

血流がもたらす摩擦抵抗 – 熱応答による心臓弁形成機構

福井 一

徳島大学先端酵素学研究所 生体力学シグナル分野

【研究の背景】

心臓は物理的ストレス(力学刺激)を常に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^{1,2)}。申請者らはゼブラフィッシュを用いて心臓管腔内における力操作法を開発してきた。さらに、心臓の管腔面を構成する心内膜内皮細胞に対して、力刺激が直接的に細胞内 Ca^{2+} 流入-Nfat [Nuclear factor activated T-cells]シグナルを活性化する機構(力学シグナル)を見出し、これが弁形成を調節することを報告した³⁾。ただし、本力学シグナル活性は機能的弁が形成されるまでの一過的なものであり、未だに『拍動する心臓で発生する「どの」力に応答して、「どのように」時空間特異性をもつ力学シグナルが規定されるのか』の答えは得られていない。解明に向けた先行研究から、1) 力学シグナルの特異性は血流が双方向である時期・部位と関連し、初期胚心臓の血流操作時、もしくは成体で血液が逆流する弁機能不全時、シグナル経路が再活性化することを見出した。2) 血液は粘性をもち、せん断応力は摩擦を介した熱エネルギーへ転換する。3) 摩擦熱がおきにくい力刺激条件(=管腔面に対して垂直に力を作用)では Ca^{2+} 流入がおきなかった。4) 生体の温度センサーである TRP (Transient receptor potential) 受容体の変異が心臓形成異常を起こすものの、熱を介した心臓形成機構は不明である。そこで、仮説「粘性をもつ血液流体中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」を着想した。

【目 的】

本研究課題は心内膜内皮における熱応答について検討することで、心臓管腔形成を規定する新たなコンセプトの提示を目指すものである。

【方 法】

検証に向けてゼブラフィッシュ胚を用い、①:心管腔を構成する心内膜内皮細胞に作用する摩擦熱の定量的解析、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。

【結 果】

まず、心管腔を構成する心内膜内皮細胞に作用する摩擦熱の定量的解析を目指して、mNeonGreen/tdTomato 蛍光強度比から温度変化を測定できる熱応答性蛍光センサープローブ: B-gTEMP⁴⁾ 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、摩擦による温度変化の検討を継続している。

熱操作系の確立にむけ、基礎生物学研究所との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ตอบสนองして即時かつ反復的に細胞内の Ca^{2+} レベル亢進を認めた。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。続いて熱感知センサーの候補同定に向けて、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 システムから各変異体を樹立した。現在、各変異体を心内膜 Ca^{2+} レポーター発現系統と交配しており、熱応答性について引き続き検討を行う。

【考 察】

心内膜内皮細胞は熱刺激にตอบสนองして細胞内 Ca^{2+} レベルが増加することが明らかになった。ま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ことから、本応答の実行因子は膜電位依存活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ている⁵⁾。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ず、今後はゼブラフィッシュ胚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うことで研究の進展が期待される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

個体がどのようにして生体外の物理情報 (力学情報、温度情報) を認識するのかという知見に立脚して、遺伝的要因のみでは説明がつかない先天性心疾患: 例えば心臓弁の低形成、心室壁肉柱構造の異常などの原因が明らかになる可能性がある。そして遺伝的素因だけでなく、母体環境や物理的ストレスがどのように発生プロセスをゆがめるのかを理解し、より正確なリスク評価基準の設定が可能になる意義をもつ。また、iPS 細胞などを用いたミニ心臓 (心臓オルガノイド) の作製系向上には、心組織の機能構築に関わる物理情報の理解が不可欠である。物理情報の理解から、より成熟した心組織を体外で作製できることが期待でき、本成果が基礎から臨床研究への橋渡しとなる。また、心移植や手術後の心機能回復向上に向けたアプローチが期待できる。

【参考・引用文献】

- 1) Hove et al., Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. *Nature*, 2003
- 2) Anand et al., BET bromodomains mediate transcriptional pause release in heart failure. *Cell*, 2013
- 3) Fukui et al., Bioelectric signaling and the control of cardiac cell identity in response to mechanical forces. *Science*, 2021
- 4) Lu et al., Intracellular heat transfer and thermal property revealed by kilohertz temperature imaging with a genetically encoded nanothermometer. *Nano Letters*, 2022
- 5) Laursen et al., Low-cost functional plasticity of TRPV1 supports heat tolerance in squirrels and camels. *PNAS*, 2016