

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01359

研究課題名(和文) 生理的および病的なメカノトランスダクションにおけるNOX4の役割

研究課題名(英文) Physiological and pathophysiological role of NOX4 in cardiac mechano-transduction

研究代表者

貝原 恵子(Kaihara, Keiko)

岡山大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：60638641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年心筋細胞において伸展刺激によりNOX2由来のROSがCa²⁺動態を修飾することが証明されたが、同族NOX4の関与は不明である。そこで、独自のカーボンファイバーを用いた単離心筋細胞伸展システムを用いて、NOX4が生理的・病態生理的メカノトランスダクションに及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

本研究より急性的な伸展刺激による負荷応答に対しNOX2と異なるメカニズムでNOX4由来のROSが収縮力の増加に関与していることが明らかとなった。また、慢性的な負荷に対してもNOX4が関与がする結果が得られたが、詳細解明のためには今後のさらなる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ROSは、様々な疾患や老化などに影響する負のイメージが強いが、実は生体防御機構である免疫や細胞の分化などに関与する生命活動に非常に重要な生理活性物質である。心臓においては、前負荷増大時に収縮力が増加するというフランク・スターリングの法則に、ROSが関与しており、心臓生理を理解する上ではROSは重要な生理活性物質となる。

本研究結果より明らかとなったNOX4由来のROSのフランク・スターリングの法則への関与は、今後の心臓生理を理解する上で非常に重要である。また、慢性的な圧負荷に関するNOX4の関与と解明は、心不全治療への応用となりうる可能性があることから今後のさらなる研究に期待できる。

研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species (ROS) synthesized by NADPH oxidase (NOX) in vivo is a very important physiologically active substance. Although, myocardial stretch-induced ROS production via NOX2 modulates Ca²⁺ handling and cellular contractility, behavior of NOX4 is unknown. In the present study, we investigated the physiological and pathophysiological role of NOX4 in cardiac mechano-transduction.

Ventricular cells isolated were subjected to 5-10% axial stretch with the cardiomyocyte stretch system, were measured ROS production, Ca²⁺ spark rate, mitochondrial membrane potential and cellular contractility. Cellular contractility and ROS production were significantly suppressed in NOX2 KO and NOX4 KO, but Ca²⁺ spark rate was suppressed only in NOX2 KO. The results suggest that role of NOX4 during stretch is different from that of NOX2. On the other hand, from the results of TAC model mice, there was an effect of NOX4 on overload, but details could not be clarified.

研究分野：心臓生理学

キーワード：NADPH oxidase 4 活性酸素(ROS) メカノトランスダクション 単離心筋細胞 圧負荷 心不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞がどのように力学刺激を受け入れ、生理・病態反応や遺伝子発現に転換するかという過程の分子機構をメカノトランスダクションという。心臓は常に収縮弛緩を繰り返し、機械刺激を受けている状態でありメカノトランスダクションの解明は、心臓生理を理解する上で非常に重要である。ところで、近年心筋細胞において伸展刺激が加わると、ROS(活性酸素: Reactive oxygen species) 生産機構として知られている NOX2 (NADPH オキシダーゼ 2) を介して産生された ROS が、リアノジン受容体を刺激しカルシウムスパーク(リアノジン受容体からの局所的かつ自発的なカルシウム放出現象)を増加することが明らかとされた(X-ROS signaling)。つまり、前負荷増大時に収縮力が増大するといわれているフランク・スターリングの法則において ROS は重要なカルシウム動態を修飾していると言える。また一方で、NOX ファミリーの NOX4 が圧負荷による心不全の病態進行に関与しているとの報告があり、メカノトランスダクションへの関与が疑われているが、NOX4 の調節機構には、諸説あり解明しきれていないのが現状である。そこで我々は心臓におけるメカノトランスダクションに NOX2 だけでなく NOX4 も関与しているとの仮説に思い至った。

2. 研究の目的

心臓は収縮弛緩を繰り返しているため常に機械刺激下にあるが、先に述べた背景より機械刺激は、ROS を介しカルシウム動態に影響を及ぼしていることが明らかとされ生理機能に大きく関与している。一方で ROS は、慢性的な機械刺激から心不全をもたらす病原因子としても重要である。我々は心筋細胞でのメカノトランスダクションにおいて、NOX4 由来の ROS が関わっているとの仮説のもとに、独自の単離心筋細胞伸展システムを用いて、NOX4 が生理的および心不全形成に関わる病態生理的メカノトランスダクションに及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウスより摘出した心臓をランゲンドルフ灌流下で酵素灌流後、心筋細胞を単離し独自の単離心筋細胞伸展刺激システム(図1)を用いて細胞に伸展刺激を加えた。単離細胞の両端は、伸展刺激を加えるためにガラス管に装着された直径約 10 μ m のカーボンファイバーによって保持された。カーボンファイバーは、接着剤等を用いることなく静電気の力によって細胞の両端を保持し、かつ、コンピューター制御のピエゾモーターを用いることで数 nm 精度にて機械刺激を制御することが出来る。

