

細胞生理学講座

教授：南沢 享 循環生理・病態学

准教授：福田 紀男 筋生理学

准教授：草刈洋一郎 筋病態学

教育・研究概要

I. 教育概要

2016年度に本講座は以下の課目を担当した。

医学科：コース基礎医科学Ⅱ（循環器ユニット・泌尿器ユニット・呼吸器ユニット）、機能系実習（生理学実習）、症候学演習、感染・免疫チュートリアル、研究室配属、英語論文抄読演習、症候から病態へ

看護学科：解剖生理学Ⅲ

看護専門学校（慈恵看護専門学校）：解剖生理学講義

II. 研究概要

1. 大血管の発生と機能獲得・維持の機序解明

1) 動脈管閉鎖機序の解明

動脈管は、肺動脈と大動脈を連結し、血液をバイパスする胎生期特有の大血管であり、生後に閉鎖する。我々は、動脈管が生後に閉鎖する分子機序を、ラット胎仔、ニワトリ胚、ヒト標本を用いて検討している。2016年度は母体感染（絨毛膜炎）がiNOSを介して動脈管の閉鎖を遅延することを明らかにした。

2) 組織線維化（心臓・肝臓）を来す病態解明

心筋線維化や肝臓線維化は組織機能を低下させ、予後を悪化させることが知られている。肺動脈絞扼術による圧負荷右室肥大乳頭筋モデルにて、圧負荷の程度によって、心筋線維化の進展が非常に明瞭に分かれることが判明し、その心筋カルシウム動態について調べて、論文発表した。さらにこのモデルを利用して線維化決定因子・バイオマーカーの同定を目指している。さらに肺動脈絞扼術後に肝臓の線維化が生じる機序は不明であったが、我々は、低心拍出力が肝臓の線維化に重要であることを明らかにした。本研究は、本学小児科との共同研究の成果である。

3) 大動脈縮窄症の発症機序の解明

大動脈縮窄症は、動脈管が連結する下行大動脈付近に狭窄をきたす疾患である。我々は、プロスタグランジン受容体の発現様式から、動脈管細胞が大動脈部分に迷入し、これが術後の再狭窄の原因になる

可能性を見出した。現在、動脈管細胞の迷入の進展が及ぶ範囲を詳細に検討中である。本研究は、兵庫県立こども病院心臓血管外科、本学心臓外科との共同研究の成果である。

2. 筋小胞体機能の制御機構の解明

心機能や骨格筋機能を維持する上で、筋小胞体を介したCa²⁺調節は中心的な役割を担う。2016年度は筋小胞体膜タンパク質であり、SERCA2の抑制作用をもつsarcoplipin欠損が筋ジストロフィーの機能低下を改善させる可能性のある実験結果を得た。後半の研究は国立精神・神経医療研究センター・武田伸一先生らとの共同研究の成果である。

3. 心筋代謝制御機構の解明

心筋はエネルギー代謝の盛んな臓器のひとつであり、70~90%のエネルギー代謝は脂肪酸に依存している。心不全になると脂肪酸代謝が低下し、糖代謝が亢進するが、その代謝改善にビタミンB₁が有効であるかを検討する実験を行った。心臓の虚血再灌流障害時において、ビタミンB₁ (thiamine pyrophosphate: TPP) を前投与した心臓では、虚血再灌流後の心収縮力が有意に高かった。現在、質量分析法によって、エネルギー代謝の変化を起こす因子を網羅的に解析している。

4. サルコメア収縮機構の解明

1) 幼若心筋細胞におけるサルコメア長ナノ計測

我々は、FRET型Ca²⁺指示タンパク質であるyellow Cameleon-Nano140 (YC-Nano140) と α -actininの融合タンパク質をラット幼若心筋細胞に発現させ、単一サルコメアの挙動と細胞内局所Ca²⁺濃度変化を同時に計測した。その結果、幅広い温度領域における自発拍動時の細胞内局所Ca²⁺濃度変化や、37°Cにおける電気刺激(5Hz)時のCa²⁺濃度変化を追跡することができた。また、Ca²⁺トランジェントの合間に生じる局所的なCa²⁺ウエーブも観測でき、サルコメアの短縮率と高い相関性を示した。我々が開発した計測手法は、正常および病態心筋における興奮収縮連関の分子メカニズムを理解する上で有用であると期待される。

