

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02085

研究課題名(和文) 多階層工学的解析に基づくメカニカルストレスを利用した心機能維持の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Mechanotransduction on cardiac physiology

研究代表者

片野坂 友紀 (KATANOSAKA, YUKI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：60432639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：心不全に至る原因や過程は一樣ではないが、唯一、高血圧などの血行動態負荷は共通の引き金である。本研究では、心筋細胞のメカノセンサー分子TRPV2を核として、『メカニカルストレスを利用した心機能維持の分子基盤』を明らかにし、新しい心不全治療戦略を提案することを目的とした。この結果、メカノセンサー分子であるTRPV2は、心筋細胞の成熟を促進する役割があることを示す実験的証拠を得た。さらに、筋ジストロフィー症に関連する心筋症を呈する心臓では、メカニカルストレスに対する適応的肥大応答能を欠き病態発症が促進されることを明らかにし、Nature Communications誌に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では、75歳以上の約50%が心不全患者であり、決定的な治療法は確立されておらず発症後の5年生存率も大変悪い。本研究では、心筋のメカノセンサー経路をターゲットとする画期的な心不全治療を提案するための基礎研究である。現行の血管拡張薬や体液調節因子阻害による降圧薬に加えて、本研究の成果としてTRPV2を介したメカニカルシグナル経路をターゲットとした心不全治療法を提案できれば、不全治療に新たな選択肢を供給することとなり、QOLを改善して国民を悩ます病気の克服に役立つことから、保健医療への貢献は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：The heart has a dynamic compensatory mechanism for haemodynamic stress. We have previously reported that TRP vanilloid family type 2 channel (TRPV2) is a key molecule in stretch-induced Ca²⁺ response of cardiomyocytes. In this study, we showed that TRPV2 has a pivotal role in mechanical stimulation-induced Ca²⁺ response, and in structural and functional development of cardiomyocytes that enable E-C coupling and synchronous contraction with neighboring cells. In addition, we showed that maintenance of the microtubule-structure is crucial for maintaining myocyte physiology to prevent heart failure, and thus, the results may lead to strategies for therapeutic intervention (Ujihara et al., Nature Communications, 2019).

研究分野：循環分子生理

キーワード：心不全 メカニカルストレス 血行動態負荷 心筋細胞 メカノセンサー TRPV2 トランスレーショナルリサーチ 多階層

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

心不全発症のトリガーは、血行動態負荷である。

心不全とは、心臓ポンプ機能が低下して末梢の臓器に十分な血液を送れない状態である。我が国では、75歳以上の約50%が心不全患者である。発症後の5年生存率も悪く、決定的な治療法は確立されていない。心不全は各種病態の終末像であり、発症に至る原因や過程は一様ではないが、唯一、高血圧などの血行動態負荷が、共通の引き金として知られている。このため、メカノセンサーを介した心不全発症機構の解明によって、画期的治療法が開発されることが期待されている。

心筋メカノセンサーの実態解明の動向について

心不全に至る疾患は多様であるが、多くの場合で、血行動態ストレス応答として心肥大が先行する。約20年前に、肥大応答の原因は、細胞内Ca²⁺の持続的な上昇であることが明らかになったが (Molkentin JD, 1998, Cell; Olson EN, 2006, Science)、そのCa²⁺流入経路は未だ不明である。2004年、心筋のアングiotenシン受容体が、膜の伸展を直接感知すると報告されたが (Yunzeng et al., 2004, Nature Cell Biol.)、受容体の下流には複数のCa²⁺チャネルが存在するため、肥大応答を引き起こすCa²⁺流入経路は同定できない。そこで、世界中の研究者が膜の伸展により直接活性化される機械刺激感受性Ca²⁺チャネルを探し始めた。我々は、世界に先駆けて、心筋メカノセンサーの候補分子を発見し (Iwata and Katanosaka, 2003, J Cell Biol.)、常に拍動を続ける心臓の形や機能を維持するためには、このメカノセンサー分子が必須であることを、ノックアウト(KO)マウスの作製・解析から明らかにした (Katanosaka et al., Nature Communications, 2014)。

