

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08557

研究課題名(和文) 心臓常在マクロファージを介した尿酸による心房細動発症の新規分子機構の解明

研究課題名(英文) A study of the novel molecular mechanism of atrial fibrillation induced by cardiac resident macrophages in hyperuricemia

研究代表者

経遠 智一 (TSUNETO, Motokazu)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：60730207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心房細動の危険因子として高尿酸血症が関与することが報告されているが、詳細は不明である。近年心臓に存在する組織常在マクロファージが心筋とギャップジャンクションを介して結合し、これらが破綻すると伝導障害が起きることが報告された。本研究では、高尿酸血症による心房細動が心臓の常在マクロファージの挙動の変化によって引き起こされている可能性を、in vivoマウスモデルおよびin vitroの解析を通じて検討したところ、高尿酸血症モデルマウスの心臓常在マクロファージ数に変化はなかった。加えて、ヒトiPS細胞由来のペースメーカー細胞を使用して尿酸が与える影響を検討したところ電気生理学的に影響を与えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスの心臓常在マクロファージ数は高尿酸状態では変化しなかったため、心房細動とは関係ないことが示唆された。この実験は知りうる限り世界で初めて行われた実験であり、有意義だと思われる。

またマウスの実験は困難であったが、この科学研究費助成事業中にヒトiPS細胞からペースメーカー細胞を誘導する培養法を開発し、論文発表できた。そこで、この細胞を使用して試験管内で尿酸を添加し、パッチクランプ法を用いてヒトiPS細胞由来ペースメーカー細胞イオンチャネルの機能を検討した。尿酸添加群と非添加群でその機能に差は見られなかったが、この実験も世界で初めて行われたものであり、有意義だと思われる。

研究成果の概要(英文)：Hyperuricemia has been reported to be a risk factor for atrial fibrillation, but the details are unknown. Recently, it has been reported that tissue resident macrophages in the heart associate with the myocardium via gap junctions, and that their disruption causes conduction defects. In this study, we investigated the possibility that hyperuricemia-induced atrial fibrillation is caused by changes in the behavior of cardiac resident macrophages through in vivo mouse models and in vitro analysis, and found that the number of cardiac resident macrophages in hyperuricemia model mice did not change. In addition, the effects of uric acid were examined using human iPS cell-derived pacemaker cells, which showed no electrophysiological effects.

研究分野：循環器学

キーワード：高尿酸血症 心臓 常在マクロファージ 心房細動

### 1. 研究開始当初の背景

心房細動の危険因子として近年、高尿酸血症が関与することが報告されている[文献 1]が、詳細な機構は分かっていない。一方で、心臓に存在する組織常在マクロファージが心筋とギャップジャンクションを介して結合し、これらが破綻すると伝導障害が起きることが報告された[文献 2]。本研究では、高尿酸血症による心房細動が心臓の常在マクロファージの挙動の変化によって引き起こされている可能性を、in vivo マウスモデルおよび in vitro の解析を通じて検討する。

### 2. 研究の目的

(1) 高尿酸血症モデルマウスから取り出した心臓の常在マクロファージの炎症惹起性を検討する。(2) 尿酸による心臓の常在マクロファージの電気的特性の変化を検討する。(3) 高尿酸血症モデルマウスにおける心臓の常在マクロファージの心房局在、及び数の変化を調べる。すなわち本研究の目的は高尿酸血症による心房細動発症のメカニズムを、尿酸による心臓の常在マクロファージの直接的障害、あるいは間接的障害という2つの観点から検討することである。

また、追加として心筋への尿酸の直接的な影響を調べるため、ヒト心臓ペースメーカ細胞への尿酸の直接作用を検討する。そのために、ヒト iPS 細胞からペースメーカ細胞を分取できる遺伝子改変ヒト iPS 細胞株を樹立し、ペースメーカ細胞へ尿酸添加したときのペースメーカ細胞の電気的な変化を検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 高尿酸血症モデルマウスを薬剤を使用して作製し、心臓の常在マクロファージの数および心臓内での分布を検討した。高尿酸血症モデルマウスの作成について、マウスはヒトと違い尿酸が Urikase によってアラントインへと分解されてしまうため、Urikase 阻害剤を毎日投与しながら、高プリン体食を与えることによって高尿酸血症モデルマウスを作製した。

