

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01630

研究課題名(和文) ポリアミン蓄積はスポーツ心臓の不整脈の誘因か？

研究課題名(英文) Does polyamine administration affect cardiac structure and function of athletes' heart ?

研究代表者

山口 真紀 (Yamaguchi, Maki)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30271315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞増殖因子ポリアミンがスポーツ性心肥大時の心機能と構造に与える影響を調べるために運動負荷を与えた群と与えない群のラットにプトレシンを経口投与し心機能と構造を比較した。プトレシンの経口投与は運動負荷を与えないと心筋中のプトレシン濃度を大きく上昇させるが明らかな心肥大は起こさないこと、運動負荷と共にプトレシンを投与すると心筋中のプトレシン濃度の上昇が抑制されることが明らかになった。主要臓器中のプトレシン濃度も概ね心筋と同様の振る舞いを示した。摂取されたプトレシンは運動負荷により体内の他の臓器に蓄積されたのではなく体外に排泄されるか代謝されることで過剰な心肥大を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Polyamines such as putrescine are poly-cation molecules indispensable for proliferation of the eukaryotic cells. Polyamines are also known as modulators of ion channels regulating physiological excitability of cardiac cells. Therefore, polyamines may play a significant role in the hypertrophy and arrhythmia of athletes' hearts. To examine the effects of oral administration of polyamine, rats were bred for 9 weeks at four combined conditions of presence and absence of 1 mg/ml of putrescine in drinking water and freely accessible wheel for spontaneous running. Putrescine concentration in the cardiac cells increased in the putrescine (+) / exercise (-) group, but not in the putrescine (+) / exercise (+) group. Electrocardiograph and structural parameters of the heart showed no appreciable effect of putrescine administration with and without exercise. Polyamine concentration in the cardiac cells was suggested to be strictly controlled to regulate exercise induced hypertrophy of the heart.

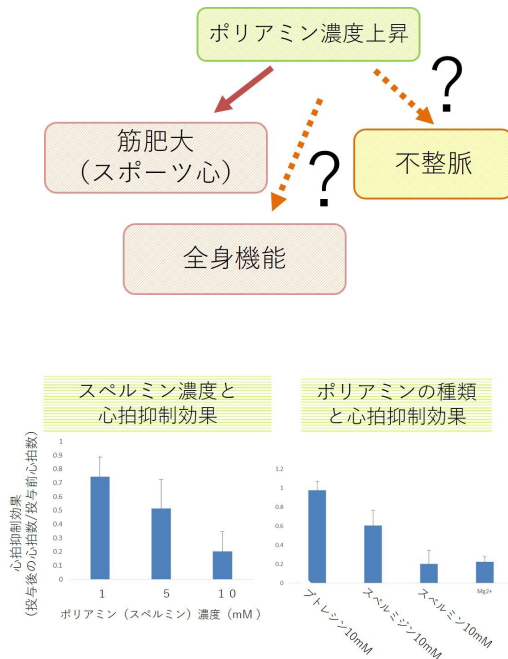
研究分野：筋生理学

キーワード：athletes's heart polyamine arrhythmia

1. 研究開始当初の背景

運動中の心肺停止は致死的不整脈が原因となる場合が多いが、その不整脈の原因は解明されておらず、予防法も確立されていない。ところでポリアミンは、全ての生物細胞に共通な増殖因子であり、哺乳類細胞にはプトレシン、スペルミジン、スペルミンの三種が存在している。動物実験では、ラットへの短期的な運動負荷に反応し、運動開始後から5日後の心筋内ポリアミン濃度が増加することが報告されている(Turchanowa et al., 2000, Calderera et al., 1974)。一方ではポリアミンは心筋細胞の興奮過程を担う生理的に重要なイオンチャネルの働きを修飾することが明らかとなっている。

申請者はこれまでに、心筋培養細胞系の自発拍動の頻度をポリアミンが濃度依存的に抑制することを見出し報告した。しかし成熟心筋細胞へのポリアミンの効果や、生体へのポリアミン経口投与の影響は明らかでない。



