

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650260

研究課題名(和文) ヒト iPS 由来心筋細胞を利用したヒト洞房結節細胞ペースメーカー機転の研究

研究課題名(英文) Pacemaking mechanism of human SA node cell using human iPS-derived cardiomyocytes

研究代表者

竹内 綾子 (Takeuchi, Ayako)

福井大学・医学部・特命助教

研究者番号：00378704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、iPS細胞由来心筋細胞を用いた細胞生物学実験と数理モデル解析を組み合わせることによって、ヒト心臓ペースメーカー機転を明らかにすることを目的とした。ヒトiPS細胞由来心筋細胞の増殖を誘発する薬物を同定し、増殖した細胞の電気生理学的解析を行ったところ、いずれの薬物でも同等の電気生理学的特性をもつ細胞が得られた。また、洞房結節細胞数理モデル解析から、ミトコンドリアと筋小胞体が協調して機能すること、洞房結節細胞の自動能発生機序におけるミトコンドリアCa動態の寄与がメカニズム依存性であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to clarify pacemaking mechanisms of human cardiac pacemaker cells, SA node cells. In order to achieve the goals, I performed cellular physiological experiments using human iPS-derived cardiomyocytes and mathematical simulations. Several combinations of chemicals enhanced proliferation of human iPS-derived cardiomyocytes, with similar electrophysiological characteristics. Theoretical analyses suggested that coupling of mitochondrial and sarcoplasmic reticulum Ca dynamics is important for pacemaking, and that contribution of mitochondrial Ca transporter is mechanism dependent.

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：iPS細胞 ペースメーカー 数理モデル解析

1. 研究開始当初の背景

これまでの心臓のペースメーカー機能に関する研究は、実験動物の心臓を用いた電気生理学的・細胞生物学的・数理モデル解析によって発展してきた。しかし、ヒトと実験動物では心拍数が大きく異なることから、そのペースメーカー機能に種差がある可能性が大いに予想されるにもかかわらず、ヒト心臓のペースメーカー機能に関する情報は研究材料の入手方法、研究手法が限定されるためにいまだ少ない。

近年、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の研究が進展し、ヒト由来 iPS 細胞から心筋細胞への分化・誘導が可能となった。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞についての研究から、iPS 細胞由来心筋細胞はヘテロな細胞集団ではあるが、心房・心室筋様細胞の活動電位はヒト心筋細胞とかなり類似することが明らかとなってきた。

2. 研究の目的

本研究では、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 由来心筋細胞解析と洞房結節細胞数理モデル解析により、機能・分子情報に立脚したヒトペースメーカー細胞 (洞房結節細胞) の数理モデルを構築し、ヒト洞房結節細胞のペースメーカー機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の電気生理学的解析

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞に、細胞増殖作用の認められた化合物 (glycogen synthase kinase-3 (GSK3) 阻害剤 BIO & Flk1 阻害剤 SU1498 & p38 MAPK 阻害剤、glycogen synthase kinase-3 (GSK3) 阻害剤 BIO & CaMKII 阻害剤 KN93 & p38 MAPK 阻害剤) あるいはコントロールとして DMSO を添加し、5 日間増殖させた。その後 2~6 日目に、current clamp 法にて活動電位を測定した (Molecular Devices 社、Axopatch200B amplifier; Digidata1440A)、細胞外液組成 (mM); 140 NaCl, 5.4 KCl, 0.33 NaH₂PO₄, 0.5 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 1.0 Na pyruvate, and 5 HEPES (pH 7.4 with NaOH)、ピペット内液組成 (mM); 110 aspartic acid, 30 KCl, 5 MgATP, 5 Na₂ creatine phosphate, 0.1 Na₂GTP, 2 EGTA, and 10 HEPES (pH 7.2 with KOH)。ピペット抵抗は 4~6 MOhm のものを用いた。また、測定は 30 で行った。

