

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12878

研究課題名(和文) 機械負荷/電気生理相互作用の組織内不均一性に基づく虚血性心疾患病態の多階層解析

研究課題名(英文) Multi-level analysis of ischemic heart disease pathology based on heterogeneity in mechano-electric coupling

研究代表者

入部 玄太郎 (Iribe, Gentaro)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90284885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：正常な心臓の壁の内側と外側の心筋細胞では様々な機能が異なることが知られている。虚血性心疾患と言われる病態(例えば心筋梗塞など)でこの細胞機能の違いがどのように障害されるかはわかっていない。今回我々は心室壁の内外側から別々に細胞を取り出し、独自の 방법으로細胞に伸展刺激を加え、その反応の違いを詳細に調べた。結果、虚血状態にすることによって伸展刺激に対する心室壁内外の反応の違いが消失してしまうことが明らかとなり、虚血性心疾患の病態の理解にとって新しい知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Myocardial cellular function is different between endocardial and epicardial cells. It is not clear how ischemic condition affects this transmural heterogeneity. In the present study, we isolate the cells from epicardium and endocardium to compare the response of their mechanical properties to stretch. We found that ischemic condition reduces the transmural heterogeneity in the response to stretch. The present findings may provide new insight into pathophysiology of ischemic heart disease.

研究分野：心臓生理学

キーワード：虚血性心疾患 心筋メカニクス 不均一性

1. 研究開始当初の背景

心臓の心室壁の内膜側と外膜側では心筋細胞の活動電位波形やカルシウム動態、収縮波形が異なることが知られている。虚血性心疾患は心筋細胞の機械的負荷の上昇に伴って心筋酸素需給バランスが崩れることにより引き起こされるが、心筋組織内の機械的負荷環境も心室壁の内膜側と外膜側では異なる。これらの不均一性は虚血性心疾患が心内膜側から起こりやすいことの一つの理由でもある。このように電気生理学的、力学的な不均一性は虚血性心疾患の病態に大きく影響している。さらに、心臓は常に収縮・弛緩を繰り返しているために心筋細胞にとっては機械的な負荷状態は生理的な環境であるが、近年この機械的な負荷環境が心筋細胞の電気的な活動を修飾していることがわかってきた（機械電気連関：mechano-electric coupling, MEC）。つまり虚血性心疾患における電気生理学的および力学的な不均一性は、MECを介することによってその病態をさらに複雑なものにしている可能性があるが、その全容は不明である。

2. 研究の目的

本研究ではまず正常心筋細胞と虚血心筋細胞における MEC 現象の貫壁性不均一性を細胞実験的に明らかにする。そして MEC の不均一性がどのように虚血心の病態に関わっているかをシミュレーション実験にて明らかにするための心筋細胞数理モデルを作成することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス心筋細胞をランゲンドルフ灌流下に酵素灌流し、その後切り出した左室自由壁の内膜側と外膜側から心筋細胞を単離する。単离心筋細胞に伸展刺激を負荷するために以下に述べるカーボンファイバーによる単离心筋細胞長さ張力制御技術を用いる。ガラス管のマウントに固定した径 $10\mu\text{m}$ のカーボンファイバーを心筋細胞両端に装着する。カーボンファイバーは接着剤等を用いずとも静電気で細胞膜上に固定することが出来る。カーボンファイバーをコンピュータ制御のピエゾモーターにてナノメートル精度で位置制御することにより伸展刺激を加える（図1）。心筋細胞の機械負荷パラメータとして重要なものは細胞の長さ及び発生張力であるが、長さは CCD カメラより直接測定する。張力はカーボンファイバーのマウント位置と先端位置の差から求められるファイバーのたわみ量と、あらかじめ測定してあるファイバーの弾性率を乗じて計算する。まずはこの実験系で測定した力学パラメータおよびそれらの伸展に対する反応が内膜側と外膜側でどう異なるかを確認する。また力学測定以外では、MEC 現象の一つとして、カルシウム指示薬である Fura-4F を用いて細胞内カルシウム濃度波形変化が内膜側と外

膜側でどう異なるかを確認する。これらを正常心筋細胞と、灌流液中にシアン化ナトリウムと低 pH を用いた疑似虚血心筋細胞にて比較する。

さらには正常心筋細胞における実験結果を再現・解析するための内膜側と外膜側の心筋細胞数理モデルを既存のオックスフォード・エカテリブルグ (OE) モデルを元に作成する。

