

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07286

研究課題名(和文)胎児心臓においてミトコンドリア機能が心拍動開始時に果たす役割の機序の解明

研究課題名(英文)A study of mitochondrial function on the mechanisms of heartbeat initiation in embryonic heart

研究代表者

當瀬 規嗣(Noritsugu, Tohse)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：80192657

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):心臓がいつ、どのように動き出すのかを明らかにするため、本研究では、ラット胎仔心臓を用いて、心臓拍動開始時の心筋ミトコンドリアの機能と心拍動維持や興奮収縮連関との関連を明らかにすることを目的としている。また、心拍動開始前後で心筋収縮を担う筋原線維やサルコメア構造の変化と関連タンパク質を解析し、心拍動開始期の心筋収縮装置の発達を明らかにすることを目的としている。心拍動開始には低酸素誘導因子(HIF-1)活性化による代謝の制御が重要な役割を持つことが示唆された。また、心拍動開始直後に見られる未成熟な筋原線維構造と関連タンパク質の発現上昇が最初期の心拍動を構成する重要な因子であ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

本研究は、生命の源と言える心拍動開始のメカニズムを、実際の心筋細胞を用い、エネルギー代謝の観点から明らかにするものであり、心臓拍動開始前後といった、心筋細胞への分化が決定される重要な時期に、実際の心臓における心臓拍動維持に必要な機構を解明することで再生医療の発展にも寄与できる。また、低酸素環境下でも自動能を維持する心筋細胞の仕組みが分かれば、洞不全症候群など疾患の新しい治療法の開発にも繋がる可能性がある。以上より、本研究は今後臨床応用が期待されている再生医療に実際の心臓の生理学的知見の提供という貢献を行うことができ、独自性・独創性が高く研究価値が高いと考える。

研究成果の概要(英文):The initiation of heartbeat is an essential step in cardiogenesis in the heart primordium, but it remains unclear how intracellular metabolism responds to increased energy demands after heartbeat initiation. Myofibrillogenesis is an essential process for cardiogenesis and is closely related to excitation-contraction coupling and the maintenance of heartbeat. However, how myofibrils and sarcomeres are associated with heartbeat initiation in the early embryonic heart development also remains unclear. In our study, it is suggested that the HIF-1-mediated enhancement of glycolysis with activation of the pentose phosphate pathway, potentially leading to antioxidant defense and nucleotide biosynthesis, covers the increased energy demand in the beating heart. And it is also suggested that heartbeat initiation can be induced by development of bundles of myofilaments with up-regulated proteins associated with myofibrillogenesis, whereas sarcomeres are not required for the initial heartbeat.

研究分野：生理学

キーワード：胎児心臓 心臓代謝 ミトコンドリア機能 サルコメア構造

1. 研究開始当初の背景

個体の発生において、心臓はあらゆる臓器に先立ち形成され、血液が形成される前から拍動を開始する。心拍動は最初の収縮から一定のリズムを持って繰り返されているが、心拍動の最初のきっかけについては不明な点が多い。心臓がいつ、どのように動きだすのかを明らかにするため、我々は拍動開始前後の心臓の生理学的特徴について研究してきた。胎児は低酸素の環境下で発生・分化・発達する。細胞の分化・誘導シグナルの活性化には低酸素環境が重要であるとの報告があり、合目的であるとする説が提唱されてきた。一方、胎児循環の中心を担う心臓は、全ての臓器に先駆けて発生し、低酸素の環境下で胎児循環を維持する必要がある。胎児の心臓は低酸素の環境下においても、心臓自身を含めた臓器に血液を供給する必要があり、胎児の各臓器の中で最もエネルギー需要が高い臓器である。実際、ヒトでは先天性心疾患は出生の約1%に生じ、心臓が最も頻度が高い先天異常をきたしうる臓器である事実からも、胎生期の心臓の発生・分化・発達が、環境の変化に敏感であることが推測される。胎児は常に低酸素の環境下にあり、胎児心筋のエネルギー代謝経路として解糖系が亢進していることが報告されているものの、嫌気性解糖のみで心拍動開始・維持に必要なエネルギーを賄うのは困難である。低酸素環境下の胎児心筋においても、心拍動維持のためにはミトコンドリアの電子伝達系が機能することが重要であると考えられるが、特にエネルギー需要が高まる心臓拍動開始直後の胎児心筋において、低酸素環境下でどのようにミトコンドリアが機能するのか詳細は明らかではない。心臓拍動開始後の胎児心筋のミトコンドリアは、成熟した細胞には有していない「特殊な機構」により効率よく電子授受を行い、エネルギー代謝に参加している可能性が考えられるが、このような特殊な機構の存在は証明されておらず、心臓拍動開始直後における心筋ミトコンドリアの興奮収縮連関および心臓拍動維持への役割については不明な点が多い。本研究では、ラット胎仔心臓を用いて、心臓拍動開始時の心筋ミトコンドリアの機能と心拍動維持や興奮収縮連関との関連を明らかにすることを目的としている。さらに、心拍動開始時の心筋エネルギー代謝と心拍動維持の関連を解明することは、再生医療の分野での応用も期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心臓拍動開始直後における心筋ミトコンドリアの役割を、低酸素の環境下で電子授受が可能となる機構に着目し、明らかにすること。また、心臓拍動開始直後における心筋ミトコンドリアの興奮収縮連関および自動能への役割を明らかにすること。である。

