

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04674

研究課題名(和文) ミトコンドリア - 筋小胞体連関による心臓リズム・エネルギー代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on regulation mechanisms of cardiac rhythm and energy metabolism via mitochondria-sarcoplasmic reticulum coupling

研究代表者

松岡 達 (Matsuoka, Satoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：00263096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集技術を用いてNCLXノックアウトマウス作成に成功した。一部のホモNCLXノックアウトマウスは低体重、心臓異常、腎臓異常等の表現型が認められた。マウス心臓のランゲンドルフ灌流において、NCLX阻害剤(CGP-37157)は心拍数を減少させる傾向があった。CGP-37157は、マウス単離心室筋細胞の30%及び50%活動電位持続時間を延長し、Ca²⁺トランジェントを増加した。NCLX抑制により筋小胞体Ca²⁺含量が増加したためと考えられた。心臓ミトコンドリアの新しい包括的数理モデルを開発し論文発表した。また、ミトコンドリア - 小胞体連関を考慮した新しい洞房結節細胞数理モデルを開発した。

研究成果の概要(英文)：NCLX-knockout mice were created using the CRISPR-Cas9 method. Some of the homo-knockout mice show phenotypes different from wild type mice, such as low body weight, and abnormalities of heart and kidney. The Langendorff perfusion of mouse heart with a NCLX blocker (CGP-37157) tended to have decreased heart rate. In isolated mouse ventricular myocytes, CGP-37157 prolonged the 30 and 50% duration of action potential, and augmented the amplitude of Ca²⁺ transient probably due to the increase of SR Ca²⁺ content. A new comprehensive mathematical model of cardiac mitochondria was developed and published. A new mathematical model of sinoatrial cell, which contains the Ca²⁺ interaction between mitochondria and SR, was developed.

研究分野：生理学

キーワード：ミトコンドリア カルシウム 心臓 数理モデル

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換体(NCLX)は、ミトコンドリアからの Ca^{2+} 排出を担うタンパクである。松岡はこれまでに、NCLX はミトコンドリア内 Ca^{2+} 量を制御するのみならず、ミトコンドリアから筋小胞体・小胞体((筋)小胞体)への Ca^{2+} 供与体として働き、(筋)小胞体 Ca^{2+} 量を調節する役割があることを、リンパ球及び心房筋由来培養心筋細胞(HL-1細胞)で発見した(ミトコンドリア-筋小胞体連関)。ミトコンドリア-筋小胞体連関をNCLX ノックダウンによって抑制すると、HL-1細胞の自発的 Ca^{2+} トランジエントの立ち上がりが緩やかになり、拍動が遅くなった。また、ミトコンドリア ATP 合成の約 20%程度が Ca^{2+} によるミトコンドリア代謝制御に依存することを、数理モデル解析から見積もっている。それ故、ミトコンドリア-筋小胞体連関の破綻は、心臓のエネルギー代謝や自動能にも強く影響すると予想された。

2. 研究の目的

本研究はこれまでの成果をさらに発展させ、正常及び異常心臓リズム発生やエネルギー代謝制御におけるミトコンドリア-筋小胞体連関の役割とそのメカニズムを解明することを目的とする。そのために、*in vitro* 及び *in situ* での心筋細胞、心筋組織解析と全身ならびに心臓特異的 NCLX ノックアウトマウス解析を行うとともに、数理モデル解析により実心臓における役割を演繹的に予測する。

3. 研究の方法

本研究では、薬理学的手法や、全身ならびに心臓特異的 NCLX ノックアウトマウスを用いた実験と、数理モデル解析を組み合わせたフィジオーム研究によって、ミトコンドリア-筋小胞体連関による心臓リズム調節とエネルギー代謝調節のメカニズムと役割を包括的に解明する。

(1) NCLX ノックアウトマウスの作成・解析

NCLX (slc24a6) をコンディショナルにノックアウトすることが可能な ES 細胞を用いて全身 NCLX ノックアウトマウスとタモキシフェンで誘導される心臓特異的 NCLX ノックアウトマウスを作成した。また、CRISPR-Cas9 技術によるゲノム編集により NCLX ノックアウトマウスを作成した。