2. 研究の目的

心不全に至る原因や過程は一様ではないが、唯一、高血圧などの血行動態負荷は共通の引き金である。しかしながら、心筋細胞の機械刺激受容機構は未だ解明されておらず、その生理的役割や心肥大・心不全発症メカニズムが明らかにされていない。この問題の解決には、生体内環境を再現・評価する医工学的的方法論の開発と、心筋メカノセンサーを核とした分子・細胞・生体を網羅する多階層からの評価に基づいたトランスレーショナルリサーチが必要である。本研究では、心筋細胞のメカノセンサー分子TRPV2を核としたマルチレベル医工学的評価を展開し、『メカニカルストレスを利用した心機能維持の分子基盤』を明らかにし、新しい心不全治療戦略を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

我々の研究から、心筋細胞の『動きながら心機能を維持する』性質は、心筋メカノセンサー分子TRPV2によって支えられていることが明らかとなってきた (Katanosaka et al., Nature Communications, 2014)。本研究では、心筋細胞のメカノセンサーの作動機序、細胞へ入力されるメカニカルシグナルの生化学情報への変換経路や、その生理的・病態生理的役割を、分子・細胞・生体の多階層の解析によって明らかにする。これまでの解析によって既に得られている、複数のメカノセンサー結合因子群や、メカノセンサー依存的な発現変化を示す分子群の情報や、組織特異的メカノセンサーKOマウスを用いて、メカノセンサー感度や機能、メカニカルシグナル変換経路、あるいは他組織のメカノセンサーの役割によって多臓器間に生じる循環調節経路を対象とした新しい心不全治療戦略を提案することを目的として以下の研究ストラテジーのもと研究を展開した。

- (1) マウスの新生児培養心筋細胞を用いて、メカノセンサー分子TRPV2の機能的・構造的役割を明らかにする。
- (2) メカノセンサー分子TRPV2から入力する分子経路と、その経路の心筋細胞機能維持に対する役割を明らかにする。
- (3) メカノセンサー分子TRPV2の筋成熟に対する役割を明らかにする。
- (4) 血行動態負荷により引き起こされる心肥大や心不全に対するメカノセンサー分子TRPV2の役割を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) マウス新生児培養心筋細胞におけるメカノセンサー分子TRPV2の機能的・構造的役割
新生児マウスより、心筋細胞を単離・培養すると、単離直後から単離後72時間の間に、心筋細胞は、互いに連絡構造を作り同調拍動する細胞シートへと成熟する。我々は、正常マウスと、心筋細胞特異的TRPV2ノックアウト(KO)マウス新生児より単離した培養心筋細胞を用いて、単離直後からこれらの細胞を形態的・機能的にモニターし、互いのマウスから得られた結果を比較した。この結果、TRPV2KO心筋細胞は、培養初期より観察されるTRPV2

由来の機械刺激依存的な Ca^{2+} 流入を欠くことが明らかとなった。その後、時間が経過しても、筋小胞体への Ca^{2+} 蓄積が促進しないことから、心筋細胞の成熟において TRPV2 は重要な役割を持つことが示唆された。また、TRPV2KO 心筋細胞は、細胞骨格分子の発現が著しく低く、細胞の拍動もほとんど見られない。これらのことを総合的に判断すると、メカノセンサー分子である TRPV2 は、心筋細胞の成熟を促進する役割があると考えられる。

(2) メカノセンサー分子 TRPV2 から入力する分子経路と、その生理的役割

すでに作成済みの心臓特異的 TRPV2KO マウスを用いて、マイクロアレイ解析を行い、正常マウス（コントロール）と比較して発現減少が著しいシグナル経路を同定した。この経路が、実際に心筋細胞内でダウンレギュレーションしているか検証するために、新生児培養心筋細胞を用いた *in vitro* 実験系を用いた実験をおこなった。この結果、TRPV2 シグナルの下流経路として X 経路と Y 経路を同定したところである。本成果については、論文作成中である。

