

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590297

研究課題名(和文) 発生学的アプローチによる心血管領域の性差機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of sex differences in cardiovascular development

研究代表者

黒川 洵子 (Kurokawa, Junko)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：40396982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：心血管病には、発症から進展・予後に至るまであらゆるところに性差があることが、先進諸国では明らかとなっているが、分子メカニズムの解明は限定的である。本研究では、心臓の再生・発生の段階を解析する事により、心血管領域の機能・病態の性差機構を探索することを目的とした。

胎児マウス冠血管径に明確な性差があり、この性差は血管拡張剤により消失したことから、胎児期における血管収縮機構に性差があることが明らかとなった。DNAマイクロアレイによる網羅的解析から性差の原因となる候補の遺伝子を同定した。この研究結果を、心疾患の予防・発症における性差を理解する為の基盤としたい。

研究成果の概要(英文)：Cardiovascular disease (CVD) affects men at younger age than women, which has been attributed to the loss of estrogen after menopause. However, recent clinical and basic studies unravel that the underlying mechanisms seem unlikely to be due to estrogen only and are more complex. Although it is well established that aging is a risk factor for CVDs, many of the molecular pathways involved in CVDs have roots in cardiac developmental programs. Thus, we here seek biological sex differences in cardiovascular development of murine hearts to obtain clues to elucidate the sex differences in CVDs. We found sex differences in morphological and physiological functions of coronary arteries in murine hearts at embryonic day 17.5, and the difference was abolished by vasodilators. These results suggest that sex differences in coronary arteries exist at a late embryonic stage in mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：循環器 性差 心臓 発生 冠血管 マウス 発現解析

### 1. 研究開始当初の背景

わが国を含む先進国では、心血管病が有病率・死亡率の大きな割合を占める。その対策は男性に対する臨床試験を中心に行われてきたが、男性に比べて女性での死亡率低下が顕著でなく、女性特有の生物特性を考慮した“性差医学”が90年代より進められてきた。正常な心血管の解剖、生理から機能、さらに病態レベルに至るまで、あらゆるところに性差が認められ、その萌芽が細胞の段階で認められることもあれば、社会的なジェンダーを背景として生じることもあることが示されてきた。

その流れの中で、申請者は、性ホルモンによる心臓の生理機能の性差研究を進めている。特に、思春期以降の女性で2倍以上の発症率であるQT延長型不整脈に関し、心筋イオンチャネルに対する性ホルモンの転写調節を介さない急性作用に注目した。心筋の性ホルモン受容体を介した非ゲノム経路を世界に先駆けて示した(ホルモン受容体→cSrc→PI3K→Akt→eNOS)。テストステロン・プロゲステロン(P4)によるQT短縮がこの不整脈に保護的に働く事を見出し、性周期・性差への影響もシミュレートすることに成功した。女性で多い薬物副作用であるこの不整脈は、創薬における緊急解決課題だが、QT延長薬moxifloxacinは不整脈を起こさないなど、他機序の影響も考慮すべきである。性差医学の立ち上げ以降、心筋細胞サイズや心筋興奮収縮連関や遺伝子発現など、様々な性差が報告されており、不整脈についても多角的に検討する必要がある。臨床的に女性は閉経後に虚血性心疾患を罹患しやすく、エストロゲンによる内皮刺激作用等で一部説明されてきたが、加齢・既往症の影響も無視できず、いまだ不明な点が多い。微小血管狭心症(造影に写らない100 $\mu$ m以下の冠血管の虚血)や冠バイパス手術後の予後不良等女性特有の虚血性心疾患も指摘されるが分子機構は全く不明であり、メカニズムの解析が待たれていたのが、研究開発当初の状況であった。

