

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591386

研究課題名（和文）先天性心疾患モデルラットの全胚培養による刺激伝導系の発生及び細胞機能異常の解明

研究課題名（英文）Developmental analyses of the cardiac conduction system and cardiomyocytic functions in the rats with congenital cardiac anomalies

研究代表者

中川 雅生（NAKAGAWA MASAO）

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40188909

研究成果の概要（和文）：正常ラット胚とビスダイアミン投与先天性心疾患モデルラット胚の心臓刺激伝導系の発生について全胚培養により検討した。正常に比し心疾患モデルラットでは刺激伝導系原基の形成は遅く部位も不明確であった。心筋細胞の成長に伴う生理学的特性を細胞単離しやすい新生仔マウスを用いて検討した。細胞はすべて紡錘状で、形態では心筋細胞、線維芽細胞、刺激伝導系細胞の区別ができなかったが、成長に伴う生理学的特性の変化が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Bis-diamine induces congenital heart defects in embryos when administered to pregnant rats. Histological analyses of the developing cardiac conduction system were performed in this animal model and the normal control rat embryos using whole embryo culture. Bis-diamine disturbed the conduction tissue development through overall poor myocardial growth. We investigated developmental changes of the physiological characteristics in the neonatal mouse myocardial cells isolated using chunk method or from Langendorff perfusion method. All the isolated cells exhibited elongated spindle-shaped appearance and a conduction tissue cell could not be distinguished from a myocardial cell or a fibroblast. Whole-cell patch-clamp experiments clearly showed the developmental changes in electrophysiological characteristics of the myocardial cells including the decrease in the inward rectifier K^+ current and depolarization of resting membrane potential.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：発生・分化、細胞・組織、パッチクランプ法、イオンチャネル、静止膜電位、生理・機能、動物

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類や鳥類では、原始心管が形成さ

れると洞結節の原基が形成され、ゆっくりした蠕動様の収縮が始まる。発生が進み四腔を

もつ心臓では、洞結節から出た刺激により規則的に拍動しているが、この過程で刺激伝導系はどのような形態的变化を遂げ、分化し完成するか明確にされていない。

(2) 先天性心疾患には多くの不整脈が伴うことが臨床的に知られている。ファロー四徴等の円錐動脈幹奇形には房室ブロックや心室性不整脈が伴うことが報告されていて、これらは時に致死的となるため、薬物治療やカテーテルによるアブレーション治療が必要なことがあり、先天性心疾患に伴う刺激伝導系の形態と不整脈の発生機序を解明することは臨床的に重要な課題であった。

(3) 研究代表者の中川らは、妊娠 10 日の母ラットにビスダイアミンを経口投与すると胎仔に総動脈幹やファロー四徴などの円錐動脈幹奇形が高率に発生することから、この動物モデルを用いて全胚培養法により心奇形の発生機序に関する研究を行ってきた。このラット胎仔の心臓では、刺激伝導系の形態や細胞の機能にも異常が生じている可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

(1) 正常及び先天性心疾患モデルラットにおける刺激伝導系の発生過程を形態学的に比較検討し、刺激伝導系細胞の分布の差を明らかにする。

(2) 刺激伝導系及び周囲の心筋細胞の成長に伴う生理学的特性の変化について、パッチクランプ法を用いて検討し、先天性心疾患に伴う不整脈の診療へ還元する。

3. 研究の方法

(1) 正常ラットと先天性心疾患モデルラットにおける刺激伝導系の発生過程の形態学的検討

①妊娠 10.5、11.5、12.5、13.5、14.5 日の Wister ラットをエーテル深麻酔下に屠殺し、各々から胚を摘出した。これらの胚を 4%パラフォルムアルデヒド (PFA) 溶液で固定後、15%ショ糖液で脱水した。一部は 10%ゼラチン包埋後、厚さ 25 μ の切片を作成し、マウス抗 HNK-1 抗体とヤギ抗コネキシン 40 抗体を用いて二重免疫組織染色を行い、心臓の形態とともにこれらの発現を共焦点型レーザー顕微鏡で三次元的に観察した。また一部は、パラフィン包埋後矢状断に厚さ 5 μ の連続切片を作成し、コネキシン 43、45、30.2 の発現を検索した。

②先天性心疾患モデルラットは妊娠 10 日の Wister 系母ラットにビスダイアミン 200mg を胃ゾンデにて注入し作成した。妊娠 10.5、11.5、12.5、13.5、14.5 日にエーテル深麻酔下に屠殺し胚を摘出した。以下、①と同様の手順で心臓発生の過程と HNK-1 及びコネキシン 40 の発現の空間的位置関係、並びにコ

