

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282127

研究課題名(和文) 心臓のマクロ機能と遺伝子発現連関のための情報制御：酸素環境応答のフィジオーム解析

研究課題名(英文) Information control for a linkage between macro cardiac function and gene expression: physiomic analysis of responses to oxygen environment

研究代表者

毛利 聡 (Mohri, Satoshi)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00294413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞が分裂を止める仕組みやエネルギー消費調節の解明は循環器医療に重要である。本研究では、出生時の酸素環境変化が心筋細胞分裂を停止する仕組み、そして一生を通じた甲状腺ホルモンによる心機能とエネルギー消費の調節機構を検討した。出生時の酸素濃度上昇は心筋細胞の核にあるFam64a分子が急激に消失させた。Fam64a発現低下は細胞分裂を抑制し、増加では亢進した。遺伝子変異による非分解Fam64a実験では、心筋細胞分裂における後期促進複合体APC/Cによる分解の必要性が示された。甲状腺機能亢進症モデル実験では、Ca輸送体NCX1およびSERCA2の発現調節によるエネルギー消費抑制的な調節が示された。

研究成果の概要(英文)：It is important to investigate the mechanisms of cell division and the regulation of energy consumption of cardiomyocyte for cardiovascular medicine. We identified Fam64a as a novel essential molecule for cardiomyocyte division. Fam64a was abundantly expressed in hypoxic fetal cardiomyocyte nuclei, but was sharply repressed by oxygen exposure, and also in postnatal cardiomyocytes. Fam64a knockdown inhibited and its overexpression enhanced the proliferation of cardiomyocytes. Non-degradable Fam64a mutant suggested that its optimum expression and subsequent degradation by anaphase-promoting complex/cyclosome before anaphase are required for cell division. Moreover, we revealed that short term triiodothyronine(T3) administration increased SERCA2 expression and decreased NCX1 expression but did not change cardiac contractility, resulting in energy-saving oxygen consumption for excitation-contraction coupling. Long term T3 administration decreased cardiac contractility and NCX activity.

研究分野：生体医工学

キーワード：細胞分裂 胎児酸素環境 心筋細胞 胎児循環 分裂促進因子 心筋肥大 後期促進複合体

1. 研究開始当初の背景

(1) 私達の体を構成する 60 兆個の細胞は同一の遺伝情報を有しており、環境変化にตอบสนองして遺伝子発現を調節して各々の機能を最適化している。個体の発生では1つの受精卵から細胞分裂により細胞数を増加させるが、その過程で選択される遺伝子は様々な環境要因の情報により制御されている。成熟後においても環境因子は生体情報として細胞の遺伝子発現を調節し、臓器・個体レベルの機能を制御する。本研究では生体の機能維持における「情報」と「応答」における“酸素”“エネルギー消費”の重要性に着目し、出生後直ぐに心筋細胞が酸素環境に応じて分裂を停止するメカニズムと、全身のエネルギー代謝が亢進して血液供給量が増加する甲状腺機能亢進症において心臓自身のエネルギー効率を改善するメカニズムを研究対象として取り上げた。

(2) 出生に伴う心筋細胞分裂停止メカニズムの解明：心筋細胞のように生後分裂能を失う組織の疾患に対して、分化可能な細胞を用いる再生医療の研究が進められている。iPS細胞はそのソースとして、卵細胞から採取するES細胞に比べ倫理的問題の回避が可能という利点があるものの、生体内で機能を発揮する細胞を作り上げる方法論が不明という点ではES細胞と同様である。心筋細胞分裂の再開を目指して遺伝子操作によるアプローチが盛んに行われているが、生体内での心筋細胞は圧力や剪断応力といった物理的刺激や酸素環境などの変化に適切にตอบสนองしており、関与する遺伝子と形質獲得の詳細なプロセスは不明である。本研究で着目する心筋細胞に訪れる出生後の劇的な酸素分圧変化（最早母体に頼る時期では無いという情報）が心筋の分裂を停止させ、収縮力を上げる分化の方向に進ませるメカニズムの解明は、生体システムの視点から再生医療の発展に不可欠であると考えられる。

