

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06790

研究課題名（和文）心臓ペースメーカー組織障害と代謝リモデリングの関連性解析とmiRNAの役割解明

研究課題名（英文）Metabolic remodeling in dysfunction of the cardiac conduction system: a role of miRNAs

研究代表者

中尾 周（Nakao, Shu）

東海大学・医学部・特任准教授

研究者番号：30646956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、これまで不明であったペースメーカー組織固有の代謝様式を特徴づける遺伝子発現パターンを足掛かりに、これまで全く報告のなかった心臓ペースメーカー組織における代謝様式解明をマウス実験で目指した。心拍生成に関与するエネルギー基質の依存度解析を実施した結果、洞房結節の心拍調節には、作業心筋と同様に好気性代謝が優位だが、解糖系にも一定の依存性を有することが判明した。また、洞房結節のmiRNAプロファイルを解析したところ、には心臓の他の領域と共通するものだけでなく洞房結節特異的なmiRNAも含まれていることが見いだされ、心拍生成能におけるmiRNAの生理学的役割を示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

洞房結節を構成するペースメーカー細胞は、心筋細胞の一種でありながら収縮のための作業心筋細胞とは異なる細胞形態、電気生理学的機能ならびに遺伝子発現パターンを有し、さらに本研究から洞房結節に特有のエネルギー代謝様式が存在することが示唆された。したがって本成果は、ペースメーカー機能の基盤となる代謝基質解明の基礎データとなる点で学術的意義があり、今後、病態時のエネルギー代謝変化を明らかにすることで、洞房結節に特有の分子機構を標的とした、作業心筋に副作用のない安全かつ新しい視点からの治療法開発につながる社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：Our previous RNA-seq analysis demonstrated that there is a typical energy metabolism in the cardiac conduction system. We further aimed to unveil the basis of the energy metabolism utilized to generate heart rate in healthy and diseased hearts and its correlation to miRNAs. Tissue electrophysiological testing revealed that the pacemaker tissue predominantly depends on oxidative phosphorylation but also relies on glycolysis. An imaging analysis illustrated that mitochondrial morphology in the pacemaker tissue appears disorganized and immature compared to that in atrial and ventricular myocytes. In addition, miRNA profiling in the pacemaker tissue found that some miRNAs expressed pacemaker-specifically, indicating physiological roles including energy metabolism of miRNAs in the pacemaker tissue.

研究分野：心臓生理学

キーワード：心臓電気生理学 病態生理学 細胞内代謝 心臓刺激伝導系 非コードRNA

## 1. 研究開始当初の背景

適度な運動は心血管病の予防に有効だが、過剰な運動は有害となりうる。長期間の高強度の持久運動は、左心室の肥大や心拍出の増加といった適応反応を惹起し、いわゆる「スポーツ心臓」を作り出すが、この構造的リモデリングが一定数のアスリートでは病的に進行し、ポンプ機能不全や不整脈を発生させる (Eur Heart J 2015;36:1445)。著しい心拍数の低下を示す徐脈性不整脈もアスリートに好発し、突然死や心不全、機械式ペースメーカ治療のリスクの増大につながる。私たちはこれまでに、運動や心不全に伴うペースメーカ障害が、心臓ペースメーカ組織におけるイオンチャネルの発現・機能低下とそれを裏付ける miRNA の発現変動に起因することを徐脈モデルマウスを用いて明らかにしてきた (Circ Res 2017;121:1058; Sci Rep 2020;10:11279)。こうして徐脈の原因分子は徐々に分かってきているが、依然として運動とイオンチャネル障害の間には謎が多く、運動によって直接活性化あるいは抑制されて不整脈を惹起するリガンド刺激や細胞内シグナル伝達系は不明なままである。

そこで私たちは、高強度の有酸素運動は全身での活性酸素種、すなわち酸化ストレスを増大させる事実に基づき、酸化ストレスに伴う遺伝子発現変動がペースメーカ組織・洞房結節領域で生じているか否かについて、運動モデルマウスを用いて RNA-seq で検証した。その結果、予想に反して酸化ストレス関連遺伝子の変化は顕著でなく、興味深いことに脂質代謝ならびに解糖系の低下を示唆する結果が得られている。運動は骨格筋や作業心筋のエネルギー代謝様式に影響を与えることから、ペースメーカ組織にも何らかの代謝変化をもたらしている可能性が高いが、ペースメーカ障害とエネルギー代謝変化の関連性は全く報告がなく、心臓自動能の源である洞房結節の自発性の活動電位生成に必要なエネルギーが生理学的にどのような代謝特性によって賄われているのかについてさえ未解明である。一方、作業心筋細胞では豊富かつ整列したミトコンドリアにおける好気性代謝によって多量の ATP 産生が可能であり、これが大きなエネルギー消費を伴う収縮運動を支えている。なお、作業心筋細胞と比べてミトコンドリアが量的に乏しい洞房結節のペースメーカ細胞は、作業心筋細胞とは異なる代謝特性を持つことが予想される。

