

第 6 回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（追加助成） <概要>

所 属	徳島大学ポスト LED フォトニクス研究所 医光融合研究部門
氏 名	高成 広起
研究テーマ	コレステロールが心房筋ギャップ結合蛋白コネキシン 40 の発現・分布に与える影響

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを 1 ページにまとめてください。（図表、写真などの貼付を含む）

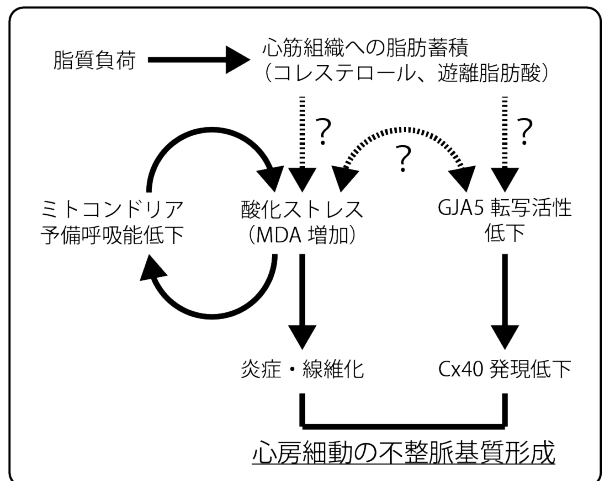
【研究目的】 食生活の欧米化に伴い、本邦では高脂質血症、高コレステロール血症などの脂質代謝異常症が急激に増加し、動脈硬化性疾患などの生活習慣病の増加につながる。また社会の高齢化と共に、加齢に伴って罹患率が増加する心房細動の患者数も増加している。生活習慣病の中でも糖尿病や高血圧症が心房細動の独立した危険因子であることが知られているが、脂質代謝異常症と心房細動との関連は不明な点が多い。我々はこれまでに高脂肪食を与えたマウスにおいて心房組織の線維化進行と不整脈基質の形成を報告してきたが、より詳細なメカニズムの検証を行った。

【研究手法】 8 週齢より通常食もしくは 60%ラード含有の高脂肪食を 4 週間与えたマウス（それぞれ ND 群と HFD 群）の心臓組織、もしくは単離心筋細胞を用いて、①組織に含まれる脂質成分の質量分析を行い、各脂質の割合を算出した。②ラマン分光法により、細胞内の脂質の分布を検証した。③酸化ストレスを MDA 発現で、Cx40 の転写活性を GJA5 に対する転写因子 Nkx2.5, Gata4, Mfa2a の ChIP assay で、さらに細胞内カルシウムシグナルを CaMKII 及び pCaMKII の Western blot から検証した。④単離心筋細胞におけるミトコンドリア機能を、細胞外フラックス分析装置を用いて評価した。

【研究成果】

1. HFD 群では ND 群に比べて心臓組織にコレステロールや遊離脂肪酸が蓄積していた。
2. HFD 群の心筋細胞では、ラマン顕微鏡で心臓組織内に蓄積された脂肪滴が確認でき、コレステロールや脂肪酸の分布が異なることが確認された。
3. HFD 群の心臓では ND 群の心臓に比べて、MDA 発現が増加し、酸化ストレスが生じていた。また GJA5 に対する ChIP assay で、HFD 群で Nkx2.5, Gata4, Mfa2a による GJA5 の転写活性が低下していた。さらに CaMKII 発現に有意差は認めなかったが pCaMKII は HFD 群で増加していた。
4. 細胞外フラックス分析装置を用いた実験では、HFD 群の心臓より単離された心筋細胞は、ND 群の心筋細胞よりもミトコンドリア機能が低下していることが示された。