(3) 甲状腺ホルモンのエネルギー消費抑制効果メカニズムの解明：成体における心臓機能応答としての酸素消費調節に関しては、心不全治療の多くの薬剤について丸ごと心臓のメカノエナジェティクスを評価する Emax-PVA-Vo2 のフレームワークによって定量的結果が報告されたが、心臓の収縮性を亢進させる薬剤はその作用機序に関わりなく全て同様の酸素消費量増加を示していた。唯一の例外が甲状腺ホルモンであり、酸素消費抑制的な心臓機能亢進作用が認められた。このメカニズムを明らかにすることは新たな心不全治療開発に道を拓くことに繋がる。

2. 研究の目的

(1) 出生時の酸素分圧変化と心筋細胞分裂制御：成人の動脈血酸素分圧（～90mmHg）に比べ、胎内では 20mmHg 程度と極めて低く

保たれており、細胞分裂を盛んに繰り返す胎児形成期において酸化ストレスによる DNA 損傷を防いでいる。そのために酸素運搬を担う赤血球ヘモグロビンも成人に比べて格段に酸素親和度が高く、容易に末梢組織に酸素を供給しないシステムとなっている。出生後には肺呼吸が始まりヘモグロビンも酸素親和度の低い成人型に変換され、末梢組織への大量酸素供給が開始される。この劇的な酸素環境変化が、出生前の細胞数増加を優先した器官形成期から、出生後の自立生存のための発育期に転換するためのシグナルとして作用しているのではと考え、本研究では酸素供給環境変化による分裂能と肥大（分化）応答の分子メカニズムを検討する。出生前後では酸素分圧以外にも、血圧、剪断応力、栄養状態などが劇的に変化するが、生体内全ての要素を含んだ状態での応答を確認するために、出生前の胎児心臓と出生後数日の心筋検体を用いた遺伝子発現の解析：PCR アレイによる mRNA 定量を行う。続いて、酸素分圧変化のみの影響を抽出するために、胎児心筋を低酸素下(3% O₂)で培養し、その後高濃度酸素(20% O₂)環境に移行するシステムを用いて同様に PCR アレイを行う。これらの実験から、出生前の低酸素から出生後の高濃度酸素暴露によってどのような遺伝子発現制御が行われているかを明らかにすることが出来る。また、同定された遺伝子を siRNA などによりノックダウンし、高濃度酸素暴露時の細胞分裂停止に及ぼす作用を評価する。心筋細胞は繊維芽細胞、血管内皮細胞などと情報をクロストークしながら機能制御を行っているため、これら周囲細胞を含めた血液ポンプシステムとして心臓機能を評価する。

(2) 甲状腺ホルモンによる酸素消費抑制的心臓機能増強効果：心臓のポンプ機能を亢進させるためには、心筋細胞の収縮・弛緩を制御する細胞内 Ca²⁺濃度変化に用いられるエネルギーが増大する。これまでに開発された様々な作用機序によって心臓機能を亢進させる薬剤や、生体のホルモンなどについて心臓のエナジェティクスについて検討されてきたが、甲状腺ホルモンだけは酸素消費量を増加させずに心臓の収縮性を増強することが報告されていた。そのメカニズムについては不明であったが、我々は Ca²⁺を細胞質から排出する 2 つの経路（Na⁺/Ca²⁺交換体による細胞外への Ca²⁺排出、筋小胞体への Ca²⁺取込み）のエネルギーコストの差に注目し、Ca²⁺指示薬による単離心筋のイメージングや分子生物学的な解析により、甲状腺ホルモンがエネルギー効率に優れた筋小胞体への Ca²⁺取込みの比率を高めることにより酸素消費抑制的な効果を実現していることを示す。

3. 研究の方法

(1)-i マウス胎児心筋細胞の分裂能と酸素濃度の検討：心臓を構成する細胞成分には、

心筋細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などがある。細胞分裂能評価にあたり、これらの細胞集団から心筋細胞を分別するために α -アクチニンをマーカーとして細胞選択を行う。胎児マウス心筋細胞を 3% および 20% 酸素下で培養し、RNA を抽出して PCR マイクロアレイ解析にて酸素分圧の違いで変化する遺伝子を検索する。また、出生時の血圧、剪断応力や栄養状態などの環境因子変化を含む生体内での遺伝子発現についても検討するために、胎児マウス、新生児マウスから心臓を摘出し、心筋細胞から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行う。培養系実験と生体検体からの結果を比較し、培養実験のみで変動する RNA を検出することで酸素濃度変化特異的な遺伝子発現変化を検出する。

