

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：32666

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23835

研究課題名(和文)ペリサイト特異的ATP依存性カリウムチャンネルが心機能に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文)Effects of pericyte-specific ATP-dependent potassium channel on cardiac function

研究代表者

安藤 康史(Ando, Koji)

日本医科大学・先端医学研究所・講師

研究者番号：10736010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：発生初期からABCC9/KCNJ8の発現に伴いK-ATPチャンネルが機能し、その阻害は細胞内Ca²⁺上昇へと変換される一方、定常時にはK-ATPチャンネルの一過的な活性化ではCa²⁺変化をほとんど引き起こさないことが分かった。構築した実験モデルを利用し、ペリサイト内Ca²⁺変動と心疾患の連関を解析することで、Kcnj8遺伝子変異性心疾患の分子基盤を紐解く基盤を形成出来た。一方、発生初期のマウス心臓ではKcnj8は心外膜細胞にも発現することを見出し、当初予想していた周皮細胞異常が心疾患を惹起するという仮説以外の新たな機序の可能性を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心疾患は死因の主要な原因であることから、心臓におけるペリサイト機能解析は学術的側面に加え、臨床面でも重要な課題の一つであると言える。ペリサイト特異的ATP依存性カリウムチャンネル異常が心疾患を誘発するメカニズムは十分には分かっておらず、本研究によりKcnj8遺伝子の発現変化とペリサイトにおけるK-ATPチャンネルと細胞内Ca²⁺濃度の連関を明らかに出来たことは、今後の詳細なK-ATPチャンネルの役割およびその異常により誘発される心疾患の発症機構の理解に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that the K-ATP channel functions with the onset of ABCC9/KCNJ8 expression in the pericytes from the early developmental stage. While inhibition of K-ATP channel was converted to the elevation of intracellular Ca²⁺, transient activation of the K-ATP channel in the resting condition unexpectedly caused little Ca²⁺ changes. Using the experimental model developed in this study, we are now able to analyze Ca²⁺ kinetics and gene expression changes in the Kcnj8 or Abcc9 mutants, and analyze the association between pericyte intracellular Ca²⁺ fluctuations and heart disease. On the other hand, we found the change in Kcnj8 gene expression along the development in the mouse heart. In the early developmental mouse heart, Kcnj8 was also expressed in epicardial cells, implying the possibility of a new mechanism other than the hypothesis that pericyte abnormalities that were initially predicted cause heart disease.

研究分野：血管生物学

キーワード：ペリサイト Kcnj8 Abcc9

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

毛細血管の内皮細胞を被覆するペリサイトは血液脳関門や脳血液循環を制御し、ペリサイトの脱落は脳血管障害や認知症を始めとした様々な脳血管性疾患の発症・進展に寄与することが示されてきた。そこで、申請者らはマウス脳血管を用いた単一細胞 RNA シークエンスにより、遺伝子発現パターンによるペリサイトの再定義を行うとともに、*Kcnj8* および *Abcc9* がマウス脳組織においてペリサイト特異的に発現することを見出した¹。

KCNJ8 (*Kir6.1*) および *ABCC9* (*Sur2*) は複合体を形成することで、ATP 依存性カリウムチャネルとして機能し (図 1)、*KCNJ8* または *ABCC9* のどちらか一方でも欠損するとチャネルとしての機能が失われるとされる。中枢におけるペリサイトの重要性和と相関するように、ヒトのエキソーム解析から *ABCC9* や *KCNJ8* の遺伝子変異または SNPs が、脳血管構造異常や神経疾患の発症に寄与することが示唆された。また、中枢に加え *KCNJ8* の遺伝子変異が心機能異常に寄与する可能性が示唆された²。更に、*Kcnj8* 遺伝子欠損マウスは心電図の ST 部の延長を伴う冠攣縮性狭心症様の心機能異常を呈し死亡することから³、この ATP 依存性カリウムチャネルが心機能に必須な役割を持つと考えられる。これまで心臓における *KCNJ8* は血管平滑筋細胞または心筋細胞に発現するとされてきたことから、これらの細胞機能異常が心疾患へと発展すると考えられてきた。しかし、正確な *KCNJ8* 発現細胞の同定はなされておらず、我々の予備検討やマウスの単一細胞トランスクリプトームデータベース (*Tabula Muris*) で *Kcnj8* の発現を確認すると、中枢と同様に成獣マウス心臓においても *Kcnj8* はペリサイト選択的に発現することが分かった。加えて、共役する *Abcc9* もペリサイトに選択的に発現することから、心機能異常がペリサイト機能異常に起因する可能性が強く示唆された。一方、ペリサイトは冠血管形成に必須であることが報告されているものの、心臓におけるペリサイトの機能はほとんど解析されておらず、心臓における本遺伝子機能を明らかにすることで心臓におけるペリサイトの役割を紐解くブレークスルーになる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