(2) NCLX 機能解析

ランゲンドルフ灌流装置を用いて、マウス心臓の心拍数、左心室圧、灌流圧を測定した。

コラゲナーゼ等を用いてマウス心臓から心室筋細胞を単離し、パッチクランプ法により活動電位を測定した。細胞質に Ca^{2+} 蛍光色素(Cal-520, AM)を負荷して EM-CCD camera を用いて Ca^{2+} トランジエントを測定した。

(3) マウス及びヒト心筋細胞数理モデル構築・解析

数理モデルは java または C#を用いて、各

要素をクラスに分けて記述するオブジェクト指向プログラミングで開発を行った。連立微分方程式は 4 次のルンゲクッタ法を用いて解を得た。

4. 研究成果

(1) NCLX ノックアウトマウスの作成・解析

NCLX (slc24a6) をコンディショナルにノックアウトすることが可能な ES 細胞を、The European Conditional Mouse Mutagenesis Program (EUCOMM) から購入し、全身 NCLX ノックアウトマウスとタモキシフェンで誘導される心臓特異的 NCLX ノックアウトマウスの作成を行った。全身 NCLX ホモノックアウトマウスにおいては、NCLX mRNA の著明な減少(約 90%)を確認した。しかしながらウェスタンブロットでは、NCLX タンパク発現の有意な減少は確認できなかった。全身状態、心臓超音波検査、心拍数、ミトコンドリアからの Ca^{2+} 排出能においても、野生型マウスとの間に著明な差異は認められなかった。タモキシフェン誘導心臓特異的 NCLX ノックアウトにおいては、タモキシフェン投与により、NCLX mRNA は約 80%減少したが、NCLX タンパク発現の有意な減少は確認できなかった。NCLX mRNA 減少にも関わらず NCLX タンパク発現や機能に有意な低下が見られなかった理由については、様々な原因が考えられるが特定には至らなかった。そのため、この ES 細胞を用いた NCLX ノックアウト作成系は断念し、CRISPR-Cas9 技術によるゲノム編集により NCLX ノックアウトマウスを作成する方法に切り替えた。この方法で、数種類の NCLX ノックアウトマウス(ホモ及びヘテロノックアウト)の作成に成功した。一部のホモ NCLX ノックアウトマウスは低体重、心臓異常、腎臓異常等の表現型が認められ、NCLX の重要性が示唆された。詳細な機能解析を継続して行っている。

(2) NCLX 機能解析

市販されている抗 NCLX 抗体は特異性が低いため、新規にウサギ抗 NCLX ポリクローナル抗体を作成した。この抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、NCLX 由来シグナルがマウス心室筋のミトコンドリアに局限することが確認された。また、凍結切断レプリカ法を用いた電子顕微鏡観察においては、NCLX 由来シグナルのミトコンドリアへの集積が確認された。

ランゲンドルフ灌流装置を用いて、マウス心臓機能(心拍数、左心室圧、灌流圧)に対する NCLX 阻害剤(CGP-37157)の効果を検討した。2 - 10 μM CGP-37157 を灌流すると、統計学的に有意差はなかったが、心拍数が減少する傾向があった。左心室圧と灌流圧に対しては影響が見られなかった。

マウス単離心室筋細胞の活動電位と Ca^{2+} トランジエントに対する CGP-37157 の効果を検討した。ガラス電極から 2 μM CGP-37157 を

細胞内に導入したところ、30%及び50%活動電位持続時間の延長と、Ca²⁺トランジエントの増加が認められた。NCLX抑制により筋小胞体Ca²⁺含量が増加したための効果であると考えられた。以上の成果を学会発表した。

(3) マウス及びヒト心筋細胞数理モデル構築・解析

心臓ミトコンドリアのCa²⁺等のイオン動態、基質輸送体、エネルギー代謝を包括的に組み込んだ数理モデルを開発し、論文発表した。数理モデル解析からは、ミトコンドリアNCLXが心筋細胞のミトコンドリアCa²⁺動態に重要であることが確認された。また、Ca²⁺によるミトコンドリアエネルギー代謝調節は、細胞質に存在するミトコンドリア代謝基質の組成に大きく依存することが明らかになった。

マウス及びヒト心筋細胞（洞房結節細胞、心室筋細胞）の数理モデルの構築を進めた。上記の詳細な心臓ミトコンドリア数理モデルを、心室筋細胞の興奮収縮連関の数理モデルと統合した新しい心室筋細胞数理モデルの構築に成功した。ミトコンドリアと細胞質との間のH⁺輸送を組み込み、H⁺バランスを数値計算することに成功した。この数理モデルを用いて、細胞質pH調節におけるミトコンドリア代謝とミトコンドリアNCLXの関与を解析し、学会発表を行った。