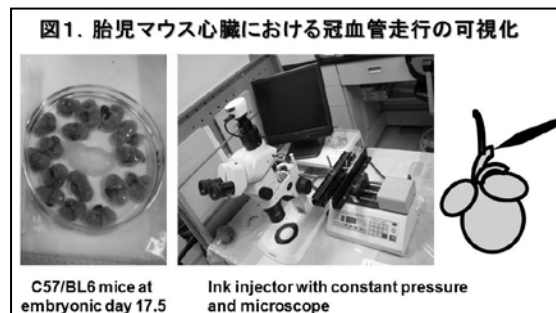
### 2. 研究の目的

心血管病には、発症から進展・予後に至るまであらゆるところに性差があることが、先進諸国では明らかとなっているが、臨床結果を説明しうるメカニズムの解明は限定的である。本申請では、心臓の再生・発生の分野に内分泌由来と遺伝子由来の性差を判別する実験系を新規に取り入れることにより、心血管領域の機能・病態の性差のメカニズムを探索することが研究の目的であった。この研究結果を、薬物誘発性不整脈や虚血性心疾患の予防・発症における性差を理解する為の基盤とすることを旨とした。

### 3. 研究の方法

#### ①胎児マウス冠血管径の性差解析

東京大学医学部 西山功一先生・有馬裕一郎先生・栗原裕基先生との連携・協力により、静脈洞にラベルする手法と胎児マウス心臓の冠血管走行の微細構造や管形成過程を可視化する新手法を導入した。野生型胎児マウスの発生段階ごとの冠動脈走行を雌雄で、インク微小注入による血管造影法を用いて比較検討した。第三分枝の冠血管まで再現性良く観察可能であり、現在のところ最も微細な構造を解析できる方法である(図1)。



手順を簡単に述べる。スミア法により発情期を確認したC57BL6j雌マウスを交配に用い、妊娠17.5日目に開腹し、子宮ごと胎生期E17.5の胎児を摘出した。その際、しっぽは雌雄を決定するgenotypingのために保存した。それぞれのマウスから心臓を切除し、aortaから定圧でインクを注入した。インクは超微粒子の市販品を用い、定圧にするため注射器用のインジェクターを使用した。インクが注入された心臓を一晩ホルマリ

ン固定した後、アルコールで脱水して4℃にて保存した。冠血管径の形態観察はアルコール脱水の後に行い、実体顕微鏡(オリンパス)下で、心臓を同じ向きに揃えて写真を撮影し、その写真を基に定量データを得た。心尖部から左冠血管の基部までを100%とし、血管径を計測する際の位置情報(冠血管の基部からの距離)として利用した。血管径を雌雄判別は、UBE1 遺伝子のPCRにより行い、形態観察後に結果を照合した。

次に、*Sry* TG (*Sry*<dl1Rlb>)マウスを利用した内分泌由来と性染色体由来の判別を行った。Y染色体上の精巣決定遺伝子 *Sry* 上に欠失がある変異(XY)マウスは表現型が雌型(精巣がなく、卵巣機能正常)になり、*Sry* が常染色体上に転座した自然発症変異(XX*Sry*)マウスの表現型は雄型(卵巣がなく、精巣機能正常)になる。*Sry* 欠失(XY)に *Sry* 転座を交配した(XX*Sry*)XY-*Sry* マウスは生殖機能をもつ正常雄であり、野生型の雌と交配させることで4種類の genotype のマウスを産出することが可能である。この4種のマウスを用いることにより、内分泌もしくは性染色体由来かを判別できる。全ての実験は、東京医科歯科大学内の動物管理の規定に則り、倫理委員会における動物実験の承認を得てから行った。

②胎児マウス冠血管径の薬理作用の性差解析  
3①で行った方法と同じ様にインクを冠血管に注入した胎児心臓を得た。ただし、心臓を摘出後、15 分間の薬物処置を行った後に臓器の固定を行った。使用した薬剤は、NOC7 とジルチアゼムであった。

③マイクロアレイによる胎児マウス心臓に発現する遺伝子の性差解析  
東京大学農学系研究科・中井雄治先生の協力により、マイクロアレイにより胎児マウス心臓に発現する遺伝子の雌雄差を解析した。3-a.の方法と同様にして、マウス胎児(E17.5)から心臓を摘出し、RNAeasy kit を用いて total RNA を抽出し

