

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19200037

研究課題名（和文）

心不全発症における機械負荷様式の多様性～機械受容分子応答機構と新規治療開発

研究課題名（英文） The role of mechanosensor on cardiovascular disease.

研究代表者

成瀬 恵治（NARUSE KEIJI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40252233

研究成果の概要（和文）：近年、肥大の分子メカニズムが解明されつつあるが、臨床的に経験される肥大は、心負荷の機械的・時間的特性に依存した多様な応答であり、一元的な現象ではない。本研究では、心不全発症における筋形質膜の  $Ca^{2+}$  輸送体の制御機構を解明するトランスレーショナルリサーチを展開して、実際の臨床で見られる機械負荷様式が多様な心不全に適用できる  $Ca^{2+}$  ハンドリング是正治療を新規治療として開発することを目的とする。

研究成果の概要（英文）： In order to elucidate the in vivo mechanotransduction system, it is essential to conduct molecular cell physiological analysis targeting mechanosensitive channel molecules, as well as physiological assessment using knockout mice. In this study, we will examine whether or not hemodynamic loads such as hypertension can cause such dysfunction of the mechanosensitive channel, and explore the roles of the mechanosensor in relation to the formation of hypertrophy and progression of heart failure. The elucidation of the molecular pathway involved in the exacerbation of heart failure will enable us to sift through novel treatment target molecules and treatment research subjects in line with the actual clinical settings.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	16,100,000	4,830,000	20,930,000
2008年度	14,600,000	4,380,000	18,980,000
2009年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
年度			
年度			
総計	38,000,000	11,400,000	49,400,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：心肥大、心不全、メカノセンサー、Ca<sup>2+</sup>ハンドリング、トランスレーショナルリサーチ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床における多様な負荷様式による肥大形成（圧負荷と容量負荷）

近年、肥大の分子メカニズムが解明されつつあるが、臨床的に経験される肥大は、心負荷の機械的・時間的特性に依存した多様な応答であり、一元的な現象ではない。顕著な具体例として圧負荷と容量負荷があり、前者として大動脈弁狭窄症の求心性肥大が、後者として大動脈弁閉鎖不全症の左室内腔拡大が挙げられる。両者とも心筋量は増大し、心肥大による合目的な生理的代償機構と認識されているが、全く異なる左室形態形成メカニズムは明らかになっていない。

圧負荷と容量負荷の相違点として機械的要素の他に、心室に高い壁張力を生じさせる時間的要素が挙げられる。圧負荷の増加は心筋細胞内カルシウム濃度の高い収縮期に高い壁張力を生じ、容量負荷は心筋細胞からカルシウムが排出されている拡張期に機械的刺激を増大させる。このような異なる負荷に対する心筋細胞応答の分子メカニズムは不明であった。

(2) 肥大誘導様式におけるCa<sup>2+</sup>ハンドリング分子の活性の違い

一般に、心筋細胞内Ca<sup>2+</sup>ハンドリング異常は、Ca<sup>2+</sup>流入系の異常のみならず、Ca<sup>2+</sup>汲み出し系、筋小胞体機能の低下によっても起こりうる。つまり、肥大発症・不全進行過程において、細胞内のどこのCa<sup>2+</sup>ハンドリング機能に異変が生じて、細胞自身が適応できる過程が存在する。このことが逆に、

Ca<sup>2+</sup>ハンドリング是正治療のターゲット分子を確立することを難しくしている。単に、細胞内のCa<sup>2+</sup>オーバーロードを回避するだけでは、病態を改善できない例も報告されている。

筋小胞体Ca<sup>2+</sup>チャネル・リアノジン受容体の機能調節メカニズムは精力的に行われており、また細胞内Ca<sup>2+</sup>除去における寄与が大きいことから治療効果が期待できる。過去に、重篤な心不全を示すマウスの小胞体機能を改善することで、心機能が劇的に回復されたという報告があるが(Hoshijima M, 2002, Nat. Med.)、小胞体機能の改善のみでは心機能が回復しないケースがあることも最近知られるようになった(Song Q, 2003, J. Clin. Inv.)。この理由は、単にCa<sup>2+</sup>オーバーロードを回避することよりも、病態発症において、どの段階でどの分子が機能異常をきたすかということが、想像以上にその後の不全進行度合いに寄与しているためでないかと考えられる。このことから、多様な負荷様式により生じる肥大発症メカニズムを詳細に解析し、どのCa<sup>2+</sup>輸送体がどの段階で機能破綻をひきおこすのか、そのことが筋収縮力・心機能にどう影響するかを明らかにする必要があると考えられた。

