

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300171

研究課題名(和文)心機能制御における心肥大・心室形態調節の分子基盤と臓器機能連関のフィジオーム解析

研究課題名(英文) Physiomic analyses of cardiac hypertrophy and ventricular geometry of in cardiac regulation

研究代表者

毛利 聡 (MOHRI, Satoshi)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00294413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：心臓の血液ポンプ機能は心筋の量と性質、心室形態によって決まり、その制御は外界からの情報を感知して、変化に適応する形で行われる。その例として出生時における心筋分裂の停止と肥大への移行について検討した。胎児心筋細胞を3%酸素下と20%酸素下で培養したところ低酸素下では分裂が継続したが、高濃度酸素では分裂が停止した。それぞれの条件で発現が変化した遺伝子を検索して、分裂を停止している心筋細胞を再び分裂させるために有用な知見が得られた。また、心筋細胞の機械的受容を司る分子のについて検討し、TRPV2と呼ばれる介在版のイオンチャンネルが心臓機能や構造の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cardiac pump function is determined by the quantity and quality of myocardium and ventricular geometry. We investigated the regulatory mechanism of the heart for the change in environment. First, we focused the effects of the change in oxygen tension on the cellular switching from division to hypertrophy during perinatal period. Fetal cardiomyocytes were harvested and cultured at different oxygen tension (low O₂: 3%, high O₂: 20%). We firstly succeeded to visualize the division of cardiomyocytes using time-lapse motion picture under low O₂ condition. Then, we found that cardiomyocytes stopped cell division under high O₂ while they kept dividing under low O₂ condition. We also performed micro-array analysis to reveal the genes regulating cell cycle, which would be useful to make the adult cardiomyocytes to restart cell division. As for the mechanosensing in the heart, we show that TRPV2 cation channel is critical for the maintenance of cardiac structure and function.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：心機能 心肥大 心筋分裂 酸素環境 機械受容

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞は生後直ぐに分裂能を失うため、その後の発達過程において心臓は肥大によって成長する。心臓の血液ポンプとしての機械特性は、i) 心筋量をどれだけ増やすか、ii) 与えられた量の心筋で、どのような形態の心室を形成するか、に依存する。成人後も過大な機械的負荷に曝されると、心筋を肥大させて増加した仕事量に対応する。機械的負荷にも大別して圧力負荷と容量負荷があり、圧力負荷は高い動脈圧に対して血液を拍出する状態で、容量負荷は多量の血液を拍出する状態である。圧力負荷に対応した求心的変化は、壁厚を増加させ心室内径を減少させることで高い圧力発生に有利な形態である。一方、容量負荷に対応した遠心的変化は、心室内径を増加させ一回の収縮で多量の血液を拍出するのに有利である。スポーツ心臓は過大な負荷に対して適応した状態であるが、ウェイトリフティングの選手とマラソン選手の心臓がそれぞれ圧力負荷と容量負荷に該当する。近年、分子生物学によって心筋細胞が肥大する分子メカニズムの詳細が急速に解明されてきたが、心臓の形態を制御する仕組みについては不明のままであった。我々はこの課題に取り組むために生体工学的な手法を駆使して心臓の機械特性をマクロレベルで評価し、その表現系を支える遺伝子・タンパクレベルでの分子応答メカニズムを明らかにする。遺伝子は生体の機能を決定しているが、表現系としての機能が環境に適していなければ個体ごと淘汰されてしまう。従って、心臓の血液ポンプとしての機能を精緻に把握し、自らを取りまく環境に適応して生体機能を発現している分子基盤を統合的に解明することで循環系の有機的理解を深め、疾病の病態生理を明らかにすることが出来る。