た。プラットフォームは、Affymetrix 社のシステムを使い、ターゲット調整をしたサンプルを GeneChip (Mouse Genome 430 2.0 Array)に乗せてハイブリダイゼーションし、画像化して解析した。データの正規化法については数種検討し、デンドログラム解析をして最も雌雄が綺麗に分離できた手法を採用した。サンプルは雌雄それぞれ n = 3 で行った。

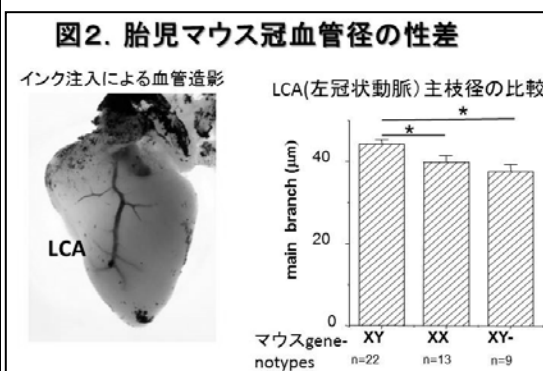
#### 4. 研究成果

##### ①胎児マウス冠血管径の性差解析

マウス胎児 E17.5 心室の冠血管径に、明確な性差を見つけた(図2)。左冠状動脈(LCA)の主枝血管径を血管基部と心尖部の位置に応じてプロットしたところ、雌の方が雄よりも細いという結果を得た。Y染色体 *Sry* 遺伝子障害 TG マウスについても、先に述べたように、ジャクソン社より購入した親マウスを繁殖させて、E17.5 の胎児を得た。野生型と同様に冠血管径について解析したところ、XX と同じ結果となったことから、内分泌由来の性差であることが示唆された。

##### ②胎児マウス冠血管径の薬理作用の性差解析

4①で見出された冠血管径の雌雄差について、



薬物存在下での性差解析も行った。図2に示すように、薬物非存在下では、左冠状動脈(LCA)の主枝血管径が雌で有意に細かったが、NOC7 という血管拡張剤存在下でインク注入による血管造影を行うと、雌雄差が消失した。NOC7 による血管拡張は、雌の左冠状動脈(LCA)の主枝血管をより弛緩させたため、薬剤非存在下で見られた雌雄差が消失したと思われる。

③マイクロアレイによる胎児マウス心臓に発現する遺伝子の性差解析

データの正規化法について、最も雌雄が分離した手法は DFW であったことから、この手法を採用して rank products を行ったところ、雌で有意に発現が高かった遺伝子が26遺伝子、雄で有意に発現が高かった遺伝子が32遺伝子、それぞれ同定された。それぞれの遺伝子を雌雄特異的に発現する遺伝子として、DAVID にて GO 解析を行った。GO term は、 $p < 0.05$  を有意として扱った。雌で発現が高い遺伝子に特徴的なシグナル経路も見えてきたが、機能は未だ不明である。一方、雄で発現が高い遺伝子は Muscle tissue development に関わるシグナルに関連している傾向があった。

5. 主な発表論文等

①雑誌論文 (計 5 件)

1. Asayama M, Kurokawa J (9名中2番目), et al. (2013) Effects of a hERG activator, ICA-105574, on electrophysiological properties of canine hearts. *J Pharmacol Sci*, 121, 1-8. 査読有
2. Kurokawa J\*, Furukawa T. (2013) Non-genomic action of sex steroid hormones and cardiac repolarization. *Biol. Pharmaceut Bull*, 36, 8-12. 査読無
3. Egashira T, Kurokawa J (29名中20番目), et al. (2012) Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovascular Research*, 95, 419-29. 査読有
4. Kurokawa J\*, Furukawa T. (2012) Region- and condition-dependence of the membrane and  $Ca^{2+}$  clocks in the sinus node. *Circ J*, 76, 293-294. Editorial Comments. 査読無
5. Sugiyama H, Kurokawa J (15名中13番目), et al. (2011) Circulating KCNH2 Current-Activating Factor in Patients with Heart Failure and Ventricular Tachyarrhythmia. *PLoS One*. 6, e198897. 査読有

②学会発表 (計 40件)

