

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282121

研究課題名(和文)心筋バイオメカニクスにおける活性酸素動態の生理・病態生理連関

研究課題名(英文) Role of reactive oxygen species in physiology and pathophysiology of cardiac biomechanics

研究代表者

入部 玄太郎 (Iribe, Gentaro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：90284885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧や心臓弁疾患では心筋細胞が常に伸展された状態になっており、それが慢性化すると心不全へと移行する。その変化を引き起こす「悪玉」物質にも実は生理的に必要な機能がある。その理解無しに安易にその物質を抑制する薬を作り出したとしてもその薬剤には副作用が出ることになる。今回の研究では活性酸素といういわゆる「悪玉」物質の伸展に対する生理的に必要な機能と病態における機能との関連の一端が明らかとなり、今後この研究結果が副作用のない心不全予防・治療法開発へと発展していくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic mechanical load to myocardium due to hypertension or cardiac valve diseases leads to the heart failure. Any substances that mediate such response look “evil”, though, they also have physiological roles. Therefore, it is important to understand their physiological and beneficial roles, otherwise any attempts aimed to eliminate such “evil” substances would have side effects by eliminating their physiologically required roles. In the present study, roles of reactive oxygen species (ROS), which has been regarded as an “evil” substance, in physiological and pathological response to myocardial mechanical load was studied, and its role in linking cardiac physiology and pathophysiology was demonstrated. The present results may be useful for the development in safe methods for the treatment and/or prevention of heart failure without side effects.

研究分野：心臓生理学

キーワード：機械感受性 活性酸素 ミトコンドリア 電子伝達系 TRPC3チャネル

### 1. 研究開始当初の背景

心筋細胞はその一生を通じて収縮・弛緩を繰り返しており、常にダイナミックに変化する機械的負荷環境下にある。近年、心筋の収縮・弛緩に伴う細胞伸展などの生理的な機械刺激が、細胞内の活性酸素(Reactive Oxygen Species: ROS)を介して収縮・弛緩に必要な細胞のカルシウム動態を修飾していることが報告されている。このように ROS は生理的に心筋バイオメカニクスに関連する重要要素に関わっている。一方で高血圧などの慢性的な心臓への機械刺激は ROS を介して心肥大・線維化を経て心不全を引き起こすこともわかっている。しかしながら伸展刺激に対する生理的な ROS 機能から病的な ROS 機能への移行やその関連はいまだよくわかっていない。

### 2. 研究の目的

以上のような背景に基づき、本研究では以下を目的とする。

#### (1) 生理的 ROS 機能:

ROS は主に NADPH オキシダーゼ (NOX) 2 とミトコンドリアの電子伝達系で産生される。そこで急性伸展刺激誘発性の生理的 ROS 産生において、NOX2 の伸展感受性にミトコンドリア機能がどのように関与しているのかを明らかにする。

#### (2) 病的心における ROS 機能:

慢性圧負荷および容量負荷心不全マウスにおいて、伸展刺激誘発性の ROS 機能変化の病態を明らかにする。

#### (3) 生理/病態生理連関:

上記(1)及び(2)の結果に加え、関連遺伝子改変マウスを用いた検討から、伸展刺激に対する生理的 ROS 動態と、不全心における病的 ROS 動態との関連性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

マウス心筋細胞をランゲンドルフ灌流下に酵素的に単離する。単離心筋細胞に伸展刺激を負荷するために以下に述べるカーボンファイバーによる単離心筋細胞長さ張力制御技術を用いる。ガラス管のマウントに固定した径 10 $\mu$ m のカーボンファイバーを心筋細胞両端に装着する。カーボンファイバーは接着剤等を用いずとも静電気で細胞膜上に固定することが出来る。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制御することにより伸展刺激を加える(図 1)。心筋細胞の機械負荷パラメータとして重要なものは細胞の長さ及び発生張力であるが、長さは CCD カメラより直接測定する。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求められるファイバーのたわみ量と、あらかじめ測定してあるファイバーの弾性率を乗じて計算する。長さと同様に DCF (ROS 指示薬) MitoSOX (ミトコンドリア