2. 研究の目的

ポリアミンの添加が成熟心筋細胞の興奮性や心臓のミクロ～マクロ構造や循環機能にどのように影響するかを調べるために、(1)成熟ラットから単離したラット単離心筋にポリアミンを添加した際のカルシウム動態と膜電位変化を調べるとともに(2)ラットに自発走による運動負荷を与えながらポリアミンを経口摂取させた際の心重量測定、心電図測定、心筋組織解析、心筋細胞内シグナル解析、ポリアミン濃度測定を実施することで、心肥大経過に伴う心興奮性の変化やその原因となる形態学的・生化学的变化に対するポリアミン経口摂取の影響を調べる。また、同様の実験をポリアミン合成抑制剤投与下

で行い、ポリアミン摂取の効果を多角的に検証する。

3. 研究の方法

(1)成熟ラットから単離した心筋細胞の興奮性に対するポリアミンの効果

成熟ラット(wistar 雄)からコラゲナーゼ処理により単離した心筋細胞に蛍光 Ca²⁺指示薬(fura-2)や蛍光膜電位指示(Di-4 ANNEPS)を導入し、細胞外液にポリアミンを添加した際の細胞内 Ca²⁺濃度変動と膜電位変化を測定した。

(2)運動負荷ラットへのポリアミン長期経口投与による心構造・機能への影響

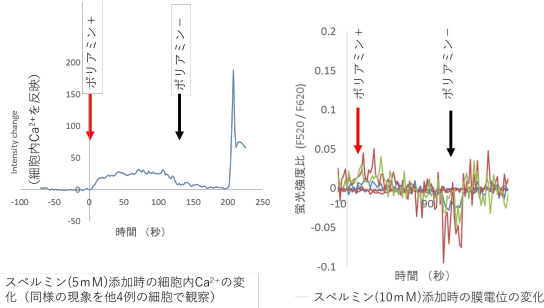
特殊(低ポリアミン含有)飼料摂取下でポリアミン無しまたは有(プトレシン 1mg/ml)の水を与えた群のそれぞれを、更に運動負荷無しまたは有の亜群に分け9-10週間飼育した。運動負荷群には回転車輪付きケージにより自発運動を行わせた。この間、体重、摂餌量、摂水量、走行距離を数日おきに記録するとともに、CT撮影を実験前と後に行い心肥大の程度や脂肪量を評価した。また動物を循環系に影響の少ないとされる吸入麻酔剤にて麻酔し、胸部誘導心電図を測定した。実験期間終了後に動物から心臓を摘出し、心重量測定、心筋組織解析、心筋細胞内シグナルのウェスタンブロッティング解析、HPCL法による体組織内ポリアミン濃度解析を実施した。

4. 研究成果

(1)成熟ラットから単離した心筋細胞の興奮性に対するポリアミンの効果

単離心筋細胞を含む細胞外液にポリアミンを添加したときの心筋細胞のカルシウム動態と興奮性の変化を解析した。単離心筋細胞を浸す人工細胞外液にスペルミン 1mM～10mMを添加し、細胞内カルシウム濃度を蛍光カルシウム指示薬 fluo4 を用いて調べたところ、単離心筋細胞の細胞内カルシウム濃度の増加および自発的なカルシウムトランジェント頻度の増加が観察された。またこのときの膜電位変化を膜電位感受性色素である Di-4 ANNEPS を用いて観察したところ、スペルミン添加によるカルシウム濃度変化と対応した膜電位の変化は観察されなかった。これより、細胞外液に添加したスペルミンは、細胞外からのカルシウム流入によるのではなく、心筋細胞内筋小胞体からのカルシウム放出により細胞内カルシウム濃度の変化を