3. 研究の方法

心拍動開始前後のラット胎仔心臓における代謝物の網羅的評価を行うためにメタボローム解析を行った。また、細胞外フラックスアナライザーによる細胞代謝の評価を行った。さらに解糖系とペントースリン酸経路の上流因子の同定および機序探索について、胎仔心臓における関連タンパク質の発現を解析した。また、心筋の興奮収縮連関を構成する収縮タンパク質の解析を行うために、ラット胎仔の心拍動開始前、開始後、開始1日後の心筋の構造を電子顕微鏡で解析し、発現しているタンパク質のプロテオーム解析を行った。

4. 研究成果

メタボローム解析の主成分解析の結果、心臓拍動前の心臓原基ではペントースリン酸系の中間代謝物であるホスホリボシルピロリン酸、解糖系の中間代謝物であるフルクトース6リン酸、フルクトース1,6ビスリン酸が多く、心臓拍動後の心臓原基では、解糖系の副産物であるATP、ペントースリン酸経路の副産物である還元型グルタチオン、GTPが多かった。以上より、心臓拍動後で解糖系およびペントースリン酸経路が活性化していることが示唆された。細胞外フラックスアナライザーにより、単離心臓原基細胞の酸素消費速度(OCR)と細胞外酸化速度(ECAR)を評価した。心臓拍動後の心臓原基細胞では、心臓拍動前と比して、baseline OCR、ATP-linked OCR、maximal OCRが有意に高く、Baseline ECARには差を示さなかったものの、オリゴマイシン添加後のECARの変化で定義したglycolytic reserveが有意に高かった。以上より、心臓拍動後でミトコンドリア呼吸能と解糖予備能の活性化が示唆された。

心臓拍動開始後の心臓原基細胞は分化・増殖しながらも、酸素利用が限られる環境下で胎児循環を維持するため心臓としての機能を維持し続ける必要があり、特殊な代謝機構の存在が示唆される。本年度の研究結果から、心臓拍動後の心臓原基ではペントースリン酸経路の活性化により核酸や抗酸化物質の生成を担いつつ、解糖とミトコンドリア呼吸能の亢進によりエネルギー需要に応答していることが示唆された。

心臓拍動開始後の心臓原基では、心臓拍動開始前に比して、HIF-1の転写活性が増加し、HIF-

1 の蛋白発現が増加していた。また、HIF-1 の蛋白発現を負に制御する von Hippel Lindau 蛋白(pVHL)の発現が心臓拍動後に低下していたことから、pVHL の発現低下を介した HIF-1 の蛋白安定化が、心臓拍動後の HIF-1 シグナルの活性化の機序の 1 つであることが示唆された。HIF-1 シグナルは pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1) の蛋白発現亢進を介してミトコンドリア TCA 回路の律速段階である pyruvate dehydrogenase E1 サブユニット(PDEA1) の Ser293 のリン酸化を増加させることで、TCA 回路およびミトコンドリア呼吸能を負に制御することが報告されている。しかし、PDEA1 の Ser293 リン酸化は心臓拍動開始前後で差を認めなかった。一方、細胞内 calcium の増加によって発現が亢進し、PDEA1 の Ser293 リン酸化を減少させる Pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 (PDP1)の発現も心臓拍動後に増加していた。以上より、心臓拍動開始後は PDK1 と PDP1 の双方の発現増加を伴うため、PDH 活性を担う PDEA1 の発現には変化がなかったことが示唆された。ミトコンドリア電子伝達系の複合体サブユニットの発現は心臓拍動開始前後で差を認めなかった。これらの成果より、心臓拍動開始には HIF-1 シグナル活性化を介した代謝の制御が重要であることが示唆された。