2. 研究の目的

(1) 心筋細胞の分裂から肥大に細胞機構のスイッチが切り替わる哺乳類の出生に伴う変化について、酸素分圧の変化がトリガーとなっている可能性について検討する。成人の動脈血酸素分圧 (~90mmHg) に比べ、胎内での酸素環境は 20mmHg 程度と極めて低く保たれており、細胞分裂を繰り返す胎児形成期において酸化ストレスによる DNA 損傷を防いでいる。そのために酸素運搬を担う赤血球ヘモグロビンも成人に比べて格段に酸素親和度が高く、容易に末梢組織に酸素を供給しないシステムとなっている。出生後には肺呼吸が始まりヘモグロビンも成人型に変換され、末梢組織への大量酸素供給が開始される。この劇的な酸素環境変化が、出生前の細胞数増加を優先した器官形成期から、出生後の自立生存のための発育期に転換するためのシグナルとして作用しているという仮説を心筋細胞にて検証する。

(1) 我々のグループは生体の複合的機械受容システムの分子基盤解明のために、機械受容

チャンネルを核とした研究を行って来た。その中で心臓に掛かる過大な機械的負荷を感じる分子(メカノセンサー)として伸展刺激により非選択的に陽イオンを細胞内に流入させるチャンネル(TRPV2: Transient Potential 2)に注目し、このチャンネルの心臓特異的強発現および欠損マウスを作成した。このモデルマウスを用いて、心筋細胞の機械感受性について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 酸素環境変化に伴う心筋分裂能停止と肥大応答の評価

低酸素環境下での胎児心筋細胞の分離
妊娠 14-18 日のマウス(C57BL/6)から胎児を取りだし、常法にて心筋細胞を分離・培養する。この時、細胞分離に使用する溶液(PBS(-), PBS(+), DMEM 等)は予め低酸素(酸素 3%; 胎児酸素分圧 20-25mmHg に相当)に維持しておき、分離作業中は可能な限り大気への曝露を避ける。分離した細胞集団を心筋細胞マーカー(-actinin)でラベルしてフローサイトメーター(FACS)で解析することにより、心筋細胞の純度を評価する。

酸素暴露による増殖活性の変化
上記の如く低酸素下に分離した胎児心筋細胞について、i) そのまま低酸素(3%; 胎児環境を模擬)及び ii) 通常酸素(20%; 出生時の変化を模擬)の条件下で 1-2 日培養し、培養前後での全細胞数(カウント)と心筋細胞比率(FACS で評価)を計測することで、酸素暴露が胎児心筋の増殖活性に及ぼす影響を評価する。また、血行動態、栄養状態の変化など全ての条件を含んでいる生体における変化についても検討し、培養系との比較を行う。(図 1)

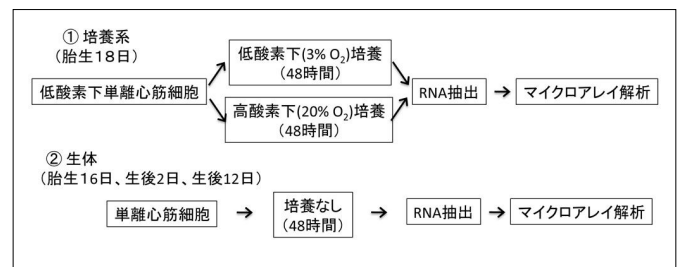


図 1: 培養系・生体における心筋細胞の酸素環境変化に対する応答の検討

細胞分裂の生細胞イメージング
心筋細胞の分裂(核分裂+細胞質分裂)を生細胞で直接捉えた報告は殆ど皆無である為、上記の心筋細胞を用い、長期間タイムラプス観察を行う。同時に、活発に分裂が起こるような培養・分離条件を検討する。

細胞増殖・細胞周期関連分子の解析
上記 2) の胎児心筋細胞(低酸素群 vs 通常酸素群)及び出生前後の心筋細胞(胎児 vs 新生児)において、細胞周期、増殖、分化、細胞死等の関連分子の発現変化を mRNA、タン

パクレベルで網羅的に解析する。

(2)心筋細胞の機械負荷応答に関する TRPV2 の役割についての検討

薬剤誘導による心臓特異的 TRPV2 ノックアウトマウスの心機能評価
 タモキシフェン投与時に心筋細胞特異的(-ミオシン重鎖を発現する細胞のみ)の TRPV2 が欠損するマウスを作成し、タモキシフェン投与後の心機能、大動脈圧および心電図をそれぞれエコーと植え込み型テレメトリーを用いて経時計測し、生存率を検討した。