【まとめ】 高脂肪食を与えたマウスでは心臓組織・心筋細胞にコレステロールや遊離脂肪酸が蓄積していた。また高脂肪食を与えられたマウスの心臓組織において酸化ストレスや Cx40 発現制御に関する転写活性の低下、ミトコンドリア機能低下、カルシウム過負荷などが生じていることが示された。これらの要素が複合的に心房組織の炎症・線維化や Cx40 発現低下を生じ、心房細動の不整脈基質を形成すると考えられた。但し、本研究では酸化ストレスや転写活性低下を生じる蒸溜のメカニズムまでは解明できなかった。



第 6 回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –
研究成果報告書（追加助成） <詳細>

所 属	徳島大学ポスト LED フォトニクス研究所 医光融合研究部門
氏 名	高成 広起
研究テーマ	コレステロールが心房筋ギャップ結合蛋白コネクシン 40 の発現・分布に与える影響

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

【研究目的】 高脂質血症や高コレステロール血症などの脂質代謝異常症はメタボリックシンドロームの一要素として様々な疾患、特に動脈硬化性疾患（脳血管障害や心血管障害）に関与する。コレステロールや飽和脂肪酸は、血管や組織の局所において炎症を生じることが主な病態メカニズムと考えられている。本邦でも食事の欧米化によって脂質代謝異常症を持つ人口の増加と共に動脈硬化性疾患も増加している。一方、社会の高齢化に伴い、加齢と共に罹患率が増える心房細動の患者も増加している。心房細動は塞栓症や心不全を生じるために厳格な内服治療や、カテーテル・アブレーションなどの高度先進医療を必要とし、罹患者数の増加によって医療経済を圧迫しつつある。生活習慣病の中でも糖尿病や高血圧症は心房細動の独立した危険因子として知られているが、脂質代謝異常症と心房細動の関連は不明である。我々は脂質代謝異常により心筋組織への脂質の蓄積、それに続発する炎症と線維化を生じ、線維化による不整脈基質形成から心房細動を生じると仮説を立てた。これまでの研究では、60%ラード含有の高脂肪食を 4 週間与えたマウスにおいて、心電図上の P 波幅（心房興奮時間）の延長と、心房筋における Cx40 発現の低下が生じることが示された。本研究では、コレステロールが Cx40 発現低下を生じるメカニズムをより詳細に検証した。

【研究方法】 8 週齢の C57BL/6J マウスに、通常食（ND 群）、もしくは 60%ラード含有の高脂肪食（HFD 群）を 4 週間与え、心臓組織を摘出して以下の実験に供した。

- 4 週間の高脂肪食投与によって心臓組織に蓄積された脂質（コレステロールと遊離脂肪酸）を、脂質量キット（Cell Biolabs, Inc.）を用いて定量評価した。
- 高脂肪食を与えたマウス心臓の凍結組織より切片を作成、共焦点ラマン顕微鏡（励起光：532 nm レーザー、計測範囲：200~3,500 cm^{-1} 、空間分解能：1 μm ）によって心筋細胞に含まれる油滴の脂質成分を空間的に分析した。
- 心筋組織の Western blot で Malondialdehyde (MDA) の定量分析を行い、心筋組織に生じている酸化ストレスの度合いを検証した。また ChIP assay で GJA5 (Cx40 を encode する遺伝子) に対する Nkx2.5, Gata4, Mef2a のインタラクションを確認した。さらにリン酸化 CaMKII (pCaMKII) のタンパク定量によって細胞内カルシウム過負荷の状態を検証した。
- 細胞外フラックス分析装置、及び Mito Stress Kit を用いて、ND 群と HFD 群のマウス心臓よりコラーゲン処理で単離した心筋細胞のミトコンドリア機能解析を行った。