2) マウス心臓における単一サルコメアのin vivoリアルタイムイメージング

心臓のポンプ機能は、心筋細胞のサルコメア長が100nm程度変化しただけでも大きく変化する(Frank-Starling機構)。本研究において我々は、生体におけるマウス左心室の心筋細胞においてサルコメアの収縮動態をリアルタイムイメージングできる技術を開発した。その結果、生きたマウスの心筋細胞内サルコメア動態を、高空間(20nm)・時間(10nm)

分解能で計測し、また心電図・心臓内圧と同時に計測することに成功した。その結果、in vivo心臓においてサルコメアはその分布領域の短いレンジで動いていること、また、拡張期から収縮期に至るサルコメア長の変化分と左心室内圧の変化分との間に高い相関性が存在することが見出された。この結果は、従来の通説とは異なり、心臓機能の制御において、サルコメア長の絶対値ではなくサルコメア動態が重要であることを示す。我々が開発したin vivoナノ計測技術は、従来の研究では不可能であった分子、細胞、臓器・個体の階層をつなぐものであり、正常心筋のみならず病態心筋の機能解析にも有用であると期待される。

3) In vivo興奮収縮連関

In vivoにおけるナノレベルの収縮関連分子の動態と心臓拍動の繋がりを調査するにあたり我々は、心臓内部の心筋細胞局所のCa²⁺動態を正確に計測する技術を開発した。すなわち、in vivo心臓内部ではCa²⁺濃度上昇はある決まった位置において円状に広がり、それが細胞内に広がってゆく。我々は新たな解析法を創出し、Ca²⁺ウェーブが発生する原点位置と時間、広がる速度を推定することに成功した。

「点検・評価」

1. 教育

医学科・コース基礎医科学Ⅱ（循環器ユニット・泌尿器ユニット）及び看護学科・解剖生理学Ⅲにおいて、2015年の方針を踏襲した。コース基礎医科学Ⅱにおいては、生理学実習において呼吸機能を教えることから、呼吸器ユニットの一部を担当することになった。さらに、クリッカーの使用を含めたactive learningへの取り組みは、一部教員に限定されているため、今後、広く利用を進めてゆくことが望まれる。2016年度もe-learningを利用して、試験対策の練習問題を配信した。これまで受講者が必ずしも多くなかったことから2016年度は、学生全員に対して半強制的に受講することを促し、殆どの学生が受講した。

2015年から実習書を作成し、学生への利便性を増している。また、心電図実習において、演習問題を多く取り入れた形式に変更し、学生からは好評であった。今後は実習前の予習を充実させる必要があると考えている。

研究室配属は宇宙航空医学研究室への配属はなく本講座のみで6名の学生を指導した。昨年度同様に6週間で個々の学生に研究テーマを持たせて取り組

ませるとともに、6名全員の学生に対し、配属開始と終了時に研究プレゼンテーションを行わせた。

2. 研究

上述した研究テーマは、各教員が自ら発案し、小規模な研究グループを形成して、独自性を保ちつつ、研究を推進している。

教室としてより高いレベルの研究を行うためには、各研究グループが本講座以外の本学研究グループ、特に臨床系研究グループとの共同研究を進めることが必要不可欠である。そのためのひとつの方策として、学外研究機関との共同研究を活性化させるため、本講座主催の「心血管研究の最前線セミナー」を継続しており、2016年度には4回開催を果たすことが出来た。