ペリサイト特異的 ATP 依存性カリウムチャネル異常が心疾患を誘発するという仮説を検証し、ペリサイトによる心機能調節機構の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Kcnj8*-CreERT2, R26-mTmG レポーターマウスおよび Sur2B 抗体を用いた免疫組織化学染色を基盤とし *Kcnj8* および *Abcc9*(Sur2B) の組織発現を解析した。

(2) Ca²⁺変動を検出可能な蛍光バイオセンサー (GCaMP7) がペリサイトに発現する遺伝子改変ゼブラフィッシュを用いて、共焦点蛍光顕微鏡下でペリサイトにおける K-ATP チャネルの基本特性を *in vivo* において検討した。

(3) 血管壁細胞選択的な *Pdgfrb*-CreERT2 または *Actb*-CreERT2 マウスを交配して得られる *Kcnj8* のコンディショナルノックアウトマウスを用いてペリサイト特異的な遺伝子欠損が心臓形態と機能に与える影響を検討することを目指した。

4. 研究成果

(1) *Kcnj8* および *Abcc9*(Sur2B) の局在解析.

タモキシフェン依存的に *Kcnj8* 陽性細胞を可視化できるレポーターマウス (*Kcnj8*-CreERT2, *Rosa26-mTmG*) を用いて (図 2A)、心臓壁細胞の発生初期 (E11.5-E14.5 および P0-2) の時点における *Kcnj8* の発現解析を実施した。その結果、成獣マウスではペリサイト選択的 (図 2B) になる一方、発生初期 (E11.5-E14.5 および P0-2) の時点ではペリサイトに加え *Kcnj8* が心外膜細胞に発現することが分かった (図 2C)。 *Kcnj8* の発現解析に加え、共役する *Abcc9* (Sur2B アイソフォーム) の発現解析を実施するため、マウス Sur2B に対する抗体作成を行い、組織染色に利用可能な抗体を得た。心臓に加え、脳や網膜組織を用いた染色を実施するとペリサイト発現遺伝子である血小板由来増殖因子 (PDGFRβ: Platelet-Derived Growth factor beta) によって染色される毛細血管周囲のペリサイトにおいて Sur2B が発現する一方で、αSMA 陽性となる血管平滑筋細胞では Sur2B の発現が認められなかった (図 3A,B)。さらに血管分岐パターンとそれに伴う壁細胞の階層性が観察しやすい網膜血管を対象とし解析を進めると、*Kcnj8* と Sur2B の発現パターンに強い相関が認められ αSMA 陰性となる細動脈から分岐後の毛細血管にて *Kcnj8* および Sur2B の発現が開始されることが明確に示された (図 3B)。一方、*Abcc9* (Sur2B) も *Kcnj8* と同様に発生初期において心外膜細胞に発現するかなど、今後は異なる発生時期における組織発現を明らかにしていく必要がある。

