

## 細胞生理学講座

講座担当教授：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  
 講師：赤池 徹 発達循環器学

### 教育・研究概要

#### I. 教育概要

2019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(ユニット「循環器」(ユニット責任者：南沢), ユニット「泌尿器」(ユニット責任者：南沢), ユニット「呼吸器」(ユニット責任者：草刈), ユニット「機能系学実習(生理学系)」(ユニット責任者：南沢)), コース臨床基礎医学(ユニット「症候学演習」(ユニット責任者：草刈), ユニット「感染・免疫テュートリアル」), コース研究室配属, 英語論文抄読演習, コース「臨床医学Ⅱ」(ユニット「症候から病態へ」)

看護学科：解剖生理学Ⅲ(ユニット責任者：南沢)

看護専門学校(慈恵看護専門学校)：解剖生理学講義(ユニット責任者：南沢)

#### 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) 肺静脈系の特殊性と病態生理の解明

肺静脈は高濃度酸素血に曝されること、左心房と接合する肺静脈部位は心房細動を引き起こす異所性刺激発生部位になることなど、体静脈とは異なる特殊な低圧系血管であるが、その血管特性の理解は進んでいない。そこで肺静脈・左心房に特異的に発現するとされる転写因子 Pitx2 の両心房への過剰発現マウスを作成し、表現型の解析を行ったところ、洞房結節の機能低下を認めた。本研究成果はアメリカ心臓病学会にてポスター発表を行った。

###### 2) 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。2019年度はプロスタグランジン E 受容体 EP4 阻害剤がラット動脈管を収縮させることを明らかにして、論文化した。また、抗生物質ゲンタマイシンが動脈管開存を起こす、という先行研究の結果を別の手法を使って検証した結果、通常の臨床使用量ではラット動脈管の開存には影響がないことを

明らかにして、論文化した。

##### 2. 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。肺高血圧症モデルラットの心室筋において早期に変化を起こす代謝要因をメタボローム解析で網羅的に解析した。その結果、ピルビン酸脱水素酵素の活性が早期に上昇する事を見出し、論文化した。

##### 4. 心筋過伸展ストレスによる心筋機能低下の機序解明

心室への過剰な容量負荷は、心不全の原因となり、心筋収縮力の減弱ならびに心筋の線維化をもたらすことが知られている。過度な容量負荷が原因で心筋は過伸展され、張力低下をきたす。乳頭筋過伸展実験で、ミトコンドリア内膜が急激に崩壊することを見出し、その発展実験として、肺動脈遮断をラット生体に人工的に生じさせ、右室の機能及び電子顕微鏡観察を行った。その成果の一部をアメリカ心臓病学会にてポスター発表を行ったところ、Basic Cardiovascular Sciences International Travel Grant を受賞した。

##### 5. サルコメア収縮機構の解明

サルコメア収縮における微小温度変化の影響を調べるために、温度感受性色素を含む蛍光温度センサーシートに、ローダミンファロイジン標識 F アクチンを結合させ、その蛍光強度によって温度を測定する高精度分析法を開発した。このアプローチにより、0.2秒以内に25℃から46℃への温度シフトが可能となった。Ca<sup>2+</sup>の不在下及びATPの存在下で、IRレーザー照射によって、温度の変化と共に細いフィラメントのスライド運動が加速することが分かった。加熱による細いフィラメントのスライド速度の加速は、Ca<sup>2+</sup>とATPの存在下でも同様に発生したが、その温度依存性はより低かった。この研究によって、哺乳類の心臓では、心臓の細いフィラメント状態のオンオフ平衡が、生理的体温で拡張期のオン状態に部分的にシフトし、収縮期の迅速かつ効率的な心筋動態を可能にすることが示された。

### 「点検・評価」

#### 1. 教育

医学科・コース基礎医科学Ⅱ(ユニット「循環器」, ユニット「泌尿器」, ユニット「呼吸器」)及び看護学科・解剖生理学Ⅲにおいて、2016年以来的方針を踏襲した。双方向性アクティブラーニングのため、

が増すという報告がある。しかしこの機構の詳細は不明である。そこで、伸展位に固定した骨格筋には筋サテライト細胞刺激因子が含まれるのではないかと仮説を立て、片肢をギプス固定したマウスの骨格筋から作成した抽出液が、マウスの単離サテライト細胞の増殖にどのような影響を及ぼすか検討した。