【研究結果】

- HFD 群では ND 群に比べて、心臓組織で蓄積される脂質（コレステロール、及び遊離脂肪酸）が有意に増加した。（図 1）。

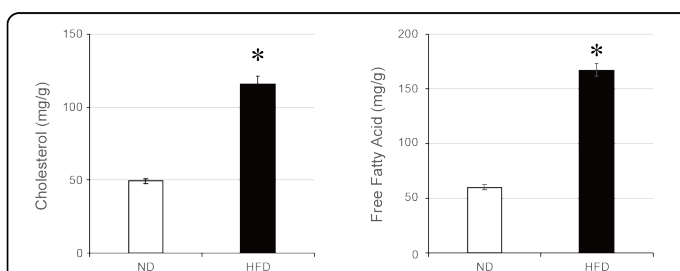


図 1. 高脂肪食を与えた群 (HFD) では、通常食を与えた群 (ND) に比べて心臓組織に含まれるコレステロール及び遊離脂肪酸が増加していた。 (*: $p < 0.05$ vs. ND, $n=5$)

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

2. HFD 群マウスの心臓組織の凍結切片を観察したところ、透過像では一部の心筋細胞に脂肪滴を確認した。この脂肪滴を共焦点ラマン顕微鏡で観察したところ、脂肪滴にも遊離脂肪酸優位の脂肪滴とコレステロール優位の脂肪滴が存在することが示された (図 2)。

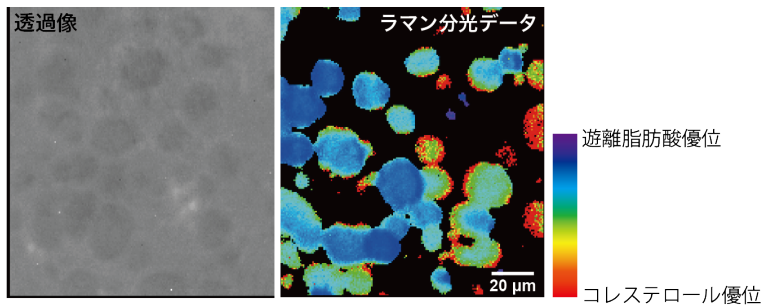


図 2. 高脂肪食を与えたマウス (HFD) の心臓凍結切片の透過像とラマン分光データ。心臓組織の一部で脂肪滴が確認され、その中でもコレステロールが有意の部分と遊離脂肪酸が有意の部分が存在する。

3. Western blot 法では、HFD 群で ND 群に比べて MDA の発現が

増加しており、酸化ストレスが脂肪負荷によって増大していることが示された (図 3a)。また GJA5 に対する ChIP assay では、Nkx2.5, Gata4, Mfa2a による GJA5 の転写活性が HFD 群で低下していた (図 3b)。また CaMKII の蛋白発現には両群間で差がなかったが、リン酸化 CaMKII (pCaMKII) は HFD 群で ND 群に比べて増加しており、HFD 群の心臓組織においてカルシウム過負荷が生じていることが示された (図 3c)。

4. ND 群と HFD 群のマウス心臓からコラゲナーゼ処理で単離した心筋細胞を用いてミトコンドリア機能を測定したところ、HFD 群では ND 群に比べてミトコンドリア呼吸予備能の低下が認められた (図 4)。

[考察と今後の課題] 本研究によって、高脂肪食を与えたマウスの心臓では脂質が心筋組織に蓄積し (図 1)、その細胞内脂質でも成分が異なる可能性が示された (図 2)。コレステロールや飽和脂肪酸は組織において炎症を惹起することが知られており (He. *Sci Rep* 2016)、本研究で示された心臓組織への脂質蓄積は、続発する炎症・線維化の成因である可能性が示唆された。但し、組織局所において脂質はマクロファージに貪食され、マクロファージを起点に炎症が生じるという報告も多くなされており、心房組織でも心外膜脂肪組織とマクロファージが炎症に関与することが示唆されている (Abe. *Heart Rhythm* 2018)。本研究では、マウス心房が非常に小さく、局所に存在するマクロファージを分離して分析することができずに心臓全体での評価を行った。今後は、心筋組織でも心房筋と心室筋、さらにはマクロファージなどの minor population 毎に分析を行う必要があると思われる。また組織中に

