

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590833

研究課題名 (和文) 心筋虚血に対する選択的筋小胞体機能調節の意義と分子機序

研究課題名 (英文) Role of selective modulation of sarcoplasmic reticulum function on cardiac contraction during ischemia.

研究代表者

本郷 賢一 (HONGO KENICHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00256447

研究成果の概要 (和文)：心収縮には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度調節が重要な役割を果たしており、特に心筋細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵所である筋小胞体機能が心収縮に与える影響は大きい。遺伝子操作により選択的に筋小胞体機能を修飾することにより、心収縮力を調節することが可能であり、本方法を用いて心筋虚血において重要な細胞内アシドーシス状態での心収縮抑制を改善することが明らかになった。また、新たな筋小胞体機能調節として筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$ リークの重要性についても明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：Regulation of intracellular Ca concentration ( $\text{Ca}^{2+}$ ) is important for cardiac contraction. Especially, modulation of sarcoplasmic reticulum ( $\text{Ca}^{2+}$  store) function has a significant role on cardiac contractility. Selective up-regulation of sarcoplasmic reticulum function improved cardiac function during acidosis (important factor of cardiac dysfunction during ischemia).  $\text{Ca}^{2+}$  leak from sarcoplasmic reticulum is identified as another important determinant of cardiac function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓病態学

## 1. 研究開始当初の背景

心不全においては、種々の原因により心収縮力が低下しており、心機能低下に起因する全身状態の悪化により死に至る病態である。近年の研究により、心筋収縮力調節・維持に細胞内 Ca 動態が重要な役割を果たしており、その詳細な機序についても明らかになりつつある。心筋細胞膜の興奮より心筋収縮にまで至る一連の過程は興奮-収縮連関と呼ばれ、細胞内 Ca 動態はその中心的位置を占めている。細胞内 Ca 貯蔵所である筋小胞体は、心筋収縮に必要とされる Ca の大部分を供給しており、特に筋小胞体内に Ca を取り込む筋小胞体 Ca ポンプ (SERCA) 機能が直接心機能調節に密接に関わっていることも明らかとなってきている。

## 2. 研究の目的

SERCA 機能は交感神経刺激や細胞内アシドーシスなど種々の条件で影響を受けることが知られているが、生体内において SERCA 機能のみを特異的に調節する薬物などは現在のところ知られていない。本研究では、病態時の選択的 SERCA 機能調節の意義及び治療への応用につき模索することを目的として、心筋虚血及び心不全時の心機能低下に対する効果を種々の生理学的手法を用いて明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 選択的筋小胞体 Ca ポンプ (SERCA) 機能改変動物

選択的 SERCA 機能亢進モデルとして、心筋特異的 SERCA 過剰発現マウス (SERCA-TG) を用いた。また、選択的 SERCA 機能抑制モデルとして、SERCA 機能を抑制するサルコリピン (SLN) を心筋特異的に過剰発現させたマウス (SLN-TG) を用いた。

(2) 左心室乳頭筋標本を用いた細胞内 Ca 濃度と収縮張力の同時測定

麻酔下に取り出したマウス心臓の左心室より乳頭筋標本を摘出する。標本を固定フックと張力測定用トランスデューサーの間に固定し、表層細胞に Ca 感受性発光蛋白エクオリンを圧注入する。電気刺激により収縮を誘起し、細胞内 Ca 濃度変化と収縮張力を同時測定する。虚血類似条件として、アシドーシス条件を、標本灌流溶液を調整することにより作成し、正常マウス心筋と筋小胞体遺伝子改変マウス心筋での効果を比較・検討する。

(3) サポニンスキンド標本による筋小胞体機能評価

マウス左心室より細い肉柱標本を摘出し、標本を界面活性剤サポニンで処理することにより、細胞表層膜のみを選択的に除去した

サポニンスキンド標本を作成する。溶液中の Ca 濃度を調整することにより、種々の条件下で筋小胞体内に Ca を負荷した後、高濃度カフェインを作用させ筋小胞体より放出された Ca 量を、溶液中に存在する蛍光色素 fluo-3 によりモニターする。本方法により、筋小胞体への Ca 取り込み能、Ca 誘発性 Ca 遊離 (CICR) 及び筋小胞体よりの Ca リークなどが詳細に検討できる。

