

令和元年6月10日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01356

研究課題名(和文) 心臓イメージング計測による心筋梗塞時不整脈のメカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of arrhythmia in cardiac ischemia-reperfusion injury by imaging technology

研究代表者

高橋 賢 (Takahashi, Ken)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50432258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット心臓のランゲンドルフ灌流によりカルシウム感受性色素Fluo4を作用させることに成功した。

心臓におけるTRPM4チャネル発現の3次元マップを作成するため、MALDIイメージングを行った結果、同時に57種以上のタンパク質の発現マップを100 μmの解像度で得ることができた。

これまでラット心臓および培養細胞で行ってきた実験をヒトiPS心筋細胞の系に移行し、虚血再灌流障害のモデルを確立した。TRPM4チャネル阻害薬の前投与により、虚血再灌流障害条件下のiPS心筋の機能低下は改善した。このことから、ヒト心筋細胞においてもTRPM4チャネルが虚血再灌流障害の発症に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心機能に関し、ヒトとラット・マウスとの間の違いが従来より指摘されている。従って、本研究でヒト由来のiPS心筋細胞を用いる心臓虚血再灌流障害の実験系を確立した意義は極めて大きい。本研究をさらに進めることにより、ヒトの心筋梗塞の予防法開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Calcium sensitive dye Fluo4 was successfully perfused into the isolated rat heart in ex-vivo condition.

MALDI imaging was performed to construct a 3D map of TRPM4 protein in the heart, which allowed simultaneous mapping of more than 57 proteins at 100 μm resolution.

We developed a new experiment system using human iPS cardiomyocytes and models of ischemia-reperfusion injury, based on the previous system using rat heart and cardiomyocytes. Pretreatment of an inhibitor of TRPM4 channel protected the iPS cardiomyocytes from cell injury under ischemia-reperfusion condition. This result suggests that TRPM4 channel is involved in ischemia-reperfusion injury in human as well.

研究分野：生体医工学、心臓生理学

キーワード：心筋梗塞 虚血再灌流障害 MALDI-TOF TRPM4 CRISPR/Cas9 ミトコンドリア膜電位 細胞内ATP濃度 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

WHO の統計によると、世界人口の最大の死亡原因は心筋梗塞を含む虚血性心疾患である。この状況は今後少なくとも数十年は継続すると考えられている。心筋梗塞の治療法としてカテーテル挿入による経皮的冠動脈形成術(PCI)や抗血小板薬の投与などがある。しかし心筋梗塞発症による致死率は 20~40% とも言われ、生存した場合も後遺症の可能性がある。

研究代表者・高橋賢は、ラットの摘出心臓系において TRPM4 チャンネル阻害薬の 9-phenanthrol の投与により虚血後にできる心筋梗塞が小さくなることを発見した (PLoS ONE 2013, 2015; 特願 2012-278633)。この薬物はミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャンネルを介さずに作用したことから、アデノシンなど従来から知られている心臓保護効果を示す薬物とは作用が異なることが示唆される。研究代表者らの摘出心臓標本の実験により、9-phenanthrol の心臓保護効果の一部は抗不整脈作用によることが示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、イメージング技術による心筋梗塞の病態解明である。本研究は、1) TRPM4 チャンネルの不整脈への寄与の心臓イメージング計測による解明、2) 心臓上の TRPM4 チャンネル発現のイメージング質量分析による 3 次元マップ作成、および 3) ヒト心筋細胞における TRPM4 チャンネルの不整脈への寄与の解明、を行う。これにより心筋梗塞を予防する新しい方法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1) 心臓イメージング計測により TRPM チャンネルの不整脈への寄与を解明

心臓の機能に対し、細胞内カルシウムイオン濃度  $[Ca^{2+}]_i$  は極めて重要な役割を果たす。 $[Ca^{2+}]_i$  は心筋の収縮力を規定する一方で、虚血再灌流後に起こる異常な持続的な  $[Ca^{2+}]_i$  上昇はカルシウムオーバーロードと呼ばれる。本研究では膜電位感受性色素およびカルシウム感受性色素を用い、摘出心臓を生きたまま (*ex vivo*) の状態でイメージング計測を行う。これにより、虚血再灌流障害時の膜電位およびカルシウムオーバーロードに対する TRPM4 チャンネルの作用を検証する。