ROS 指示薬) や TMRE (ミトコンドリア膜電位感受性指示薬) を用いた蛍光イメージングによって ROS 産生やミトコンドリア膜電位などを測定する。

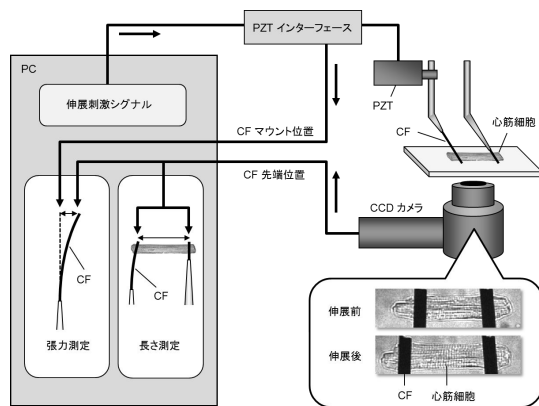


図 1

### 4. 研究成果

#### (1) 生理的 ROS 機能に関して

我々はこれまで、伸展刺激に伴う ROS の産生増加にミトコンドリアが関わっていることを報告してきたが、そのメカニズムは不明のままであった。今回、伸展刺激誘発性の ROS 増加にミトコンドリア由来の ROS がどの程度関わっているか MitoSOX を用いて検討したところ、ミトコンドリア由来の ROS 産生は伸展刺激では増加せず、増加した ROS はほぼ NOX2 由来であることが明らかとなった。そこでミトコンドリアがどのように伸展刺激誘発性 ROS 増加に関わっているかを明らかにするため薬理的なミトコンドリア機能阻害効果を検討した。その結果、脱共役剤の FCCP 投与では伸展刺激誘発性 ROS 増加は阻害されなかった。また、ロテノンによる呼吸鎖複合体 I の阻害でも同様に ROS 増加は阻害されなかったが、アンチマイシン A による複合体 III の阻害では伸展刺激誘発性の ROS の増加は抑制された(図 2)。このことから伸展刺激が呼吸鎖複合体 III の活性を増加させ、そこから何らかの経路を介して NOX2 を刺激することによって ROS を増加させることが示唆された。

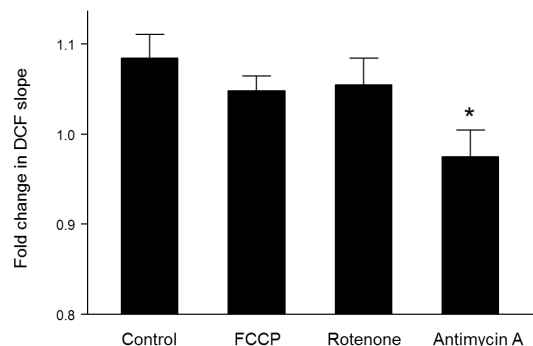


図 2

また、ミトコンドリア機能の一つとしてミトコンドリア膜電位の伸展感受性を検討した

ところ、伸展とともにミトコンドリア膜電位は直ちに過分極し、その伸展誘発性過分極は細胞骨格である微小管の脱重合剤であるコルチシンと、呼吸鎖複合体 III の阻害剤であるアンチマイシン A によって抑制された(図 3)。この結果から、伸展刺激は微小管を介して複合体 III のミトコンドリア膜間腔へのプロトン汲み出しを促進することによってミトコンドリア膜電位を分極させることが示唆された。ミトコンドリアの過分極は ATP 合成のための電気化学的勾配が大きいことを意味する。心筋の伸展、すなわち前負荷の増加はフランク・スターリングの心臓法則により収縮時の総機械的エネルギーが大きい(ATP 消費量が多い)よって伸展時のミトコンドリア膜電位増大は増加する ATP 需要に応じた ATP 合成という観点からは有利であり、合目的な反応である。

