

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26702014

研究課題名(和文) 心筋細胞のT管膜維持機構の解明：T管膜局所Ca²⁺管理機構の分子基盤と生理的意義研究課題名(英文) The importance of local Ca²⁺ control beneath the T-tubule membrane in cardiomyocytes

研究代表者

氏原 嘉洋(Ujihara, Yoshihiro)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80610021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,900,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞の膜陥入管構造であるT管膜は、細胞の効率的な収縮に必須である。そのため、T管膜構造の崩壊は心不全の引き金になるが、その崩壊メカニズムは不明であった。圧力負荷によって誘導される心不全において、T管膜が崩壊する前に、収縮ごとに流入してくるCa²⁺を細胞外へ排出する輸送体であるNa⁺/Ca²⁺交換体(NCX1)のT管膜上での機能が著しく低下することを明らかにした。NCX1を過剰発現することでNCX1の機能低下を回避すると、T管膜構造の崩壊と心不全の進行を抑制することができた。これらの実験結果は、T管膜のNCX1による局所Ca²⁺制御が心筋細胞の構造と機能の維持に重要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Transverse tubules (T-tubules) are invaginations of the sarcolemma and critical for cardiomyocyte contraction. Therefore, T-tubule disorganization is linked to decreased contractility in heart failure. However, the molecular details have remained unclear. Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1) is essential Ca²⁺ regulator of myocyte Ca²⁺ homeostasis and preferentially localized to T-tubule membrane. We found that NCX1 activity was depressed before T-tubule disorganization during the progression of heart failure induced by pressure overload. In addition, the recovery of depressed NCX1 activity by inducing NCX1 expression prevented T-tubule disorganization and heart failure progression. These results suggest that local Ca²⁺ control beneath the T-tubule membrane is crucial for the maintenance of myocyte structure and function, in which NCX1 has a pivotal role.

研究分野：医用生体工学

キーワード：バイオメカニクス メカノバイオロジー メカノフィジオロジー リモデリング カルシウム ホメオスタシス T管膜 心不全

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞は生涯にわたって収縮・弛緩を繰り返し、心臓の血液ポンプ機能を支えている。効率的な収縮・弛緩を実現するために、心筋細胞には特有の微細構造が発達している (図1)。形質膜の陥入管構造であるT管膜は、細胞内に敷き詰められた一つ一つの収縮装置サルコメアの間隔 (約 2 μm) に沿うように、細胞内 Ca^{2+} ストアである筋小胞体と共に規則正しく配置されている。このような構造的特徴は、形質膜に生じた電位変化を瞬時に筋小胞体からの Ca^{2+} 放出に変換して、細胞内に張り巡らされたサルコメアの同調した収縮を実現している。多くの心不全の心筋細胞では、T管膜構造が崩壊している様子が報告されており、これが収縮能低下の引き金であると考えられている (Guo et al., *Cardiovasc. Res.*, 2013)。しかしながら、T管膜構造の維持機構の分子基盤がほとんどわかっていないことから、心不全の発症や重篤化の決定的な治療法は、未だに見つかっていない。

心筋細胞の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX1) は、主としてT管膜に局在し、生理条件下の心臓では、収縮ごとに流入してくる Ca^{2+} の実質上唯一の細胞外への排出系として働いている。心筋細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇は、収縮不全、転写因子やプロテアーゼの活性化を招いて心不全を引き起こすことが知られている。心不全の心筋細胞では、NCX1 の発現量が亢進していることが報告されており、これは蓄積した Ca^{2+} を細胞外へ排出するための適応的な応答であると考えられている (Studer et al., *Circ. Res.*, 1994)。しかしながら、NCX1 は、周囲の環境に応じて、双方向に Ca^{2+} を輸送することが可能であるため、細胞内への Ca^{2+} 流入系として働き悪性因子となるか、逆に細胞外への Ca^{2+} 排出系として働き心筋細胞保護に寄与するか、NCX1 の病態生理的な意義は未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

心筋細胞の T 管膜に局在する NCX1 の生理・病態生理的意義を明らかにすることを通して、T管膜構造の維持機構の分子基盤を解明し、新しい心不全の治療を提案することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 任意のタイミングで心筋細胞特異的に NCX1 を強制発現可能なマウス