(1)-ii マウス培養心筋の分裂過程可視化
出生に伴う酸素分圧の変化が心筋細胞の分裂を停止させる分子メカニズムを検討すると共に、核分裂や細胞質分裂の過程を可視化することで、酸素分圧変化が心筋細胞を分裂停止させているプロセスを明らかにする。

(2) 甲状腺機能亢進症マウスにおける Ca^{2+} ハンドリング
甲状腺機能亢進症モデルの作製には 8 週齢の C57BL/6J マウスを用い、トリヨードサイロニン(T3) 2,000mg/kg/day を腹腔内に投与し作製した。投与を 1 週間行ったものを T3-short 群、8 週間投与したものを T3-long 群とし、対照群(無処置)と合わせて 3 群間で比較検討した。麻酔下に心拍数 500 ± 20 拍/分の条件で心機能・血行動態実験を行った心筋収縮・弛緩を制御する Ca^{2+} をハンドリングする 2 経路にエネルギーコストの違いが存在することに注目し、甲状腺機能亢進症マウスの Na^+/Ca^{2+} 発現量変化を評価し、時間分解能に優れた Ca^{2+} 蛍光指示薬 indo-1 を用いた細胞内全体の Ca^{2+} トランジェント計測を行い、 Ca^{2+} ハンドリング分子の変化が Ca^{2+} 動態に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 出生に伴う心筋細胞分裂停止メカニズムの解明

低酸素心筋培養・観察システムの開発と心筋分裂能-酸素濃度関係の解明

心筋細胞の培養は胎児もしくは新生児動物を用いて行われる。一般には心臓摘出・心筋単離は大気酸素下で行われているが、我々は酸素に曝露されることでマウス心筋細胞の分裂能が低下すると考え、心筋単離過程より培地やトリプシン溶液を厳密に低酸素に制御して扱うプロトコルを開発した。また、心筋細胞の分裂能に関しては、分裂時に発現が上昇している分子マーカーを用いて評価する研究が主流であるが、細胞質分裂まで行われているかどうかを確認するため、タイムラプスイメージングで観察を行った。その結果、

単離作業および培養(24h)とも低酸素(3% O_2)とした実験では、実際に細胞分裂を行った心筋細胞は 4.5%であったが、細胞単離を大気中で行った心筋細胞は 1%にまで分裂する割合が減少した。また、細胞単離を低酸素で行い、大気酸素濃度で培養下細胞は 0.5%まで分裂率が低下した。これらの結果は、マウス胎児心筋が胎内の低酸素環境から出生後肺呼吸が開始され劇的に酸素濃度が上昇する事が引き金となって細胞分裂を停止していることを示唆している。また、細胞分裂能を表す Ki-67 や p3 分子も酸素分圧の上昇と伴に発現が減少し、細胞周期促進遺伝子群の発現も劇的に低下する事が確認された。

酸素環境変化による心筋細胞細胞周期停止因子として Fam64a を同定

摘出胎児心臓と出生後の摘出新生児心臓について遺伝子発現の変化をマイクロアレイを用いて検討した。生体内では、酸素環境以外にも血行動態や栄養環境といった因子が働くが、培養系と組み合わせる事で酸素濃度変化そのものによる変化を検出するため、同様に培養心筋細胞を用いて、低酸素環境から高酸素環境に切り替えた時の遺伝子発現の変化についてマイクロアレイを用いて検索を行った。その結果、2つの実験系で共通して発現が大きく変化した 55 種類の遺伝子(4 遺伝子は発現増加、51 遺伝子は発現低下)を候補として選び、発現低下した遺伝子それぞれをノックダウンして細胞分裂を大きく低下させた 11 遺伝子に絞り込んだ。(*Mcm3*, *Ccne2*, *Ccna2*, *Fam64a*, *Cdca5*, *Tuba1b*, *My14*, *Nusap1*, *Pgk1*, *Aldoa*, and *Aurkb*)。これらの中で、最も細胞周期促進遺伝子を抑制していたのは Fam64a であった。

Fam64a の動態、発現と心筋分裂

Fam64a はこれまでにガンなど盛んに分裂を行う細胞種における細胞周期促進因子として報告されていた。低酸素下培養の心筋細胞においては核に豊富に存在していたが、高濃度酸素に曝露される事でタンパク、mRNA とともに速やかに発現低下していた。胎児心臓と新生児心臓における発現も同様であった。低酸素培養下で Fam64a をノックダウンしたところ、細胞周期促進遺伝子や分裂マーカーである Ki-67 の発現は劇的に低下した。また、実際に細胞質分裂まで行う心筋細胞は 82%減少した。次に、バキュロウイルスを用いた Fam64a 強制発現の実験を行った。GFP によって標識し、Fam64a が核に強く局在することが確認できた。そして、Fam64a の培養心筋細胞における強制発現は対照として GFP のみを発現させたものに比較して 3 倍の分裂を示した。