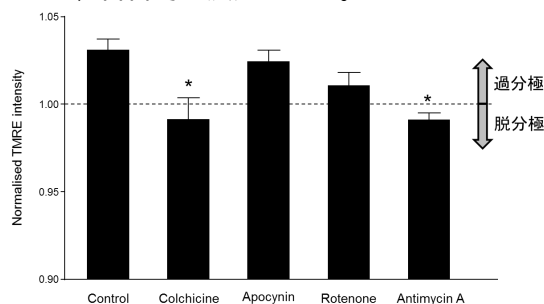


図 3

(2) 病的心における ROS 機能に関して慢性的な機械的負荷として、横大動脈狭窄 (TAC) を施した圧負荷肥大心マウス、およびドキシソルピシン (DOX) 投与による拡張型心筋症の容量負荷マウスを用いた。これらのマウスの心筋細胞を単離し、伸展刺激誘発性の ROS 産生及びミトコンドリア膜電位の変化を検討した。その結果、TAC マウス DOX マウスいずれも伸展刺激誘発性の ROS 産生増加は健常心マウスと変わらなかった。一方で伸展刺激誘発性のミトコンドリア過分極に関しては TAC マウスでは健常マウスと変わらず過分極が見られたが、DOX マウスでは見られなかった(図 4)。このことから圧負荷と容量負荷では伸展刺激誘発性の ROS 増加のシグナル伝達経路が異なる可能性がある。

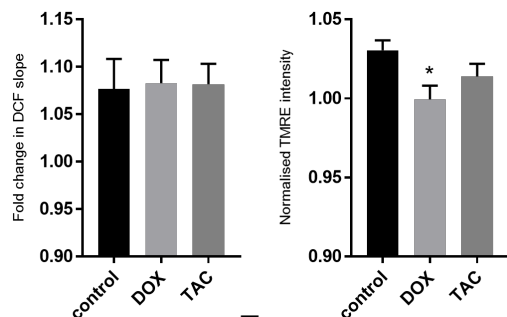


図 4

(3) 生理/病態生理連関に関して心筋細胞を伸展すると細胞内カルシウムの増加無しにフランク・スターリングメカニズム (FSM) によって直ちに発生張力は増強する(図 5 (ii))。伸展をそのまま数分間維持すると次第に細胞内カルシウムが増加することによって発生張力も増加していく(図 5 (iii))。この反応を伸展誘発性の遅発性張力増強 (slow force response: SFR) という。高

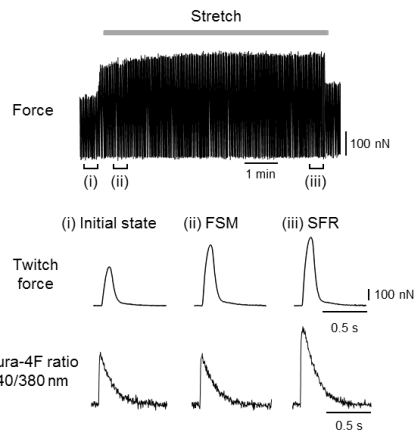


図 5

血圧などの慢性的機械的負荷においては活性化された ROS が TRPC3 や TRPC6 と呼ばれる非選択性陽イオンチャネルを活性化し、心肥大を引き起こすことがわかっている。ROS を介する生理的反応と病的反応をリンクするキーファクターとして TRPC3/6 が関与しているかを明らかにするために伸展に対する垂急性の反応としての SFR における TRPC3 及び TRPC6 の役割を検討した。両者のノックアウトマウスを用いた検討では SFR における細胞内カルシウム上昇は見られず、陽イオン流入経路として両チャネルが関与していることが示唆された(図 6)。