ギプスにて伸展位に固定したマウス骨格筋からの抽出液の作成は、以下の方法で行った。まずマウスを麻酔下で後肢を伸展した状態でギプス固定、2日後にマウスを安楽死させ、ギプス固定側と無拘束側の骨格筋を摘出した。摘出した骨格筋はホモジェナイズの後に遠心分離をし、上清を採取し、280nmで吸光度を測定した後に筋抽出液として保存した。

マウス骨格筋サテライト細胞の採取と培養は以下の方法で行った。マウス両下肢の骨格筋を採取し、37℃ 60分の酵素処理によりサテライト細胞を採取し、増殖培地にて5日間培養した。この際に、ギプス固定有・無の条件で作成した4種類の抽出液（ギプス固定側前脛骨筋（TA）／長趾伸筋（EDL）、ギプス固定側腓腹筋（GAS）／足底筋PLA、無拘束側TA/EDL、無拘束側GAS/PLA）を0.34mg/mlまたは0.68mg/mlの濃度で加えた。期待に反して、同一筋群で比較すると伸展状態で固定をした筋から作成した抽出液により強い増殖促進効果は認められなかった。筋が受動的に伸展をうけることはサテライト細胞の増殖因子を刺激しないのではないかと考えられた。しかし同一筋群でギプス固定側と無拘束側の筋からそれぞれ作成した抽出液の効果を比べると、無拘束側のほうがギプス固定側よりも増殖効果が大きい傾向が認められた。そこで本実験の結果を「伸展固定側から採取した抽出液を加えた群」と「無拘束側から採取した抽出液を加えた群」に二別して平均値をとりなおしてみたところ、「伸展固定側から採取した抽出液を加えた群」より「無拘束側から採取した抽出液を加えた群」の方が細胞数が有意に多いことがわかった。つまり、*in vitro*の結果から予測した受動的な伸展刺激よりも、能動的な運動を繰り返した方がより多くの増殖因子が分泌されると考えられた。

#### IV. マウス骨格筋サテライト細胞から分化誘導した骨格筋のミオシン重鎖発現パターン

サテライト細胞は、休止している筋芽細胞であり、骨格筋が損傷されると活性化され、既存の骨格筋線維に融合することなどにより筋修復ないしは筋再生を行う。

昨年度までに、サテライト細胞から分化させた筋

線維の主たるミオシンアイソフォームは大人のマウスに発現している型（I～IIa, IIx, IIb（速筋型）～EO（外眼筋型）とは異なる移動度を示し、その移動度は、embryonic myosin heavy chainを主とする新生仔マウス腓腹筋ホモジネートのものとほぼ同等であることを明らかにした。サテライト細胞は由来筋が異なっても一度共通のアイソフォームを経、その後細胞内外の機械的・化学的シグナルによってそれぞれの部位特異的なアイソフォームとなると考えられた。

本年度はこれに加えて、基盤研究室 岩本武夫先生に受託し、質量分析に基づくアイソフォーム発現解析を行った。サテライト細胞のミオシンの解析により、embryonic myosin heavy chainとともにMYH7B由来cardiac betaの発現が確認された。これは胎児期の心臓などでの発現が報告されているものである。本アイソフォームが検出されたことについての妥当性と意義については今後の検討課題と考える。

#### 「点検・評価」

##### 1. 研究

##### 1) DSC法による骨格筋細胞内の水性状解析

今年度は精製したミオシンフィラメントのDSC測定を実施し、-24℃や-21℃の融解ピークを観察することができた。しかし除膜筋線維の実験条件と比べると、濃度の問題や試料中に含まれる水の割合の違いなど、検討すべき問題は残されている。次年度は精製フィラメントの濃度を高め除膜筋線維の条件に近づけることや、解析法の改善を行うとともに、精製アクチンフィラメントでの測定の準備を進めていく。

##### 2) 筋疾患に関する変異リアノジン受容体の解析

今年度は計算時間を250ナノ秒まで延長して解析し、また分子動力学計算から得られた原子の配置を簡便に可視化できる解析手法を構築した。次年度は、点変異により主にカテコラミン誘発性多形性心室頻拍（CPVT）を引き起こすと示唆されている心臓に発現するRyR2についてRyR1と同じ手法でMD計算を行う。RyR2についても、N末端領域はX線結晶構造が解かれているので、この構造を用いてMD計算を行うことができる。RyR2にもRyR1で見出された塩橋／水素結合ネットワーク形成に関与するアミノ酸残基が保存されていることが一次構造により確かめられているので、これらに人工的変異（アラニン置換）を導入してMD計算を実施する予定

