

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282122

研究課題名(和文)多階層医工学的解析に基づく心臓の機械受容システムの分子基盤と生理的意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of mechanotransduction in the heart

研究代表者

片野坂 友紀 (Katanosaka, Yuki)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60432639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、心筋細胞のメカノセンサー分子を同定し、この分子を任意で発現抑制できるノックアウトマウスを作成し、この表現型を多階層から解析した。その結果、常に拍動している心臓において、このメカノセンサーは必要不可欠な分子であることが明らかとなった (Katanosaka et al., 2014, Nature Communications)。さらに、心臓の血行動態負荷に対する可塑性は、このメカノセンサーを介した細胞内シグナルによって支えられていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The heart has a dynamic compensatory mechanism for haemodynamic stress. However, the molecular details of myocardial mechanotransduction have remained unclear. Here we generated temporally-controlled cardiac-specific transient receptor potential, vanilloid family type 2 (TRPV2)-deficient mice. The elimination of cardiac TRPV2 resulted in a rapid and severe decline in cardiac function, with abnormal cellular morphology, intracellular Ca<sup>2+</sup> handling, and contractility. These results suggested that TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function.

研究分野：医工学、生理学、細胞生理学、生化学、形態学

キーワード：メカノセンサー 心筋細胞 リモデリング カルシウム チャネル 血行動態負荷 心肥大 心不全

## 1. 研究開始当初の背景

心不全とは、心臓ポンプ機能が低下して末梢の臓器に十分な血液を送れない状態である。我が国では、75歳以上の約50%が心不全患者である。発症後の5年生存率も悪く、決定的な治療法は確立されていない。心不全は各種病態の終末像であり、発症に至る原因や過程は一樣ではないが、唯一、高血圧などの血行動態負荷が、共通の引き金として知られている。このため、メカノセンサーを介した心不全発症機構の解明によって、画期的治療法が開発されることが期待されている。

心不全に至る疾患は多様であるが、多くの場合で、血行動態ストレス応答として心肥大が先行する。約15年前に、肥大応答の原因は、細胞内  $Ca^{2+}$  の持続的な上昇であることが明らかになったが (*Molkentin JD, 1998, Cell; Olson EN, 2006, Science*)、その  $Ca^{2+}$  流入経路は未だ不明である。2004年、心筋のアンジオテンシン受容体が、膜の伸展を直接感知すると報告されたが (*Yunzeng et. al., 2004, Nature Cell Biol.*)、受容体の下流には複数の  $Ca^{2+}$  チャネルが存在するため、肥大応答を引き起こす  $Ca^{2+}$  流入経路は同定できない。そこで、世界中の研究者が膜の伸展により直接活性化される機械刺激感受性  $Ca^{2+}$  チャネルを探し始めた。

我々は、世界に先駆けて、心筋メカノセンサーの候補分子を発見し (*Katanosaka, 2003, J Cell Biol.*)、この分子の生体での役割を明らかにするために、薬物で任意に心筋細胞からこの分子をノックアウト(KO)できるマウスの開発にとりくんできた。目的のマウスが完成し、このKOマウスの心臓での表現型の解析から、いくつかの成果が得られるようになってきたところであった。

## 2. 研究の目的

心不全に至る原因や過程は一樣ではないが、唯一、高血圧などの血行動態負荷は共通の引

き金である。しかしながら、心筋細胞の機械刺激受容機構は未だ解明されておらず、その生理的役割や心肥大・心不全発症メカニズムが明らかにされていない。この問題の解決には、生体内環境を再現・評価する医工学的な方法論の開発と、心筋メカノセンサーを核とした分子・細胞・生体を網羅する多階層からの評価に基づいたトランスレーショナルリサーチが必要である。本研究では、メカノセンサー分子・細胞・臓器機能からの多階層医工学的評価に基づき、心臓の機械刺激受容機構を解明することを通して、生体の多様な血行動態負荷を巧みに利用した心機能維持および適応応答機構、および心不全発症機構の分子基盤を明らかにし、新しい心不全治療戦略を提案することを目的とした。