(2) 洞房結節細胞数理モデル構築

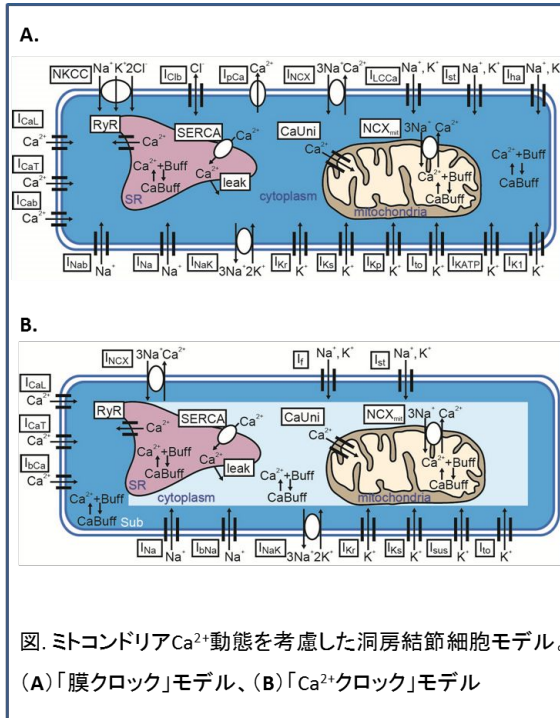
既存の洞房結節細胞数理モデル (Maltsev and Lakatta, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009; Himeno et al., *J Physiol Sci*, 2008, Himeno et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011) に、新たに研究代表者らが開発したミトコンドリア Ca²⁺動態 (ミトコンドリア Ca²⁺ユニポータ MCU、ミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺輸送担体

NCLX、Ca²⁺バッファー) (Kim et al., *J Physiol*, 2012; Takeuchi et al., *Sci Rep*, 2013) の数理モデルを導入した。これらのモデルを用いて、洞房結節細胞の自動能発生におけるミトコンドリアの寄与を解析した。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の増殖促進作用が認められた化合物の組み合わせ (glycogen synthase kinase-3 (GSK3) 阻害剤 BIO & Flk1 阻害剤 SU1498 & p38 MAPK 阻害剤、glycogen synthase kinase-3 (GSK3) 阻害剤 BIO & CaMKII 阻害剤 KN93 & p38 MAPK 阻害剤) それぞれについて、増殖後の細胞の特徴を明らかにするために、活動電位を測定し、コントロールとの比較を行った。その結果、いずれの組み合わせについても、平均拡張期電圧 mean diastolic potential、活動電位の最大立ち上がり速度 dVm/dt、活動電位持続時間 APD50 の値に有意差は認められず、コントロールと同様の活動電位波形が得られた (Uosaki et al., *Circ Cardiovasc Genet*, 2013)。また、マウス iPS 細胞由来心筋細胞と比較して、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞では、拍動周期が長く、拡張期が延長していた。さらに、活動電位の最大立ち上がり速度が低い細胞が多いという特徴が明らかとなった。

実験動物を中心とした心臓ペースメーカー機能の研究から、洞房結節細胞の自動能は過分極活性化陽イオン電流 (If) (Kaupp and Seifert, *Annu Rev Physiol*, 2001; Liu et al., *Prog Biophys Mol Biol*, 2008) や、内向き陽イオン電流 (Ist) (Guo et al., *J Physiol*, 2005; Toyoda et al., *Br J Pharmacol*, 2005) で主に形成される膜電位の自発的な興奮に起因すると考えられてきた。しかし近年、筋小胞体からの自発的な Ca²⁺リークに依存した細胞膜 Na⁺-Ca²⁺交換電流の増加が発火頻度を決定するという「Ca²⁺クロック」仮説が提唱され、これまでの学説は「膜クロック」仮説と呼ばれるようになった (Lakatta et al., *Circ Res*, 2010)。両仮説の妥当性については研究者間で意見が分かれる。研究代表者は、自動能をもつ拍動培養心筋細胞 HL-1 細胞では、ミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺交換機転 (NCLX) が「Ca²⁺クロック」を修飾することによって、自動能形成に寄与することを明らかにした (Takeuchi et al., *Sci Rep*, 2013; Kim et al., *Adv Exp Med Biol*, 2013)。そこで、洞房結節細胞の自動能発生における NCLX の寄与を明らかにするために、細胞の自発興奮が「膜クロック」で駆動される Himeno model (Himeno et al., *J Physiol Sci*, 2008; *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008) と「Ca²⁺クロック」で駆動される Maltsev & Lakatta model (Maltsev and Lakatta, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009) の 2 つの数理モデルをプロトタイプとして選択し、新たにミトコンドリア Ca²⁺動態に関するコンポーネントを実装した (次ページ図)。これらのモデルを用いて NCLX の抑制シミュレーション