単離心筋レベルでの収縮能評価と Ca 動態の検討
 対照およびノックアウトマウス摘出心臓をランゲンドルフ灌流し、トリプシンを用いて心筋細胞を単離、無負荷状態での心筋細胞収縮率と、Ca 指示薬である Indo-1 による細胞内 Ca 動態の評価を行った。

4. 研究成果

(1)培養細胞の分裂能評価と酸素環境応答

心筋細胞分裂の可視化
 心筋細胞の分裂は、分裂マーカールと呼ばれる細胞分裂時に上昇する細胞周期制御に関係するタンパク質で評価されることが多い。しかし、細胞分裂には核分裂、細胞質分裂などの過程があり、分裂マーカール発現が上昇していても実際に娘細胞に分かれたかどうかの確認は出来ない。これまで実際の分裂を観察した報告は殆ど無く、1970年代に静止写真での観察が報告されているのみである。我々は心筋細胞の分裂能を正確に把握するために、まず胎児心臓を構成する心筋細胞のみを - アクチニンをマーカーとして線維芽細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞と分離した。(図2)

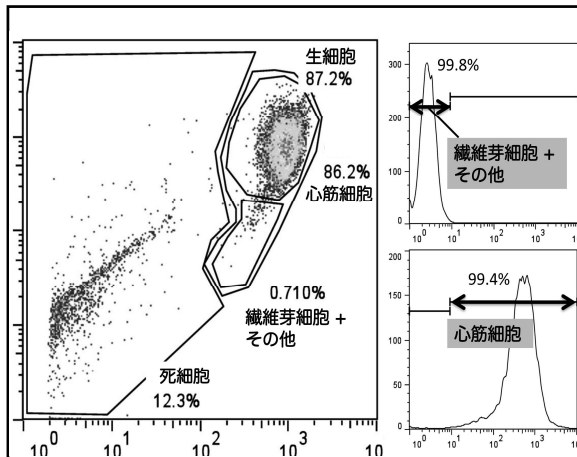


図2：胎児心臓から採取した細胞の分離

この心筋細胞群を用いて、低酸素心筋培養法と可視化技術を開発し、心筋細胞の有糸核分裂と細胞質分裂を初めて観察することに成

功した。(図3)

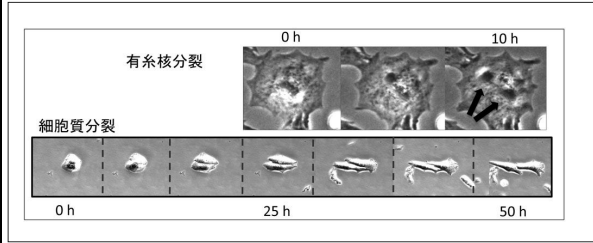


図3：心筋細胞の有糸核分裂と細胞質分裂

心筋細胞分裂の酸素環境変化への応答の定量

胎生14日、16日、18日のマウス心臓を採取し、3%および20%酸素下で96時間培養して細胞数の変化を評価した。96時間後には低酸素下(3%酸素)では細胞数が増加し、大気と同レベルの酸素下(20%酸素)ではいずれの胎生日数でも減少していた。(図4)心筋細胞の増加比率に関しては胎生早期の細胞の方が、時間が経過したものよりも分裂能を強く有していた。(図4)