## 3. 研究の方法

心筋細胞において、メカノセンサー分子を任意に発現抑制するKOマウスを作成した。

成体マウスの心臓において、メカノセンサーをKOし、心機能・心筋細胞機能・構造を解析した。

上記のKOマウスにおいて、キーとなる分子経路を対象にPCRアレイ解析を行い、メカノセンサーを介したシグナル経路を推定した。

上記で推定した経路の寄与がどの程度あるか、KOマウスにキー因子を投与して、その表現型解析をした。

圧負荷によって引き起こされる心臓や心筋細胞機能におこる変化を検討した。

メカノセンサーを中心とした複合体を同定するための生化学的実験系の確立を試みた。

## 4. 研究成果

我々は、介在板に局在するTRPV2の生理的役割を明らかにするために、成体マウスの心臓のTRPV2を発現抑制したKOマウスを作

製した。これまでに、全身性の TRPV2 ノックアウト (KO) マウスでは胎生致死となることが報告されていたため、我々は、薬物で任意に心筋細胞から TRPV2 の発現抑制できるマウスを作製した。

タモキシフェン投与開始から 4 日後の TRPV2KO マウスの心臓は、心肥大やファイブローシスは見られなが、心機能が著しく低下しており、1 週間以内に 70% の死亡率を示した。また、電子顕微鏡観察による微細構造レベルで、介在板構造の乱れや介在板直下の細胞骨格分子の脱重合が観察された。さらに、N-cadherin や  $\beta$ -catenin などの介在板に局在する接着分子の局在が乱れており、隣り合う心筋細胞同士の機械的な連関が弱まっていることが予想された。

個々の心筋細胞の機能低下は、心臓ポンプ機能を低下させる主要因となる。そこで、著しい心機能の低下を示した、薬物投与開始から 4 日後の TRPV2KO マウスの心臓から心筋細胞を単離して、電気刺激依存的な収縮力と、興奮収縮連関に伴う細胞内  $Ca^{2+}$  トランジエントを解析した。驚くべきことに、単一心筋細胞の形態や収縮力、細胞内  $Ca^{2+}$  ハンドリングは、いずれも低下しておらず、正常心から単離した細胞と違いがなかった。この結果は、TRPV2KO マウスの心機能が低下した原因は、個々の細胞機能の低下に起因するものではなく、介在板構造の崩壊によって隣り合う心筋細胞同士の機械的カップリングが低下したことが原因であることを示している。

これまでの多くの遺伝子改変モデルの研究から、IGF-1 受容体/PI3K $\alpha$ /Akt 経路は、生理条件下での心臓の形や機能の維持に大変重要な役割を示すことが明らかとなっている。我々は、IGF-1 添加培地では、TRPV2KO 細胞の形態萎縮が軽減されていることを発見した。IGF-1 は、心筋細胞や周囲の繊維芽細胞から分泌され、心筋細胞に保護的な作用をもたらすことが知られている。

また心不全患者の心筋では IGF-1 発現が低いことも報告されている。我々の実験においても、正常心筋細胞では、20% の伸展刺激を 1Hz、30 分間継続的に与えた場合、細胞外へ IGF-1 が分泌された。一方で、TRPV2KO 細胞では、30 分間伸展培養を経た後でも、IGF-1 の分泌量は伸展刺激前と変わりなかった。