誘発すると考えられた。



—スベルミン(5mM)添加時の細胞内Ca²⁺の変化 (同様の現象を他4例の細胞で観察)
—スベルミン(10mM)添加時の膜電位の変化

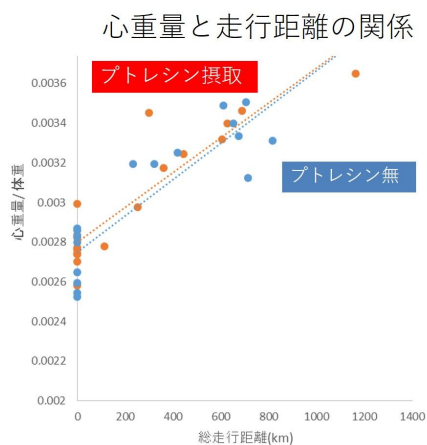
(2) 運動負荷ラットへのポリアミン長期経口投与による心構造・機能への影響

○体重および脂肪量の推移

実験期間中のラットの体重の推移を実験開始時に対する比率で評価したところ、運動群のうちでポリアミン摂取群がポリアミン非摂取群に比べて実験終了時の体重が有意に少なかった。また、この体重の違いの原因を調べるために腰部 CT 像により体脂肪量を評価したところ、特に運動群においてポリアミン非摂取群の体脂肪率の平均値が摂取群では少なかった。このことから、ポリアミン摂取群では運動時に動員されるいずれかのシグナル経路を活性化することにより有酸素的代謝を促進し脂質からのエネルギー合成が進むものと推測された。

○心重量と組織学的構造に対する影響

実験終了時点での心重量は走行距離に依存して増加しており、自発走により心肥大が誘発できたことが確認されたが、プトレシン摂取の有無による明らかな差異は認められなかった。ただし組織学的には運動負荷に伴うポリアミン摂取により線維化割合が増強する傾向が観察された。



○心機能に対する影響

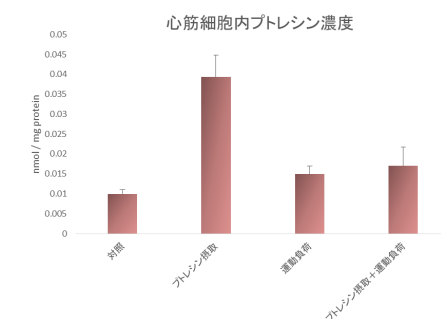
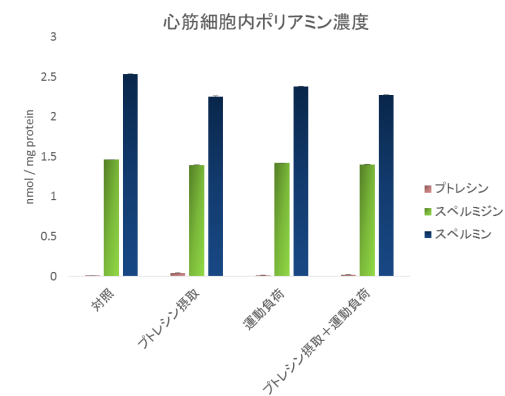
心電図ではスポーツ性心肥大時に特徴的とされる早期脱分極と類似の波形が運動群で観察されたが、ポリアミン摂取の有無による明らかな違いは認められなかった。

○プトレシン経口摂取による細胞内シグナル変化のウェスタンブロッティング解析

ウェスタンブロッティング解析により、心肥大や不整脈、ポリアミン・エネルギー代謝との関連が示唆されるタンパク質(Kir2.1、COX、カルシニューリン、ODC、MAPK、コラーゲン)発現量を測定したところ、プトレシン投与による明らかな違いは認められなかった。

○体内ポリアミン分布

実験期間終了後に測定した血清および心筋細胞内ポリアミン濃度は、運動負荷群で上昇しており、Caldarera らによる短期の持久運動にともなう影響と合致する傾向を示した。また、非運動群ではポリアミン摂取によって血清および心筋ポリアミン濃度が約5(心筋細胞内)~10倍(血清)に増加していたが、ポリアミン摂取とともに運動負荷を行った群ではその増加割合が大きく抑制されており、経口摂取されたポリアミンの血清および心筋内の濃度増加が運動負荷により抑えられる機構が存在すると考えられた。