2016年度においても各教員が文科省科研費などの獲得・継続によって、資金面では比較的安定した研究活動を行うことが出来た。しかし、科研費の一部は最終年度となるため、さらなる研究発展のため、科研費の新規採択及び大型研究費の獲得を、今後も目指してゆく必要がある。

研究活動の成果として、教員・大学院生の奮起によって、2016年度は原著英文論文7編、総説4編を発信することが出来、2015年度よりは増加した。今後も原著論文をコンスタントに発表し、より高いレベルの雑誌に掲載してゆく必要がある。

3. その他の学内活動

医学教育の啓蒙（アウトリーチ）活動においては、2015年に引き続き「働き者の心臓を見て、触って、聴いて、知りつくそう」というテーマで文部科学省事業「ひらめき☆ときめきサイエンス」を開催した。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Onda A¹⁾, Kono H¹⁾ (¹Teikyo Univ), Jiao Q (Hangzhou Normal Univ), Akimoto T (Univ Tokyo), Miyamoto T (Tsukuba Univ), Sawada Y (Natl Rehabilitation Ctr), Suzuki K²⁾, Kusakari Y, Minamiswa S, Fukubayashi T²⁾ (²Waseda Univ). A new mouse model of skeletal muscle atrophy using spiral wire immobilization. *Muscle Nerve* 2016; 54(4): 788-91.
- 2) Tsukamoto S, Fujii T, Oyama K, Shintani SA (Univ Tokyo), Shimozawa T¹⁾, Kobirumaki-Shimozawa F, Ishiwata S¹⁾ (¹Waseda Univ), Fukuda N. Simultaneous imaging of local calcium and single sarcomere length in rat neonatal cardiomyocytes using yellow Cameleon-Nano140. *J Gen Physiol* 2016; 148(4): 341-55.

- 3) Ito K, Hongo K, Date T, Ikegami M, Hano H, Owada M, Morimoto S, Kashiwagi Y, Katoh D, Yoshino T, Yoshii A, Kimura H, Nagoshi T, Kajimura I, Kusakari Y, Akaike T, Minamisawa S, Ogawa K, Minai K, Ogawa T, Kawai M, Yajima J (Cardiovascular Inst), Matsuo S, Yamane T, Taniguchi I, Morimoto S (Kyushu Univ), Yoshimura M. Tissue thrombin is associated with the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2017; 228: 821-7.
- 4) Kusakari Y, Urashima T, Shimura D, Amemiya E, Miyasaka G, Yokota S, Fujimoto Y, Akaike T, Inoue T, Minamisawa S. Impairment of excitation-contraction coupling in right ventricular hypertrophied muscle with fibrosis induced by pulmonary artery banding. *PLoS One* 2017; 12(1): e0169564.
- 5) Shimozawa T¹⁾, Hirokawa E, Kobirumaki-Shimozawa F, Oyama K, Shintani SA (Univ Tokyo), Terui T, Kushida Y, Tsukamoto S, Fujii T, Ishiwata S¹⁾ (¹Waseda Univ), Fukuda N. In vivo cardiac nano-imaging: A new technology for high-precision analyses of sarcomere dynamics in the heart. *Prog Biophys Mol Biol* 2017; 124: 31-40.

II. 総 説

- 1) Akaike T, Minamisawa S. Prostaglandin E-mediated vascular remodeling of the ductus arteriosus and ductus-dependent congenital heart diseases. *J Mol Genet Med* 2016; 10: 3.
- 2) 赤池 徹, 南沢 享. 動脈管閉鎖のメカニズム 分子機序に基づく治療への再考. *日小児会誌* 2016; 120(10): 1444-52.