ミトコンドリア-小胞体連関を考慮した新しい洞房結節細胞数理モデルを開発し、ミトコンドリアNCLX機能と活動電位発生頻度（すなわち心拍数）との関連を数理解析した。NCLXを抑制することで、筋小胞体Ca²⁺含量が減少し、いわゆる“Ca²⁺クロック”機序により活動電位発生頻度が減少すると予測された。結果を学会発表した。

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)

Hu Y, Duan Y, Takeuchi A, Hai-Kurahara L, Ichikawa J, Hiraishi K, Numata T, Ohara H, Iribe G, Nakaya M, Mori MX, Matsuoka S, Ma G, Inoue R. Uncovering the arrhythmogenic potential of TRPM4 activation in atrial-derived HL-1 cells using novel recording and numerical approaches. *Cardiovasc Res*. 2017;113(10):1243-1255.

doi: 10.1093/cvr/cvx117. 査読有
Saito R, Takeuchi A, Himeno Y, Inagaki N, Matsuoka S. A simulation study on the constancy of cardiac energy metabolites during workload transition. *J Physiol*. 2016;594(23):6929-6945.

doi: 10.1113/JP272598. 査読有
Sasaki K, Makiyama T, Yoshida Y,

Wuriyanghai Y, Kamakura T, Nishiuchi S, Hayano M, Harita T, Yamamoto Y, Kohjitani H, Hirose S, Chen J, Kawamura M, Ohno S, Itoh H, Takeuchi A, Matsuoka S, Miura M, Sumitomo N, Horie M, Yamanaka S, Kimura T. Patient-specific human induced pluripotent stem cell model assessed with electrical pacing validates S107 as a potential therapeutic agent for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164795.

doi:10.1371/journal.pone.0164795.

Sakamaki K, Ishii TM, Sakata T, Takemoto K, Takagi C, Takeuchi A, Morishita R, Takahashi H, Nozawa A, Shinoda H, Chiba K, Sugimoto H, Saito A, Tamate S, Satou Y, Jung SK, Matsuoka S, Koyamada K, Sawasaki T, Nagai T, Ueno N. Dysregulation of a potassium channel, THIK-1, targeted by caspase-8 accelerates cell shrinkage. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(11):2766-2783.

doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.08.010.
Kim B, Takeuchi A, Hikida M, Matsuoka S. Roles of the mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCLX, in B lymphocyte chemotaxis. *Sci Rep*. 2016;6:28378.

doi: 10.1038/srep28378.
Narita K, Murata T, Matsuoka S. The ventromedial hypothalamus oxytocin induces locomotor behavior regulated by estrogen. *Physiol Behav*. 2016;164(PtA):107-12. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.05.047.

〔学会発表〕(計19件)

Satoshi Matsuoka, Ayako Takeuchi. Intracellular localization of mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger NCLX in mice ventricular myocytes. Biophysical Society 62th Annual Meeting (国際学会) 2018年
Yukari Takeda, Misaki Tsukioka, Shino Fujisawa, Moe Fujisawa, Yousuke Shimizu, Erika Iwai, Rena Horie, Saki Matsunaka, Ayako Takeuchi, Satoshi Matsuoka. Frequency-dependences of action potential and Ca²⁺ transient and roles of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange in mice ventricular myocytes. Cardiac Physiome Society's 20th Workshop (国際学会) 2017年
Satoshi Matsuoka. Na/Ca exchange and mitochondria function -the use of mathematical models- IUPS 38th world congress (招待講演)(国際学会) 2017年
Ayako Takeuchi, Ryuta Saito, Yukiko

Himeno, Satoshi Matsuoka. A simulation study on roles of Ca^{2+} in constancy of cardiac energy metabolites during workload transition. 2016 Cardiac Physiome Workshop (国際学会) 2016年. Satoshi Matsuoka, Ayako Takeuchi, Ryuta Saito, Yukiko Himeno. A simulation study on Ca^{2+} regulation of energy metabolism in cardiac mitochondria. "Japan-China Joint Symposium-Towards FAOPS2019- Progress in computational physiology." The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan 2017年.

Ayako Takeuchi, Bongju Kim, Satoshi Matsuoka. Physiome study on the roles of mitochondria-endoplasmic reticulum Ca^{2+} crosstalk in lymphocytes.