(3) メカノセンサー分子 TRPV2 の筋成熟に対する役割

(1) の仮説をマウス生体において検証するために、若年期より TRPV2 を発現抑制したマウスを作成し、このマウスの成長に伴う心臓の機能と構造の成熟度合いを詳細に解析した。この結果、TRPV2 は心臓の機能と構造の成熟度合いを決定する因子であることが示唆される実験的証拠を得た。本成果についても、研究成果(2)と同時に、同一の論文内で発表する予定にしており、現在論文作成中である。

(4) 血行動態負荷により生じる心肥大や心不全におけるメカノセンサー分子 TRPV2 の役割

(1) から (3) までの実験結果より、メカノセンサー分子 TRPV2 は、心筋細胞の構造的・機能的成熟に重要な役割を果たすことが示唆される。心筋細胞は、終末分化細胞より形成されており、生後の様々な血行動態負荷（メカニカルストレス）に対して、一つ一つの細胞が変容（形や機能を変えること）によって、ストレスに適応することが知られている。このため、心筋細胞特異的 TRPV2KO マウスを用いて、血行動態負荷に対するストレス適応能（ストレス耐性能・予備力）を生理的・機能的に解析した。この結果、心筋細胞特異的 TRPV2KO マウスは、血行動態負荷に対するストレス適応能（ストレス耐性能・予備力）が著しく低下しており、血行動態負荷に対して適応的肥大ができずに重篤な心不全へと進行することが明らかとなった。本成果についても、研究成果(2)と同時に、同一の論文内で発表する予定にしており、現在論文作成中である。

以上(1)から(4)の結果より、本研究課題は当初の計画通り達成できたと考えられる。

(5) (1) から (4) の結果から派生した新しい展開について

心筋細胞は、動けば肥大し、動かなければ痩せるという特性を持つ。筋ジストロフィー症に関連する心筋症などでは、心室筋が痩せてしまい拡張することが知られている。本研究では、筋ジストロフィー症に関連する心筋症を発症するマウスを用いて、心筋細胞機能や構造、細胞内シグナル経路（生化学的状況）を詳細に解析した。また、このようなマウスの心臓の血行動態負荷（メカニカルストレス）に対する応答を解析した。この結果、筋ジストロフィー症に関連する心筋症を呈する心臓では、メカニカルストレスに対する適応的肥大応答ができないことが明らかとなった。本成果は、Nature Communications 誌に出版した（引用文献）。今後、このようなマウスモデルにおける TRPV2 の役割が明らかになると考えられる。

引用文献

- Molkentin J.D., et al., A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. 1998, Cell, 93:215-228.
- Olson E.N., Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. 2006, Science, 313:1922-1927.
- Yunzeng Z., et al., Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. 2004, Nature Cell Biol., 6:499-506.
- Iwata Y., Katanosaka Y., et al., A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca^{2+} -permeable growth factor-regulated channel. 2003, J Cell Biol. 161:957-967. (Yuko Iwata and Yuki Katanosaka contributed equally to this work.)
- Katanosaka Y*, et al., TRPV2 is critical for cardiac function and compensatory hypertrophic response to hemodynamic stress. 2014, Nature Communications DOI:10.1038/ncomms4932. *corresponding author
- Ujihara Y., Katanosaka Y*, et al., Elimination of fukutin reveals cellular and molecular pathomechanisms in muscular dystrophy-associated heart failure. Nature Communications DOI:10.1038/s41467-019-13623-2. *corresponding author