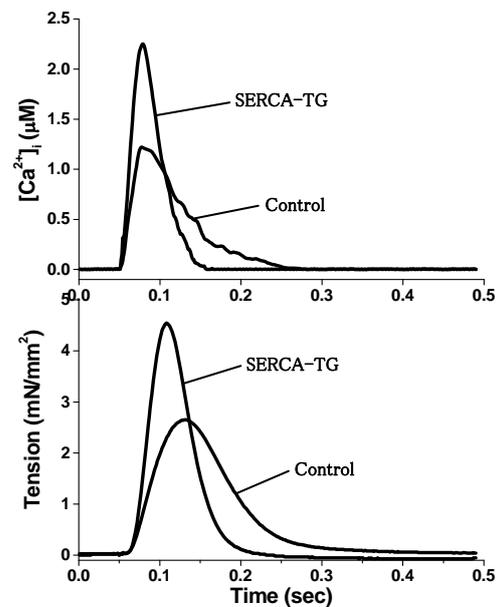
## (4) 生化学的検討

左室乳頭筋より蛋白抽出を行い、Western Immunoblot により興奮-収縮連関に重要な筋小胞体関連蛋白であるリアノジン受容体 (RyR)、SERCA、フォスホランパン (PLN) などの同定を行う。蛋白キナーゼ依存性リン酸化については、蛋白キナーゼ A (PKA) リン酸化部位特異的抗体及びカルシウム・カルモデュリン依存性蛋白キナーゼ II (CaMK II) リン酸化部位特異的抗体を用いて定量評価を行った。

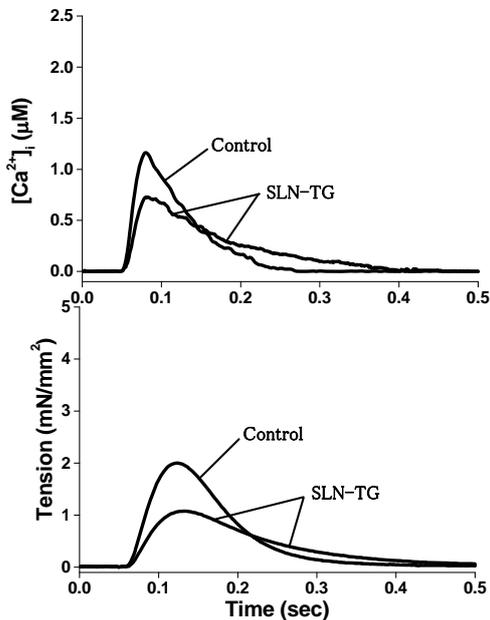
## 4. 研究成果

(1) 選択的 SERCA 機能改変動物における細胞内 Ca 動態と収縮力変化

マウス左室乳頭筋標本における細胞内 Ca 濃度変化 (CaT、上段) と収縮張力 (Tension、下段) を示す。Control に比し心筋特異的 SERCA 過剰発現マウス (SERCA-TG) では CaT は著明に増大し、また時間経過の短縮が認められた。収縮張力も増大し、時間経過も同様に短縮していた。



心筋特異的 SLN 過剰発現マウス (SLN-TG) においては、CaT の低下と時間経過の延長が認められ (上段)、収縮張力も同様に減少及び時間経過の延長が認められた (下段)。