ユビキチンリガーゼ APC/C による細胞分裂後期直前の Fam64a 分解が心筋細胞分裂に必要
細胞分裂途中の Fam64a-GFP を観察すると、

有糸分裂後期の直前で急速に消失していることが明らかになった。これらから、Fam64aの十分な発現と、細胞周期の特定時期（有糸分裂後期の直前）におけるユビキチンリガーゼ APC/C による分解の両方が胎児心筋の分裂完了に必要であること、出生後の新生児及び成体では Fam64a、APC/C 共に発現・活性が低下していることが明らかになった。また、遺伝子改変により APC/C による分解を受けない Fam64a を用いた実験を行ったところ、Fam64a が核に発現しているにも拘らず心筋細胞の分裂は抑制された。つまり、胎児期における Fam64a の十分な発現と APC/C による分解系が正常に働き、Fam64a の発現が細胞周期に合わせて周期的に増減することが重要である。

低酸素環境下での Fam64a 発現は Hif1- の制御を受けない

低酸素環境下で Fam64a が発現誘導されるメカニズムとして、低酸素での中心的調節因子である Hif1- の関与について検討した。ヒトおよびマウス Fam64a には Hif1- 結合サイト (5' -GCGTG-3') が存在している。しかしながら、クロマチン免疫沈降アッセイ、ルシフェラーゼレポーターアッセイによって検討したところ、Hif1-、Phd3、Mif とともに低酸素環境下での Fam64a 発現誘導に重要な役割を果たしているという結果は得られなかった。本研究においては、胎児マウスを使ったゲノムワイドの網羅的スクリーニング解析により、胎児心筋細胞の分裂に必須な新規遺伝子 Fam64a を同定した。(Scientific Reports, inpress) Fam64a の機能についてはガン細胞での報告が数件あるものの、心筋における報告は皆無であり、その機能は全く未知である。Fam64a が心筋細胞の分裂を停止させるメカニズムとしてユビキチンリガーゼ APC/C が関与していることも明らかにすることができた。今後の課題として、上流の酸素濃度センシングのメカニズムは解明されるべき課題である。

(2) 甲状腺ホルモンのエネルギー消費抑制効果メカニズムの解明

甲状腺機能亢進症マウスのマクロ心機能および血行動態評価

T3-short 群で左室収縮性；Ees、循環血漿量を反映する左室拡張末期容積；EDV には対照群と比較して有意差を認めず、血管抵抗を表す実効動脈エラストランス；Ea は低下していた。T3-long 群では Ees、Ea が有意に低下し、EDV は増加していた。左室重量は対照群と比較して T3-long 群で有意に増加していた。

心筋細胞 Ca²⁺輸送体分子の評価

各々の群で心臓の収縮・弛緩を制御し長期的には心肥大にも関与する Ca²⁺に関して検討するために Ca²⁺輸送タンパクの発現量を検討して、T3-long 群における Na⁺/Ca²⁺交換体(NCX)の有意な発現減少、T3-short 群および

T3-long 群における SERCA2 の有意な発現増加を確認した。(図1)

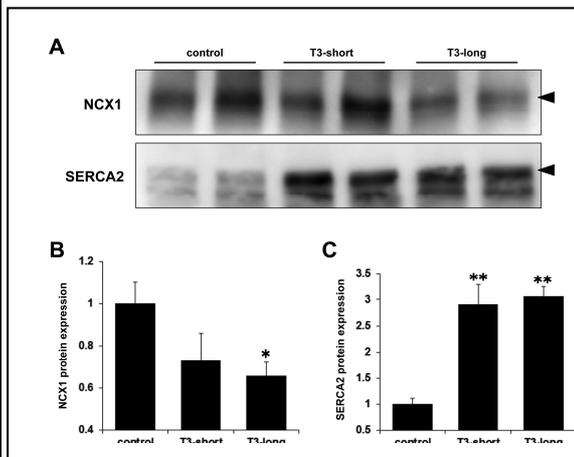


図1: 甲状腺機能亢進症モデルマウスの心筋における輸送体発現変化 (A: ウェスタンブロット、B: NCX1 定量、C: SERCA2 定量)