マウスの心臓常在マクロファージはフローサイトメトリーによって CD45+Lineage-F4/80+ として認識することが可能であり[文献 2]、これを用いてマクロファージの数を検討した。

(2) ヒト心臓のペースメーカ細胞はヒト iPS 細胞から誘導されたものを使用した。ただし、ヒト iPS 細胞から心筋へ誘導したものの中には他の心筋も混入していたため、ペースメーカ細胞を純化する必要があった。そこでペースメーカ細胞のマーカーであると考えられるイオンチャネル HCN4 と転写因子 SHOX2 の遺伝子発現を可視化できる HCN4-GFP/SHOX2-mCherry iPS 細胞を作製し、ペースメーカ細胞を GFP+/mCherry+ 両陽性細胞としてソーティングした。ソーティングしたペースメーカ細胞に尿酸を加え、パッチクランプ法で電気的特性の変化を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 予備実験では一度はマクロファージの数が減少したデータが得られていたが、二度目以降の実験ではその再現性が乏しかった。これは、高尿酸血症モデルマウスの作製の難しさ、心臓をフローサイトメトリーによって解析する際に必要である、心臓をバラバラにする工程の不安定さを克服しきれなかったことが原因の一つであると考えられる。また、心臓常在マクロファージを免疫染色にて識別することを試みたが、バックグラウンドシグナルが強く、抗体による認識ができなかった。心臓常在マクロファージの認識方法をノックインマウスを使用する等によって、精査する必要があると思われる。

(2) 追加実験としてヒト iPS 細胞由来のペースメーカ細胞を使用して尿酸が与える影響を検討することを試みた。そのために、まずヒト iPS 細胞からペースメーカ細胞を純化する必要があったため、Cas9 を使用した遺伝子改変 HCN4-GFP/SHOX2-mCherry ヒト iPS 細胞を作製した。この細胞は培養 60 日目に 4 種類の細胞分画が確認でき(図 1)、GFP+mCherry+ 両陽性細胞分画に 70% 以上のペースメーカ細胞の濃縮が確認できた。この結果は国際専門誌に論文として受理された[文献 3]。

このヒト iPS 細胞由来ペースメーカ細胞を使用して in vitro にて尿酸を 3 日間添加した。パッチクランプ法を用いてヒト iPS 細胞由来ペースメーカ細胞のイオンチャネルの機能を、電流 ( $I_{Ca,L}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{Na}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ) を調べる事により検討した。しかし、尿酸添加群と非添加群で差が見られなかった(図 2)。

以上のことより、高尿酸血症による心房細動への関与は、心臓常在マクロファージの数、及び、ヒトペースメーカ細胞のイオンチャネルの機能の変化によるものではないことが示唆された。