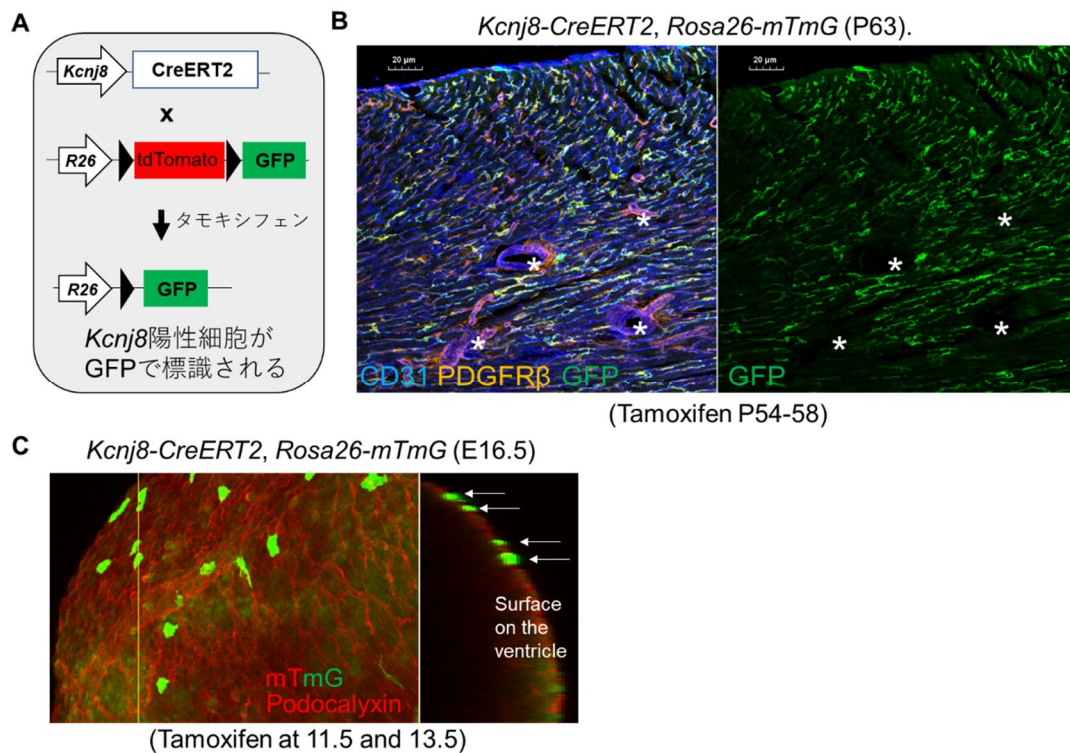


図 2. 胎生期および成獣マウス心臓における *Kcnj8* 陽性細胞の同定

- A. *Kcnj8* 陽性細胞を可視化できるレポーターマウス(*Kcnj8-CreERT2, Rosa26-mTmG*)の模式図
 B. 成獣心臓における *Kcnj8* 陽性細胞(GFP: 緑)は毛細血管(CD31; 青)周囲のペリサイト(PDGFRβ: 橙)に限局し、動脈(アスタリスク)周囲の血管平滑筋細胞やその他の細胞では認められない。
 C. 胎生期(E11.5, 13.5)の心臓ではペリサイトに加え、心臓表面の心外膜細胞に *Kcnj8* の発現が認められる。右図: 左側黄色線での断面図。

(2) カルシウムバイオセンサーを用いたペリサイトにおける K-ATP チャンネルの基本特性解析.

K-ATP チャンネルの開口、閉口は細胞内→外へのカリウムイオン排出制御を介した細胞膜電位変化を促し、膜電位依存性カルシウムチャンネルによるカルシウムイオンの流入促進、抑制へと変換される。K-ATP チャンネルによる細胞内 Ca^{2+} の調節は、さまざまな生理学的プロセス、例えばグルコースレベルに応答したインスリン分泌や、代謝センサーとしての役割、血管収縮調節に関与することが膵β細胞や血管平滑筋細胞で良く知られている。しかし、ペリサイトにおいて *Kcnj8* (*Kir6.1*)/*Abcc9* (*Sur2B*)から構成される K-ATP チャンネルが細胞内 Ca^{2+} 制御に関わるのかは十分に明らかではなかった。そこで、カルシウムイオン変化を指標としてペリサイトにおける K-ATP チャンネルの基本特性を明らかにする為、ペリサイトでカルシウムバイオセンサー(GCaMP7)を発現する遺伝子改変ゼブラフィッシュを樹立し (図 3A)、検討を行った。その結果、K-ATP チャンネル遮断薬である Glibenclamide は、*abcc9/kcnj8* 陽性のペリサイトにおいて Ca^{2+} オシレーション頻度を増加させること、またこの Ca^{2+} 上昇は T 型 Ca^{2+} チャンネル阻害剤 ML218 によってキャンセルされることが分かった (図 3B,C)。一方、*abcc9* レポーターの発現が認められないゼブラフィッシュ大動脈を被覆する壁細胞では、Glibenclamide による細胞内 Ca^{2+} 上昇は認められなかった (図 3D)。これらの結果から、*ABCC9/KCNJ8* から構成される K-ATP チャンネルがペリサイトで機能し、膜電位依存性カルシウムチャンネルを介して細胞内 Ca^{2+} ダイナミクスを調節し得ることが示唆された。しかし、興味深いことに K-ATP チャンネルの活性化剤である Pinacidil は予想に反して、細胞内 Ca^{2+} オシレーション頻度を抑制することはなかった。