ネキシン 43、45、30.2 の発現を検索した。
③全胚培養を用いたビスダイアミン投与ラット胚の心臓における HNK-1、コネキシン 40、43、45、30.2 の発現の検討

妊娠 10 日の Wister 系母ラットにビスダイアミン 200mg を胃ゾンデにて注入した。妊娠 10.5 日にエーテル深麻酔下に屠殺し、速やかに子宮を摘出、New(1973)の方法により全胚培養を開始した。ラット血清と Tyrode 液を 4:1 に混じた培養液 5ml と CO₂:O₂:N₂ =5:5:90(%)のガスで培養ビンを充満し、37°C 培養器中で 30 回/分の速さで回転しながら培養した。実態顕微鏡下で心臓の形態を観察しながら、ループ形成期、心室中隔形成期、心房中隔形成期を確認して培養を中止し、①と同様の手順で HNK-1 及びコネキシン 40 の発現の空間的位置関係、並びにコネキシン 43、45、30.2 の発現を検索した。

(2) 刺激伝導系の細胞及びその周囲の心筋細胞の生理学的特性の検討

①正常ラット胚の心筋細胞単離の試み

胎生 14.5 日の正常ラット胚の心臓における HNK-1 及びコネキシン 40 発現に一致する部位の心筋を摘出し、全細胞パッチクランプ法 (EPC-8 patch-clamp amplifier, HEKA Electronics) により細胞の生理学的特性を検討する目的で、Ca 無添加の Krebs-Ringer 液中に心臓を浸しコラゲナーゼで心筋細胞の単離を試みた (chunk 法)。また、Langendorff 灌流法による新生仔ラットの心筋細胞単離を試みた。

②新生仔マウス心室筋細胞を Langendorff 灌流下にコラゲナーゼ処理により単離した場合 (Langendorff 灌流法) と従来のコラゲナーゼ存在下で機械的な破砕により単離した場合 (chunk 法) の細胞形態と電気生理学的特性の比較検討

日齢 0 の正常新生仔 C57BL/6J マウスの心臓を Langendorff 灌流法により単離した心筋細胞と chunk 法により単離した心筋細胞を Tyrode 液で保存した状態で細胞の形態学的評価を行うとともに、パッチクランプ法により静止膜電位及び活動電位を測定した。また、内向き整流性カリウムチャネルの電流密度も測定した。

③Langendorff 灌流法による新生仔マウス心筋細胞の単離と成長に伴う生理学的特性変化の検討

正常新生仔 C57BL/6J マウスと日齢 60 の成獣の心臓を Langendorff 灌流後に心筋細胞を単離し、Tyrode 液で保存した状態でパッチクランプ法により膜電位を測定した。また、カリウムチャネルや Ca²⁺透過型非選択的陽イオンチャネルである TRPC(transient receptor potential canonical)チャネルの成長に伴う発現の変化について検討した。

4. 研究成果

(1) 正常ラット胚の心臓において HNK-1 陽性細胞が集塊をなすのは ED13.5 日以後で、特に心室中隔後端の房室結節に一致する部位に強い発現が認められた。ED14.5 日には発達した心室中隔 (図 1*) の左室 (図 1 LV) 側と右室 (図 1 RV) 側に連続した HNK-1 陽性細胞が確認された (図 1 a)。この部位に一致してコネクシン 40 (図 1b)、43、45、30.2 の発現が認められたが、心室壁内にも少数の陽性細胞が散在して認められた。しかし、ビスダイアミン投与群では心室中隔の形成が正常より遅く、ED14.5 日で HNK-1 陽性細胞の発現が認められたが、明らかな集塊の形成は認められなかった (図 2)。全胚培養したラットでも同様の結果で、ED11.5 日や 12.5 日では HNK-1 陽性細胞は少なく、散在する傾向があった。コネクシン 40 (図 2b)、43、45、30.2 の発現も正常に比べ少なかった。