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Katanosaka K., Takatsu S., Mizumura K., Naruse K., Katanosaka Y. | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 TRPV2 is required for mechanical nociception and the stretch-evoked response of primary sensory neurons. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Scientific reports | 6. 最初と最後の頁 16782 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-35049-4. | 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 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Ujihara Y, Kaangawa M, Mohri S, Takatsu S, Kobayashi K, Toda T, Naruse K, Katanosaka Y | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Elimination of fukutin reveals cellular and molecular pathomechanisms in muscular dystrophyassociated heart failure | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 5754 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13623-2 | 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 片野坂友紀 | 4. 巻 270 |
| 2. 論文標題 TRPV2を核とした心臓のメカノバイオロジー研究 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 医学のあゆみ | 6. 最初と最後の頁 904-909 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 6件/うち国際学会 4件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 片野坂友紀 |
| 2. 発表標題 心臓の分化・成熟およびストレス応答におけるメカノセンサーTRPV2の役割 |
| 3. 学会等名 第57回日本生体医工学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 片野坂友紀 |
| 2. 発表標題 Fukutin-KO心筋細胞から探る筋ジストロフィー関連心筋症の病態発症メカニズム |
| 3. 学会等名 第4回 日本筋学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 片野坂友紀 |
| 2. 発表標題 心臓の可塑性や生理機能を支える膜輸送体：メカノセンサーTRPV2 |
| 3. 学会等名 第91回 日本生化学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 澁谷慎、日比野雄平、片野坂公明、片野坂友紀 |
| 2. 発表標題 骨格筋特異的TRPV2ノックアウトマウスを用いたメカニカルストレス応答の解析 |
| 3. 学会等名 第6回 若手による骨格筋細胞研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuki Katanosaka |
| 2. 発表標題 TRPV2 is crucial for the development of intercalated discs in mouse hearts. |
| 3. 学会等名 63rd Annual meeting of biophysical society |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuki Katanosaka |
| 2. 発表標題 TRPV2 promotes the structural and functional maturation of cardiomyocytes. |
| 3. 学会等名 3rd International Symposium on Mechanobiology (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshihiro Ujihara, Satomi Takatsu, Keiji Naruse, Satoshi Mohri, Yuki Katanosaka |
| 2. 発表標題 The role of NCX1 on the maintenance of T-tubule architecture in pressure-overloaded hearts |
| 3. 学会等名 62nd annual meeting of biophysical society (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuki Katanosaka, Yoshihiro Ujihara, Yumiko Chiba, Satoshi Mohri, Keiji Naruse |
| 2. 発表標題 TRPV2 is crucial for the development of excitation-contraction coupling in neonatal cardiomyocytes. |
| 3. 学会等名 62nd annual meeting of biophysical society (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuki Katanosaka |
| 2. 発表標題 Critical roles for TRPV2 in the formation and maintenance of intercalated discs in cardiomyocytes |
| 3. 学会等名 第95回 日本生理学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 片野坂友紀 |
| 2. 発表標題 Fukutin-KO心筋細胞から探る筋ジストロフィー関連心筋症の病態発症メカニズム |
| 3. 学会等名 第5回 若手による骨格筋研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuki Katanosaka |
| 2. 発表標題 心臓のメカノバイオロジー ~心筋細胞のTRPV2の役割を中心に~ |
| 3. 学会等名 第42回日本高血圧学会 (シンポジウム) (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Katanosaka Y, Ujihara Y, Katanosaka K, Naruse K. |
| 2. 発表標題 The role of TRPV2 during the development of excitation-contraction coupling in neonatal cardiomyocytes. |
| 3. 学会等名 Gordon Conference muscle E-C coupling (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 | 金川 基 (Kanagawa Motoi) (00448044) | 神戸大学・医学研究科・講師 (14501) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 中村 一文 (Nakamura Kazufumi) (10335630) | 岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301) | |
| 研究分担者 | 片野坂 公明 (Katanosaka Kimiaki) (50335006) | 中部大学・生命健康科学部・准教授 (33910) | |
| 研究分担者 | 氏原 嘉洋 (Ujihara Yoshihiro) (80610021) | 名古屋工業大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授 (13903) | |