心不全進行過程における NCX1 の役割を明らかにするために、ドキシサイクリン (DOX) 存在下でのみ、心筋細胞特異的に NCX1 を強制発現可能な遺伝子改変マウスを独自に作製し (Ujihara et al., *Cardiovasc. Res.*, 2016)、実験に使用した。

(2) 大動脈縮窄 (TAC) 手術による圧力負荷モデルの作製

マウス胸部大動脈を細径針と共に結紮後、針を引き抜くことで狭窄を生じさせ、左心室

に過大な圧力負荷を作用させることで心不全を誘導した。

(2) 心筋細胞の単離

摘出したマウス心臓の大動脈に逆行性にカニューレーションを行い、血液を洗い流した後にコラゲナーゼ、トリプシン、プロテアーゼを含む酵素液を灌流することで、細胞を単離した。細胞は 37°C で保存し、単離後 8 時間以内に使用した。

(3) T 管膜構造の定量化

膜電位感受性色素 Di-8-ANEPPS を用いて単離した心筋細胞の細胞膜を染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光画像を取得し、二値化処理した画像を周波数解析することで、T管膜の周期性を定量化した。

(4) Ca^{2+} イメージング

電気刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の計測には、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 Indo-1 AM を、NCX1 活性の計測には、Fura-2 AM を用いた。

(5) NCX1 の発現量・局在の解析

心不全の進行に伴う Ca^{2+} ハンドリング分子の発現量の変化をウエスタンブロットで、局在の変化を免疫蛍光染色で調べた。

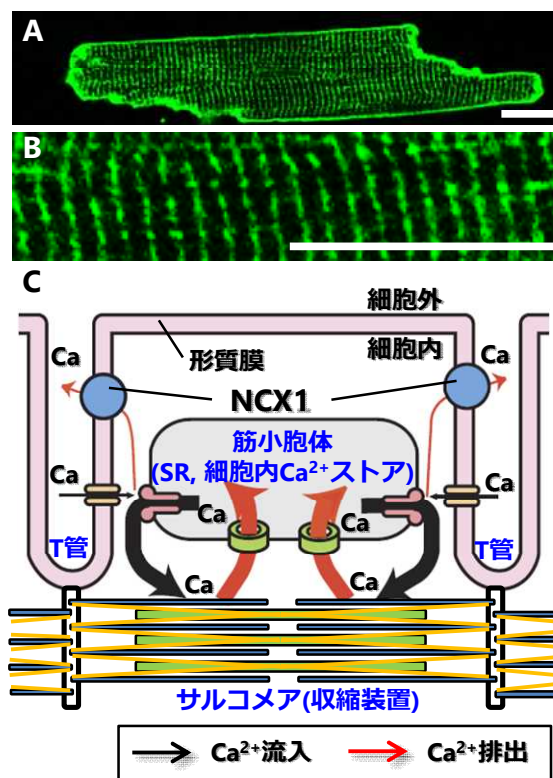


図1: 哺乳類心室心筋細胞におけるT管膜の重要性。(A)単離したラット心室心筋細胞の膜染色画像。(B)画像(A)の拡大像。(C)心筋細胞の収縮・弛緩のタイミングを決める Ca^{2+} ハンドリングの模式図。T管膜や筋小胞体膜上には、NCX1 などの多数の Ca^{2+} ハンドリング分子が局在し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を厳密に管理している。スケールバー、20 μm 。

4. 研究成果

TAC手術を施し、左室に過大な圧力を作用させたところ、体重に対する心臓の重量比、左室内径、細胞断面積は経時的に増大した。左室内径短縮率は次第に低下し、TAC後16週には、重篤な心不全に移行していることを確認した。

圧力負荷による心不全進行過程のT管膜のリモデリングを観察したところ、TAC後8週の時点ではTAC前と同程度の周期性が維持されていた。しかし、TAC後16週では周期性が著しく低下しており、T管膜が崩壊していることがわかった。

TAC後のNCX1の発現量の経時変化をウエスタンブロットで調べたところ、NCX1の発現量は12週目までは増大していたが、16週後には著しく低下した(図2)。続いて、NCX1活性を調べたところ、TAC後6週までは上昇した(図2)。しかし、TAC後8週の時点では、NCX1活性は著しく低下し、その後も引き続き低下していた。このことは、TAC直後は、圧力負荷への適応的な応答としてNCX1活性が上昇して心臓のポンプ機能を維持しようとするものの、やがて負荷に耐えきれなくなり、心不全が進行する過程ではNCX1の活性が低下することを示している。