ンを行ったところ、いずれのモデルでもミトコンドリア NCLX の機能分子数の減少によって筋小胞体 Ca²⁺濃度が減少することが予測された。すなわち、ミトコンドリアと筋小胞体 Ca²⁺輸送担体が協調して機能することが示唆された。一方、自発興奮の間隔は「膜クロック」モデルでは短縮、「Ca²⁺クロック」モデルでは延長と、正反対の結果をもたらすことを見出した。すなわち NCLX の寄与はメカニズム依存性であることを見出した。さらに、詳細にモデルを解析したところ、「膜クロック」モデルでは NCLX の機能分子数減少によって細胞内 Na⁺濃度が減少し、内向き陽イオン電流 (I_{st}) が活性化されるため、活動電位発生間隔の短縮がもたらされることが示された。一方、「Ca²⁺クロック」モデルでは、If 電流や I_{st} の寄与が小さく、HL-1 細胞と同様に筋小胞体を介した Ca²⁺動態の寄与が大きい。そのために、NCLX の機能分子数の減少によって筋小胞体 Ca²⁺動態が抑制されると、筋小胞体からの自発的な Ca²⁺リークで決定される活動電位発生間隔の延長がもたらされたと考えられる。以上の結果から、洞房結節細胞の拍動リズム発生のメカニズムは、細胞膜チャネルと筋小胞体 Ca²⁺動態のバランスで異なることが示唆された。

一方、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞において、ミトコンドリアをミトコンドリア選択的色素 (MitoTracker Green) で染色したところ、自動能を持つ細胞はミトコンドリアが豊富に存在した。このことより、おそらくヒト iPS 細胞由来心筋細胞の自動能発生においても、ミトコンドリア及びミトコンドリア Ca²⁺輸送体が寄与すると推測された。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Uosaki H, Magadum A, Seo K, Fukushima H, Takeuchi A, Nakagawa Y, Moyes KW, Narazaki G, Kuwahara K, Laflamme M, Matsuoka S, Nakatsuji N, Nakao K, Kwon C, Kass DA, Engel FB, Yamashita JK. Identification of chemicals inducing cardiomyocyte proliferation in developmental stage-specific manner with pluripotent stem cells. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 6, 624-633, 2013. doi:

10.1161/CIRCGENETICS.113.000330. 査読有.

Kim B, Takeuchi A, Koga O, Hikida M, Matsuoka S. Mitochondria Na⁺-Ca²⁺ Exchange in Cardiomyocytes and Lymphocytes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 961, 193-201, 2013. doi:

10.1007/978-1-4614-4756-6_16. 査読有.