## 2. 研究の目的

臨床的に経験される心肥大は、心負荷の機械的・時間的特性に依存した多様な応答であり、一元的な現象ではない。我々は、これまで、心不全においてCa<sup>2+</sup>過負荷をもた

らす「Ca<sup>2+</sup>輸送体そのもの」の制御機構を解析してきた。本申請研究では、多様な肥大誘導様式において、これら Ca<sup>2+</sup>輸送体の制御機構を詳細に解析したい。また、これら Ca<sup>2+</sup>輸送体を中心とした筋細胞形質膜の分子複合体の分子応答メカニズムを明らかにすることで、様々な負荷による心筋肥大-心不全進行過程を分子レベルから細胞・臓器レベルまで階層的・統合的に把握することが可能になると考えている。本研究では、心不全発症における筋形質膜の Ca<sup>2+</sup>輸送体の制御機構を解明するトランスレーショナルリサーチを展開して、実際の臨床で見られる機械負荷様式が多様な心不全に適用できる Ca<sup>2+</sup>ハンドリング是正治療を新規治療として開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、「肥大発症様式が異なれば、心臓そのものにかかる機械的負荷が異なるために、同じ肥大でも分子応答機構は全く異なる。このような異なる機械負荷状況下においては、当然そこで働く細胞内シグナル伝達経路が変わってくるため、そこで働く Ca<sup>2+</sup>輸送体の活性制御メカニズムにも違いが生じている。このことが、その後の心不全進行速度・悪化度合いを決定する因子となる。」のではないかという仮説を実験的根拠に基づいて証明する。

(1) 多様な肥大誘導モデルを使い、肥大応答の分子機序を解明する。

我々は、これまでの研究において、肥大誘導形式によって、心筋細胞内で活性化されるシグナリング経路に違いがあることを明らかにしてきた。肥大誘導様式によって心臓にかかる負荷は異なるが、特に、この際の Ca<sup>2+</sup>輸送体（機械受容チャネル

TRPV2 や Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換体）には、分子の活性状況を反映するような修飾状況の違いが生じていることを見出した。

圧負荷や容量負荷のような、機械的負荷の様式の異なるモデル動物において、これらの Ca<sup>2+</sup>輸送体の分子修飾状況を詳細に検討する。このことにより、トランスジェニックマウスの研究からでは一見同化であるとみなされている肥大という現象を、分子レベルで違うものと区別できる。また、このような違いを生み出す分子経路を明らかにすることにより、実際の臨床に即した新規治療ターゲット分子・治療研究対象をクローズアップすることが可能となる。

(2) トランスジェニックマウスの解析による病態への役割

作製した心筋細胞の機械受容感受性を調節したトランスジェニックマウスを用いて、圧負荷および容量負荷、大動脈結紮等、アドレナリン受容体アゴニスト刺激、虚血再還流モデル等、様々な肥大・不全誘導を施し、正常マウスに同様の刺激を施したときに比べ、表現型（組織・細胞形態、Ca<sup>2+</sup>トランジェント・収縮能力、細胞内シグナリング経路・まるごとの心臓の心機能評価）にどのような違いが生じるか詳細に解析する。

### 4. 研究成果

本研究を通して、Ca<sup>2+</sup>ハンドリング分子の修飾変化・機能変化を、生体レベルの実験から確認することができた。また、遺伝子操作した分子の役割を、生体レベルで検証することが可能となった。これらの遺伝子改変マウスから、肥大耐性を示すもの、重篤な心不全を示すもの等、様々な表現型を示すものが得られた。重篤な心不全を示

すマウスは、その後の治療研究にも、役立てることができる。また、これらのマウスと、既存のCa<sup>2+</sup>ハンドリング分子をターゲットとしたトランスジェニックマウスとの掛け合わせ実験により、肥大・不全への進行は、単にCa<sup>2+</sup>オーバーロードを回避することにあらずという生理的Ca<sup>2+</sup>ハンドリングの複雑性・緻密性を示す実験的証拠が得られた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 29 件)

(1)Matsuura K, Hayashi N, Takiue C, Hirata R, Habara T, Naruse K: Blastocyst quality scoring based on morphologic grading correlates with cell number. Fertil Steril、査読有、2010 Jan 14. [Epub ahead of print]

(2)Matsuura K, Hayashi N, Kuroda Y, Takiue C, Hirata R, Takenami M, Aoi Y, Yoshioka N, Habara T, Mukaida T, Naruse K: Improved development of mouse and human embryos using a tilting embryo culture system. Reprod Biomed Online、査読有、20: 358-364 (2010)