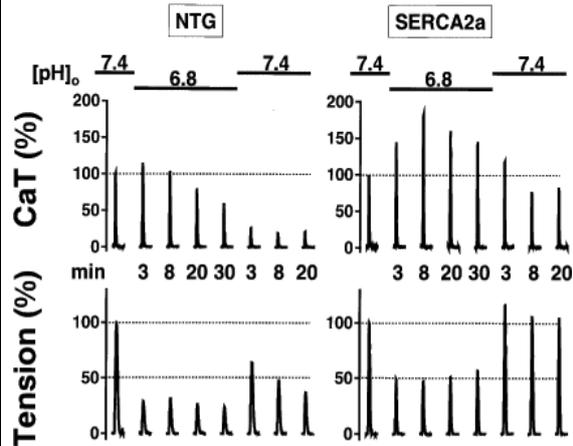


上記の結果により、選択的に SERCA 機能を増大または減少させることにより、心収縮力及び時間経過の調節が可能であることが示された。

(2) 細胞内アシドーシス時の心収縮抑制に対する選択的 SERCA 機能亢進の効果

マウス左室乳頭筋標本における細胞内 Ca 濃度変化 (CaT、上段) と収縮張力 (Tension、下段)。左側はコントロールマウス心筋 (NTG) の結果を、右側は SERCA-TG 心筋 (SERCA2a) での結果を示す。細胞外 pH ([pH]<sub>o</sub>) を 7.4 から 6.8 に低下させてアシドーシス状態にすると、収縮張力の著明な低下が認められたが、収縮抑制の程度は SERCA-TG ではより軽度で保たれていた。また同時に CaT の増大が認められたが、こちらは SERCA-TG で有意に大きかった。再度 [pH]<sub>o</sub> を 7.4 に戻した際の回復期については、NTG では収縮張力は一部しか回復しなかったのに対し、SERCA-TG ではほぼ完全に回復し、CaT は NTG では減少したのに対し、SERCA-TG ではアシドーシス前のレベルに保たれていた。

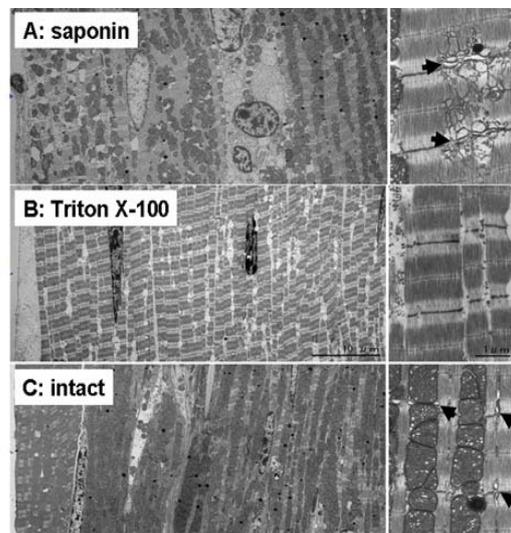
以上の結果は、アシドーシス時の収縮抑制に対し選択的に SERCA 機能を亢進させることで、著明に低下した収縮蛋白系 Ca 感受性に起因する収縮力低下を、SERCA 機能亢進により一部代償して心収縮力を維持する可能性が示唆された。また、アシドーシスからの回復期にも同様に CaT の低下を代償することで張力維持に働くと考えられた。



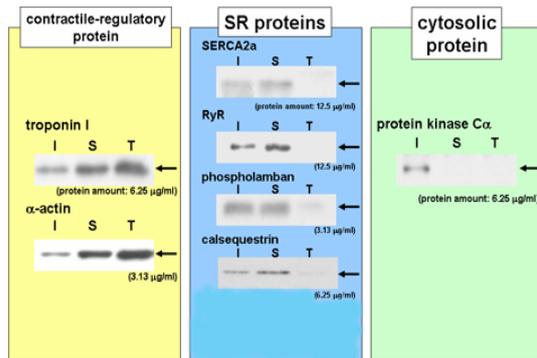
(3) サポニン処理スキンド標本による筋小胞体機能測定法

マウス左室より乳頭筋または肉柱を摘出し、界面活性剤であるサポニンで処理することにより、細胞形質膜のみを除去し、筋小胞体などの細胞内膜系を保持したサポニンスキンド標本を作成した。本標本を用いて筋小胞体機能を測定するにあたり、標本の妥当性につき検討を行った。