このシステムを用いて、単一細胞に伸展刺激を加え、その際の細胞内の ROS 産生量や、ミトコンドリア膜電位、カルシウムスパーク数、単一細胞における発生張力等を測定した。

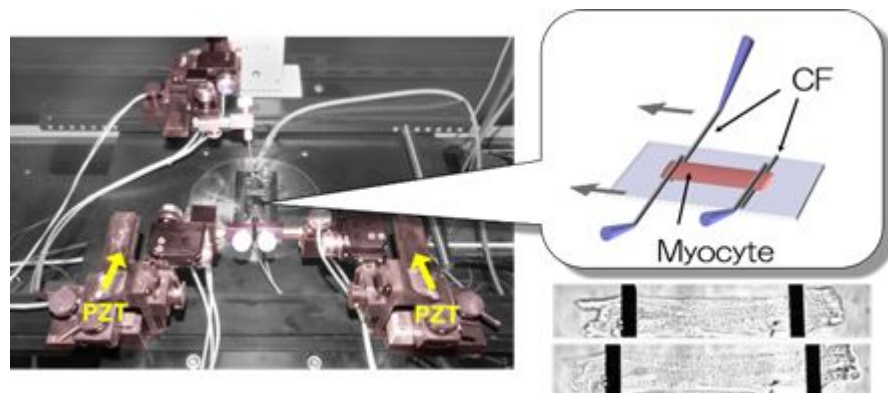


図 1 . 単離心筋細胞伸展システム

4. 研究成果

(1) NOX4KO (NOX4 ノックアウト) マウス単離心筋細胞伸展時の ROS 産生量・カルシウムスパーク数・発生張力の測定。

これまでの報告と同様に、C57BL/6 マウス (WT) において心筋細胞伸展時の ROS 産生の増加は、有意に認められた。一方で、NOX4 阻害剤である GKT136901 (10nM) 添加時および、NOX4KO マウス由来の心筋細胞伸展時は、有意な ROS 産生の増加が抑制された。そこで、単一心筋細胞における収縮力指標である ESFLR (end-systolic force length response) の測定を行ったところ、GKT136901 添加時、及び NOX4KO マウス由来心筋細胞に

において有意な収縮力の低下が確認された。つまり、NOX4 由来の ROS が伸展刺激時のカルシウム動態に影響していることが示唆された。そこで次に、NOX4 由来の ROS による NOX2 の活性化報告より NOX2 の上流に NOX4 が存在する可能性を考え、伸展時のカルシウムスパーク数の測定を行ったところ、GKT136901 添加時、及び NOX4KO マウス由来心筋細胞共に C57BL/6 と相違なく伸展刺激を加えるとカルシウムスパーク数は優位に増加した (図 2)。この結果より、NOX2 とは異なったメカニズムにて NOX4 は、伸展刺激時のカルシウム動態に影響していることが示唆された。しかし、この NOX4 の関与するメカニズムについての説明は、これからの研究課題である。

(2) ミトコンドリア機能解明のため伸展刺激時ミトコンドリアの膜電位を測定。

NOX4 のミトコンドリア局在を免疫染色にて確認した後 (図 3)、伸展時のミトコンドリア膜電位測定をおこなった。通常、心筋細胞伸展時にはミトコンドリア膜電位は、過分極する。この反応は、ATP 合成のための電気化学勾配が大きいことを意味し、前負荷が増加した際にフランク・スターリングの法則に伴い収縮力を増加させるための ATP 合成に対応した反応であると言える。そこで、ミトコンドリアに局存在する NOX4 が伸展時の膜電位