1. Kurokawa J, Kodama K, Goryoda S, Furukawa T (2013). Regulation of cardiac L-type  $Ca^{2+}$  currents through a non-genomic action of sex

hormones. 86回日本薬理学会年会, 福岡, *J Pharmacol Sci*. 121, 43P. (2013.3.21-23) 3/22 シンポジウム発表

2. Kurokawa J, Kodama M, Goryoda S, T Furukawa (2013.2.4) Involvement of PDE2 in a localized regulation of the L-type  $Ca^{2+}$  channels by progesterone. 57<sup>th</sup> Biophysical Society Annual Meeting, Philadelphia, *Biophys J*, 104, 281a-282a.(Feb 3-6, 2013)
3. 高橋 和也, 黒川 洵子(9名中8番目)ら (2013.2.14-15) イメージングによる培養心筋細胞の拍動伝搬評価. 日本安全性薬理研究会 第5回学術集会, 東京, 弥生講堂. 2/15
4. 五領田小百合, 黒川洵子(7名中7番目)ら (2014.3.27-30). 心筋細胞における性ホルモン非ゲノム経路の局在化機構. 日本薬学会 第134回年会, 熊本. 3/30 口頭発表
5. Fujitsuka M, Kurokawa J(9名中2番目) et al. (2014.3.19-21) Effects of substrate elasticity on contractile properties of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. 第87回日本薬理学会大会, 仙台, 3/21 ポスター発表
6. Li M, Kurokawa J(6名中6番目) et al. (2014.3.19-21) A novel in vitro model for evaluating drug-induced QT prolongation using genetically modified human iPS-derived cardiomyocytes. 第87回日本薬理学会大会, 仙台, 3/20 口頭発表
7. Li M, Kurokawa J(6名中6番目) et al. (2014.2.15-19) A novel approach for evaluation of drug-induced QT prolongation using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. The 58<sup>th</sup> Biophysics Society Annual Meeting, San Francisco, Poster.
8. Kanda Y, Kurokawa J(5名中5番目) et al.. (2014.1.16-.18) Development of human iPS cell-derived mature cardiomyocytes for assessment of drug-induced QT prolongation. 第七回武田科学振興財団薬科学シンポジウム, 大阪. ポスター発表.
9. 五領田小百合, 黒川洵子(7名中7番目)ら (2013.10.19). 心筋プロゲステロン受容体を介した性ホルモン非ゲノム経路の細胞内局在化機構. 日本薬理学会第129回関東部会, 東京. 10/19 口頭発表
10. Hayakawa T, Kurokawa J(10名中9番目) et al. (2013.9.16-19) Contractile behaviors of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte monolayers evaluated with an image-based analysis using motion vector prediction technique: A comparison with