前述したように、我々の作製した心臓特異的 TRPV2KO マウスは、タモキシフェン投与を始めてから 3 日後には TRPV2 発現が著しく抑制される。この時期、TRPV2KO 心臓では、IGF-1、IGF-1 受容体、PI3K $\alpha$ 、Akt1 の mRNA の発現量が著しく低下していたため、TRPV2 の発現抑制にともなって IGF-1 受容体/PI3K $\alpha$ /Akt 経路が減弱していることが予想された。減弱した IGF-1 受容体/PI3K $\alpha$ /Akt 経路を維持するために、タモキシフェン誘導と同時に IGF-1 を投与したところ、1 週間後には、TRPV2KO 心臓で観察される心室の拡大や心体重比の増大が、正常心とほぼ変わらないレベルに維持されており、心機能も一部回復した。

本研究では、TRPV2 は、心臓の形や機能の維持に欠かせない分子であることを示した。介在板の機能を維持するために、TRPV2 の分子構造そのものが必要であるのか、TRPV2 活性が必要であるのかについては、現在のところ不明である。また、成体マウスの介在板では、TRPV2 活性とは無関係に、TRPV2 の分子構造そのものが、介在板を形成する分子群や、介在板近傍の筋繊維をコーディネートしている可能性も示唆される。TRPV2 も他の TRP チャネル同様、細胞質領域で介在板を形成する分子群と結合し、「メカノセンシティブ複合体」を形成しているのかもしれない。これらの仮説をサポートするデータとして、我々は、既に、いくつかの興味深い結合分子を同定しており、現在生化学的・分子生理的解析を進めている最中である。

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 7 件)

- (1) Katanosaka Y, Iwasaki K, Ujihara Y, Takatsu S, Nishitsuji K, Kanagawa M, Sudo A, Toda T, Katanosaka K, Satoshi M, Naruse K. TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. **Nature Communications**, 2014, DOI:10.1038/ncomms4932 (査読有)
- (2) Junsuke Igarashi, Takeshi Hashimoto, Yasuo Kubota, Kazuyo Shoji, Tokumi Maruyama, Norikazu Sakakibara, Yoh Takuwa, Yoshihiro Ujihara, Yuki Katanosaka, Satoshi Mohri, Keiji Naruse, Tetsuo Yamashita, Ryuji Okamoto, Katsuya Hirano, Hiroaki Kosaka, Maki Takata, Ryoji Konishi, Ikuko Tsukamoto. Involvement of S1P1 receptor pathway in angiogenic effects of a novel adenosine-like nucleic acid analog COA-Cl in cultured human vascular endothelial cells. **Pharmacology Research and Perspectives**, 2014, DOI:10.1002/prp2.68 (査読有)
- (3) Saito F, Kanagawa M, Ikeda M, Hagiwara H, Masaki T, Ohkuma H, Katanosaka Y, Shimizu T, Sonno M, Toda T, Matsumura K. Overexpression of LARGE suppresses muscle regeneration via down-regulation of insulin like growth factor 1 and aggravates muscular dystrophy in mice. **Hum Mol Genet.** 2014, 23(17):4543-58. (査読有)
- (4) Ujihara Y, Iwasaki K, Takatsu S, Hashimoto K, Naruse K, Mohri S, Katanosaka Y. Induced NCX1 overexpression attenuates pressure overload-induced pathological cardiac remodeling. **Cardiovascular Res.** 2016, 111:348-361. Doi:10.1093/cvr/cvw113. (査読有)
- (5) Ujihara Y, Mohri S, Katanosaka Y. Effects of induced  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger overexpression on the spatial distribution of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and junctophilin-2 in pressure-overloaded hearts. **Biochem Biophys Res Commun.** 2016, 480:564-569. Doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.090. (査読有)
- (6) 片野坂友紀「心臓の構造と機能における TRPV2 の役割」『循環器内科』78:2, 171-178, 科学評論社, 東京, 2015 (査読無)
- (7) 片野坂友紀、「TRP シグナルを利用した機械受容～心臓の可塑性や生理機能を支える TRP チャネルを中心に～」『医学のあゆみ』257, 1015-1022, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2016 (査読無)

[学会発表](計 24 件)