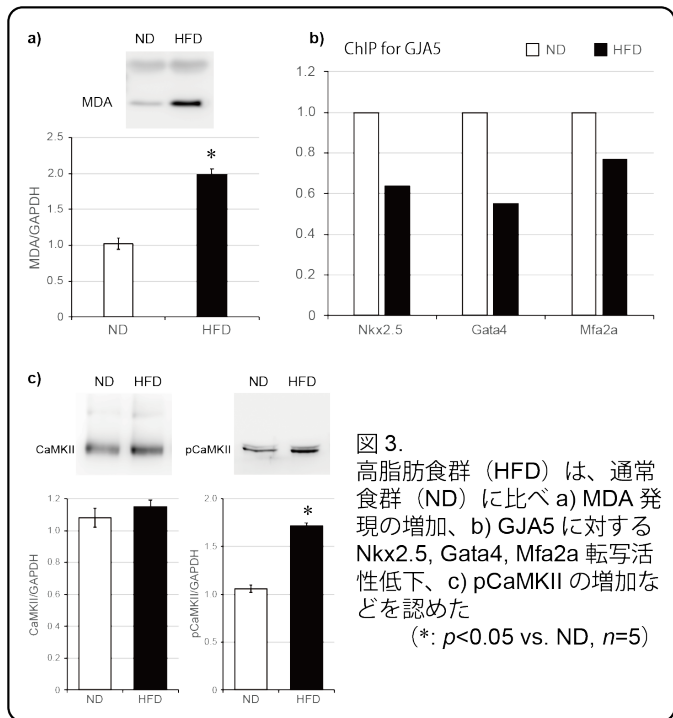


図 3. 高脂肪食群 (HFD) は、通常食群 (ND) に比べ a) MDA 発現の増加、b) GJA5 に対する Nkx2.5, Gata4, Mfa2a 転写活性低下、c) pCaMKII の増加などを認めた (*: $p < 0.05$ vs. ND, $n = 5$)

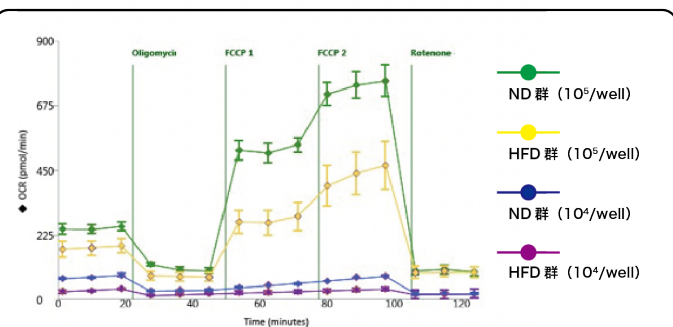


図 4. 高脂肪食を与えたマウス (HFD) の心筋細胞 (黄) は通常食を与えたマウス (ND) の心筋細胞 (緑) よりもミトコンドリア予備呼吸能が低下していた。

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

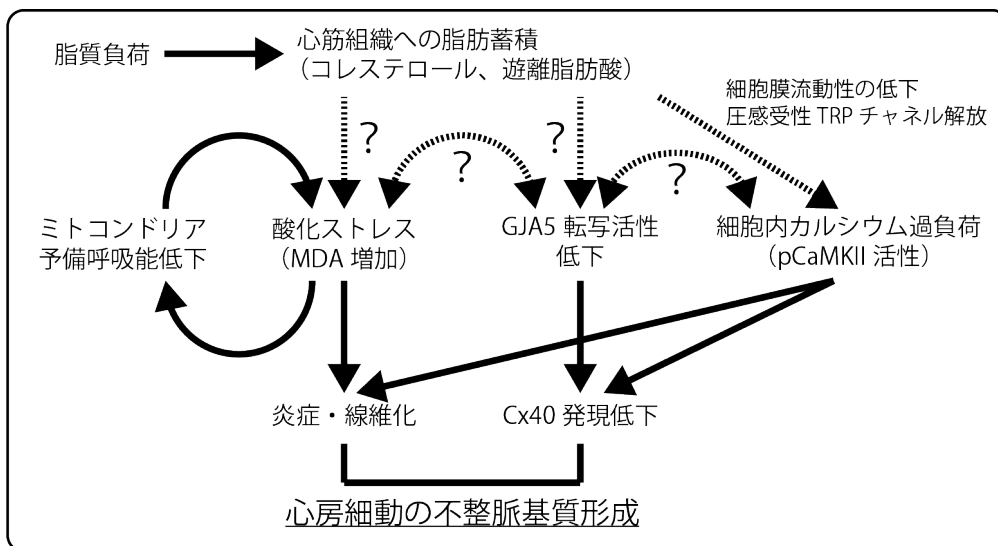
含まれる遊離脂肪酸の増加は確認したものの、飽和脂肪酸、あるいは不飽和脂肪酸がどの程度蓄積しているかまでは確認できなかった。今後は質量分析法などを用いて、詳細な脂質成分の分析を行う必要がある。