心筋細胞 Ca²⁺ハンドリング

各々の群のマウス単離心筋細胞を用い、それらの収縮率、Ca²⁺指示薬負荷による Ca²⁺ハンドリングの評価を行った。T3-long 群における単離心筋細胞の収縮低下を認めしたが、最大 Ca²⁺濃度にはいずれの群間にも差を認めなかった。この結果は T3-long 群において動員される Ca²⁺量に関しては対照群、T3-short 群と差が無いにも拘わらず、心筋細胞の収縮性が低下していることを示している。T3-long 群では NCX によるイオン交換活性も有意に低下していた。(図2) 免疫組織染色を行い NCX 発現の減少と T 管への局在低下を認めた。

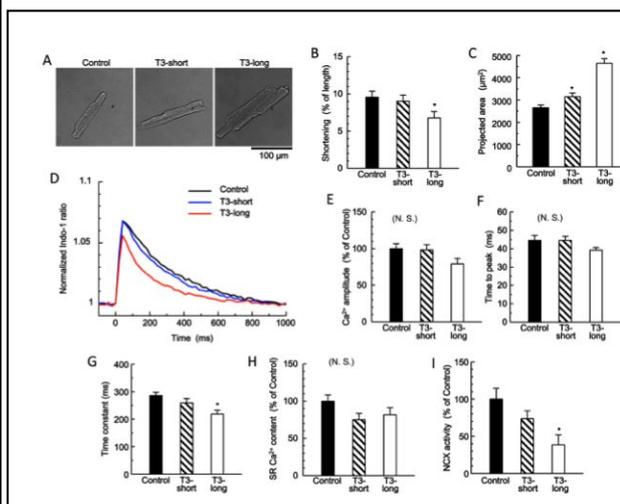


図2: indo-1 を用いた細胞内全体の Ca²⁺トランジェント計測 (A: 各群単離心筋、B: 心筋短縮率、C: 細胞投影面積、D: Ca²⁺トランジェント計測代表例、E: Ca²⁺トランジェント最大振幅、F: 最大値までの時間、G: 弛緩時間定数、H: 筋小胞体 Ca²⁺含有量、NCX 活性)

本研究では長期的にわたる慢性介入により心肥大と機能低下を来すマウス甲状腺機能亢進モデルに対して、初めて血管抵抗・循環血漿量非依存性の指標として Ees を用いる事により左室機能を評価した。Ees による心機能評価は、心臓を収縮・弛緩に伴って弾性定数の増減するバネと捉え、その最大値を収縮性 Ees とする。この概念を今回の実験に適用すると、T3-short 群は Ees が不変で心筋量が増加傾向であったことから、同等の弾性特性を持つバネが追加されたと解釈することが出来る。一方、T3-long 群では心筋量増加が進みバネは更に追加されたが、そのバネの弾性特性は対照群に比べて低いものと解釈できる。(図3) また、T3-short 群では駆出率 EF が対照群に比較して増加しているが、これは血管抵抗の低下と循環血漿量の増加に伴うものであり、本研究のように負荷非依存性の心機能評価を行うことのメリットが現れていると考える。