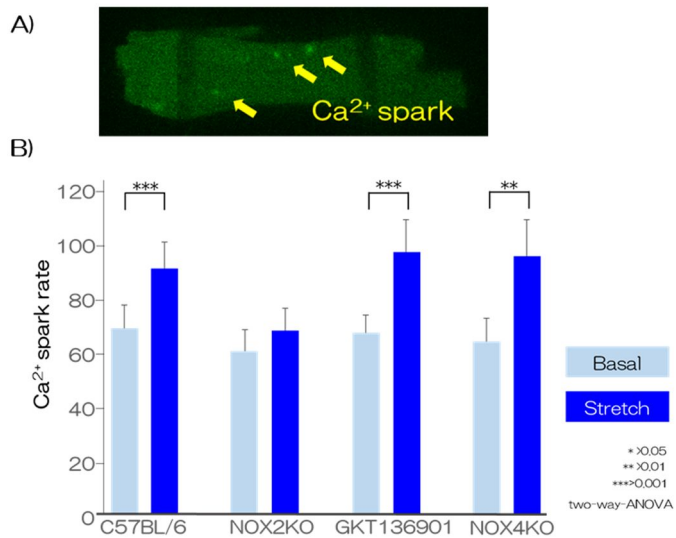


図 2: 単離心筋細胞伸展時のカルシウムスパーク数変化

A) 単離心筋細胞にカルシウム指示薬をロードし顕微鏡下でリアノジン受容体からの自発的・局所的なカルシウム放出現象カルシウムスパークを観察した
B) サルコメア長を基準とし約8%の伸展を加える前後5秒間におけるカルシウムスパーク数を表した

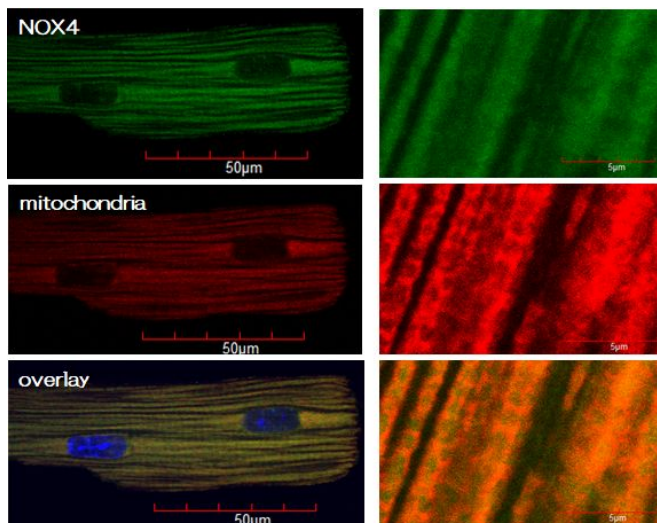


図 3: C57BL/6 マウス由来心筋細胞における NOX4 の局在

過分極にどのように影響を及ぼすかを明らかにするために、GKT136901 添加時、及び NOX4KO マウス由来心筋細胞についてミトコンドリア膜電位の測定を行ったところ、C57BL/6 と同様に伸展時のミトコンドリア膜電位は過分極した。つまり、NOX4 は伸展時のミトコンドリア膜電位には、影響を及ぼさないことが明らかとなった。

(3) 心不全モデルマウスにおける機能不全の及ぼす NOX4 の影響。

伸展時のミトコンドリア膜電位は過分極するが、心不全が進行した心臓においてはミトコンドリア機能低下が言われており伸展刺激によるミトコンドリア膜電位への影響は明らかでない。そこで、横行大動脈縮窄術 (TAC : Transverse aortic constriction) にて心臓に圧負荷をかけ

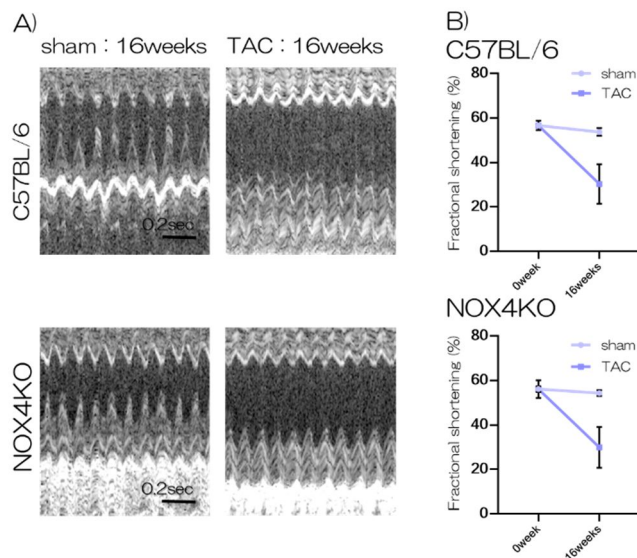


図 4 : TAC 手術後の心エコー検査による心機能評価

A) 乳頭筋レベルの左心室短軸断面画像をMモードで測定した
B) Mモード画像より、収縮力の指標となる左室内径短縮率 (FS) を算出した

心不全を誘導し、十分に病態が進行した 16 週目のマウス (図 4) を用いて伸展時のミトコンドリア膜電位を測定した。C57BL/6 で優位な収縮力低下による心機能の低下が確認できた心臓より単離した心筋細胞においては、ESFLR も優位に低下していたが、伸展時のミトコンドリア膜電位は、予想に反し正常心筋細胞と相違なく過分極した。また、病態進行の原因物質である ROS に関して、予想に反しベースラインでの ROS 産生量、伸展時の ROS 産生量変化共に、正常と病態間の有意差はなかった。