ラット胎仔の心拍動開始前、開始後、開始 1 日後の心筋の構造解析と心筋タンパク質のプロテオーム解析を行ったところ、拍動開始 1 日後の細胞では明確なサルコメア構造が観察され、開始後の一部の細胞にはデンスボディ様の未成熟な筋原線維が観察されるものの、開始前の細胞では筋原線維は観察されなかった。一方、プロテオーム解析の結果から、拍動開始前から開始後でアップレギュレートされたタンパク質の中で、約 28%が筋原線維構成タンパク質、23%が筋原線維調節タンパク質であることが明らかとなった。以上のことから、心拍動の開始にはデンスボディ様の未成熟な筋原線維の出現と、筋原線維調節タンパク質の発現上昇が重要な要因となっていることが示唆された。

以上より、ラットの心拍動開始後の心臓はペントースリン酸経路の活性化と解糖ならびにミトコンドリア呼吸能の活性化が増大するエネルギー需要に応答しており、心拍動開始には低酸素誘導因子(HIF-1)活性化による代謝の制御が重要な役割を持つことが示唆された。さらに、心拍動開始直後に見られる未成熟な筋原線維と筋原線維関連タンパク質の発現上昇が最初期の心拍動を構成する重要な因子であることが示唆された。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato Tatsuya, Ichise Nobutoshi, Kobayashi Takeshi, Fusagawa Hiroyori, Yamazaki Hiroya, Kudo Taiki, Tohse Noritsugu	4. 巻 12
2. 論文標題 Enhanced glucose metabolism through activation of HIF-1 covers the energy demand in a rat embryonic heart primordium after heartbeat initiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-03832-5	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 Ichise Nobutoshi, Sato Tatsuya, Fusagawa Hiroyori, Yamazaki Hiroya, Kudo Taiki, Ogon Izaya, Tohse Noritsugu	4. 巻 13
2. 論文標題 Ultrastructural Assessment and Proteomic Analysis in Myofibrillogenesis in the Heart Primordium After Heartbeat Initiation in Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	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） 10.3389/fphys.2022.907924	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 房川祐頼、佐藤達也、一瀬信敏、小林武志、山崎寛也、寺島嘉紀、當瀬規嗣
2. 発表標題 心拍動開始時の胎児ラット心臓原基におけるCa ²⁺ ハンドリングに関わる分子発現変化の特徴
3. 学会等名 第100回日本生理学会北海道地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤達也、一瀬信敏、山崎寛也、小林武志、寺島嘉紀、千葉充将、當瀬規嗣
2. 発表標題 ラット胎生心の心拍動開始時におけるミトコンドリア機能の検討
3. 学会等名 第99回日本生理学会北海道地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuya Sato, Nobutoshi Ichise, Takeshi Kobayashi, Hiroya Yamazaki, Yoshinori Terashima, Noritsugu Tohse
2. 発表標題 Energy metabolism in rat fetal hearts just after the initiation of heartbeat is altered via increased glycolytic flux and activated mitochondrial function.
3. 学会等名 64th Annual Meeting of the Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuya Sato, Nobutoshi Ichise, Takeshi Kobayashi, Hiroya Yamazaki, Yoshinori Terashima, Noritsugu Tohse
2. 発表標題 Mitochondrial aerobic respiration in the fetal heart is activated just after initiation of the heartbeat.
3. 学会等名 第97回日本生理学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 達也, 一瀬 信敏, 房川 祐頼, 山崎寛也, 工藤 大樹, 黄金 勲矢, 當瀬 規嗣
2. 発表標題 心拍動開始後のラット胎児心臓原基では低酸素誘導因子1 (HIF-1) の発現増加を伴い 細胞内糖代謝が変化する
3. 学会等名 第101回日本生理学会地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsuya Sato, Nobutoshi Ichise, Hiroyori Fusagawa, Hiroya Yamazaki, Taiki Kudo, Izaya Ogon, Noritsugu Tohse.
2. 発表標題 Intracellular glucose metabolism is enhanced with activation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in a rat embryonic heart primordium after heartbeat initiation.
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 Hiroya Yamazaki, Nobutoshi Ichise, Tatsuya Sato, Taiki Kudo, Hiroyori Fusagawa, Izaya Ogon, Noritsugu Tohse.
2. 発表標題 Characteristics of sarcomere formation and expression patterns of myofibrillar components in a rat embryonic heart primordium after heartbeat initiation.
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022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	佐藤 達也 (Sato Tatsuya) (40592473)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究分担者	一瀬 信敏 (Ichise Nobutoshi) (60448610)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

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