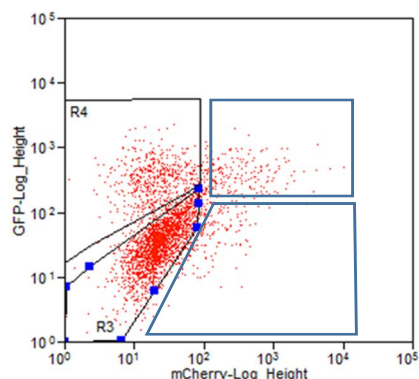


図 1. ヒトペースメーカ細胞の蛍光

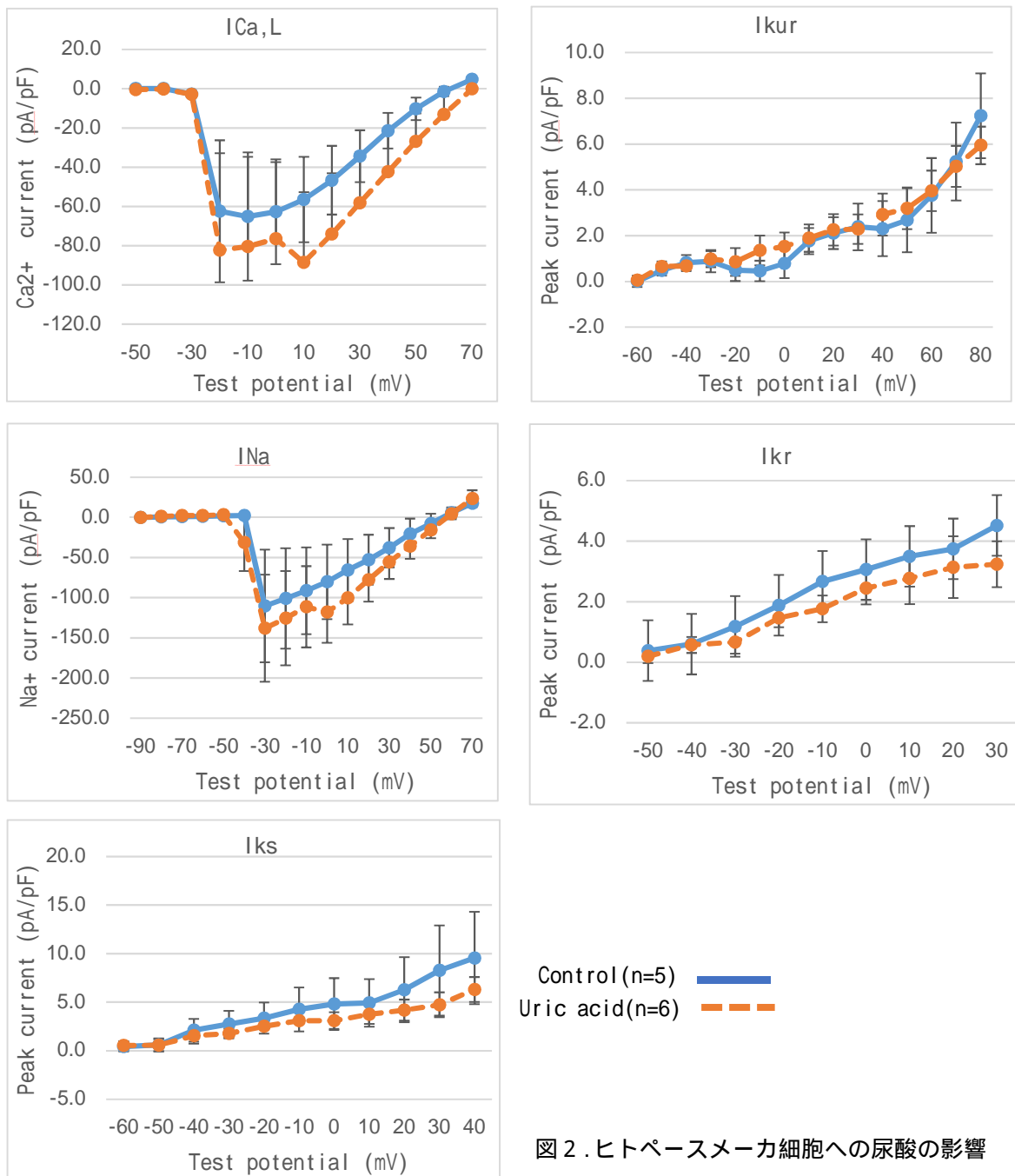


図2. ヒトペースメーカー細胞への尿酸の影響

#### 参考文献

1. Kuwabara M, Kuwabara R, Hisatome T, et al. "Metabolically Healthy" Obesity and Hyperuricemia Increase Risk for Hypertension and Diabetes: 5-year Japanese Cohort Study. *Obesity* 25:1997-2008. 2017
2. Hulsmans M, Clauss S, Xiao L, et al. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell* 169:510-522. 2017
3. Wakimizu T, Morikawa K, Fukumura K, et al. SHOX2 refines the identification of human sinoatrial nodal cell population in the in vitro cardiac differentiation. *Regen Ther.* 21:239-249. 2022