III. 学会発表

- 1) 藤本義隆, 浦島 崇, 伊藤怜司, 河内貞貴, 梶村いちげ, 赤池 徹, 小川 潔, 南沢 享. (ポスター) Pulmonary hypertension due to left heart disease の機序解明を目的としたモデル動物作製の試み. 第52回日本小児循環器学会・学術集会. 東京, 7月.
- 2) 久我和寛, 草刈洋一郎, 南沢 享. (ポスター) FGF23によるTGF- β を介した心臓線維化促進効果. 心血管膜輸送研究会2016. 福岡, 10月.
- 3) Fujimoto Y, Akaike T, Kusakari Y, Minamisawa S. (Poster) Pulmonary hypertension due to left atrium stenosis caused intrapulmonary venous arterialization in rats. The 7th Scientific Meeting of Asian Society for Vascular Biology. Hualien, Oct.
- 4) Fujimoto Y, Urashima T, Akaike T, Kusakari Y, Minamisawa S. (Poster) Pulmonary hypertension due to left atrium stenosis caused intrapulmonary venous arterialization in rats. American Heart Association Scientific Sessions 2016. New Orleans, Nov.
- 5) 大山廣太郎. (口頭) 細胞内Ca²⁺制御システムにおける発熱・感温機構の一細胞頭微解析. 第1回Biothermology Workshop. 岡崎, 12月.
- 6) Akaike T, Minamisawa S. (Poster) A sarcoplasmic reticulum localized protein phosphatase targets phospholamban threonine-17 phosphorylation and regulates ischemia-reperfusion injury. 第33回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2016). 東京, 12月.
- 7) Kuga K, Kusakari Y, Akaike T, Minamisawa S. (Oral) FGF23 promote cardiac fibrosis by activating FGFR1 in presence of TGF- β stimulation. 第33回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2016). 東京, 12月.
- 8) Fujimoto Y, Urashima T, Akaike T, Kusakari Y, Minamisawa S. (Oral) Intrapulmonary venous remodeling caused by pulmonary hypertension due to left atrium stenosis in rats. 第33回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2016). 東京, 12月.
- 9) Yokota T, Zhang Q, Ding Y, Minamisawa S, Hsiai T, Kulkarni R, Xiao X, Wang Y. (Oral) p38 MAP Regulates Chamber Specific Postnatal Remodeling of Cardiac Ventricles. 第33回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2016). 東京, 12月.
- 10) 岸渕安也名, 赤池 徹, 南沢 享. (ポスター) ゲンタマイシンによる新生仔ラット動脈管閉鎖への影響. 第94回日本生理学会大会. 浜松, 3月.
- 11) 塚本精一, 大山廣太郎, 藤井輝之, 小比類巻生, 石渡信一 (早稲田大), 福田紀男. (ポスター) ラット幼若心筋細胞のZ線におけるYellow Cameleon-Nano140融合 α -actinin発現を用いたサルコメア動態と局所的カルシウムの同時観測. 第94回日本生理学会大会. 浜松, 3月.
- 12) 小比類巻生, 福田紀男. (シンポジウム11: 日本生物物理学会連携シンポジウム 生物物理学的手法による生理学研究の新展開) マウス心臓における興奮収縮連関のナノイメージング. 第94回日本生理学会大会. 浜松, 3月.
- 13) 南沢 享. (シンポジウム22: 小胞体Ca²⁺ストア研究の進展) 心筋筋小胞体でのカルシウム再取り込み機構. 第94回日本生理学会大会. 浜松, 3月.
- 14) 金 美香¹⁾²⁾ (¹国立循環器病センター研究所), 横山詩子²⁾, 石渡 遼²⁾, 南沢 享, 石川義弘²⁾ (²早稲田大). (シンポジウム38: 酸素濃度変化が起点となる心血管生理調節機構) 酸素化により動脈管は解剖学的閉鎖を誘導する. 第94回日本生理学会大会. 浜松, 3月.
- 15) 碓井文雄, 山田祐揮, 草刈洋一郎, 南沢 享. (ポスター) 心筋過伸展による線維化関連因子発現変化.