以上より、ビスダイアミンは正常な刺激伝導系の発生を発生早期から阻害することが明らかとなった。

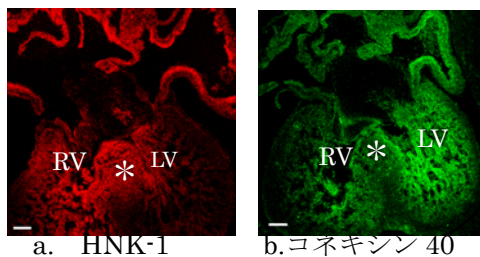


図 1 正常ラット胚における HNK-1 とコネクシン 40 の発現

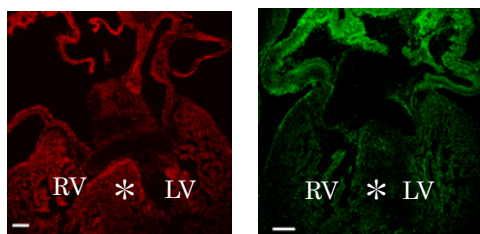


図 2 ビスダイアミン投与ラット胚における HNK-1 とコネクシン 40 の発現

(2) 刺激伝導系及び心筋細胞の成長に伴う生理学的特性の変化について

① 正常ラットでの細胞単離の結果

胎生 14.5 日の正常ラット胚を用い、心室中隔に一致する部位の組織を摘出し心筋細胞の単離を試みた。しかし、組織が小さく、細胞の単離と確保は困難であった。次に新生仔ラットを用い Langendorff 灌流法による細胞単離と同様の検討を試みたが、やはり単離が困難であったため、従来の機械的な破碎による細胞単離法 (chunk 法) を用いることに

した。そこで、Langendorff 灌流法による細胞単離が可能な出生直後のマウスを用い、Langendorff 灌流法と chunk 法により心筋細胞を単離した場合で形態や電気生理学的特性に差が生じないかを検討した。

② 出生直後 (0 日齢) の新生仔マウス心筋細胞を Langendorff 灌流法により単離した場合と chunk 法により単離した場合の細胞形態と生理学的特性の差について

Langendorff 灌流法により単離された心筋細胞は chunk 法により単離された細胞と比較して以下の差があることが明らかになった。

i) Langendorff 灌流法により単離された心筋細胞は形態的に紡錘状、chunk 法で単離した細胞は球形 (図 3) で、細胞の大きさを反映する膜容量は、Langendorff 灌流法により単離された心筋細胞において平均 $32.3 \pm 5.9 \text{ pF}$ で、chunk 法で単離した細胞の平均値 $20.4 \pm 2.7 \text{ pF}$ に比べて大きかった。

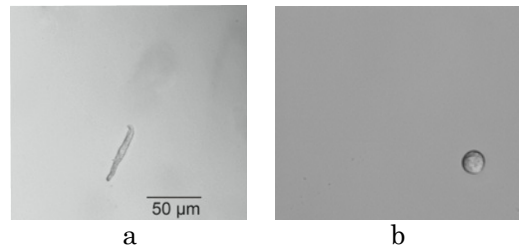


図 3. Langendorff 灌流法により単離された心筋細胞 (a) と chunk 法により単離された心筋細胞 (b)

ii) 両者において活動電位時間に差はなかったが、静止膜電位は Langendorff 灌流法により単離された心筋細胞では $-80.6 \pm 1.1 \text{ mV}$ (図 4 左) と、chunk 法の細胞 $-60.5 \pm 2.6 \text{ mV}$ (図 4 右) より有意に過分極していた (図 4)。

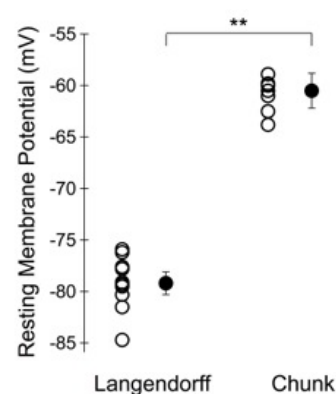


図 4. Langendorff 灌流法により単離された心筋細胞と chunk 法により単離された心筋細胞の静止膜電位

iii) 内向き整流性カリウムチャネルの電流密度は Langendorff 灌流法により単離された心筋細胞において $45.5 \pm 8.0 \text{ pA/pF}$ で chunk 法

により得られた細胞の $9.2 \pm 1.8 \text{ pA/pF}$ に比して有意に大きかった (図5)。

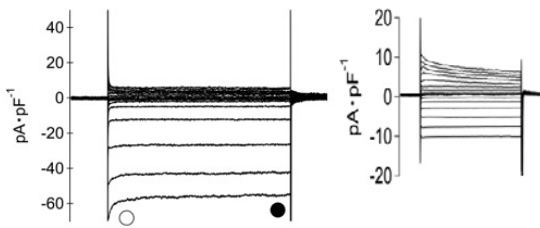


図5. Langendorff 灌流法により単離され心筋細胞 (左) と chunk 法により単離された心筋細胞 (右) の内向き整流性カリウムチャネルの電流密度