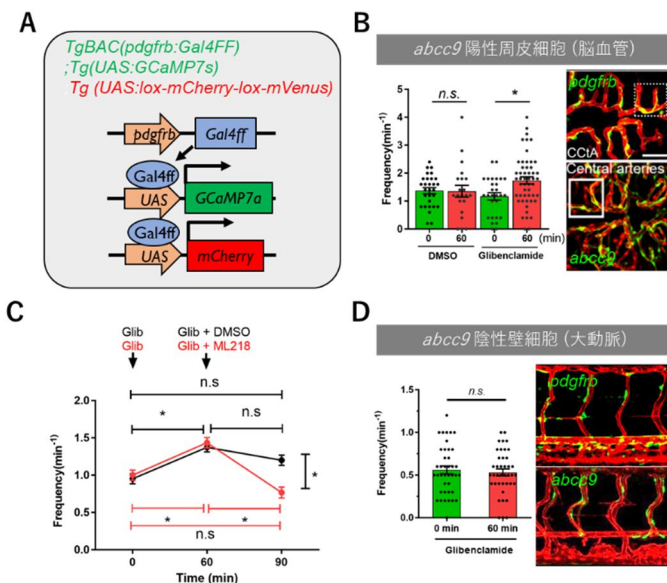


図 3. ペリサイトにおける K-ATP による細胞内 Ca²⁺調節

- A. ペリサイト内 Ca²⁺変動を解析可能な遺伝子改変ゼブラフィッシュシステムの模式図
- B. 受精後 4 日目のゼブラフィッシュ脳血管のペリサイトは *abcc9/kcnj8* 陽性であり、Glibenclamide により細胞内 Ca²⁺オシレーション頻度が増加する。
- C. B で認められる Glibenclamide による細胞内 Ca²⁺オシレーション頻度上昇は、T 型 Ca²⁺チャネル阻害剤 ML218 によってキャンセルされる。
- D. 受精後 4 日目のゼブラフィッシュ大動脈腹側の壁細胞は *abcc9* 陰性であることと一致して、Glibenclamide は細胞内 Ca²⁺オシレーション頻度に影響しなかった。

(3) *Kcnj8* のコンディショナルノックアウトマウスを用いたペリサイト特異的な遺伝子欠損が心臓形態と機能に与える影響の検討

本研究課題の最も重要な解析であり、壁細胞選択的 *Pdgfrb-CreERT2* により *Kcnj8* 欠損を試みたが、導入した *Pdgfrb-CreERT2* が上手く機能せず再度 *Pdgfrb-CreERT2* を用いた実験系の構築を試みた。また全身性の *actb-CreERT2* を用意したが、心臓のペリサイトでは組換え効率が低いことが分かり、ペリサイトの臓器特異的な遺伝子発現差異が示唆されるとともに、臓器特異性を考慮した遺伝子機能制御モデルを確立する必要性が示された。