(3)Yamada A, Mohri S, Nakamura M, Naruse K: A fully automated pH measurement system for 96-well microplates using a semiconductor-based pH sensor. Sensors & Actuators: B. Chemical、査読有、143: 464-469 (2010)

(4)Ito S, Suki B, Kume H, Numaguchi Y, Ishii M, Iwaki M, Kondo M, Naruse K, Hasegawa Y, Sokabe M: Actin cytoskeleton regulates stretch-activated Ca<sup>2+</sup> influx in human pulmonary microvascular endothelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol、査読有、2009 Jul 31. [Epub ahead of print]

(5)Cheng CM, Matsuura K, Wang IJ, Kuroda Y, Leduc PR, Naruse K: Fabricating small-scale, curved, polymeric structures with convex and concave menisci through interfacial free energy equilibrium. Lab Chip、査読有、9(22): 3306-3309(2009)

(6)Iwaki M, Ito S, Morioka M, Iwata S, Numaguchi Y, Ishii M, Kondo M, Kume

H, Naruse K, Sokabe M, Hasegawa Y: Mechanical stretch enhances IL-8 production in pulmonary microvascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun、査読有、389(3): 531-536(2009)

(7)Mochizuki T, Sokabe T, Araki I, Fujishita K, Shibasaki K, Uchida K, Naruse K, Koizumi S, Takeda M, Tominaga M: The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca<sup>2+</sup> influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. J Biol Chem、査読有、284(32): 21257-21264(2009)

(8)Tetsunaga T, Furumatsu T, Abe N, Nishida K, Naruse K, Ozaki T: Mechanical stretch stimulates integrin alphaVbeta3-mediated collagen expression in human anterior cruciate ligament cells. J Biomech、査読有、42(13): 2097-2103(2009)

(9)Naruse K, Tang QY, Sokabe M: Stress-Axis Regulated Exon (STREX) in the C terminus of BK(Ca) channels is responsible for the stretch sensitivity. Biochem Biophys Res Commun、査読有、385(4): 634-639(2009)

(10)Ishii M, Numaguchi Y, Okumura K, Kubota R, Ma X, Murakami R, Naruse K, Murohara T: Mesenchymal stem cell-based gene therapy with prostacyclin synthase enhanced neovascularization in hindlimb ischemia. Atherosclerosis、査読有、206(1): 109-118(2009)

(11)Iwata M, Suzuki S, Hayakawa K, Inoue T, Naruse K: Uniaxial cyclic stretch increases glucose uptake into C2C12 myotubes through a signaling pathway independent of insulin-like growth factor I. Horm Metab Res、査読有、41(1): 16-22(2009)

(12)Hyakutake T, Hashimoto Y, Yanase S, Matsuura K, Naruse K: Application of a numerical simulation to improve the separation efficiency of a sperm sorter. Biomed Microdevices、査読有、11(1): 25-33(2009)

(13)Suemori T, Morimatsu H, Mizobuchi S, Morita K, Katanosaka Y, Mohri S, Naruse K: Impairment of leukocyte deformability in patients undergoing esophagectomy. Clin Hemorheol Microcirc、査読有、41(2):

127-136 (2009)

(14) Katanosaka Y, Bao JH, Komatsu T, Suemori T, Yamada A, Mohri S, Naruse K: Analysis of cyclic-stretching responses using cell-adhesion-patterned cells. J Biotechnol、査読有、133(1): 82-89 (2008)

(15) Shimizu N, Yamamoto K, Obi S, Kumagaya S, Masumura T, Shimano Y, Naruse K, Yamashita JK, Igarashi T, Ando J: Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor  $\beta$ . J Appl Physiol、査読有、104: 766-772 (2008)

(16) Hirano Y, Ishiguro N, Sokabe M, Takigawa M, Naruse K: Effects of tensile and compressive strains on response of a chondrocytic cell line embedded in type I collagen gel. J Biotechnol、査読有、133(2): 245-252 (2008)

(17) Ito S, Kume H, Naruse K, Kondo M, Takeda N, Iwata S, Hasegawa Y, Sokabe M: A novel  $Ca^{2+}$  influx pathway activated by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells. Am J Respir Cell Mol Biol、査読有、38(4): 407-413 (2008)

(18) Yasui F, Miyazu M, Yoshida A, Naruse K, Takai A: Examination of signalling pathways involved in muscarinic responses in bovine ciliary muscle using YM-254890, an inhibitor of the Gq/11 protein. Br J Pharmacol、査読有、154(4): 890-900 (2008)