〔学会発表〕(計 16 件)

Takeuchi A, Matsuoka S 「Mitochondrial Na-Ca exchanger NCLX-mediated mitochondria-sarcoplasmic reticulum Ca crosstalk and cardiomyocyte automaticity」第 91 回日本生理学会大会 (2014 年 3 月 17 日、シンポジウム、鹿児島)

竹内綾子、松岡達 「洞房結節細胞自動能におけるミトコンドリア NCLX の寄与 シミュレーション解析」生理学研究所研究会、(2013 年 11 月 27 日、岡崎) 竹内綾子、松岡達 「システム生理学研究による細胞内イオンダイナミクス—細胞生理機能連関の包括的理解」第 7 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、(2013 年 11 月 24 日、仙台)

Takeuchi A, Matsuoka S 「Simulation analyses of the role of NCLX, a mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger, on the regulation of automaticity in sinoatrial node cells」2013 Cardiac Physiome Workshop (2013 年 10 月 17 日~19 日、バーハーバ、アメリカ合衆国)

Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S 「Theoretical analysis of mitochondrial NCX-mediated regulation of automaticity in sinoatrial node cells」The 2nd HD Physiology International Symposium: Multi-Level Systems Biology (2013 年 6 月 28 日~29 日、東京)

Kim B, Takeuchi A, Matsuoka S 「Mitochondrial NCX controls directional migration of B lymphocytes」第 90 回日本生理学会大会 (2013 年 3 月 27 日~29 日、東京)

Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S

「Theoretical analysis of mitochondrial NCX (NCLX)-mediated regulation of cardiac automaticity」第90回日本生理学会大会(2013年3月27日、東京)

Kim B, Takeuchi A, Matsuoka S 「Role of mitochondrial NCX on CXCL12-induced chemotaxis in A20 B lymphocytes」57th Biophysical Society Annual Meeting (2013年2月3日、フィラデルフィア、アメリカ合衆国)

Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S 「Inhibition of a mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCLX, slows beating rate of cardiomyocyte」第6回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム(2012年11月23日~24日、京都)

竹内綾子, 金鳳柱, 松岡達 「拍動培養心筋細胞 HL-1 におけるミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺交換輸送体 NCLX の役割」生理学研究学会(2012年11月21日、岡崎)

Matsuoka S, Takeuchi A, Kim B 「Fine-Tuning of Cardiac Automaticity by Mitochondria Na⁺-Ca²⁺ Exchange (NCLX)」2012 Cardiac Physiome Workshop(2012年10月31日、サンディエゴ、アメリカ合衆国)

Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S 「Mechanisms underlying NCLX reduction-mediated slowing of cardiomyocyte beating rate」Cardiac Physiome Workshop (2012年10月31日~11月2日、サンディエゴ、アメリカ合衆国)

竹内綾子, 金鳳柱, 松岡達 「ミトコンドリア Na-Ca 交換輸送体 NCLX を介した心筋細胞自動能制御」第29回日本心電学会学術集会(2012年10月12日、千葉)

Takeuchi A, Kim B, Matsuoka S 「Regulation of “Ca clock”-mediated cardiac automaticity by mitochondrial NCX (NCLX)」12th Symposium of the European Calcium Society (2012年9月9日~12日、トゥールーズ、フランス)

竹内綾子, 金鳳柱, 松岡達 「心筋細胞の自動能発生におけるミトコンドリア Na⁺-Ca²⁺交換輸送体 NCLX の役割」第7回トランスポーター研究会(2012年6月9日~10日、京都)

連関. In 生理学実習書. 日本生理学会教育委員会 監修, 南江堂, 12章-2, pp237-243, 2013. 総ページ数 296 ページ. Matsuoka S, Takeuchi A. Giant Patch and Macro Patch. In Patch Clamp Techniques-From beginning to advanced protocols. edited by Okada Y, Springer Protocols, Tokyo, Chapter 14, pp207-218, 2012. 総ページ数 439 ページ.

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
なし

取得状況(計0件)
なし

〔その他〕
福井大学医学部統合生理学ホームページ
<http://isphysio.med.u-fukui.ac.jp/>

<http://seiri2.med.lab.u-fukui.ac.jp/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
竹内綾子 (TAKEUCHI, Ayako)
福井大学・医学部・特命助教
研究者番号: 00378704

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
姫野友紀子 (HIMENO, Yukiko)
立命館大学・日本学術振興会特別研究員

〔図書〕(計2件)

松岡達, 竹内綾子. 心室筋細胞興奮収縮