンドリアのコンタクトサイトが存在し、そこにCa²⁺透過性チャンネルが局在することが報告されている。また、単離 *Tric-a* 欠損心筋細胞において一過的・局所的Ca²⁺放出であるCa²⁺スパークの頻度は、浸透圧刺激した際に野生型に比べて減少しており、筋小胞体内のCa²⁺貯蔵量が増加していることが予想される。つまり筋小胞体に蓄積したCa²⁺がミトコンドリアとのコンタクトサイトを通じてミトコンドリアへ移動し、ミトコンドリアの変性を生じた可能性も考えられる。今後、筋小胞体Ca²⁺動態について定常状態及びISO負荷によるCa²⁺スパーク、Ca²⁺トランジェント、Ca²⁺貯蔵量などについて詳細に検討し、*Tric-a* 欠損によるISO誘発性心筋細胞死のメカニズムに迫る予定である。さらには、マクロファージ及び炎症性サイトカインによる線維化増悪の可能性についても検討を行う。

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6件)

1. 山崎大樹 TRIC (trimeric intracellular cation)-A チャンネルは血管平滑筋において血圧調節に寄与する *YAKUGAKU ZASSHI* 査読無 **132**, 1037-1043, 2012
2. Venturi E, Matyjaszkiewicz A, Pitt SJ, Tsaneva-Atanasova K, Nishi M, Yamazaki D, Takeshima H, Sitsapesan R. TRIC-B channels display labile gating: evidence from the TRIC-A knockout mouse model. *Pflugers Arch.* 査読有 **465**, 1135-1148, 2013. DOI: 10.1007/s00424-013-1251-y.
3. Venturi E, Sitsapesan R, Yamazaki D, Takeshima H. TRIC channels supporting efficient Ca²⁺ release from intracellular stores. *Pflugers Arch.* 査読有 **465**, 187-195, 2013. DOI: 10.1007/s00424-012-1197-5.
4. 山崎大樹, 陶晟辰, 竹島浩 The Roles of Calcium and Phosphorus in Cardiovascular Diseases. TRIC channel and hypertension. *Clin Calcium.* 査読無 **23**, 543-550, 2013. DOI: CliCa1304543550.

5. Tao S[#], Yamazaki D[#], Komazaki S, Zhao C, Iida T, Kakizawa S, Imaizumi Y, Takeshima H. Facilitated hyperpolarization signaling in vascular smooth muscle overexpressing TRIC-A channels.

J. Biol. Chem., 査読有 **288**, 15581-15589, 2013. (#: equally contributed.) DOI: 10.1074/jbc.M112.435396.

6. Zhou X, Lin PH, Yamazaki D, Park KH, Komazaki S, Wayne Chen SR, Takeshima H, Ma J. TRIC Channels and Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis.

Circ. Res., 査読有 **114**, 706-716, 2014. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301816.

〔学会発表〕(計 18 件)

山崎大樹、TRIC チャンネルによる血圧調節メカニズム、第 7 回トランスポーター研究会、2012 年 6 月、京都

山崎大樹、循環機能調節における小胞体カルシウムハンドリング、京都大学学際融合教育研究推進センター生理化学研究ユニットシンポジウム、2012 年 6 月、京都

山崎大樹、陶晟辰、喜多紗斗美、西美幸、今泉祐治、岩本隆宏、竹島浩、血管平滑筋における TRIC-A チャンネルによる血圧調節メカニズムの解明、第 26 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2012 年 10 月、兵庫

山崎大樹、陶晟辰、竹島浩、平滑筋特異的 TRIC-A トランスジェニックマウスにおける過分極シグナルの亢進、筋生理の集い、2012 年 12 月、東京

Tao S, Yamazaki D, Hypotension in SM-specific TRIC-A-transgenic mice. Biophysical Society 57th Annual Meeting, 2013 年 2 月、Philadelphia (米国)

Zhao C, Park KH, Naitou D, Wang C, Yamazaki D, The role of Ca²⁺ handling in TRIC knockout neonatal cardiomyocytes, Biophysical Society 57th Annual Meeting, 2013 年 2 月、Philadelphia (米国)

Zhou X, Park KH, Lin PH, Yamazaki D Co-expression of TRIC-A and cardiac Ryanodine receptor affects store-overload induced calcium release in HEK293 cells, Biophysical Society 57th Annual Meeting, 2013 年 2 月、Philadelphia (米国)

山崎大樹、陶晟辰、竹島浩、TRIC-A は血管平滑筋において SR のカルシウム分布を制御する、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月、福岡

陶晟辰、山崎大樹、竹島浩、TRIC-A の過剰発現による過分極シグナルの亢進は血管を弛緩させる、第 8 回トランスポーター研究会、2013 年 6 月、熊本

Yamazaki D, Facilitated hyperpolarization signaling relaxes vascular smooth muscle in Tric-a-overexpressing mice, HDP 第 2 回国際シンポジウム、2013 年 6 月、東京

陶晟辰、山崎大樹、駒崎伸二、趙成珠、飯

田綱規、柿澤昌、今泉祐治、竹島浩、平滑筋特異的 TRIC-A 過剰発現マウスにおける低血圧発症メカニズムの解明、第 123 回日本薬理学会近畿支部会、2013 年 7 月、名古屋

陶晟辰、山崎大樹、竹島浩、平滑筋特異的 TRIC-A 過剰発現マウスにおける低血圧発症メカニズム、第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013 年 10 月、京都

Van B, Nishi M, Komazaki S, Park KH, Yamazaki D, Ma J, Takeshima H, The MBOAT family protein Mitsugumin56 contributes to postnatal maturation in the muscle sarcoplasmic reticulum, Biophysical Society 58th Annual Meeting, 2014 年 2 月、San Francisco (米国)

Zhao C, Yamazaki D, Aoyama F, Iida T, Nishi M, Sawaguchi A, Takeshima H, Impaired bone formation in Tric-b-knockout mice, Biophysical Society 58th Annual Meeting, 2014 年 2 月、San Francisco (米国)

Obrien F, Venturi E, Galfre E, Matyjaszkiewicz A, Yamazaki D, Nishi M, Takeshima H, Stisapesan R, H⁺ inhibits TRIC-B channels derived from mouse TRIC-A knockout tissue, Biophysical Society 58th Annual Meeting, 2014 年 2 月、San Francisco (米国)

Yamazaki D, Tao S, Takeshima H, SR counter-ion channels mediated blood pressure regulation, 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月、鹿児島

山崎大樹、趙成珠、陶晟辰、王朝弘、西美幸、竹島浩、TRIC-A 欠損マウスにおけるイソプロテレノール誘発性心臓線維化、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月、仙台

山崎大樹、陶晟辰、竹島浩、TRIC-A 過剰発現による血管弛緩メカニズム、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月、熊本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 大樹 (YAMAZAKI Daiju)

京都大学・生理化学ユニット・特定講師

研究者番号：40467428