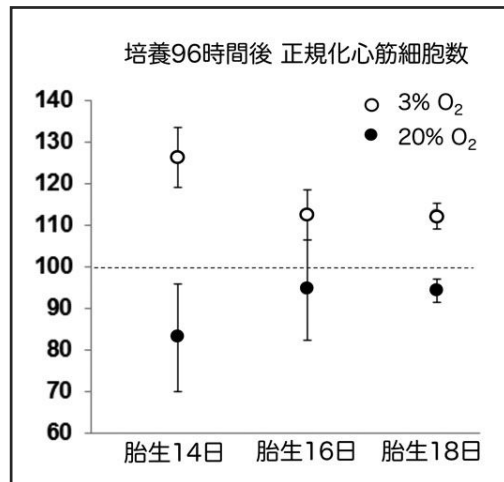


図4：胎生日数の異なる心筋細胞の酸素環境変化に対する細胞分裂能応答

遺伝子発現変化

培養心筋細胞を用いた3%および20%酸素下での遺伝子発現の違い、そして生体における出生前と出生後の遺伝子発現の差を比較し、培養細胞系および生体マウスの出生前後で共通して増加あるは減少している遺伝子を選び出した。現在、siRNAを用いてどの遺伝子が酸素環境変化に伴う細胞分裂停止に関与しているかを検討している。

これらの結果より、出生直後に分裂能を失うとされている心筋細胞は、自らが置かれた環境の変化を感知して遺伝子発現を調節していることが明らかになった。具体的には、出生によって血液の酸素分圧が上昇し、母胎からの酸素・栄養供給が終了して血液ポンプである心臓の機能を向上させなければならない状況に適応していると考えられる。哺乳類

の心筋細胞は、成体になると収縮タンパクであるアクチン・ミオシンによって多くが占められており、細胞分裂を行うには不適である。従って、出生間際まで分裂によって細胞数を増加させ、出生後は細胞の肥大によって心臓全体を成長させているのである。胎児酸素環境は動脈血酸素分圧が 20mmHg 程度と成体と比較して大幅に低いが、細胞分裂を繰り返すためには DNA 複製における障害を防ぐためには適した環境と考えられる。成長過程、あるいは成体となった後も、動脈圧など心臓に対する機械的負荷に適応して心臓は肥大するが、どのようなメカニズムで応答しているのかは不明な部分が多い。このような成体機構を理解するためには、後述する心筋細胞の膜タンパク TRPV2 など機械的刺激を受容する分子の候補について検討することが重要となると考えられる。

(2)心筋細胞の機械的刺激に対する応答における TRPV2 の役割

TRPV2 薬剤によるノックアウトの影響 TRPV2 が心筋細胞では介在版に局在することを確認した。タモキシフェンを投与すると、心筋細胞においてのみ TRPV2 が発現なくなるように遺伝子改変したマウスに対して薬剤を 4 日間投与し、生存率を検討した。(タモキシフェン投与により TRPV2 発現が 5%以下に減少することを確認したため) タモキシフェン投与後 3 日目より死亡が認められ、野生型(実際には、 $TRPV2^{flox/flox}; Cre^{+/-}$ (Vehicle)、 $TRPV2^{flox/flox}$ (+Tamoxifen)、 $TRPV2^{flox/flox}$ (Vehicle) で確認)と比較して有意に高い死亡率が確認された。(図 5)

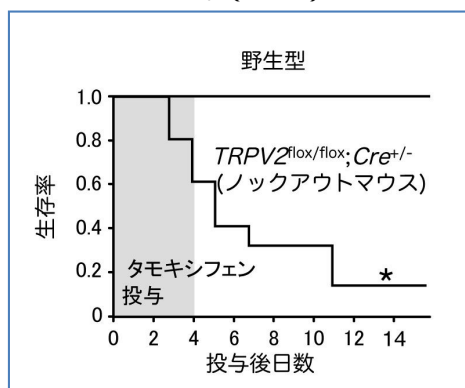


図 5 : タモキシフェン投与による心臓特異的 TRPV2 ノックアウトによる生存率

TRPV2 のノックアウトが循環系に及ぼす影響を調べるために、植え込み型テレメトリーシステムを用いて動脈圧と心電図を経時的に記録した。動脈圧は右頸動脈にカニューレシオンしたカテーテルから、心電図は II 誘導を模した方向で計測を行った。典型的な動脈圧経過を図 6 に示す。タモキシフェン投与後 3 日目から動脈圧は低下し、4 日目以降は平均動脈圧が 50mmHg を下回るようになった。