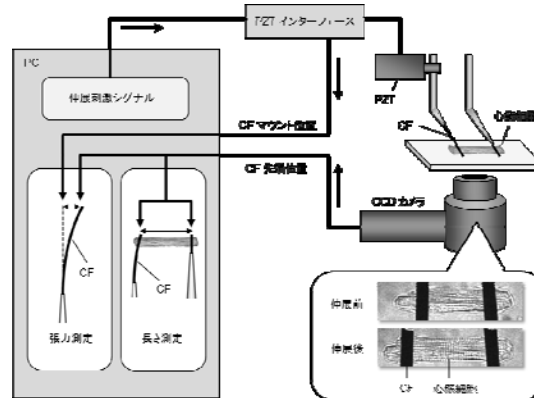


図1

4. 研究成果

1Hz で刺激した心筋細胞を 4~5 段階伸展（図2上）した時の長さ張力関係から得られた収縮期末長さ張力関係（End-systolic force-length relationship: ESFLR）の傾き（収縮性の指標）および拡張期末長さ張力関係（End-diastolic force-length relationship: EDFLR）の傾き（図2中）を比較したところ、両者に壁内不均一性は見られなかった（図2下）。

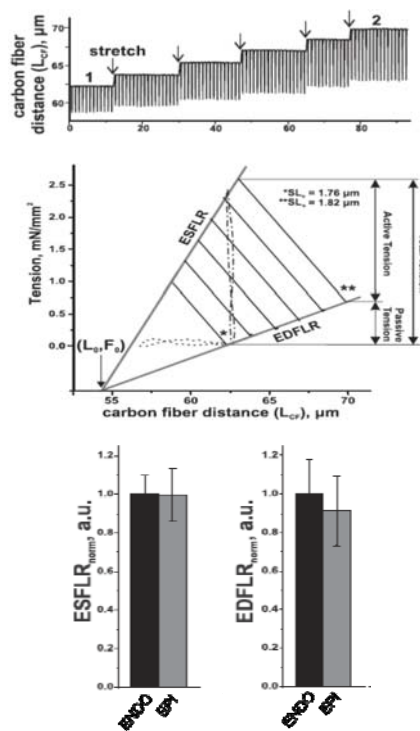


図2

一心拍の収縮波形における最大収縮到達時間 (T_{max}) は心内膜側の方が長いが、伸展時には心内外膜両方において延長する。延長の度合いは心外膜側のほうが大きく、結果、伸展によって内外の不均一性は減少した (図 3 左)。また、一心拍の細胞内カルシウム ($[Ca^{2+}]_i$) トランジェント波形においてはその減衰時定数 (τ) は心内膜側の方が長いが伸展時には心外膜側において延長し、結果、伸展によって内外の不均一性は減少した (図 3 右)。

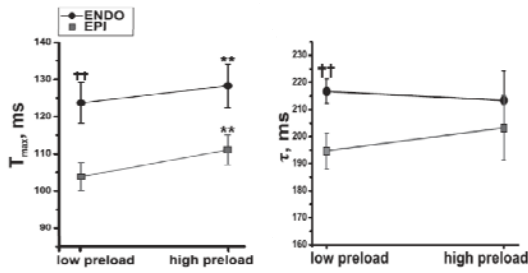


図 3

これらの結果を心筋細胞数理モデルを用いたコンピュータ・シミュレーションで再現するためにオリジナル OE モデルの心外膜側細胞モデルの cooperativity パラメータの調整を行った。cooperativity はカルシウムとトロポニン C 間 (解離定数 K_{off} : 低下)、カルシウム・トロポニン C 複合体間 (CaTnC-CaTnC: 増強)、クロスブリッジとカルシウム・トロポニン C 複合体間 (Xb-CaTnC: 増強) の 3 つに関して検討した。その結果、どの心外膜

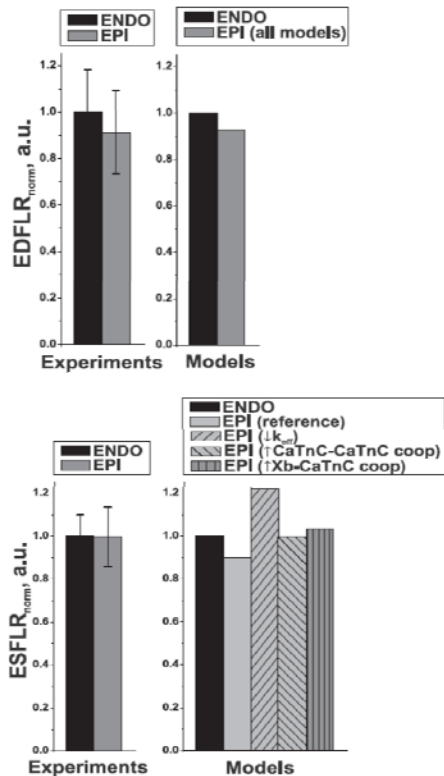


図 4

細胞モデルでも EDFLR の値に差はなく、実験結果をよく再現した (図 4 上)。ESFLR の傾きに関しては CaTnC-CaTnC、もしくは Xb-CaTnC の cooperativity を増強した場合に細胞実験結果 (図 2 下左、図 4 左) と同様心内外膜差が無くなった (図 4 右)。カルシウムトランジェント波形の減衰に関しては、どの心外膜細胞モデルも伸展時には τ が延長し細胞実験結果 (図 3 右、図 5 左) を再現した。