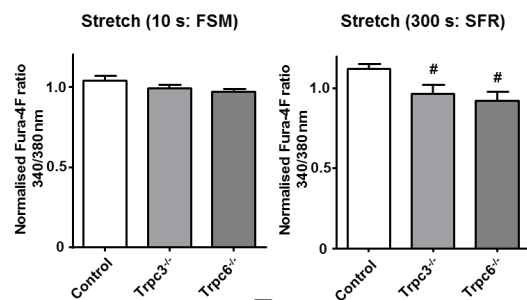


図 6

これらの結果から、ROS が伸展刺激に対する生理的な反応から病的な反応全てに関与し、中でも ROS から TRPC3/6 を介した反応は生理と病態生理の境界にまたがる重要な因子であることが示唆された。本研究により、慢性的機械的負荷から心不全へ至るメカニズムと生理機能の関連の一端が明らかとなり、生理機能に影響しない(副作用の少ない)心不全治療法の開発に繋がる知見であると思われる。

## 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 6件)

Iribe, G., Kaihara, K., Yamaguchi, Y., Nakaya, M., Inoue, R., Naruse, K., Mechano-sensitivity of mitochondrial function in mouse cardiac myocytes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, in press. 査読有り

Yamaguchi, Y., Iribe, G., Nishida, M., Naruse, K., Role of TRPC3 and TRPC6 channels in the myocardial response to stretch: linking physiology and pathophysiology. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, in press. 査読有り

Khokhlova, A., Iribe, G., Yamaguchi, Y., Naruse, K., Solovyova, O., Effects of simulated ischemia on the transmural differences in the Frank-Starling relationship in isolated mouse ventricular cardiomyocytes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, in press. 査読有り

Yamaguchi, Y., Iribe, G., Kaneko, T., Takahashi, K., Numaga-Tomita, T., Nishida, M., Birnbaumer, L., Naruse, K., 2017. TRPC3 participates in angiotensin II type 1 receptor-dependent stress-induced slow increase in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in mouse cardiomyocytes. *J. Physiol. Sci.* doi:10.1007/s12576-016-0519-3 査読有り

Khokhlova, A.D., Iribe, G., 2016. Transmural Differences in Mechanical Properties of Isolated Subendocardial and Subepicardial Cardiomyocytes. *Bull. Exp. Biol. Med.* 162, 48–50. doi:10.1007/s10517-016-3542-8 査読有り

Iribe, G., Kaneko, T., Yamaguchi, Y., Naruse, K., 2014. Load dependency in force-length relations in isolated single cardiomyocytes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 115, 103–114. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2014.06.005 査読有り

[学会発表](計 22件)

貝原恵子, 成瀬恵治, 入部玄太郎: 伸展刺激誘発性 ROS 産生におけるミトコンドリアの役割. 第 68 回日本生理学会中国四国地方会, 2016 年 11 月 5 日, 岡山.

Yamaguchi Y, Iribe G, Kaneko T, Takahashi K, Numaga-Tomita T, Nishida M, Birnbaumer L & Naruse K: TRPC3 participates in the angiotensin II type 1 receptor-dependent slow force response to stretch in mouse cardiomyocytes. The 45th European Muscle Conference, 2016, 5<sup>th</sup> September, Montpellier, France.

山口陽平, 入部玄太郎, 成瀬恵治: 統合生理学的手法による TRPC3 の細胞内局在部位解析への新規アプローチ. 第 55 回日本生体医工学会大会, 2016 年 4 月 26-28 日, 富山.

Iribe G: Localization of TRPC3 channels estimated by in-silico and cellular functional experiments. Experimental and Computational Biomedicine, 2016, 11<sup>th</sup> April, Ekaterinburg, Russia.

山口陽平, 入部玄太郎, 貝原恵子, 成瀬恵治: 心筋細胞における TRPC3 を介した伸展刺激感知機構. 第 93 回日本生理学会大会, 2016 年 3 月 22 日, 札幌.