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horie H, Hisatome I, Kurata Y, Yamamoto Y, Notsu T, Adachi M, Li P, Kuwabara M, Sakaguchi T, Kinugasa Y, Miake J, Koba S, Tsuneto M, Shirayoshi Y, Ninomiya H, Ito S, Kitakaze M, Yamamoto K, Yoshikawa Y, Nishimura M.	4. 巻 45
2. 論文標題 1-Adrenergic receptor mediates adipose-derived stem cell sheet-induced protection against chronic heart failure after myocardial infarction in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hypertens Res	6. 最初と最後の頁 283-291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41440-021-00802-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otani N, Kurata Y, Maharani N, Kuwabara M, Ikeda N, Notsu T, Li P, Miake J, Yoshida A, Sakaguchi H, Higaki K, Nakasone N, Tsuneto M, Shirayoshi Y, Ouchi M, Ninomiya H, Yamamoto K, Anzai N, Hisatome I.	4. 巻 85
2. 論文標題 Esm1 and Stc1 as Angiogenic Factors Responsible for Protective Actions of Adipose-Derived Stem Cell Sheets on Chronic Heart Failure After Rat Myocardial Infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 657-666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circrep.CR-20-0016.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Mai, Horie Hiromu, Kurata Yasutaka, Inoue Yumiko, Notsu Tomomi, Wakimizu Takayuki, Adachi Maya, Yamamoto Kenshiro, Morikawa Kumi, Kuwabara Masanari, Sakaguchi Takuki, Morisaki Takayuki, Miake Junichiro, Nishimura Motonobu, Tsuneto Motokazu, Shirayoshi Yasuaki, Ito Shin, Kitakaze Masafumi, et al.	4. 巻 Online ahead
2. 論文標題 Esm1 and Stc1 as Angiogenic Factors Responsible for Protective Actions of Adipose-Derived Stem Cell Sheets on Chronic Heart Failure After Rat Myocardial Infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 Online ahead
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-20-0877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otani Naoyuki, Kurata Yasutaka, Maharani Nani, Kuwabara Masanari, Ikeda Nobuhito, Notsu Tomomi, Li Peili, Miake Junichiro, Yoshida Akio, Sakaguchi Hiromi, Higaki Katsumi, Nakasone Naoe, Tsuneto Motokazu, Shirayoshi Yasuaki, Ouchi Motoshi, Ninomiya Haruaki, Yamamoto Kazuhiro, Anzai Naohiko, Hisatome Ichiro	4. 巻 2
2. 論文標題 Evidence for Urate Uptake Through Monocarboxylate Transporter 9 Expressed in Mammalian Cells and Its Enhancement by Heat Shock	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 425 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circrep.CR-20-0016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minato Hiroyuki, Hisatome Ichiro, Kurata Yasutaka, Notsu Tomomi, Nakasone Naoe, Ninomiya Haruaki, Hamada Toshihiro, Tomomori Takuya, Okamura Akihiro, Miake Junichiro, Tsuneto Motokazu, Shirayoshi Yasuaki, Endo Ryo, Otsuki Akihiro, Okada Futoshi, Inagaki Yoshimi	4. 巻 43
2. 論文標題 Pretreatment with cilnidipine attenuates hypoxia/reoxygenation injury in HL-1 cardiomyocytes through enhanced NO production and action potential shortening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 380-388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-019-0391-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Adachi Maya, Watanabe Mai, Kurata Yasutaka, Inoue Yumiko, Notsu Tomomi, Yamamoto Kenshiro, Horie Hiromu, Tanno Shogo, Morita Maki, Miake Junichiro, Hamada Toshihiro, Kuwabara Masanari, Nakasone Naoe, Ninomiya Haruaki, Tsuneto Motokazu, et al.	4. 巻 83
2. 論文標題 -Adrenergic Blocker, Carvedilol, Abolishes Ameliorating Actions of Adipose-Derived Stem Cell Sheets on Cardiac Dysfunction and Remodeling After Myocardial Infarction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 2282 ~ 2291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-0261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 経遠 智一, 江橋 由夏, 久留 一郎
2. 発表標題 ヒト血管内皮細胞への尿酸塩結晶の影響の検討
3. 学会等名 第55回日本痛風・尿酸核酸学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 脇水 孝之, 経遠 智一, 白吉 安昭, 久留 一郎
2. 発表標題 HCN4/Shox2 遺伝子標識によるヒト iPS 細胞からの心臓洞房結節ペースメーカー細胞の分取システムの構築
3. 学会等名 心電学関連春季大会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 脇水 孝之, 経遠 智一, 久留一郎, 白吉 安昭
2. 発表標題 HCN4/Shox2遺伝子標識によるヒトiPS細胞由来心臓ペースメーカー細胞の分取システムの構築と機能解析
3. 学会等名 第 44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wakimizu T, Tsuneto M, Shirayoshi Y, Hisatome I
2. 発表標題 An investigation of human cardiac pacemaker cells differentiation process using human induced pluripotent stem cells visualizing HCN4/Shox2 gene
3. 学会等名 The18th Stem Cell Research Symposium
4. 発表年 2021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	李 佩俐 (Li Peili)  (40464292)	鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・助教   (15101)	

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 分 担 者	久留 一郎  (HISATOME Ichiro)  (60211504)	鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・教授     (15101)	

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