生理条件下では、NCX1は主としてT管膜上に存在するため、TAC前の正常な心臓のNCX1を免疫染色すると、T管膜と同様に一定間隔で周期的なシグナルが観察された。一方、TAC後8週の時点では、シグナルの周期性が失われていた。TAC後8週において、NCX1の発現量は増大していたにもかかわらず、NCX1活性が低下していたのは、局在の異常に起因すると考えられる。大変興味深いことに、8週の時点ではT管膜は存在していたことから、NCX1の局在の乱れはT管膜の崩壊に起因するものではなく、NCX1が選択的に内在化された結果であることが推察される。

TAC後8週目以降の細胞外へのCa²⁺排出能の低下が、T管膜の崩壊を引き起こし、心不全の進行を促進させているのではないかと考え、8週目からマウスの腹腔内にDOXを投与して、NCX1を心臓特異的に強制発現させた。DOX投与後4週(TAC後12週)でNCX1活性はTAC前と同程度まで回復し、TAC後16週まで維持されていた。TAC後16週では、T管膜構造は崩壊していたが、NCX1を強制発現させた場合は、TAC後16週でもT管膜構造は維持されていた(図3)。TAC後16週では、T管膜が崩壊しているために、電気刺激による細胞内のCa²⁺濃度変化が不均一であったのに対し、NCX1を強制発現した場合は、均一な濃度変化が維持されていた。このことから、心不全進行過程におけるNCX1活性の低下を回避することで、T管膜の構造だけではなく、機能も維持できることがわかった。細胞レベルの形態や収縮率に加え、臓器レベルの形態や機能も維持されており、圧力負荷が作用し続けているにもかかわらず、心不全

の進行が抑制されていた。

以上のことから、NCX1のT管膜局所のCa²⁺管理は、細胞の構造と機能の維持に重要であり、NCX1の機能の低下を抑制することが、心不全治療に成り得ることが示唆された。

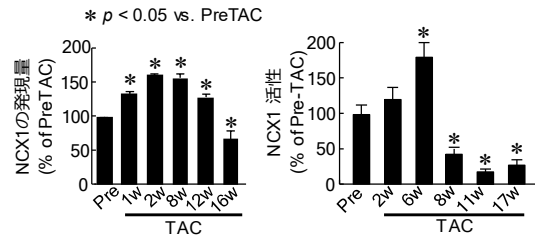


図2: 大動脈縮窄手術(圧力負荷)によって誘導された心不全進行過程におけるNCX1の発現量と活性の経時変化。手術後6週まではNCX1によるCa²⁺輸送能力が上昇しているが、その後急激に低下した。

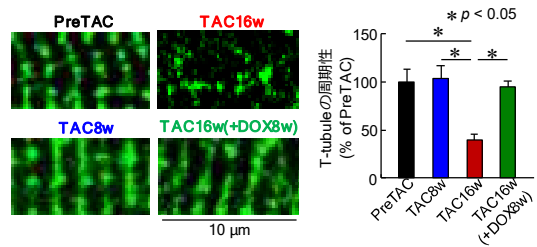


図3: 圧力負荷による心不全進行過程においてNCX1強制発現すると、T管膜構造を維持できる。

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6件)

- ① Hanashima A, Hashimoto K, Ujihara Y, Yobimoto T, Kodama A, Mohri S. Complete primary structure of the I-band region of connectin at which mechanical property is modulated in zebrafish heart and skeletal muscle. *Gene*, 2017;59:19-26.
DOI: 10.1016/j.gene.2016.10.010
- ② Ujihara Y, Mohri S, Katanosaka Y. Effects of induced Na⁺/Ca²⁺ exchanger overexpression on the spatial distribution of L-type Ca²⁺ channels and junctophilin-2 in pressure-overloaded hearts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016;480(4):564-569.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.090