以上より、機械的に破碎して細胞を単離する方法ではマウス心室筋細胞の正確な電気生理学的特性が計測できないと考えられた。③Langendorff 灌流法による新生仔マウスおよび成獣の心筋細胞の単離と成長に伴う生理学的特性変化の検討

②で得られた結果から、機械的破碎でしか細胞単離ができないラットを用いて成長に伴う刺激伝導系や心筋細胞の生理学的特性を検討するには限界があると判断し、生後0日、7日、14日の新生仔マウスを用いて研究を継続した。生後0日のマウスの活動電位は比較的長いプラトー相を有していたが、日齢が進むにつれプラトー相は短くなった (図6)。静止膜電位は生後0日の $-80.6 \pm 1.1 \text{ mV}$ から日齢が進むにつれ変化し、生後14日には $-74.5 \pm 0.5 \text{ mV}$ と有意に脱分極した (図7)。急速活性型遅延整流性カリウムチャネルである I_{kr} の電位は、日齢0の $10.0 \pm 1.0 \text{ pA/pF}$ から成獣では $1.0 \pm 0.1 \text{ pA/pF}$ まで、日齢が進むにつれ80%減少した (図8)。また、新生仔ではウエスタンブロットで I_{kr} の発現蛋白である ERG の強い発現が確認されたが、日齢が進むにつれ減少した。

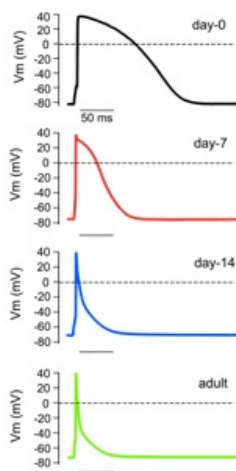


図6. マウス心筋細胞の活動電位の変化

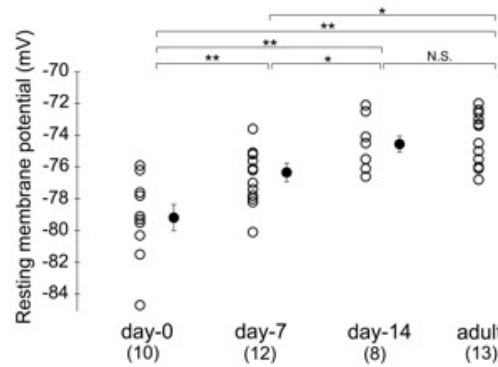


図7. マウス心筋細胞の成長に伴う静止膜電位の変化

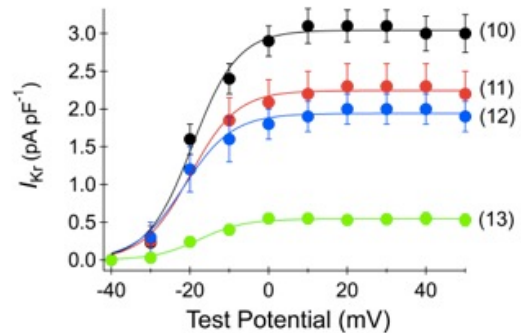


図8. マウス心筋細胞の成長に伴う急速活性型遅延整流性カリウムチャネル I_{kr} 電位の変化 (黒: 生後0日、赤: 生後7日、青: 生後14日、緑: 成獣) () の数字は使用した動物数

TRPC チャンネル電流 (タプシガルギンで誘発される膜電流として記録) の日齢0における電位は $5.8 \pm 1.2 \text{ pA/pF}$ であったが、日齢が進むにつれ低下し、成獣では $1.8 \pm 0.9 \text{ pA/pF}$ となった (図9)。ウエスタンブロットで TRPC 1、3、4、5 の発現を検討したところ、成長に伴いいずれの発現も減少した。

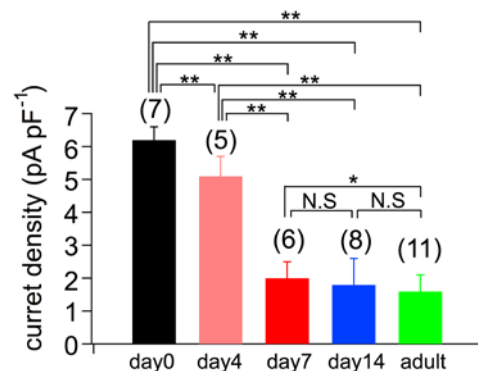


図9. 単離マウス心筋細胞の TRPC チャンネルを介する膜電流の成長に伴う変化

以上の結果から、心筋細胞の電気生理学的特性は成長に伴い大きく変化することが明らかになったが、ビスダイアミンで惹起される先天性心疾患では刺激伝導系の発生における形態異常とともに細胞の成長が障害されることで正常な生理学的変化が妨げられ不整脈の原因となっていることが推測された。