続いて、NOX4 の影響を明らかにするために NOX4KO マウスを用いて TAC 手術を行ったところ、NOX4KO マウスに TAC 手術施行後を施しても病態が進行しないとの報告とは異なり心不全への進行が確認できた (図 4)。この現象の相違メカニズムを検証することは出来なかったが、報告で使用された NOX4KO マウスは心臓特異的 NOX4 欠損マウスであるのに対し、今回使用した NOX4KO マウスは全身 NOX4 欠損マウスという相違があった。NOX4 は、心筋細胞だけでなく血管内皮にも発現することが知られており TAC 手術を施した NOX4 欠損マウスにおいては、血管からの影響も考えられる。よって、心不全移行への NOX4 の影響を明らかにするためには、今後のさらなる研究が必要である。また、TAC 手術を施した NOX4KO マウスでは、心エコーによる心機能低下が確認できるにも関わらず、単一細胞における収縮力の指標である ESFLR が上昇するという矛盾した結果となったが、詳細についてはさらなる研究が必要である。

本研究結果より急性伸展刺激による負荷応答には、NOX4 由来の ROS が収縮力の増加に関与しているがそのメカニズムは不明であり、また、慢性的な負荷応答に対しても NOX4 の関与が疑われるがその結果は矛盾しており、詳細解明のためには今後のさらなる研究が必要である。本研究により明らかとなったメカノトランスダクションにおける NOX4 の役割は、フランク・スターリングの法則における心機能を理解する上で非常に重要であり、また、さらなる研究において慢性的な負荷応答に対する NOX4 の影響を明らかにすることは今後の心不全治療へのアプローチへとつながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Cameron Breanne A., Kai Hiroaki, Kaihara Keiko, Iribe Gentaro, Quinn T. Alexander	4. 巻 11
2. 論文標題 Ischemia Enhances the Acute Stretch-Induced Increase in Calcium Spark Rate in Ventricular Myocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 289 ~ 298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2020.00289	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 Iribe Gentaro, Kaihara Keiko, Yamaguchi Yohei, Nakaya Michio, Inoue Ryuji, Naruse Keiji	4. 巻 130
2. 論文標題 Mechano-sensitivity of mitochondrial function in mouse cardiac myocytes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Progress in Biophysics and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 315 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pbiomolbio.2017.05.015	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 貝原恵子、成瀬恵治、入部玄太郎
2. 発表標題 Effects of NADPH oxidase (NOX) 4 on single cell mechanics in mouse ventricular cardiomyocytes.
3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桂大輔、貝原恵子、赤嶺透子、成瀬恵治、入部玄太郎
2. 発表標題 マウス心筋の伸展誘発性活性酸素産生およびミトコンドリア過分極におけるパネキシンヘミチャネルの役割
3. 学会等名 第71回 日本生理学会中国四国地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤嶺透子、貝原恵子、桂大輔、成瀬恵治、入部玄太郎
2. 発表標題 心筋バイオメカニクス制御におけるプリン作動性シグナリングの役割
3. 学会等名 第42回 日本生体医工学会中国四国支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Katsura, Gentaro Iribe, Keiko Kaihara, Keiji Naruse.
2. 発表標題 Role of pannexin hemichannel on stretch-induced mitochondrial hyperpolarization in cardiomyocytes
3. 学会等名 9th FAOPS CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Kaihara, Gentaro Iribe, Hiroaki Kai, Keiji Naruse.
2. 発表標題 Single cell mechanics effects of NADPH oxidase (NOX) 4 in mouse ventricular cardiomyocytes.
3. 学会等名 第56回 生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Kaihara, Gentaro Iribe, Yohei Hayama, Hiroaki Kai, Keiji Naruse
2. 発表標題 Effects of stretch-induced reactive oxygen species on single cell mechanics in mouse ventricular cardiomyocytes.
3. 学会等名 第95回 日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Kai, Gentaro Iribe, Keiko Kaihara, Yohei Yamaguchi, Keiji Naruse
2. 発表標題 Effects of stretch-induced reactive oxygen species on calcium handling in mouse ventricular cardiomyocytes
3. 学会等名 第95回 日本生理学会大会
4. 発表年 2018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	入部 玄太郎 (Iribe Gentaro) (90284885)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	