(図 6)

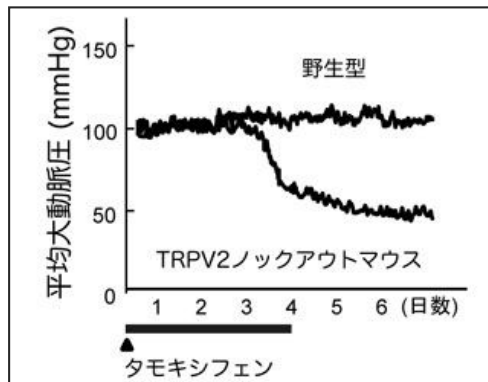


図 6 : タモキシフェン投与後の動脈圧

心室の壁運動をエコーにて観察すると、タモキシフェン投与後 4 日目には左心室の高度な拡張と重篤な心機能低下を示していた。これより、TRPV2 ノックアウトによる急激な動脈圧の低下は心機能低下によるものと考えられた。(図 7)

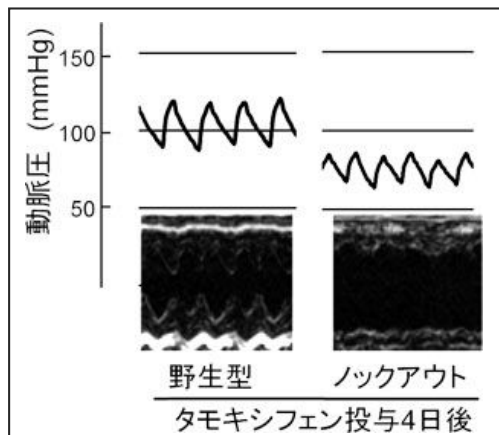


図 7 : TRPV2 ノックアウトによる心機能と動脈圧の低下

心電図では、心室の興奮時間を表す QRS 幅が拡大して、電気的な刺激の伝導障害が疑われた。QRS 軸は経過中変化がなく、脚伝導は正常で心室の固有心筋細胞間の伝導障害によるものと考えられた。TRPV2 が介在版に局在していることを考えると、ギャップジャンクションにおける機能維持に關与していることが示唆された。(図 8)

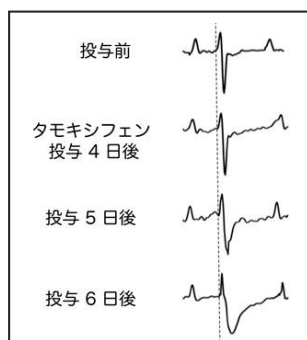


図8：TRPV2 ノックアウトによる心電図変化以上の結果より、TRPV2 が心臓のポンプ機能を維持していることが示唆された。エコーでの心室全体の機能低下が、個々の心筋細胞の機能低下によるものか検討するために、トリプシンによる細胞分離とCa動態を検討した。単離心筋細胞を1Hz、2Hz、4Hzで電気刺激すると、タモキシフェン投与後4日までは収縮率の低下は無く、Ca動態についても同様であった。投与後9日では心筋細胞内Caトランジェントの低下と収縮率の低下を認めた。タモキシフェン投与4日では左心室の収縮不全が既に生じていたが、単離した心筋細胞では収縮に異常が無く、心筋細胞間の張力伝達の以上によるものと考えられた。(図9)