### 2) イメージング質量分析により心臓上の TRPM4 チャンネル発現の 3 次元マップを作成

イメージング質量分析装置は、組織切片上のタンパク質のみならず、脂質や化学物質などの分布を約 20  $\mu\text{m}$  の空間解像度でイメージング可能な装置である。この装置を用い、従来の免疫染色法では困難なタンパク発現分布 (TRPM4 チャンネル) 解析を 3 次元的に行う。これにより、虚血再灌流時の不整脈形成メカニズムの解明を目指す。

### 3) ヒト心筋細胞における TRPM チャンネルの不整脈への寄与を解明

ヒト iPS 細胞を心筋細胞へ分化誘導する培養細胞系を用い、虚血再灌流を実験的に模擬した環境下における細胞内カルシウムイオン濃度の変化、活動電位形成、および収縮状態を計測し、これらに対する TRPM4 チャンネルの寄与を明らかにする。

## 4. 研究成果

1) ラット心臓のランゲンドルフ灌流によりカルシウム感受性色素 Fluo4 を作用させることに成功した。虚血再灌流障害を発症した心臓のカルシウムおよび膜電位感受性色素を用いたライブイメージングは今後の課題である。

2) 心臓における TRPM4 チャンネル発現の 3 次元マップの作成を目的とし、Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (MALDI イメージング、図 1)を行った。ターゲット臓器である心臓およびコントロール臓器である精巣を、TRPC6 ノックアウトマウスおよび野生型のマウスから 1 個ずつ採取し試料として用いた。その結果、同時に 57 種類以上のタンパク質の発現マップを 100  $\mu\text{m}$  の解像度で得ることができた。心臓においては心筋特異的タンパク質である cardiac alpha actin, cardiac troponin T, tropomyosin alpha-1 chain, titin, myosin light chain 1, myosin light chain 3, myosin-6 の局在を確認することができた。一方で TRPM4 を含めイオンチャネルタンパク質の発現を確認することはできなかった。今後はサンプル処理の方法を改善し、TRPM チャンネルの分布確認を目指す。

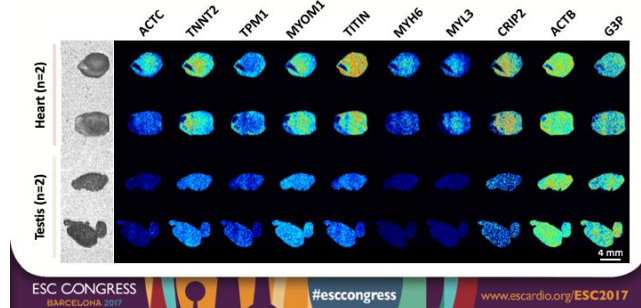


図 1. MALDI イメージング

cardiac alpha actin, cardiac troponin T, tropomyosin alpha-1 chain, titin, myosin light chain 1, myosin light chain 3, myosin-6 の局在を確認することができた。一方で TRPM4 を含めイオンチャネルタンパク質の発現を確認することはできなかった。今後はサンプル処理の方法を改善し、TRPM チャンネルの分布確認を目指す。

3) これまでラット心臓および心筋培養細胞株で行ってきた実験系を、ヒト iPS 心筋細胞の系に移行した。心機能に関し、ヒトとラット・マウスとの間の違いが従来より指摘されている。最終目標をヒトの心筋梗塞の予防法開発とする本研究において、ヒトにおける実験系の確立の意義は極めて大きい。

ヒト iPS 心筋細胞を用い、虚血再灌流障害の 2 つのモデルを確立した。一つは過酸化水素水の投与、もう一つは低酸素曝露・再酸素化処理である。過酸化水素水投与に関し、750  $\mu\text{M}$  で 4 時間の投与が有効であることが分かった。また低酸素曝露・再酸素化処理に関しては、2% 酸素で 22 時間の曝露後、20% 酸素で 2 時間再酸素化を行うことにより虚血再灌流による細胞障害が模擬されることが分かった。これらの虚血再灌流障害モデルにおいて、iPS 心筋細胞の活性の低下および収縮能の低下が確認された。TRPM4 チャンネルの阻害薬である 9-phenanthrol の前投与により、虚血再灌流障害モデルにおける細胞活性の低下および収縮能低下は減弱した。このことから、ヒト心筋細胞においても TRPM4 チャンネルが虚血再灌流障害の発症に関与していることが示唆された。

また心臓虚血再灌流障害に加え、低酸素・低栄養の曝露による心筋梗塞モデルをヒト iPS 心筋細胞において確立した。またヒト iPS 心筋細胞において、細胞内カルシウムイオンレベルのリアルタイム記録、およびミトコンドリア膜電位の記録を行った。