今回、ラマン分光法で心筋組織の脂質成分を分析できたことは非常に新しい知見である（図 2）。これまで細胞や組織に蓄積される脂質に空間的な不均一性があるという報告は認めない。カテーテルアブレーション中に確認される心房組織の線維化領域は空間的に不均一である。本研究技術を応用することで、脂質蓄積部（さらにその中の脂質成分）と炎症部位との関連などを解明できる可能性が示された。

脂質は細胞膜においてリン脂質や脂質ラフトの構成成分となる。飽和脂肪酸の増加は細胞膜の流動性を低下させると考えられる（Maulucci. *Free Rad Res* 2016）。またコレステロールの増加は脂質ラフトの形成を促進し、同様に細胞膜の流動性を低下させると考えられる（Fernández-Pérez. *Front Aging Neurosci* 2018）。我々の予備検討では、原子間力顕微鏡で測定された HeLa 細胞の細胞膜の剛性は平均 750 Pa 程度、これに M β CD とコレステロールを投与してコレステロール負荷状態にすると平均 1,050 Pa、また M β CD のみ投与してコレステロール除去状態にすると平均 600 Pa と、コレステロールによって細胞膜の剛性に変化が見られた（提示データなし）。細胞膜の剛性が変化すると、細胞膜や細胞骨格に加わるメカノストレスの変化につながる。脂質負荷によって細胞膜の剛性が増加すると、細胞骨格や細胞膜に加わるメカノストレスは増加し、圧感受性 TRP チャネルから細胞内カルシウム過負荷を生じる可能性がある（図 3c）。今後、脂質負荷の有無による細胞骨格や細胞内カルシウム動態の変化を検証することも必要と思われる。

今回の研究で、脂質負荷が GJA5 の転写活性が低下させることを示した（図 3b）。Nkx2.5 と Gata4 は Cx40 蛋白の転写調節を行う転写因子として既に知られている（Linhares. *Cardiovasc Res* 2004）。選考実験では脂質負荷によって Cx40 の mRNA 発現の低下を確認しており、本研究では Nkx2.5 や Gata4 による GJA5 転写調節の低下を確認できたことから、脂質負荷による Cx40 発現減少には転写調節異常が関与することが示された。しかし、脂肪負荷によって転写調節の異常を来すメカニズムまでは明らかにすることができなかった。酸化ストレスや細胞内カルシウム過負荷が関与している可能性があるが、今のところは直接的な実証を得ることはできていない。この GJA5 転写調節に対する脂質負荷の影響は、今後の研究課題である。

糖尿病や高血圧症は様々な複合因子によって心房細動のリスクを高めるが、脂質代謝異常症においても同様に、複数のメカニズムが絡み合って心臓組織に影響することで、心房細動のリスクを高めている可能性が示された。動脈硬化性疾患の予防という観点からだけでなく、心房細動予防という観点からも脂質代謝異常症の厳格な管理を行う必要があると考える。