そこでこの機構を追及するために、運動実験後に同時に採取した全身の主要臓器についてもポリアミン含量を測定した結果、運動により血清と心筋への蓄積が抑制された摂取プトレシンは、体内のいずれの臓器でも同様に増加が蓄積されていることがわかった。つまり、経口摂取されたプトレシンは運動により積極的に体外に排泄されたか代謝されたと考えられた。以上のことより、外来性に摂取されたプトレシンにより心筋内プトレシン濃度が増加しただけでは心肥大や不整脈を起こすシグナルは動かないこと、運動とプトレシン摂取が同時に行われた場合には、プトレシン濃度が適切な範囲となるように運動とリンクした代謝調節が行われ、病的な心肥大や不整脈が抑制される機構があることが強く示唆された。

○ スペルミジン、スペルミンおよびポリアミン合成阻害剤 DFMO の経口投与の影響

プトレシン経口投与により得られた以上の結果がより価数の多いポリアミンであるスペルミジン、スペルミンやポリアミン合成阻害剤投与についても拡張されるか否かを確認するために、ラットにスペルミジン、スペルミンおよびポリアミン合成阻害剤 DFMO を経口摂取させた際の心臓のミクロ～マクロ形態と脂肪量への影響を調べた。DFMO1%を摂取させると、予想に反して、成長に伴う体重の増加が著しく減少した。しかし、体重あたりの心重量には大きな変化はなかった。体重あたりの腹膜周囲脂肪重量は、DFMO1%投与により著しく減少していた。また、電子顕微鏡像では、DFMO 投与群で筋線維の崩壊や異常ミトコンドリア構造が多く観察された。この結果より、DFMO は、直接的にポリアミンの合成を抑えるとともに間接的に核酸合成を阻害する効果を発揮することで、全身の筋タンパクや脂肪細胞の増殖を抑制しつつ循環機能を維持するために必要な最低限の筋タンパク量を確保するように働いたと考えられた。

○ 結語

ポリアミンは刺激伝導系や固有心筋細胞に濃度依存的に多彩な効果を及ぼし得るが、生体に経口投与した場合には運動とリンクした巧みな濃度調節が起こり、心機能や構造の病的変化が起こらないように制御されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計7件)

山口真紀、山澤徳志子、大城戸真喜子、池田道明、山内秀樹、高木邦彰、竹森重 心筋細胞のカルシウム応答に対する細胞増殖因子ポリアミンの効果 第70回体力医学会大会 2015年9月

山口真紀、山澤徳志子、大城戸真喜子、池田道明、山内秀樹、竹森重 心筋細胞のカルシウム応答と膜電位に対するポリアミンの効果 第71回日本体力医学会 2016年9月

山口真紀、山澤徳志子、大城戸真喜子、池田道明、栗原貫、山内秀樹、竹森重 心興奮現象に対するポリアミンの効果 日本ポリアミン学会第8回年会 2017年1月

山口真紀、山澤徳志子、大城戸真喜子、山内秀樹、池田道明、森本茂、竹森重 心筋の興奮性と形態に対するポリアミンの効果 第72回体力医学会 2017年9月

山澤徳志子、村山尚、大城戸真喜子、山口真紀、山内秀樹、竹森重、櫻井隆、大野哲生 骨格筋肥大に対するポリアミンの役割 第72回日本体力医学会 2017年9月

山澤徳志子、村山尚、大城戸真喜子、山口真紀、山内秀樹、竹森重、櫻井隆 ポリアミンによる骨格筋肥大誘発メカニズム 第3回筋学会 2017年8月

山澤徳志子、村山尚、大城戸真喜子、山口真紀、山内秀樹、竹森重、櫻井隆、大野哲生 骨格筋肥大に対するポリアミンの作用 第247回生理学東京談話会 2017年10月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 真紀 (YAMAGUCHI, Maki)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30271315

(2) 研究分担者

竹森 重 (TAKEMORI, Shigeru)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：20179675

大城戸真喜子 (OHKIDO, Makiko)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：30287304

山内秀樹 (YAMAUCHI, Hideki)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：60220244

(3) 連携研究者

山澤徳志子 (YAMAZAWA, Toshiko)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：002822616

(4)研究協力者

池田道明 (IKEDA, Michiaki)
東京慈恵会医科大学・医学部・訪問研究員