- ③ 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 Research*, 2016;111(4):348-61. DOI: 10.1093/cvr/cvw113
- ④ Ujihara Y, Nakamura M, Soga M, Koshiyama K, Miyazaki H, Wada S. Computational studies on strain transmission from a collagen gel construct to a cell and its internal cytoskeletal filaments, *Computers in Biology and Medicine*, 2015;56:20-29. DOI:10.1016/j.combiomed.2014.10.015
- ⑤ Nakamura N, Ujihara Y. Numerical Simulations of Tensile Tests of Red Blood Cells: Effects of the Hold Position, *Micro and Nanosystems*, 2015; 7(3):135-142. DOI:10.2174/1876402908666160105235937
- ⑥ Sasae Y, Hashimoto K, Ujihara Y, Hanashima A, Honda T, Morita Y, Mohri S. Left ventricular mechanics and myocardial calcium dynamics in short-term and long-term hyperthyroid mice. *Kawasaki Medical Journal*, 2015;41:41-55. DOI:10.11482/KMJ-E41(2)41

[学会発表] (計 26 件)

- ① 氏原 嘉洋、橋本 謙、成瀬 恵治、毛利 聡、片野坂 友紀、圧負荷によって誘導される不全心における *junctional*-2 の局在変化に及ぼす NCX1 の影響、日本生理学会第 94 回大会、2017/03/29、アクトシティ浜松 (静岡県浜松市)
- ② 氏原 嘉洋、橋本 謙、毛利 聡、片野坂 友紀、圧力負荷によって誘導される心不全発症における Ca^{2+} 排出系の役割、第 29 回 バイオエンジニアリング講演会、2017/01/19、ウインクあいち (愛知県名古屋)
- ③ 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^+/Ca^{2+} 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、2016/04/27、富山国際会議場 (富山県富山市)
- ④ 氏原 嘉洋、橋本 謙、成瀬 恵治、毛利 聡、

- 片野坂 友紀、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、第 93 回日本生理学会大会、2016/03/23、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ⑤ 氏原 嘉洋、橋本 謙、毛利 聡、片野坂 友紀、心筋細胞における TRPV2 を介したメカニカルシグナル経路、日本機械学会第 28 回 バイオエンジニアリング講演会、2016/01/09、東京工業大学 (東京都目黒区)
- ⑥ 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、第三回若手による骨格筋研究会、2015/11/24、九州大学 (福岡県福岡市)
- ⑦ 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、第 67 回 日本生理学会中国四国地方会、2015/10/24、米子コンベンションセンター (鳥取県米子市)
- ⑧ 氏原 嘉洋、生理的な力学情報を利用した心機能を維持する仕組み、バイオメカニクスフォーラム 21 第 77 回研究会、2015/07/04、大阪大学 (大阪府豊中市)
- ⑨ 氏原 嘉洋、橋本 謙、成瀬 恵治、毛利 聡、片野坂 友紀、成体マウス心臓の機能維持における TRPV2 の役割、第 54 回 日本生体医工学会大会、2015/05/09、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- ⑩ 氏原 嘉洋、心筋リモデリングにおける T 管膜局所の Ca^{2+} 管理の重要性、日本生体医工学会 第 153 回 バイオメカニクス研究会、2015/02/06、川崎医科大学 (岡山県倉敷市)
- ⑪ 氏原 嘉洋、片野坂 友紀、 Ca^{2+} handling の是正による筋機能の維持 ~新しい心不全治療ターゲットとしての NCX1~、第二回 若手による骨格筋細胞研究会、2014/11/05、コープイン京都 (京都府京都市)
- ⑫ Ujihara Y, Mohri S, Katanosaka Y, The critical role of Na^+/Ca^{2+} exchanger on the maintenance of T-tubule structure, 18th European Bioenergetics Conference, 2014/07/16, Lisobon (Portugal)
- ⑬ 氏原 嘉洋、岩崎 慶一郎、高津 理美、橋本 謙、成瀬 恵治、毛利 聡、片野坂 友紀、心筋細胞 T 管膜の Na^+/Ca^{2+} 交換体による局所 Ca^{2+} 制御の重要性、2014/06/25、仙台国際センター (宮城県仙台市) (他 13 件)

[その他]

- ① ホームページ
<https://www.kawasaki-m.ac.jp/med/study/info.php?id=202>

- ② プレスリリース
心不全の進行を抑制する分子を特定
http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id399.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

氏原 嘉洋 (UJIHARA Yoshihiro)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：80610021

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

毛利 聡 (MOHRI Satoshi)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：00294413

橋本 謙 (HASHIMOTO Ken)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：80341080

花島 章 (HANASHIMA Akira)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：70572981

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

本田 威 (HONDA Takeshi)
川崎医科大学・医学部・大学院生