まとめ・考察

本研究では、発生初期から *ABCC9/KCNJ8* の発現に伴い K-ATP チャネルが機能し、その阻害は細胞内 Ca²⁺上昇へと変換される一方、定常時には K-ATP チャネルの一過的な活性化では予想したような Ca²⁺変化をほとんど引き起こさないことが分かった。今後詳細な解析が更に必要だが、心疾患を模倣する変異を組み込んだ改変個体で同様の Ca²⁺動態および遺伝子発現変化を解析し、ペリサイト内 Ca²⁺変動と心疾患の連関を解析することで、*Kcnj8* 遺伝子変異性心疾患の分子基盤を紐解くヒントになると考えている。仮にこれまでに知られている K-ATP チャネル活性の細胞応答として知られている Ca²⁺変動と心疾患の連関が認められない場合は、ペリサイト内 Ca²⁺異常がトリガーではなく、例えばペリサイト膜近傍の K⁺の恒常性異常が原因となる可能性などが予想される。また、本研究において発生に伴う *Kcnj8* 遺伝子の発現変化を明らかにした。発生初期では *Kcnj8* は心外膜細胞にも発現することを見出し、当初予想していたペリサイト異常が心疾患を惹起するという仮説以外の新たな機序の可能性が浮上した。これまでに、心外膜細胞はペリサイトだけではなく線維芽細胞や心筋細胞など、異なる細胞種へと分化する可能性が示唆されていることから、*Kcnj8* 遺伝子変異性心疾患がペリサイト以外の細胞腫に起因する可能性が新たに浮上した。今後 *Kcnj8* 遺伝子変異性心疾患の分子メカニズムを明らかにするためには成獣マウスにおいてペリサイト選択的な遺伝子欠損により心機能に与える影響を検討することや、変異マウスにおいて *Kcnj8* 由来細胞の遺伝子発現などを解析することが重要であると考えられる。実際に本期間での重要課題として設定していたが、予定していた *CreERT2* ラインに問題があり成獣において *Kcnj8* 欠損の心機能への影響を検討することはできなかった。今後、新たに実験系を整備し検証することで、ATP 依存性カリウムチャネルの機能異常が心疾患を誘発するメカニズムの全容解明を目指す。

< 引用文献 >

1. Vanlandewijck, M., He, L., Mäe, M. et al. A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature* 554, 475–480 (2018). <https://doi.org/10.1038/nature25739>
2. Huang, Y., Hu, D., Huang, C., et al. Genetic Discovery of ATP-Sensitive K⁺ Channels in Cardiovascular Diseases. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 12:e007322. (2019) <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.119.007322>
3. Miki, T., Suzuki, M., Shibasaki, T. et al. Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med* 8, 466–472 (2002). <https://doi.org/10.1038/nm0502-466>
4. Litviňuková, M., Talavera-López, C., Maatz, H. et al. Cells of the adult human heart. *Nature* 588, 466–472 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2797-4>

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 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Rho SS, Kobayashi I, Oguri-Nakamura E, Ando K, Fujiwara M, Kamimura N, Hirata H, Iida A, Iwai Y, Mochizuki N, Fukuhara S.	4. 巻 49
2. 論文標題 Rap1b Promotes Notch-Signal-Mediated Hematopoietic Stem Cell Development by Enhancing Integrin-Mediated Cell Adhesion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental cell	6. 最初と最後の頁 681-696
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2019.03.023.	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 該当する

1. 著者名 Rho Seung-Sik, Oguri-Nakamura Eri, Ando Koji, Yamamoto Kiyotake, Takagi Yuki, Fukuhara Shigetomo	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for analysis of integrin-mediated cell adhesion of lateral plate mesoderm cells isolated from zebrafish embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100428 ~ 100428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2021.100428	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 Ando Koji, Shih Yu-Huan, Ebarasi Lwaki, Grosse Ann, Portman Daneal, Chiba Ayano, Mattonet Kenny, Gerri Claudia, Stainier Didier Y.R., Mochizuki Naoki, Fukuhara Shigetomo, Betsholtz Christer, Lawson Nathan D.	4. 巻 -
2. 論文標題 Conserved and context-dependent roles for Pdgfrb signaling during zebrafish vascular mural cell development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.03.29.437552	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤 康史, Christer Betsholtz, 福原 茂朋
2. 発表標題 血管壁細胞のspecificationに関わるシグナル機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤 康史、福原 茂朋
2. 発表標題 ATP依存性カリウムチャネルによる血管平滑筋細胞分化調節
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤 康史、福原 茂朋
2. 発表標題 Investigation of the molecular mechanism underlying mural cell specification in zebrafish
3. 学会等名 第28回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 安藤 康史	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学のあゆみ	5. 総ページ数 120
3. 書名 血管新生 -基礎と臨床-	

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.nmsbyoutai.com/

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------