## 2. 研究の目的

心臓ペースメーカ組織の中でも心拍信号の主たる生成領域である洞房結節におけるエネルギー代謝特性を明らかにすること、そして代謝制御に関与する miRNA を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 組織電気生理学的解析

心拍生成機能を支える各種エネルギー基質の寄与率について以下のように検証した。成体マウスを頸椎脱臼にて安楽殺後、速やかに摘出した心臓から右心房および心房中隔を含む心房組織標本を切り出した。この心房組織標本を用いて、十分に酸素化した生理学的な Tyrode 溶液 (エネルギー基質としてグルコースを含む) を灌流下にて自発性興奮の頻度を細胞外電位記録を開始した。生体信号のデータ化にはアンプ内蔵 AD 変換器 Power Lab 26T と Lab Chart 8 ソフトウェア (ADInstruments 社) を使用した。平衡化したのちに安定化した拍動数を基底値とした。その後各種検証条件に変えたときの拍動数の推移を解析した。

### (2) 代謝速度定量解析

エネルギー代謝速度を定量化するために、摘出洞房結節組織片における酸素消費速度 (ミトコンドリア呼吸) の簡易測定を蛍光指示薬キットを用いて試みた。また、より高感度かつリアルタイム測定可能な XF Analyzer (Agilent 社) を用いて摘出洞房結節組織片および単離洞房結節細胞について解析を実施した。

### (3) ミトコンドリア形態解析

成体マウス心臓から単離した洞房結節細胞に対して、ミトコンドリアに集積する TMRM を蛍光指示薬として取り込ませ、コンフォーカル顕微鏡 FV3000 (Evident 社) にて生細胞蛍光観察を実施した。さらに、洞房結節細胞における個々のミトコンドリア形態を解析するために、連続プロ

ック表面走査電子顕微鏡システム 3View (Gatan 社) で得られたマウスおよびウサギ洞房結節の画像スタックから IMOD ソフトウェアにて洞房結節細胞のミトコンドリアをランダムにセグメンテーションすることで立体像を描出した。

#### (4) miRNA 機能解析

以前の研究で得られていた成体マウスの洞房結節および右心房筋 miRNA プロファイルを再解析して、洞房結節特異的な miRNA の有無を検証した。また、見いだされた特異的 miRNA のレンチウイルス発現ベクターを作製した。

### 4. 研究成果

#### (1) 組織電気生理学的解析

還流液を低酸素処理したものに切り替えたところ、拍動数が顕著に低下した。また、ATP 合成酵素阻害薬 rotenone で処理しても拍動数は低下したことから、自発拍動数の生成・維持は ATP 依存性であり、好気条件が必要であることが分かった。一方、還流液からグルコースを除去あるいは解糖系阻害薬 2-DG を加えると、拍動数は一過性に低下したのちに反発するように基底値よりも高値となった。さらに、還流液にグルコースの代わりに TCA 回路に流入するエネルギー基質である乳酸、ピルビン酸、グルタミンを添加したところ自発性拍動数は維持され、グルコース除去で認められた拍動数の低下が抑制された。以上の結果から、洞房結節の心拍生成には、グルコース、乳酸、ピルビン酸、グルタミンをエネルギー基質として利用可能であり、作業心筋と同様に好気性代謝が優位だが、解糖系にも一定の依存性を有することが判明した。一方、心室筋における主たるエネルギー基質は脂肪酸だが、脂肪酸添加 Tyrode 溶液の安定した灌流が困難であり、脂肪酸の心拍生成機能への高い寄与は本解析において確認できていない。

#### (2) 代謝速度定量解析

エネルギー代謝速度を定量化するために、摘出洞房結節組織片における酸素消費速度 (ミトコンドリア呼吸) の簡易測定を蛍光指示薬キットを用いて試みたが、マウスあるいはラットの洞房結節サイズでは検出限界以下の結果しか得られなかった。また、より高感度かつリアルタイム測定可能な XF Analyzer にて解析を試みたが、解析プレート底への組織片の接着が困難であり、安定した解析が不可能であった。次に、マウス心臓から洞房結節細胞をコラゲナーゼなどの酵素処理にて単離したのちに XF Analyzer で解析した。しかしながら、単離細胞のプレート底への接着は容易ではなく、各種コーティング試薬を種々の条件で検証する必要が生じた。条件検討の結果、本解析の遂行に適した細胞の単離と播種の方法を確立した。少なくとも基底状態において、洞房結節細胞のミトコンドリア呼吸速度に隣接する心房筋細胞と違いがあることを示唆する結果が得られている。今後は、エネルギー産生における代謝基質 (ブドウ糖、脂肪酸、グルタミン) への依存性を評価するために、各エネルギー基質に対する代謝阻害薬による代謝速度への影響を解析する。加えて、強制水泳運動によって作出した運動モデルマウスの洞房結節においても解析を実施し、運動に伴うエネルギー代謝様式の変化の解明につなげる。