第94回日本生理学会大会、浜松、3月。

- 16) 田代倫子¹⁾、小比類巻生、井上 華¹⁾、田井 忍¹⁾、福田紀男、小林 了¹⁾、小西真人¹⁾ (1東京医科大)。(ポスター) ラット心室筋細胞のNa⁺依存性Mg²⁺汲み出し機構におけるSLC41A1。第94回日本生理学会大会、浜松、3月。

V. その他

- 1) 南沢 享。動脈管平滑筋細胞、内皮細胞から分泌される血管リモデリング因子の同定。平成23年度～平成27年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「安定同位体医学応用研究基盤拠点 (SI医学応用研究基盤拠点) の形成」研究成果報告書 2016; 113-6.
- 2) 草刈洋一郎。SI医学応用による心筋線維化バイオマーカーの検索。平成23年度～平成27年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「安定同位体医学応用研究基盤拠点 (SI医学応用研究基盤拠点) の形成」研究成果報告書 2016; 105-7.
- 3) 赤池 徹。心筋の発達・分化における心筋線維芽細胞の役割の解明。平成23年度～平成27年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「安定同位体医学応用研究基盤拠点 (SI医学応用研究基盤拠点) の形成」研究成果報告書 2016; 108-10.
- 4) 中邨智之 (関西医科大)、南沢 享、青木浩樹 (久留米大)、横山詩子 (横浜市立大)。動脈弾性板の形成・破壊の分子機構とその動脈疾患における役割。がん・心臓病の基礎的・先駆的研究事業報告書 (平成27年度公益財団法人車両競技公益資金記念財団) 2016; 23-35.

生 化 学 講 座

教授：吉田 清嗣 分子腫瘍学

教育・研究概要

I. 乳癌幹細胞株 iCSCL10A の転移機構の解析

乳癌幹細胞株 iCSCL-10A は、リプログラミング因子 (OCT4, SOX2, Klf4, c-Myc) を乳腺上皮細胞株 MCF-10A に導入することによって樹立された人工乳癌幹細胞株である。本細胞株は、自己再生能、多分化能、薬剤耐性能、造腫瘍能などの癌幹細胞の性質を保持しているが、その転移能については不明である。そこで、近赤外蛍光タンパク質 iRFP を iCSCL-10A 細胞に安定発現させ、免疫不全マウスに心腔内投与し、*in vivo* 蛍光イメージングにより転移の有無を調べた。その結果、親株 MCF-10A 細胞を移植したマウスでは全く転移は認められなかったが、iCSCL-10A 細胞を移植したマウスでは、移植4週間後から高率に大腿骨・脛骨転移を認めた。次に、iCSCL-10A 細胞の骨転移に関与する遺伝子を探索するため、セルソーターを用いて骨転移巣から iCSCL-10A 細胞を単離し、マイクロアレイ解析により移入前後での遺伝子発現の変化を調べた。その結果、細胞接着、シグナル伝達、代謝などに関係する遺伝子において発現変化が認められた。現在、これら遺伝子の骨転移への関与について解析中である。

II. DYRK2 の機能に重要なアミノ酸残基の同定

DYRK2 は真核生物において進化的に保存された CMGC ファミリーに属するリン酸化酵素である。したがって CMGC ファミリー間で保存されているアミノ酸残基は、DYRK2 においても、その構造や機能に重要であると考えられる。そこで我々は、CMGC ファミリーの機能発現に重要な活性化ループに注目して一連の DYRK2 変異体を作製し、それらの解析を行った。作製した変異体は緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質として細胞内で発現される。DYRK2 の活性化ループに存在する 382 番目のチロシン残基 (Y382) は自己リン酸化を受けることが知られており、このリン酸化によって DYRK2 はキナーゼ活性を発揮する。まず、野生型の DYRK2 を COS7 細胞で強制発現させたところ、細胞は上皮細胞様に進展した状態から球状に変化した。一方、Y382 がリン酸化されない変異体 (Y382F) を細胞で発現させたところ、COS7 細胞の形態は上