である。

### 3) 骨格筋筋萎縮や増殖を制御する因子の究明と臨床への応用

In vitro の報告から予測された受動的な伸展刺激よりも、能動的な運動を繰り返した方がより増殖因子の分泌に効果的であることが示唆された。同様な傾向はウサギ外眼筋にて上直筋を手術した際の拮抗筋においても観察されたことから、次年度はこの効果の発現機構をより追及し、臨床応用へとつなげることも目指していく。

## 2. 教育

教育面では、医学科2年コース基礎医科学Ⅰのユニット「自然と生命の理」およびコース基礎医科学Ⅱのユニット「感覚器系」を主に担当した。

コース基礎医科学Ⅰのユニット「自然と生命の理」講義では、続くコース基礎医科学Ⅱで学ぶ各論的な器官系の働きを理解する土台となるような生理学の総論的な部分を物理化学の立場から理解することを目的に内容を編成しているが、本年度は更にコース基礎医科学Ⅱとの連携を深めることを意識し、酸塩基平衡と腎臓での物質輸送の概要を物理化学的観点から捉える講義を新設した。講義では講義中に学生が自らの理解を確認する時間を設けるとともに、講義終了時にその日の要点を用紙にまとめ提出することで、後日教員からのフィードバックを受ける機会とする方式を、演習では、講義内容の能動的な理解のために、達成度別小グループを編成し、講義内容を咀嚼するための演習課題を与え、それらをグループ内で教えあいながら解くという方式を引き続き採用した。実習では動物や人体を用いた生命現象にかかわる実験を、グループ構成員同士が方法を相談しながら進める選択実験を継続した。昨年まで行っていた「PCを用いた生命現象に関する時間変化のシミュレーション実習」は、方法に改善の余地が認められたため一度とりやめとし、コース基礎医科学Ⅱのユニット「感覚器系」に繋がる「弁別閾値の測定」を新規テーマとして導入した。

コース基礎医科学Ⅱではユニット「感覚器系」を担当した。本年度は昨年度よりも更にユニット内での内容連携を強化し、スライドの共有や講義内容の相互引用を増やすことにより感覚器系全体、ならびにユニット「神経系」との関わりが理解できるような構成を工夫した。また試験では、ユニット全体での統合がなされているかを意識した問題となるように工夫した。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Yamazawa T, Ogawa H, Murayama T, Yamaguchi M, Oyamada H, Suzuki J, Kurebayashi N, Kanemaru K, Oguchi K, Sakurai T, Iino M. Insights into channel modulation mechanism of RYR1 mutants using  $Ca^{2+}$  imaging and molecular dynamics. *J Gen Physiol* 2020; 152(1): e201812235
- 2) Sugi H, Yamaguchi M, Ohno T, Okuyama H, Yagi N. X-ray diffraction studies on the structural origin of dynamic tension recovery following ramp-shaped releases in high-Ca rigor muscle fibers. *Int J Mol Sci* 2020; 21(4): 1244.

### II. 総説

- 1) Ogawa H, Kurebayashi N, Yamazawa T, Murayama T. Regulatory mechanisms of ryanodine receptor/ $Ca^{2+}$  release channel revealed by recent advancements in structural studies. *J Muscle Res Cell Motil* 2020 Feb 10. [Epub ahead of print]

### III. 学会発表

- 1) Yamazawa T, Ogawa H, Yamaguchi M, Murayama T, Oyamada H, Suzuki J, Kurebayashi N, Kanemaru K, Oguchi K, Sakurai T, Iino M. (Poster) Molecular dynamics and  $Ca^{2+}$  imaging of mutant type 1 ryanodine receptors. Gordon Research Conference, Lucca, June.
- 2) 渡辺 賢, 石田行知, 中原直哉, 山村 聡. (口頭) 消化管虚血による消化管平滑筋収縮機能と構造の変調. 第29回日本病態生理学学会大会. 東大阪, 8月.
- 3) 渡辺 賢, 石田行知, 中原直哉, 劉 英明. (シンポジウム) 細いフィラメント制御とスキンド盲腸収縮・弛緩. 第61回日本平滑筋学会総会. 名古屋, 8月.
- 4) 山澤徳志子. (口頭) 分子動力学計算とカルシウムイメージングによるリアノジン受容体制御機構の解析. 生理学研究所研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」. 岡崎, 9月.
- 5) 山澤徳志子, 小林琢也, 呉林なごみ, 野口 悟, 井上高良, 井上由紀子, 西野一三, 櫻井 隆, 村山 尚. (口頭) リアノジン受容体変異マウスを用いた悪性高熱症病態解析. 第74回日本体力医学会大会. つくば, 9月.
- 6) 山口真紀, 栗原 貫, 中原直哉, 大野哲生, 山内秀樹, 平野和宏, 山澤徳志子, 竹森 重. (ポスター) 外眼筋の構造的特徴の探求. 第74回日本体力医学会大会. つくば, 9月.
- 7) 河原巧絃, 山口真紀, 山澤徳志子, 秋山暢丈, 竹森 重. (ポスター) マウス骨格筋サテライト細胞から分