#### (3) ミトコンドリア形態解析

成体マウス心臓から単離した洞房結節細胞のミトコンドリアに対する生細胞蛍光観察において、同時に単離した心房筋細胞および心室筋細胞では、整然と密に配列したミトコンドリアが観察されたが、洞房結節細胞ではその大きさおよび配列に不均一さが認められた。さらに、洞房結節の電子顕微鏡画像スタックからセグメンテーションした洞房結節細胞の個々のミトコンドリア形態は、細胞の突起状構造物と核周囲では異なる形状のミトコンドリアが分布していることが判明した。本検証によって単離細胞ならびに切出し組織片からのミトコンドリア形態解析が可能となったため、今後も解析を進めて洞房結節細胞におけるミトコンドリア形態を明らかにする。加えて、強制水泳運動によって作出した運動モデルマウスの洞房結節においてミトコンドリア形態を解析し、運動に伴う変化を解明する。

#### (4) miRNA 機能解析

成体マウスの洞房結節および右心房筋 miRNA プロファイル解析から、洞房結節には心臓の他領域と共通にするものだけでなく洞房結節特異的な miRNA も含まれていることが見いだされた。心拍生成能における miRNA の生理学的役割を示唆する結果であったことから、これらの miRNA のレンチウイルス発現ベクターを作製した。今後は初代培養新生仔マウス心室筋細胞あるいは分化誘導したマウス多能性幹細胞由来自発拍動心筋細胞についてこれらの miRNA を強制発現させ

たときの拍動数の変化を検証するとともに、主要な脂質代謝制御に関わる転写因子（PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 、SREBP1 など）の発現制御候補領域に miRNA 結合配列があるか否か、もしあれば当該領域の転写活性に miRNA 発現の影響があるか否かを不死化培養細胞株を用いたルシフェラーゼアッセイで実験的に検証する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sogo T, Nakao S, Tsukamoto T, Ueyama T, Harada Y, Ihara D, Ishida T, Nakahara M, Hasegawa K, Akagi Y, Kida Y, Nakagawa O, Nagamune T, Kawahara M, Kawamura T.	4. 巻 43
2. 論文標題 Canonical Wnt signaling activation by chimeric antigen receptors for efficient cardiac differentiation from mouse embryonic stem cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Inflamm Regen	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-023-00258-6	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 Nakao S, Atkinson AJ, Motomochi T, Fukunaga D, Dobrzynski H.	4. 巻 34
2. 論文標題 Common arterial trunk in a cat. A high-resolution morphological analysis with micro-computed tomography.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Vet Cardiol	6. 最初と最後の頁 8-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jvc.2020.12.003	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 Mesirca P, Nakao S, Nissen SD, Forte G, Anderson C, Trussell T, Li J, Cox C, Zi M, Logantha SJR, Yaar S, Carstensen H, Bidaud I, Stuart L, Soattin L, Morris GM, da Costa Martins PA, Cartwright EJ, Oceandy D, Mangoni ME, Jespersen T, Buhl R, Dobrzynski H, Boyett MR, D'Souza A.	4. 巻 129
2. 論文標題 Intrinsic electrical remodeling underlies atrioventricular block in athletes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circ Res	6. 最初と最後の頁 e1-e20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCRESAHA.119.316386	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 Logantha SJRJ, Cai X, Yanni J, Jones C, Stephenson R, Stuart L, Quigley G, Monfredi O, Nakao S, Oh IY, Starborg T, Kitmitto A, Vohra A, Hutcheon R, Corno A, Jarvis J, Dobrzynski H, Boyett M, Hart G.	4. 巻 14
2. 論文標題 Remodelling of the Purkinje network in congestive heart failure in the rabbit.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circ Heart Failure	6. 最初と最後の頁 e007505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.007505	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 Harada Y, Tanaka T, Arai Y, Isomoto Y, Nakano A, Nakao S, Urasaki A, Watanabe Y, Kawamura T, Nakagawa O.	4. 巻 26
2. 論文標題 ETS-dependent enhancers for endothelial-specific expression of serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 during mouse embryo development.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 611-626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12874	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 Boyett MR, Yanni J, Tellez J, Bucchi A, Mesirca P, Cai X, Logantha SJRJ, Wilson C, Anderson C, Ariyaratnam J, Stuart L, Nakao S, Allah EA, Jones S, Lancaster M, Stephenson R, Chandler N, Smith M, Bussey C, Monfredi O, Morris G, Billeter R, Mangoni ME, Zhang H, Hart G, D'Souza A.	4. 巻 166
2. 論文標題 Regulation of sinus node pacemaking and atrioventricular node conduction by HCN channels in health and disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Prog Biophys Mol Biol	6. 最初と最後の頁 61-85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pbiomolbio.2021.06.008	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