第 6 回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（追加助成） <発表実績/予定一覧>

所 属	徳島大学ポスト LED フォトニクス研究所 医光融合研究部門
氏 名	高成 広起

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 国内外雑誌を問わない。 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	Yagishita F, Tanigawa JI, Nii C, Tabata A, Nagamune H, <u>Takanari H</u> , Imada Y, Kawamura Y. Fluorescent Imidazo[1,5-a]pyridinium Salt for a Potential Cancer Therapy Agent. <i>ACS Med Chem</i> 2019;10:1110-4.
2	Umeda R*, <u>Takanari H</u> *, Ogata K, Matsumoto S, Kitano T, Ono K, Tokumaru O. Direct free radical scavenging effects of water-soluble HMG-CoA reductase inhibitors. <i>J Clin Biochem Nutr</i> 2019;64:20-6. (*: equal contribution)
3	Kondo H, <u>Takanari H</u> (5 th out of 28), Teshima Y, Nakagawa M, Takahashi N. Interleukin 10 Treatment Ameliorates High-Fat Diet-Induced Inflammatory Atrial Remodeling and Fibrillation. <i>Circ Arrhythm Electrophysiol</i> 2018;11:e006040.
4	Baburin I, van der Heyden MAG, <u>Takanari H</u> (11 th out of 16), Vos MA, Hering S. Dehydroevodiamine and hortiamine, alkaloids from the traditional Chinese herbal drug Evodia rutaecarpa, are IKr blockers with proarrhythmic effects in vitro and in vivo. <i>Pharmacol Res</i> 2018;131:150-63.
5	Masuda K, <u>Takanari H</u> , Morishima M, Ma F, Wang Y, Takahashi N, Ono K. Testosterone-mediated upregulation of delayed rectifier potassium channel in cardiomyocytes causes abbreviation of QT intervals in rats. <i>J Physiol Sci</i> 2018;68:759-67.
6	Ji Y, Veldhuis MG, Zandvoort J, Romunde FL, Houtman MJC, Duran K, van Haften G, Zangerl-Plessl EM, <u>Takanari H</u> , Stary-Weinzinger A, van der Heyden MAG. PA-6 inhibits inward rectifier currents carried by V93I and D172N gain-of-function KIR2.1 channels, but increases channel protein expression. <i>J Biomed Sci</i> 2017;24:44.
7	Ji Y, <u>Takanari H</u> , Qile M, Nalos L, Houtman MJC, Romunde FL, Heukers R, van Bergen En Henegouwen PMP, Vos MA, van der Heyden MAG. Class III antiarrhythmic drugs amiodarone and dronedarone impair KIR 2.1 backward trafficking. <i>J Cell Mol Med</i> 2017;21:2514-23.
② <論文 PDF 添付なし>	
1	<u>Takanari H</u> , Fontes MSC, van der Heyden MAG, Vos MA, van Veen TAB. Response to the letter from Warren et al. <i>Cardiovasc Res</i> 2017;113:1799-1800.

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2019 年 11 月 18 日	徳島大学医歯薬学研究部公開シンポジウム（招待講演） 高成広起 ，細胞や組織のラベルフリー・イメージング：臨床応用を目指した研究。
2	2019 年 9 月 7 日	生体医工学シンポジウム（ポスター発表）金村洋平、 高成広起 、井上高教．光ファイバーラマン分光装置の構築及び検証．
3	2019 年 6 月 7 日	日本医科大学金曜会セミナー（招聘講演） 高成広起 ．光で生体を見る～生理現象や病態の可視化を目指した研究～．
4	2019 年 3 月 30 日	The 9 th . Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (Poster Presentation) Takanari H . The influence of KATP channel abnormality on calcium handling of endoplasmic reticulum.
3. 投稿、発表予定（投稿中の論文も含める）		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2020 年 4 月	Journal of Dermatological Science (IF: 3.986)
2	2020 年 8 月	Optics Express (IF: 3.561)
3	2020 年 12 月	Cardiovascular Research (IF: 7.014)