(19) Kajiya M, Hirota M, Inai Y, Kiyooka T, Morimoto T, Iwasaki T, Endo K, Mohri S, Shimizu J, Yada T, Ogasawara Y, Naruse K, Ohe T, Kajiya F: Impaired NO-mediated vasodilation with increased superoxide but robust EDHF function in right ventricular arterial microvessels of pulmonary hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol、査読有、292(6): H2737-H2744 (2007)

(20) Iwata M, Hayakawa K, Murakami T, Naruse K, Kawakami K, Inoue-Miyazu M, Yuge L, Suzuki S: Uniaxial cyclic stretch-stimulated glucose transport is mediated by a  $Ca^{2+}$ -dependent mechanism in cultured skeletal muscle cells. Pathobiology、査読有、74(3): 159-168 (2007)

(21) Mohri S, Nakamura M, Naruse K: Automation of pH measurement using a flow-through type differential pH sensor system based on pH-FET. IEEJ Trans SM、査読有、127(8):367-370 (2007)

[学会発表] (計 174 件)

招待講演・シンポジウム(国際)

(1) Naruse K、Mechanobiology、International Symposium on Nanobio-Interfaces Related to Molecular Mobility、2009年11月9-10日、Tokyo

[図書] (計3件)

(1) 片野坂友紀、竹内 崇、貝原恵子、成瀬恵治、第7章生体組織への近似化、分化制御 3. 伸展培養法、実験医学別冊 改訂 培養細胞実験ハンドブック、pp247-251、2008年、(株)羊土社出版

(2) 片野坂友紀、入部玄太郎、山田 章、成瀬恵治、第5章 心血管系細胞への機械刺激負荷技術、バイオテクノロジーシリーズ 細胞分離・操作技術の最前線、pp265-275、2008年、(株)シーエムシー出版

(3) 片野坂友紀、竹内 崇、成瀬恵治、第3章 細胞機能解析技術. メカニカルストレスに対する細胞応答の解析技術、次世代医療のための高分子材料工学、pp158-167、2008年、シーエムシー出版

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

(1) 名称: 自己組織化ペプチドおよび高強度ペプチドゲル

発明者: 永井祐介、横井秀典、上杉晃司、成瀬恵治

権利者: (株)メニコン、国立大学法人岡山大学

種類: 特願

番号: 特願 2009-054983、PCT/JP2010/052047

出願年月日: 21年3月9日、22年2月12日

国内外の別: 国外

(2) 名称: 卵細胞の培養装置及びその方法

発明者: 成瀬恵治、舟橋弘晃、石田敬雄、松浦宏治、原 鐵晃

権利者: 国立大学法人岡山大学

種類: 特願

番号: 特願 2007-194968 PCT/JP2008/063624

出願年月日: 平成19年7月

国内外の別: 国外

(3) 名称: 受精卵の培養方法及び受精卵の培養装置

発明者：成瀬恵治、石田敬雄  
権利者：ストレックス(株)及び岡山大学  
種類：特願  
番号：特願 2008-90926  
出願年月日：20 年 3 月 31 日  
国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

(1)名称:pH または濃度の測定装置及び pH または濃度の測定方法

発明者：山田 章、中村通宏、毛利 聡、成瀬恵治

権利者：国立大学法人岡山大学

種類：特許

番号：特許 4452843 号

取得年月日：22 年 2 月 12 日

国内外の別：国内

〔その他〕

報道関連情報

(1)2009. 12. 28 日本経済新聞 「不妊治療の受精卵培養 母胎に似た環境で」

(2)2008. 10 ジネコ新聞 最先端医療の現場を拝見

(3)2008. 4. 1 日刊工業新聞 不妊治療で装置出荷 卵細胞の培養促進

(4)2008. 1. 7 日本産業新聞 「受精胚の培養装置」

(5)2007. 12. 11 日刊工業新聞 「不妊治療の装置開発」

(6)2007. 12. 5 日経新聞 「泳ぐ力が強い精子選別」

(7)2007. 10. 10 山陽新聞 「岡山大の卵細胞培養装置 大阪の企業に技術移転 T L O」

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

成瀬 恵治 (NARUSE KEIJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40252233

### (2)研究分担者

毛利 聡 (MORI SATOSHI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00294413

松井 秀樹 (MATSUI HIDEKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30157234

富澤 一仁 (TOMIZAWA KAZUHITO)

熊本大学・大学院医学薬学研究科・教授

研究者番号：40274287

片野坂 友紀 (KATANOSAKA YUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60432639

入部 玄太郎 (IRIBE GENTARO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90284855

中村 一文 (NAKAMURA KAZUFUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10335630

草野 研吾 (KUSANO KENGO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：60314689

大江 透 (OHE TOHRU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70263556