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 相澤茉優、中原正登、石田智明、植山萌恵、中尾周、川村晃久
2. 発表標題 新生仔マウスの心筋再生に関する新規miRNAの探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中谷真由、堀本嵩人、植山萌恵、中尾周、川村晃久
2. 発表標題 洞房結節におけるエネルギー代謝依存性の電気生理学的解析
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植山萌恵、石田智明、原田恭弘、中原正登、水田友里、馬場 藍、長谷川浩二、中尾 周、川村晃久
2. 発表標題 心筋ダイレクトプログラミングにおける好気性代謝制御因子IDHの役割.
3. 学会等名 第6回日本心血管協会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳澤和輝、石田智明、植山萌恵、土井晃大、馬場 藍、長谷川浩二、中尾周、川村晃久
2. 発表標題 3アドレナリン受容体の心拍制御への関与.
3. 学会等名 第6回日本心血管協会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakao S, Yanagisawa K, Ueyama T, Hasegawa K, Kawamura T
2. 発表標題 Beta-3 adrenergic receptors in the sinoatrial node for heart rate regulation.
3. 学会等名 26th International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakao S, Mesirca P, Nissen SD, Mangoni M, Jespersen T, Buhl R, Dobrzynski H, Boyett MR, D' Souza A.
2. 発表標題 Cardiac ion channel remodelling underlies exercise-induced atrioventricular block in large and small animal models.
3. 学会等名 The 5th JCS Council Forum on BCVR
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳澤和輝、土井晃大、植山萌恵、馬場 藍、中尾周、川村晃久
2. 発表標題 運動誘発性徐脈モデルマウスの洞房結節における遺伝子発現プロファイリング
3. 学会等名 第113回近畿生理学談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳澤和輝、植山萌恵、馬場藍、石田智明、中尾周、川村晃久
2. 発表標題 3アドレナリン受容体の心拍制御への関与
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakao S, Kawamura T, Dobrzynski H, Boyett M, D'Souza A
2. 発表標題 Cardiac ion channel remodelling associated with miRNA upregulation underlies exercise-induced bradyarrhythmias.
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植山萌恵、中原正登、齊藤佳穂、石田智明、KAO Chih Chi、中尾周、川村晃久
2. 発表標題 マウスの心臓再生に寄与する新規microRNAの探索
3. 学会等名 第44回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中谷真由、堀本嵩人、植山萌恵、原田恭弘、中尾周、川村晃久
2. 発表標題 洞房結節のペースメーカー機能における代謝エネルギー基盤のex vivo解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中尾周
2. 発表標題 シンポジウム「心臓研究の多様性と、その未来」 心臓刺激伝導系研究：病態生理学から機能再生療法へ
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ORCID <a href="https://orcid.org/0000-0001-8990-1179">https://orcid.org/0000-0001-8990-1179</a> Researchmap <a href="https://researchmap.jp/ShuNakao">https://researchmap.jp/ShuNakao</a> 東海大学 医学部医学科 基礎医学系 生体機能学領域 &#8203;応用分子生理学研究室（中尾研） <a href="https://nakaolab2021.wixsite.com/home">https://nakaolab2021.wixsite.com/home</a> 生命科学部・中尾周講師らがアスリートに発生する不整脈の新たな分子メカニズムを解明 <a href="http://www.ritsumeai.ac.jp/news/detail/?id=2091">http://www.ritsumeai.ac.jp/news/detail/?id=2091</a>
--

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
研究協力者	川村 晃久  (Kawamura Teruhisa)  (90393199)	立命館大学・生命科学部・教授    (34315)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	Boyett Mark  (Boyett Mark)	University of Bradford・Faculty of Life Sciences・Honorary Professor	
研究協力者	D'Souza Alicia  (D'Souza Alicia)	University of Manchester・BHF Basic Science Intermediate Research Fellow	
研究協力者	Dobrzynski Halina  (Dobrzynski Halina)	University of Manchester・School of Medical Sciences・Senior Lecturer	

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			
	英国	University of Manchester	University of Liverpool	University of Bradford
フランス	University of Montpellier			
デンマーク	University of Copenhagen			