しかし、これまでの成果は研究を始めるにあたって意図した目的である先天性心疾患に伴う不整脈治療に貢献することには大きな隔りがある。その理由は①先天性心疾患のモデル動物であるラットの胚や新生仔において心筋細胞をLangendorff灌流法でうまく単離することができなかつた、②心筋細胞の単離が可能なマウスの心臓ではラットほどHNK-1陽性組織、すなわち刺激伝導系と判断される存在が明確でなく、また、Langendorff灌流法で単離された細胞はすべて紡錘状で心筋細胞、線維芽細胞、刺激伝導系細胞の区別ができなかつた、③ビスダイアミンはマウスではラットのような心臓発生の異常をきたさなかつたことなどがあげられる。今後この研究を継続し、当初掲げた目的を達成するにはラットの心筋細胞を単離する方法を確立しなければならない。可及的速やかにこの問題を克服できる方法を確立し、引き続きこの課題に取り組んでいきたい。

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 13 件)

- ① Hoshino S, Omatsu-Kanbe M, Nakagawa M, Matsuura H Postnatal development decline in I_{K1} in mouse ventricular myocytes isolated by the Langendorff perfusion method: comparison with the chunk method, *Pflugers-Archiv European Journal of Physiology*, 463:649-668, 2012 査読あり
- ② Hanato T, Nakagawa M, Okamoto N, Nishijima S, Fujino H, Shimada M, Takeuchi Y, Imanaka-Yoshida K, Developmental defects of coronary vasculature in rat embryos administered bis-diamine, *Birth Defects Res (Part B)*, 92:10-16, 2011 査読あり
- ③ Ding WG, Toyoda F, Ueyama H, Matsuura H, Lysophosphatidylcholine enhances I_{Ks} currents in cardiac myocytes through activation of G protein, PKC and Rho signaling pathways. *J Mol Cell Cardiol* 50:58-65, 2011 査読あり
- ④ 中川雅生、小児循環器疾患治療薬の適応拡大に向けた取り組み、*日児誌*、114:1829-1835、2010 査読あり
- ⑤ 宗村純平、藤野英俊、米田真紀子、中川雅生、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬を含めた慢性心不全治療が奏効した拡張型心筋症の1小児例、*日児誌*、114(10):1567-1571、2010 査読あり
- ⑥ Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S (2010). Ca^{2+} paradox injury mediated through TRPC channels in mouse ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 161:1734-1750. 査読あり
- ⑦ 古川央樹、藤野英俊、野田恭代、藤戸敬士、丸尾良浩、中川雅生、竹内義博、アミノ酸調整乳使用中に発症したセレン欠乏による二次性心筋症の1例、*日児誌*、113:1582-1586、2009 査読あり

[学会発表] (計 18 件)

- ① Hoshino S, Nakagawa M, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Rapidly activating delayed rectifier K^+ current during post-natal development in mouse ventricle, The 45th Annual Meeting of Association for European Paediatric Cardiology, 2011. 5. 18-21, Granada,
- ② Hoshino S, Nakagawa M, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Postnatal developmental changes in the TRPC channels in mouse cardiomyocytes, The 45th Annual Meeting of Association for European Paediatric Cardiology, 2011. 5. 18-21, Granada,
- ③ Nakagawa M, Status of pediatric pharmacology and drug development in Japan, JSCPT-KSCPT-SCPT Joint Conference, 2011.12.1-3, Hamamatsu,
- ④ Hoshino S, Nakagawa M, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Postnatal developmental changes in the TRPC channels in mouse heart, 第87回日本生理学会大会、2010.5.19-21、盛岡

- ⑤ 宗村純平、藤野英俊、中川雅生、竹内義博、三枝ブロックに脚間リエントリー心室頻拍を合併した2歳女児例、第14回日本小児心電学研究会、2009.11.21、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 雅生 (NAKAGAWA MASAO)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40188909

(2) 研究分担者

藤野 英俊 (FUJINO HIDETOSHI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：40209078

松浦 博 (MATSUURA HIROSHI)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：60238962

(3) 研究協力者

花戸 貴司 (HANATO TAKASHI)
滋賀医科大学・医学部・研究生

黄瀬 一慶 (KISE KAZUYOSI)
医法社団昂会湖東記念病院・小児科医長

星野 真介 (HOSHINO SHINSUKE)
滋賀医科大学・医学部・大学院生