- 化誘導した骨格筋のミオシン重鎖発現パターン. 第74回日本体力医学会大会. つくば, 9月.
- 8) 池田道明, 大野哲生, 中原直哉, 山口真紀, 山澤徳志子, 森本 茂, 竹森 重. (口頭) 爪の伸びの季節変動解釈のための爪重量密度測定から-爪の中の水の状態. 第74回日本体力医学会大会. つくば, 9月.
- 9) 森本 茂, 山口真紀, 竹森 重. (口頭) 筋力保持中に見られる運動単位筋振動信号の振幅増強は活動後の振幅増強に繋がるか? 第74回日本体力医学会大会. つくば, 9月.
- 10) 山澤徳志子, 小川治夫, 山口真紀, 村山 尚, 小山田英人, 呉林なごみ, 鈴木純二, 金丸和典, 小口勝司, 櫻井 隆, 飯野正光. (ポスター) 変異リアノジン受容体の分子動力学シミュレーション. 日本生物物理学会第57回年会. 宮崎, 9月.
- 11) 中原直哉, 大野哲生, 木村雅子, 木村澄子, 竹森 重. (ポスター) 熱測定で評価した骨格筋内の水と筋タンパクの相互作用. 第136回成医会総会. 東京, 10月.
- 12) 山澤徳志子, 小川治夫, 村山 尚, 山口真紀, 小山田英人, 鈴木純二, 呉林なごみ, 金丸和典, 小口勝司, 櫻井 隆, 飯野正光. 分子動力学計算による変異リアノジン受容体チャネル変調機構. 第249回生理学東京談話会. 千葉, 11月.
- 13) 山口真紀, 中原直哉, 大野哲生, 山内秀樹, 平野和宏, 山澤徳志子, 竹森 重. (口頭) 外眼筋線維の構造的特徴. 筋生理の集い. 東京, 12月.
- 14) Yamazawa T, Ogawa H, Murayama T, Yamaguchi M, Oyamada H, Suzuki J, Kurebayashi N, Kanemaru K, Oguchi K, Sakurai T, Iino M. (Poster) Molecular dynamics and  $Ca^{2+}$  imaging of mutant type 1 ryanodine receptor. 64th Annual Meeting of the Biophysical Society. San Diego, Feb.
- 15) 山澤徳志子. (シンポジウム14:  $Ca^{2+}$ 誘発性  $Ca^{2+}$ 放出 (CICR) 研究の最前線: CICR 発見から50年を記念して) 分子動力学シミュレーションと悪性高熱症モデルマウスによるCICR制御機構の解析. 第93回日本薬理学会年会. 横浜, 3月. (紙上開催)
- 16) 山澤徳志子, 小川治夫, 村山 尚, 山口真紀, 小山田英人, 鈴木純二, 呉林なごみ, 金丸和典, 小口勝司, 櫻井 隆, 飯野正光. (ポスター) 変異リアノジン受容体の分子動力学解析. 第97回日本生理学会大会. 別府, 3月. (誌上開催)
- 17) 山口真紀, 河原巧絃, 飯田貴絵, 山澤徳志子, 秋山暢丈, 竹森 重. (ポスター) 骨格筋サテライト細胞の増殖・分化過程に対する骨格筋抽出液の効果. 第97回日本生理学会大会. 別府, 3月. (誌上開催)
- 18) 中原直哉. (ポスター) Actin filaments render considerable heat capacity to skeletal muscle sarcomere. 第97回日本生理学会大会. 別府, 3月. (誌上開催)

## V. その他

- 1) 山口真紀, 木村雅子, 大野哲生, 秋山暢丈, 中原直哉, 竹森 重, 八木直人. 収縮性クロスブリッジにより惹起される心筋トロポニンTの構造変化. SPring-8/SACLA 利用研究成果集 2019; 7(2): 120-4.