**招待講演として**

- (1) Yuki Katanosaka, The critical role of TRPV2 in the maintenance of cardiac structure and function (International symposium of mechanobiology-2014、Okayama)、2014年5月22日
- (2) Yuki Katanosaka, Translocation of desmin from intercalated discs in TRPV2-deficient myocytes. Intermediate Filaments in Neuromuscular Disorders *Satellite Workshop to ICNMD2014* Sunday July 6th, 2014, Nice Acropolis Convention Center
- (3) 片野坂友紀、「メカニカルストレスを利用した筋細胞の機能維持」, 第 87 回日本生化学会、シンポジウム「次世代筋研究の夜明け」, 京都 (2014 年 10 月 17 日)
- (4) Yuki Katanosaka, 第 88 回日本薬理学会、名古屋, 2015 TRPV2 is crucial for cardiac structure and function. (第 88 回 日本薬理学会・生理学会合同国際シンポジウム)、

2015年3月19日

- (5) **片野坂友紀**, 第二回 若手による骨格筋研究会「メカノトランスダクションを利用した筋細胞の成熟機構」2015.11.5(コープイン京都)
- (6) **片野坂友紀**・第55回日本生体医工学会大会, 富山, 2016年4月28日  
The critical role of TRPV2 within the working heart (オーガナイズドセッション、シンポジウム)
- (7) **Yuki Katanosaka**, 第90回日本薬理学会, 長崎, 2017年3月16日  
The critical role of TRPV2 in the hearts (次世代シンポジウム)
- (8) **Yuki Katanosaka**, 第94回日本生理学会, 浜松, 2017年3月28日  
TRPV2 is required for normal cardiac plasticity. (公募シンポジウム)
- 一般講演として**
- (1) **Yuki Katanosaka**  
TRPV2 is crucial for cardiac structure and function, Gordon Research Conference (2014年6月7-13日) Colby-Sawyer College
- (2) **Yoshihiro Ujihara**, Satoshi Mohri, **Yuki Katanosaka**, The critical role of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger on the maintenance of T-tubule structure, 18th European Bioenergetics Conference (2014年7月15日) University of Lisbon
- (3) 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**, 心筋細胞 T 管膜の  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換体による局所  $\text{Ca}^{2+}$  制御の重要性, 日本生体医工学会(2014年6月) 仙台国際センター
- (4) **片野坂公明**, 高津理美, 水村和枝, 成瀬恵治, **片野坂友紀**, 成体一次感覚ニューロンに発現する TRPV2 の機械痛覚における役割, 生理研研究会・痛みと痛覚情動連関の神経機構(2014年12月10-11日)

生理学研究所

- (5) **Kimiaki Katanosaka**, Kazuhiro Takeda, **Yuki Katanosaka**, Makiko Kashio, Makoto Tominaga, Kazue Mizumura, The immunohistochemical characterization of the new heat-sensitive primary sensory neuron in mouse dorsal root ganglia. The 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan(2015年3月23日) 神戸国際会議場
- (6) Saito F, **Kanagawa M**, Ikeda M, Hagiwara H, Masaki T, Ohkuma H, **Katanosaka Y**, Shimizu T, Sonno M, Toda T, Matsumura K., Overexpression of LARGE suppresses muscle regeneration via down-regulation of insulin like growth factor 1 and aggravates muscular dystrophy in mice. 第37回日本神経科学大会(2014年9月11-13日) パシフィコ横浜
- (7) Saito F, **Kanagawa M**, Ikeda M, Hagiwara H, Masaki T, Ohkuma H, **Katanosaka Y**, Shimizu T, Sonno M, Toda T, Matsumura K., Overexpression of LARGE suppresses muscle regeneration via down-regulation of insulin like growth factor 1 and aggravates muscular dystrophy in mice, 第87回日本生化学会、京都(2014年10月17日) 京都国際会議場
- (8) **Yoshihiro Ujihara**, Satoshi Mohri, Keiji Naruse, **Yuki Katanosaka**, TRPV2 is critical for cardiac function in adult. The 54th Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering. 2015, May. Nagoya
- (9) **Yuki Katanosaka**, TRPV2 is critical for cardiac structure and function. Gordon Conference muscle E-C coupling, 2015, June(5/31-6/5), Sunday river
- (10) 氏原嘉洋・毛利聡・成瀬恵治・**片野坂友紀**, 新生児培養心筋細胞の介在板形成と