TRPM4 チャンネルを CRISPR ノックアウトしたヒト iPS 心筋細胞を用い、虚血再灌流障害の模擬状態において TRPM4 チャンネルが細胞傷害に与える影響を調べる実験系を考案した。その前段階として、ラット心筋細胞株 H9c2 の TRPM4 チャンネルの CRISPR ノックアウトを行なった(図 2)。その結果、単一对立遺伝子ノックアウト細胞および両対立遺伝子ノックアウト細胞を得た。単一对立遺伝子ノックアウト細胞において、虚血再灌流障害を模擬する過酸化水素投与を行なったところ、野生型細胞と比べ細胞傷害の程度が軽減されていることを確認した。また単一对立遺伝子ノックアウト細胞では、過酸化水素投与によるミトコンドリア膜電位変化および細胞内 ATP 濃度の減少が軽減されていることを確認した。

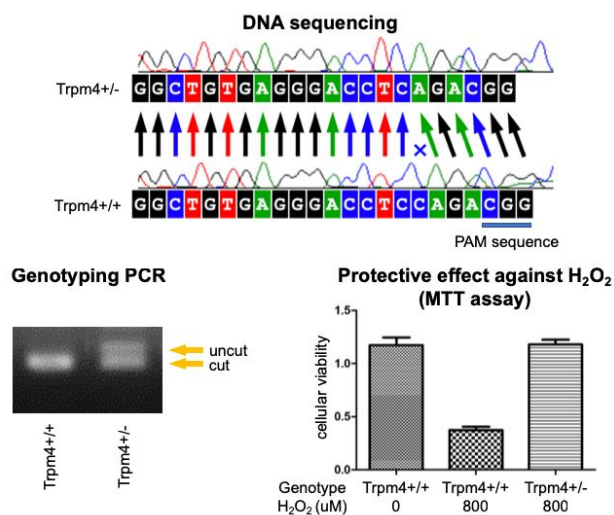


図 2. TRPM4 チャンネルの CRISPR ノックアウト

これらの結果は、虚血再灌流障害のもう一つのモデルである低酸素/再酸素化処理においても同様に認められた。以上の結果から、虚血再灌流障害の模擬状態における細胞傷害には TRPM4 チャンネルが関与しており、そのメカニズムにはミトコンドリア膜電位変化および細胞内 ATP 濃度の減少が関係していることが示唆された。今後はヒト iPS 心筋細胞を用いて TRPM4 チャンネルの CRISPR ノックアウトを行い、ヒトの心臓虚血再灌流障害の病態解明を進めたい。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Wang C, Naruse K, Takahashi K. Role of the TRPM4 Channel in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. *Cells*. 査読有. 7(6). 2018 年. 62. DOI: 10.3390/cells7060062

Takahashi K, Okumura H, Guo R, Naruse K. Effect of Oxidative Stress on Cardiovascular System in Response to Gravity. *International Journal of Molecular Sciences*. 査読有. 18 巻. 2017 年. 1426-1426. DOI: 10.3390/ijms18071426

[学会発表](計 6 件)

Takahashi K. Mechanobiology and its application to medical problem solving. 2019 International Conference on Biology and Medical Sciences. 2019 年

Tada C, Takahashi K, Naruse K. Effect of dimensional factor of cell culture on cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells. The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2018 年

Wei H, Wang C, Takahashi K, Naruse K. Cellular model of ischemic heart disease using human induced pluripotent stem cells. The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2018 年

Wang C, Wei H, Naruse K, Takahashi K. TRPM4 channel is involved in cellular damage caused by simulated ischemia-reperfusion injury: study of human iPSC-derived cardiomyocytes. The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2018 年

魏恒, 王晨, 高橋賢, 成瀬恵治. ヒト iPSC 細胞を用いた虚血性心疾患モデルの構築. 第 69 回日本生理学会中国・四国地方会. 2017 年

Takahashi K, Naruse K. Simultaneous mapping of multiple proteins in heart using matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. European Society of Cardiology Annual Congress 2017. 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 1 件)

名称：虚血性疾患の予防又は治療剤

発明者：高橋賢、王静、成瀬恵治

権利者：同上

種類：特許

番号：6073125

取得年：2017 年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

高橋賢の研究 Blog

<https://ken-takahashi.net/?cat=4>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：成瀬 恵治

ローマ字氏名：(Naruse, Keiji)

研究協力者氏名：王 晨

ローマ字氏名：(Wang, Chen)

研究協力者氏名：宮地 孝明

ローマ字氏名：(Miyaji, Takaaki)

研究協力者氏名：魏 恒

ローマ字氏名：(Wei, Heng)

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。