Khokhlova AD, Iribe G & Solovyova OE: Transmural differences in excitation-contraction coupling in mouse ventricle. Biophysical Society 60th Annual Meeting, 2016, 27<sup>th</sup> February-2<sup>nd</sup> March, Los Angeles, USA.

Yamaguchi Y, Iribe G & Naruse K, Role of TRPC3 in a slow force response to stretch on mice cardiomyocytes. The 8th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress, 2015, 24<sup>th</sup> November, Bangkok, Thailand.

山口陽平, 入部玄太郎, 成瀬恵治: 持続伸展刺激下の AT1 受容体-TRPC3 系による心筋の張力制御機構. 第 67 回日本生理学会中国四国地方会, 2015 年 10 月 24 日, 米子.

Khokhlova A, Iribe G & Solovyova O: Load-dependency in mechanical properties of subepicardial and subendocardial cardiomyocytes. 2015 Computing in Cardiology Conference, 2015, 6-9<sup>th</sup> September, Nice, France.

Yamaguchi Y(1), Yamaguchi Y(2), Wakimoto S, Iribe G & Naruse K:

Development of a fluidic gripper for isolated cardiomyocytes. The 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2015, 28<sup>th</sup> August, Milan, Italy.

Khokhlova AD, Iribe G, Solovyova OE, Naruse K & Markhasin V: Influence of stretch on transmural gradient in mechanical properties of single ventricular cells. Physiology 2015, 2015, 6-8<sup>th</sup> July, Cardiff, UK.

入部玄太郎, 成瀬恵治: 細胞数値モデルによる心筋力学・電気生理のマクロ・ミクロ統合. 第54回日本生体医工学会大会, 2015年5月8日, 名古屋.

山口陽平, 金子智之, 成瀬恵治, 入部玄太郎: マウス心室筋細胞における1型アンジオテンシン II 受容体の活性化による TRPC3 と TRPC6 の伸展負荷時の張力増加現象での役割. 第92回日本生理学会大会, 2015年3月22日, 神戸.

入部玄太郎, 成瀬恵治: 心筋メカニクスとカルシウム動態の力学的負荷依存性のシミュレーション解析. 第66回日本生理学会中国四国地方会, 2014年11月2日, 高松.

Vasilyeva A, Iribe G, Naruse K & Solovyova O: Regional differences in contractility of isolated subepicardial and subendocardial ventricular myocytes. The 43rd European Muscle Conference, 2014, 10-14th September, Salzburg, Austria.

Yamaguchi Y, Kaneko T, Naruse K & Iribe G: Cation influx via TRPC3 and TRPC6 plays a central role in the slowly increasing force during sustained stretch. The 43rd European Muscle Conference, 2014, 10-14th September, Salzburg, Austria.

入部玄太郎, 貝原恵子, 成瀬恵治: 心筋ミトコンドリア活性酸素産生における急性伸展刺激の影響. 第53回日本生体医工学会大会, 2014年6月26日, 仙台.

Iribe G: Physiological implications of mechanosensitive responses in cardiomyocyte organelles. International Symposium on Mechanobiology, 2014, 22<sup>nd</sup> May, Okayama.

Yamaguchi Y, Kaneko T, Naruse K & Iribe G: Activation of TRPC3 and TRPC6 initiated by AT1 receptor regulates the slow force response in mouse ventricular myocytes. International Symposium on Mechanobiology, 2014, 22<sup>nd</sup> May, Okayama.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

入部玄太郎 (IRIBE, Gentaro)  
岡山大学医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号: 90284885

(2)研究分担者

(3)連携研究者

西田基宏 (NISHIDA, Motohiro)  
岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授  
研究者番号: 90342641

成瀬恵治 (NARUSE, Keiji)  
岡山大学医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 40252233

(4)研究協力者