- 筋成熟化における TRPV2 の役割、中国四  
国生理学会、鳥取、2015 年 10 月 24 日
- (11) 氏原嘉洋・片野坂友紀 筋細胞の  
Mechanotransduction を介したエネルギー  
管理の可能性. 第 3 回 骨格筋研究会、  
九州大学、2015 年 11 月 14 日
- (12) TRPV2 is critical for the structural and  
functional maturation of cardiomyocytes.  
Yuki Katanosaka, Yoshihiro Ujihara,  
Satoshi Mohri, Keiji Naruse. Annual meeting  
of American Society of Cell Biology,  
2015/12/12-16, 国外 (San Diego)
- (13) 心筋細胞における TRPV2 を介したメカ  
ニカルシグナル経路 (Mechanical  
signaling via TRPV2 in cardiomyocytes),  
口頭, Yoshihiro Ujihara, Ken Hashimoto,  
Satoshi Mohri, Keiji Naruse, Yuki  
Katanosaka, バイオエンジニアリング学  
会, 2016/1/9, 東京
- (14) 圧力負荷による心不全進行過程の T 管リ  
モデリングにおける NCX1 の役割, ポス  
ター, 氏原嘉洋, 橋本謙, 成瀬恵治, 毛利  
聡, 片野坂友紀, 第 93 回日本生理学会大  
会, 2016/3/23, 札幌
- (15) 氏原嘉洋, 橋本謙, 成瀬恵治, 毛利聡, 片  
野坂友紀, 心不全進行過程における  
Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 交換体の強制発現が心筋細胞の  
微細構造に及ぼす影響, 第 55 回日本生体  
医工学会大会, ポスター掲示, 富山国際  
会議場, 富山, 2016/04/27
- (16) C2C12 筋芽細胞の融合・分化過程におけ  
るメカノセンサーの役割 The role of  
stretch-activated channel on myogenic  
differentiation of skeletal myoblast  
千葉弓子, 氏原嘉洋, 片野坂友紀, 第 4  
回骨格筋研究会、名古屋、2016 年 11 月  
19 日

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 片野坂友紀 「心臓の構造と機能における

TRPV2 の役割」循環器内科、科学評論社、  
2015 : 78;2; 171-178

- (1) 片野坂友紀 「TRP シグナルを利用した機  
械受容～心臓の可塑性や生理機能を支え  
る TRP チャネルを中心に～」  
『医学のあゆみ』257, 1015-1022, 医歯薬  
出版株式会社, 東京, 2016

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

新聞報道 (2014 年 5 月 30 日)

Katanosaka et al., Nature  
Communications の紹介記事として  
共同通信・日本経済新聞・山陽新聞  
毎日新聞・科学新聞  
電子ジャーナル: Web レター「Okayama  
University Medical Research Updates  
(OU-MRU)」Vol.4

[http://www.okayama-u.ac.jp/tp/news/ne  
ws\\_id4201.html](http://www.okayama-u.ac.jp/tp/news/news_id4201.html)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

片野坂 友紀 (KATANOSAKA YUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助  
教

研究者番号 : 60432639

(2) 研究分担者

金川 基 (KANAGAWA MOTOI)

神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号 : 00448044

片野坂 公明 (KATANOSAKA KIMIYUKI)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号 : 50335006

中村 一文 (NAKAMURA KAZUFUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准  
教授

研究者番号 : 10335630

氏原 嘉洋 (UJIHARA YOSHIHIRO)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 80610021