"Simulation studies of structures, dynamics, and functions of ion channels and transporters". The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan 2017年.

Keiko Ishihara, Satoshi Matsuoka, Makoto Takano "Mechanisms for external K^+ dependence of K^+ permeation and gating of Kir2.1 inward rectifier K^+ channel". The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan 2017年.

Ayako Takeuchi, Ryuta Saito, Yukiko Himeno, Satoshi Matsuoka. A theoretical study on the roles of Ca^{2+} in the energy metabolite stability during cardiac workload transition. Biophysical Society 61th Annual Meeting (国際学会) 2017年.

竹内綾子, 齋藤隆太, 姫野友紀子, 松岡達 心臓仕事量増大時におけるエネルギー代謝産物安定性制御メカニズムに関する数理解析 第63回 中部日本生理学会 2016年.

竹内綾子, 齋藤隆太, 姫野友紀子, 松岡達 新規ミトコンドリアエネルギー代謝数理解析モデルを用いた心臓エネルギー代謝制御メカニズムの解析 平成28年度生理学研究所 研究会「心臓・血管系の包括的な機能統合研究」2016年.

竹内綾子, 松岡達. ミトコンドリア-小胞体 Ca^{2+} クロストークに関するフィジオーム研究. 日本膜学会第38年会 2016年シンポジウム.

Yuta Nishimura, Takao Shimayoshi, Ayako Takeuchi, Tetsuya Matsuda, and Satoshi Matsuoka. Simulation of cellular responses to myocardial anoxia and acidosis. 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology

Society, (国際学会) 2016年.
西村優汰, 嶋吉隆夫, 竹内綾子, 松田哲也, 松岡達. 細胞内カルシウム濃度がミトコンドリアエネルギー代謝に与える影響のシミュレーション解析. 生体医工学シンポジウム. 2016年.

Ayako Takeuchi, Satoshi Matsuoka. Simulation analysis of automaticity of sinoatrial node. Society for Mathematical Biology 2015 conference (国際学会) 2015年.

Ayako Takeuchi, Kazuhide Horiguchi, Satoshi Iino, Yugo Fukazawa, Satoshi Matsuoka. Contribution of mitochondria to the generation of automaticity of sinoatrial node cells; a simulation study. e-Heart シンポジウム. 2015年.

村田拓也, 竹内綾子, 松岡達. 心筋細胞 HL-1 の周期的 Ca transient 発生における vitamin D receptor の関与 生理学研究所研究会「心臓・血管系の包括的な機能統合研究」. 2015年.

Satoshi Matsuoka, Ayako Takeuchi. Physiome study on mitochondrial Ca^{2+} dynamics. 67th Annual meeting of the Korean Physiological Society. KPS-PSJ Joint Symposium "Model-based analysis of physiological system" (国際学会) 2015年.

竹内綾子, 松岡達. ミトコンドリア-筋小胞体構造的クロストークを考慮したマウス洞房結節細胞数理解析モデルの構築. 第93回日本生理学会大会. 2016年.

松岡達. 心臓リズム・代謝制御機構. 第93回日本生理学会大会. (教育講演) 2016年.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

なし
取得状況(計0件)

なし

〔その他〕
ホームページ等
福井大学学術研究院医学系部門医学領域
形態機能医科学講座 統合生理学分野

英文
<http://isphysio.med.u-fukui.ac.jp/>

和文
<http://www-n.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/integrative/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡達 (MATSUOKA, Satoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：00263096

(2)研究分担者

竹内 綾子 (TAKEUCHI, Ayako)
福井大学・学術研究院医学系部門・准教授
研究者番号：00378704

(3)連携研究者

疋田正喜 (HIKIDA, Masaki)
秋田大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：60228715

嶋吉隆夫 (SHIMAYOSHI, Takao)
九州大学・情報基盤研究開発センター・准教授
研究者番号：60373510

(4)研究協力者

飯野 哲 (IINO, Satoshi)
福井大学・学術研究院医学系部門・教授
研究者番号：40242854

堀口 和秀 (HORIGUCHI, Kazuhide)
福井大学・学術研究院医学系部門・准教授
研究者番号：20377451

深澤 有吾 (FUKAZAWA, Yugo)
福井大学・学術研究院医学系部門・教授
研究者番号：60343745