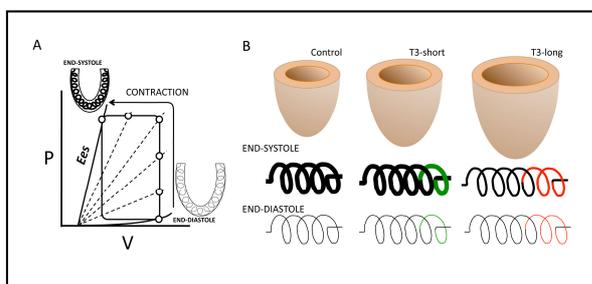


図3：甲状腺機能亢進症における心室メカニクス：急性代償期と慢性非代償期の可変弾性モデルによる理解

このような左心室機械特性の変遷過程で、心筋細胞における収縮・弛緩を制御する Ca^{2+} ハンドリングは、収縮に寄与した Ca^{2+} を細胞外に排出する NCX を介する経路の比率が低下し、筋小胞体にくみ上げる SERCA2 を介する経路の比率が上昇していた。これは酸素消費の観点からは、左室仕事量の増加に対応するエネルギー効率の良い適応的な応答と考えられるが、T3-long 群ではこの傾向が続くものの心機能の低下を来していた。これまで不全心において NCX 発現増加が認められていることが多く報告されていることを考えると、NCX を多く発現することは Ca^{2+} 排出を促進して心不全の進行を抑制している可能性がある。従って、甲状腺機能亢進症は短期的に NCX タンパク発現を低下させてエネルギー効率の良い Ca^{2+} ハンドリングを実現するものの、長期的には T 管構造の不安定化、収縮調節タンパクの Ca^{2+} 感受性低下などにより心機能低下に繋がっているのかもしれない。NCX 発現低下が長期的に心不全を進める原因であるかどうかを明らかにするためには、甲状腺機能亢進心不全モデルに心臓特異的に NCX を強発現するなどして検証していく必要があると考える。

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 5 件)

Hashimoto K, Kodama A, Honda T, Hanashima A, Ujihara Y, Murayama T, Nishimatsu S, and Mohri S. Fam64a is a novel cell cycle promoter of hypoxic fetal cardiomyocytes in mice. Scientific Reports 2017, in press.

Sasae Y, Hashimoto K, Ujihara Y, Hanashima A, Honda T, Morita Y, and Mohri S. Left ventricular mechanics and myocardial calcium dynamics in short-term and long-term hyperthyroid mice. Kawasaki Medical Journal 41(2):41-56, 2015.

Tian Z, Ujihara Y, Mohri S, Oike Y. et al. ANGPTL2 activity in cardiac pathologies accelerates heart failure by perturbing cardiac function and energy metabolism. Nat Commun. Sep 28;7:13016, 2016.

Ujihara Y, Iwasaki K, Takatsu S, Hashimoto K, Naruse K, Mohri S, Katanosaka Y. Induced NCX1 overexpression attenuates pressure overload-induced pathological cardiac remodelling. Cardiovasc Res. Sep;111(4):348-61, 2016.

Ujihara Y, Mohri S, Katanosaka Y. Effects of induced Na^+/Ca^{2+} exchanger overexpression on the spatial distribution of L-type Ca^{2+} channels and junctophilin-2 in pressure-overloaded hearts. Biochem Biophys Res Commun. 480(4):564-569, 2016.

〔学会発表〕(計 7 件)

橋本 謙, 児玉 彩, 呼元 知子, 本田 威, 花島 章, 氏原 嘉洋, 毛利 聡 コネクチン novex-3 アイソフォームはマウスにおいて胎児心筋細胞の分裂を促進する 第 94 回日本生理学会大会「浜松アクトシティコンgresセンター(静岡・浜松)」

橋本 謙, 本田 威, 花島 章, 氏原 嘉洋, 毛利 聡 Fam64a は哺乳類出生時の心筋細胞分裂停止に関与する 第 68 回日本生理学会中国四国地方会「岡山大学(岡山・岡山)」

氏原 嘉洋, 橋本 謙, 成瀬 恵治, 毛利 聡, 片野坂 友紀 圧負荷によって誘導される不全心における junctophilin-2 の局在変化に及ぼす NCX1 の影響 第 94 回日本生理学会大会「浜松アクトシティコンgresセンター(静岡・浜松)」

橋本 謙, 本田 威, 花島 章, 氏原 嘉洋, 毛利 聡 Fam64a は低酸素によって誘導される哺乳類胎児心筋細胞の増殖に必須である 第 55 回日本生体医工学会大会「富山国際会議場(富山・富山)」

氏原 嘉洋, 橋本 謙, 成瀬 恵治, 毛利 聡, 片野坂 友紀 心不全進行過程における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の強制発現が心筋細胞の微細構造に及ぼす影響 第 55 回日本生体医工学会大会「富山国際会議場(富山・富山)」

橋本 謙, 本田 威, 花島 章, 氏原 嘉洋, 毛利 聡 出生時の酸素上昇による心筋細胞の分裂停止に関与する重要分子の同定 第 93 回日本生理学会大会「札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)」

氏原 嘉洋, 橋本 謙, 成瀬 恵治, 毛利 聡, 片野坂 友紀 圧力負荷による心不全進行過程の T 管リモデリングにおける NCX1 の役割 第 93 回日本生理学会大会「札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

毛利 聡 (MOHRI Satoshi)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：00294413

(2) 研究分担者

橋本 謙 (HASHIMOTO Ken)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：80341080

氏原 嘉洋 (UJIHARA Yoshihiro)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：80610021