- extracellular electrophysiology. 13<sup>th</sup> annual meeting of Safety Pharmacology Society. Rotterdam, Netherlands. Poster.
11. Li M, Kurokawa J (6名中6番目) et al. (2013.6. 28–29) Functional optimization of commercially available human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for evaluation of drug-induced QT prolongation. The 2nd HD Physiology International Symposium, Tokyo. 6/29 ポスター発表
  12. Kodama M, Goryoda S, Tomida T, Furukawa T, Kurokawa J (2013.6. 28–29) Localized cAMP signaling in the heart regarding a cross-talk with a non-genomic pathway of progesterone receptors. The 2nd HD Physiology International Symposium, Tokyo. 6/29 ポスター発表
  13. 五領田小百合, 児玉昌美, 古川哲史, 黒川洵子 (2013.3.27–30). 心筋細胞における性ホルモン非ゲノム経路の局在化機構. 日本薬学会第133回年会、横浜. 大学院生優秀発表賞受賞 3/29 口頭発表
  14. Goryoda S, Kodama M, Furukawa T and Kurokawa J (2013.3.21–23). Localization of a non-genomic pathway of cardiac progesterone receptors. 第86回日本薬理学会大会、福岡 *J Pharmacol Sci*, 121, 206P. 3/22 ポスター発表
  15. Lopez-Redondo F, Kurokawa J (7名中2番目) et al. (Feb 3–6, 2013) Human ES- and iPS-derived cardiomyocytes. A comparative electrophysiological study. 57<sup>th</sup> Biophysical Society Annual Meeting, Philadelphia, *Biophys J*, 104, 298a. 2.4 発表
  16. Goryoda S, Kurokawa J (5名中5番目) et al. (2013.1.16–17). Localized regulation of cardiac ion channels via a non-genomic pathway of sex hormone receptors in murine cardiomyocytes. 新学術領域研究: 第6回領域全体会議、沖縄。
  17. 森田唯加, 黒川洵子 (12名中3番目)ら. (2012.12.11–14). 新規心臓転写因子による心臓細胞運命決定と機能的な心臓再生。ワークショップ発表, 第35回日本分子生物学会年会, 福岡。
  18. Uno H, Kurokawa J (7名中6番目) et al. Evaluation of contractile behavior of human iPS cell-derived cardiomyocytes based on motion vector prediction method. 第6回アジア毒性学会、2012年7/17–2. ポスター発表。
  19. Hayakawa T, Kurokawa J (8名中7番目) et al. (2012) Contractile behaviors of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte monolayers evaluated with an image-based analysis using motion vector prediction technique: a comparison with extracellular electrophysiology. (2012.10.1–4) Safety Pharmacology Society 12<sup>th</sup> annual meeting Phoenix, Arizona.
  20. Hayakawa T, Kurokawa J (7名中6番目) et al. (2012) Evaluation of contractile behavior of human iPS cell-derived cardiomyocytes based on motion vector prediction method. (2012.7.17–19) 第39回日本毒性学会, 仙台 *J Toxicol Sci*, 37 suppl II, S475
  21. Lopez-Redondo F, Kurokawa J, Furukawa T (2012.3.14–16) An involvement of sympathetic nervous system stimulation in a gender disparity of nongenomic actions of dihydrotestosterone on cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> currents. 第85回日本薬理学会大会、京都 *J Pharmacol Sci*, 118, 156P.
  22. Li M, Kurokawa J (8名中2番目) et al. (2012.1.20–21) Quantitative characterization of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. The 1<sup>st</sup> HD physiology International Symposium, 東京。
  23. Morita Y, Kurokawa J, (10名中4番目) et al. Sall<sup>1</sup> cells represent a renewing cardiac progenitor population. 40<sup>th</sup> Keystone symposia, Cardiovascular Development and Regeneration. January 22–27, 2012, New Mexico, USA
  24. Nakamura K, Kurokawa J (8名中6番目) et al. Circulating KCNH2 current-activating factor in patients with heart failure - Novel mechanism of ventricular tachyarrhythmia- 第4回センシングバイロジィ・シンポジウム、2012年1月30日、東京
  25. 児玉昌美、萩原理生、有馬勇一郎、西山功二、栗原裕基、古川哲史、黒川洵子 (2011.12.13–16) マウス胎児心臓における冠血管走行の性差. 第34回日本分子生物学会、横浜. 12/13 発表
  26. 小泉章子, 笹野哲郎, 黒川洵子, 木村航、古川哲史 (2011.11.4–5) His-Purkinje 系特異的転写因子の遺伝的欠失は、マウスで J wave 症候群類似の表現型を示す. 平成 23 年度生理学研究所研究会, 岡崎 11/5 発表
  27. 李敏、黒川洵子 (5名中2番目)ら. (2011.6.4) Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. 第124回日本薬理学会関東部会、東京。
  28. Hayakawa, T, Kurokawa, J (8名中7番目) et al. (2011.11.17–18) A non-invasive method