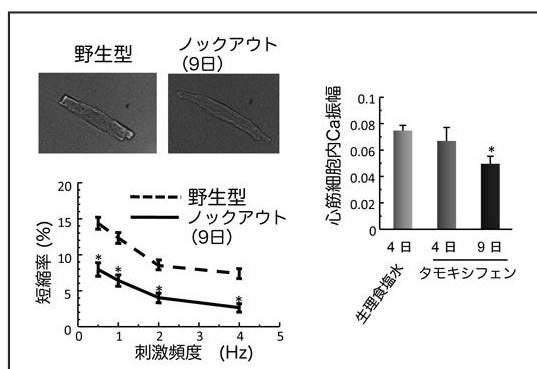


図9：単離心筋細胞の電気刺激による収縮率と、Ca動態

TRPV2 の機械的進展感受性

心筋細胞においてTRPV2をノックアウトすると心筋細胞間の電気伝導や張力の伝達に障害が生じることにより心機能が低下することが明らかになった。次に、TRPV2がどのようなメカニズムで心筋細胞の機能を維持しているかを明らかにするため、作用の候補である機械的伸展感受性について検討した。(図10)

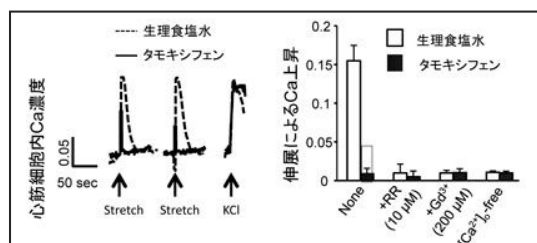


図10：TRPV2 ノックアウトによる培養心筋細胞Ca濃度変化

薬剤誘導性で心臓特異的にTRPV2をノックアウトできるように遺伝子改変したマウスの胎児心筋を機械的な伸展を加えることが出来るシリコンチャンバに培養し、生理食塩水を加えたものとタモキシフェン投与時によ

りTRPV2をノックアウトしたものに周期的な伸展刺激を加えてFura-2にて細胞内Caを測定した。TRPV2をノックアウトしたものは伸展によってCa濃度が上昇しなくなっており、薬剤によってTRPV2を抑制した実験でも同様の結果が得られた。この結果より、TRPV2は心筋細胞の介在版において機械的伸展刺激を感知している可能性が示唆された。

生来のあらゆる臓器・細胞は環境に応じた機能を発揮するような可塑性を有している。エネルギーを消費しながら血液ポンプとして働く心臓では酸素や力学的な環境を感知してその機能を調節している。本研究では心臓の調節機構における酸素環境変化や力学的環境変化への応答について分子メカニズムからCa動態、マクロ心機能まで統合的に検討した。

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 1件)

Katanosaka Y, Iwasaki K, Ujihara Y, Takatsu S, Nishitsuji K, Kanagawa M, Sudo A, Toda T, Katanosaka K, Mohri S, Naruse K. TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. Nat Commun. 2014 May 29;5:3932.

(学会発表)(計 5件)

笹江友美、橋本謙、氏原嘉洋、毛利聡 甲状腺機能亢進症モデルマウスにおける心臓リモデリングの評価 第65回日本生理学会大会中国四国地方会 2013年11月1日 倉敷(川崎医科大学)

Katanosaka Y, Ujihara Y, Mohri S TRPV2 is crucial for cardiac structure and function. Gordon Research Conference June 10, 2014 NH, USA (Colby-Sawyer College)

Mohri S, Ujihara Y, Katanosaka Y TRPV2 maintains the structure and function of intercalated discs. June 10, 2014 NH, USA (Colby-Sawyer College)

Ujihara Y, Mohri S, Katanosaka Y Isolated myocytes from TRPV2-deficient heart are fully functional. Gordon Research Conference June 10, 2014 NH, USA (Colby-Sawyer College)

氏原嘉洋、岩崎慶一郎、高津理美、西辻光希、橋本謙、成瀬恵治、毛利聡、片野坂友紀 T 間膜構造維持における Na⁺/Ca²⁺交換体の役割 第65回日本生理学会大会中国四国地

方会 2013 年 11 月 1 日 倉敷 (川崎医科大学)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

毛利 聡 (MOHRI Satoshi)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00294413

(2) 研究分担者

橋本 謙 (HASHIMOTO Ken)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：80341080

氏原 嘉洋 (UJIHARA Yoshihiro)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80610021

(3) 連携研究者

成瀬 恵治 (NARUSE Keiji)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40252233