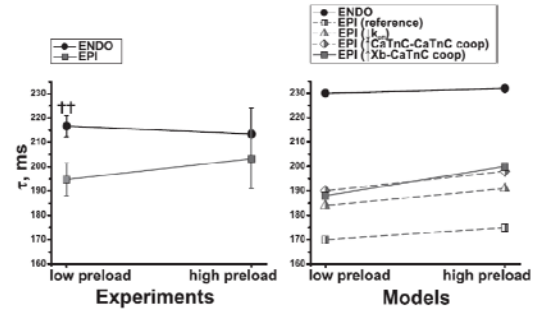


図 5

以上の結果から、心外膜側と心内膜側の心筋細胞における機械刺激に対する力学反応およびカルシウム動態の反応の違いは主に cooperativity の壁内不均一性にあると考えられ、特にカルシウム・トロポニン C 複合体間およびクロスブリッジとカルシウム・トロポニン C 複合体間の cooperativity の違いが重要であることが示唆された。

このような正常心筋細胞における壁内不均一性が虚血性心疾患でどのように変化するかを検討するために同様の実験を疑似虚血 (10 分、15 分+再灌流) 下に行った。疑似虚血溶液はシアン化ナトリウムと

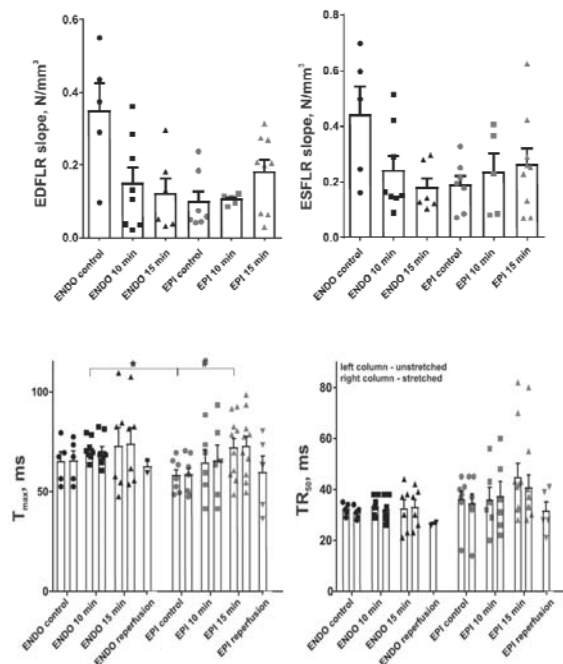


図 6

2-deoxyglucose を添加し pH を 6.5 に調整したものをを用いた。

心内膜側の細胞では 15 分間の疑似虚血及び再灌流によって EDFLR も ESFLR もその傾きが両方共低下したのに対して、心外膜側の細胞では両方共増加した (図 6 上)。また、収縮波形の変化を見ると、疑似虚血により T_{max} 及び 50%弛緩時間 (TR_{50}) は内外両細胞にて延長したが、延長の程度は、 T_{max} においては心外膜側の方が大きかった (図 6 下)。これらの結果から、虚血により心室壁内の不均一性が消失することが明らかとなった。

この現象が虚血性心疾患による心機能低下においてどのような意味を持つかを解明していくことが今後の課題である。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)。

- ① Khokhlova AD, Iribe G. Transmural Differences in Mechanical Properties of Isolated Subendocardial and Subepicardial Cardiomyocytes. Bull Exp Biol Med 査読有、162: 48–50, 2016.
- ② Khokhlova A, Balakina-Vikulova N, Katsnelson L, Iribe G, Solovyova O. Transmural cellular heterogeneity in myocardial electromechanics. J Physiol Sci 査読有、(June 1, 2017). doi: 10.1007/s12576-017-0541-0.
- ③ Khokhlova A, Iribe G, Yamaguchi Y, Naruse K, Solovyova O. Effects of simulated ischemia on the transmural differences in the Frank–Starling relationship in isolated mouse ventricular cardiomyocytes. Prog Biophys Mol Biol 査読有、130: 323–332, 2017.
- ④ Khokhlova A, Iribe G, Katsnelson L, Naruse K, Solovyova O. The effects of load on transmural differences in contraction of isolated mouse ventricular cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol 査読有、114: 276–287, 2018.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Khokhlova A, Iribe G & Solovyova O. Changes in contractile function of subendocardial and subepicardial cardiomyocytes induced by acute ischemia. 7th International Workshop Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmias. 16th-24th Sep 2016, Freiburg, Germany.
- ② Iribe G. Role of myocardial subcellular mechano-sensitivity in integrative cardiac function. Korea-Japan Joint Symposium, ‘Exquisite mechanisms for sensing and orchestrating mechanical signals’. 95th

Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 30th Mar 2018, Takamatsu.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

入部玄太郎 (IRIBE, Gentaro)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90284885

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()