

37. 心臓管腔を形成する血行流動を介した熱作用機構の解明

徳島大学 先端酵素学研究所 生体力学シグナル分野 准教授 福井 一

概要

心臓は物理的ストレス（力学刺激）を常去感受する代表的な臓器であり、細胞に対する外部からの力学刺激は心臓発生から成体心機能の恒常性に至るまで必須の役割を果たす。ただし、細胞に対して恒常的に外部からの力学刺激が存在する環境下では、力学刺激に対する生体シグナル応答がどのようにして適切に調節されるのか明らかになっていない。本研究では、ゼブラフィッシュ胚心臓をモデルとして、細胞外から継続的に生じる力学刺激を適切に認識する心管腔形態調節システムの理解を目指した。血液流体に着目した結果、弁領域の心内膜内皮細胞で早期弁形成時に限った力学シグナル活性は双方向性の血流感受に対する応答であることが示唆された。双方向血流から生じる摩擦抵抗・熱作用が心臓管腔内の生体力学シグナルを制御する可能性の下、温熱操作を行った結果、温熱刺激に応答して即時的に同様のシグナル亢進を認めた。また、生体温度測定を目指したゼブラフィッシュ系統の樹立が完了し、本系統が個体レベルで温度定量が可能であることが示唆される結果を得た。現在、熱感知センサーの候補同定に向けて変異体を複数樹立しており、今後の解析から生体環境から生じる情報を適切に処理する機構が明らかになると期待される。

背景および目的

生体はゲノムには書き込まれない「力による生体応答因子や生体シグナル制御機構」が存在する。しかしながら、生命活動に伴い動的に生体外力（生体に外から作用するさまざまな力）の総和が変容する「個体条件」では、力の作用を正確に定義できていない。我々はゼブラフィッシュ胚の拍動心臓を対象とした先行研究から、心臓管腔形成を司る「物理的な力に直接応答するシグナル機構（力- Ca^{2+} 流入-Nfat シグナル）」を明らかにした¹⁾。ただし生理的条件において、この心管腔内の力学応答シグナルは時期と部位が限られており、継続的に力が生じる心臓における絶対的な力学量の大小では説明できない「大きな問い」が残されている。そこで本研究は、細胞外から継続的に生じる力学刺激を適切に認識した心管腔形態調節システムを理解することを目的とした。様々な外力が発生する心臓で、どのような力により、どのような応答機構が調節されるのか明らかにすることは、力学作用を正確に評価できる基準を設けることができる。また、心疾患と生体力学作用の因果関係など、病態シグナル研究などに波及することが期待される。

方法

先行研究から、仮説「粘性をもつ血液流体の摩擦抵抗から生じる熱が力学作用本体となり、心臓管腔内の生体力学シグナルを制御する」の着想に至った。検証に向けてゼブラフィッシュ胚を用い、①:力操作に応答して力学シグナルが活性化する際に生じる熱エネルギーの定量検討、②:熱操作系の確立、③:熱感知センサー同定に向けたアプローチを実行した。なお、力学シグナルの検証には心内膜 Ca^{2+} 蛍光センサー発現系統である *Tg(fli1a:GCaMP7a)* を用いた。熱操作系には局所的赤外光レーザー照射（IR-LEGO）法を活用した。

結果および考察

①心管腔を構成する心内膜内皮細胞に作用する熱情報と生体シグナル応答の関連理解を目指して、磁気ピンセット法により拍動停止心臓に対して人為的に物理刺激を加えた実験系を解析対象とした。まず、この物理刺激条件下で生体シグナルが活性化 (Ca^{2+} 上昇) する結果をえた。次に心臓管腔内に留置した磁性体の大きさと、胚体外に位置するプローブから発する磁力との距離などにより力学入力量を推定した。仕事量が全て熱へと変換されると仮定して、細胞膜の熱容量と物理刺激が加わる面積を考慮すると、1秒あたり 0.5 から 1℃程度の温度上昇を見積もることができた。

②熱操作系の確立にむけ、マイクロバブルの超音波操作を予定していたが、購入予定機器の販売停止に伴い新たな実験手法を考えた。共同研究から局所的赤外光レーザー刺激:IR-LEGO 法による温熱操作を行った。ゼブラフィッシュ胚心臓では、温熱刺激に応答して即時的に細胞内の Ca^{2+} レベル亢進と、その後定常状態への低下を認めた。また本応答活性は膜電位依存性チャネル阻害剤によりキャンセルされることが明らかになった。

③蛍光タンパク質である mNeonGreen と tdTomato を比較した際、環境温度上昇に伴い tdTomato の蛍光強度が顕著に低下するため、蛍光強度比取得から温度変化が測定できる。この特徴を利用した熱応答性蛍光センサープローブ: B-gTEMP²⁾ を発現するゼブラフィッシュ系統を樹立した。全細胞で発現する *Tg(eef1a111:B-gTEMP)*、心内膜内皮細胞膜の内層で発現する *Tg(fli1a:myr-B-gTEMP)*、心内膜内皮細胞膜の外層で発現する *Tg(fli1a:B-gTEMP-GPI)* の計 3 系統の樹立に成功した。全細胞で発現する系統を用いた解析から、473 nm の青色レーザー照射により B-gTEMP の蛍光強度比が秒オーダーという高時間分解能で高温方向へシフトする結果を得た。本プローブが個体レベルで使用可能であることが示唆されたため、現在、拍動心臓における温度変化情報の解析を継続している。つづいて熱感知センサーの候補同定に向けて、②の結果をふまえて膜電位依存性チャネルファミリーである複数の TRP 受容体に着目し、CRISPR/Cas9 システムから変異体作製に取り組んだ。各候補遺伝子ともに複数の変異体樹立が完了しており、心内膜 Ca^{2+} レポーター発現系統との交配から熱応答性について引き続き検討する。

本研究から、心内膜内皮細胞は熱刺激に応答して細胞内 Ca^{2+} レベルが増加することが新たに明らかになった。阻害剤の検討から、本応答は膜電位依存性チャネル活性に関わることが示唆されたため、実行因子は膜電位依存性かつ熱応答能を有することが知られる TRP チャネルが有力な候補となる。TRP チャネルのオーソログ (相同遺伝子) 間では、生物種で温度応答閾値が劇的に異なることが知られる³⁾。従って、培養細胞などで行われてきた温度研究結果をそのまま当てはめるのではなく、ゼブラフィッシュ胚を用いた実験①で得られた結果をふまえていく。引き続きゼブラフィッシュ心臓でみられる温度応答の理解に向け、生理的な条件における温度の定量測定、そして機能欠失変異体の解析を行い、研究の進展を目指す。

謝辞

本研究課題を採択いただいた三菱財団と審査員の方々に深く感謝申し上げます。本助成により、研究室立ち上げに伴う共焦点顕微鏡の移設を行うことができ、研究に欠かすことができないイメージングデータを取得することが出来ました。まだ論文化には至っておりませんが、近い将来にはご支援に応えた形を提示できるよう精進いたします。

(完)

引用文献

- 1) Fukui et al., Bioelectric signaling and the control of cardiac cell identity in response to mechanical forces. Science, 2021
- 2) Lu et al., Intracellular heat transfer and thermal property revealed by kilohertz temperature imaging with a genetically encoded nanothermometer. Nano Letters, 2022
- 3) Laursen et al., Low-cost functional plasticity of TRPV1 supports heat tolerance in squirrels and camels. PNAS, 2016