- for monitoring the contractile behaviors of cardiomyocytes based on the high-resolution digital video analysis. Stem cell Society Singapore Symposium 2011, Biopolis, Singapore.
29. 黒川 洵子 (2014. 3.15)「女性研究者支援から性差医療研究へ」第3回順天堂大学女性研究者シンポジウム、東京。
  30. Kurokawa J (2014.3.3) 男女別薬物誘発性不整脈評価の基盤となる基礎研究. 新学術領域研究, 第8回領域会議研究報告会, 京都.
  31. Kurokawa J (2014.1.11-12) Summary of Kirishima Meeting and the Next Step: Computational (*in silico*) safety pharmacology working group. Speaker & Moderator. 1st Think Tank Meeting on Cardiac Safety 2014 in Kirishima、霧島. 1/12 発表.
  32. 黒川 洵子, 諫田泰成, 古川哲史 (2013.12.6) iPS 心筋を用いた心機能評価. シンポジウム, 第23回日本循環薬理学会、福岡.
  33. 黒川 洵子 (6名中1番目) (2013. 11. 27-28) ヒト iPS 由来心筋を用いた薬剤誘発性不整脈の研究. 口頭発表, 平成 25 年度生理学研究所研究会, 岡崎. 27 日発表
  34. 黒川 洵子 (5名中1番目) (2013.10.11-12) ヒト iPS 由来心筋を用いた心臓毒性評価系の構築. 第30回日本心電学会, 青森. 10/11 シンポジウム発表
  35. 黒川 洵子 (2013.8.28) 薬物誘発性不整脈の男女差に関する研究. 特別講演. 岡山心臓血管研究会, 岡山.
  36. Kurokawa J (2013.3.27-29) Gender differences in cardiac repolarization and the underlying mechanisms. Scandinavian Japan symposium at the 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Funabori Chiba. シンポジウム (3/29)
  37. Kurokawa J (2013.1.24-27) Gender differences in cardiac physiology. Poster&oral, Japan-French Frontier of Science 2013, Shiga.(1/25-26 発表)
  38. Kurokawa J (5名中1番目, 2013.1.16-17). Sex and Gender Differences in signal transductions at cardiomyocytes. 新学術領域研究: 第6回領域全体会議、沖縄。
  39. 黒川 洵子, 児玉昌美, 五領田小百合, 古川哲史 (2012. 11. 21-22) 性ホルモンシグナル局在化による心筋L型カルシウムチャネル調節機構. 平成24年度生理学研究所研究会, 岡崎
  40. 黒川 洵子 (2012. 10. 13) QT 延長シグナル調節機構. シンポジウム、第29回日本心電学会学術集会, 千葉幕張メッセ
- ③図書(計 2件)
1. Sasano T, Kurokawa J\* (2013) Remodeling of potassium channels in cardiac hypertrophy  
In: *Molecular Mechanisms of Cardiac Remodeling*. Jugdutt BI, Dhalla NS (Eds): Springer, New York, p31-45.
  2. Kurokawa J\*, Kodama M, Furukawa T, Clancy CE (2012) Sex and gender aspects in anti-arrhythmic therapy. In: *Sex and Gender Difference in Pharmacology*. Handbook of Experimental Pharmacology 214, Rigitz-Zagosek V (Ed): Springer-Verlag, Germany. p237-263.
- ④産業財産権  
○出願状況(計 2件)
- 「正常な内向きのカリウム電流特性を有するヒト iPS 細胞由来心筋細胞, その作製方法, 及びそれを用いた薬物スクリーニング方法」  
発明者:黒川 洵子(代表), 諫田泰成, 関野祐子, 古川哲史 権利者:同上  
種類:特許権 番号:2013-116243  
出願人:国立大学法人東京医科歯科大学  
出願日:平成25年5月31日 国内
- 「正常な内向きのカリウム電流特性を有する iPS 細胞由来心筋モデル細胞」  
発明者:黒川 洵子, 古川哲史, 諫田泰成, 関野祐子 権利者:黒川 洵子, 古川哲史  
種類:特許権 番号:PCT/JP2014/002888  
出願人:国立大学法人東京医科歯科大学  
出願日:平成26年5月30日 国外
- [その他]  
ホームページ:  
[http://www.tmd.ac.jp/mri/cph/index4\\_e.html](http://www.tmd.ac.jp/mri/cph/index4_e.html)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
黒川 洵子 (43)  
東京医科歯科大学難治疾患研究所・准教授  
研究者番号:40396982
  - (2) 研究分担者 なし
  - (3) 連携研究者  
西山 功一 (46)  
熊本大学付属病院・特任講師  
研究者番号:80398221