電子顕微鏡を用いて、標本の微細構造について検討した。スキンド前の標本 (intact) では収縮蛋白系周囲に筋小胞体及び T 管の存在が認められ、ミトコンドリアも構造が保たれていた。サポニンスキンド標本 (saponin) においても筋小胞体・T 管構造は良く保たれており、ミトコンドリアも存在している。対照としてより強力な界面活性剤であるトリトン処理スキンド標本 (Triton X-100) を示すが、この標本では収縮蛋白系以外の構造はほとんど消失していた。以上の結果より、サポニンスキンド標本では筋小胞体を含めた細胞内構造が良く保持されており、生筋に近い状態での実験が可能であると考えられた。

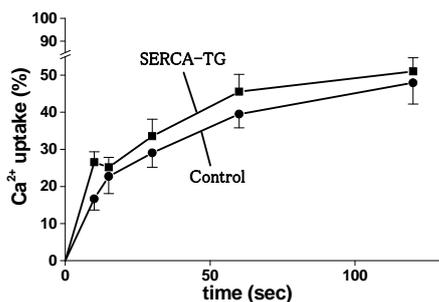


次に、各標本において機能蛋白質が温存されているかどうかを、各々の蛋白質に特異的な抗体を用いた Western Immunoblot により検討した。収縮蛋白質系 (contractile-regulatory protein) である troponin I 及び  $\alpha$ -actin は、生筋 (I)、サポニンスキンド標本 (S)、トリトンスキンド標本 (T) の全てにおいて良く保たれていた。筋小胞体関連蛋白質 (SR proteins) においては、SERCA、RyR、SERCA 調節蛋白質 phospholamban 及び筋小胞体内 Ca 結合蛋白質 calsequestrin は、生筋 (I) とサポニンスキンド標本 (S) では良く保たれていたが、トリトンスキンド標本 (T) では消失していた。細胞質内蛋白質 (cytosolic protein) である protein kinase C $\alpha$  は、サポニンスキンド標本 (S) 及びトリトンスキンド標本 (T) で消失していた。この結果より、サポニンスキンド標本では、筋小胞体関連蛋白質を十分に維持した状態で細胞内溶液環境を容易に変えることにより、筋小胞体機能評価が可能であることが示された。

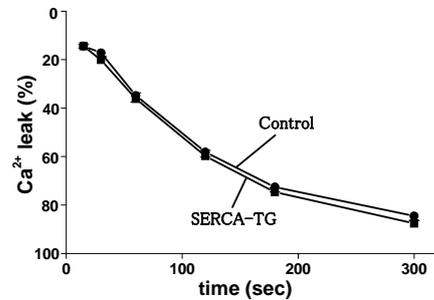


#### (4) 選択的 SERCA 機能調節による筋小胞体機能の修飾

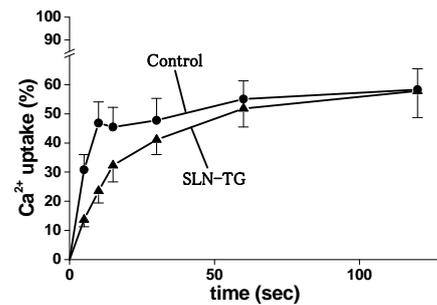
筋小胞体機能を、筋小胞体への Ca 取り込み ( $\text{Ca}^{2+}$  uptake) と筋小胞体からの Ca リーク ( $\text{Ca}^{2+}$  leak) に分けて検討を行った。サポニン処理スキンド標本において、標本周囲を一定の Ca 濃度 (pCa7.0) で ATP を含む溶液で満たすと、時間依存性に  $\text{Ca}^{2+}$  uptake の増加が認められる (Control)。同様の実験を SERCA-TG で行ったところ、 $\text{Ca}^{2+}$  uptake は早い時間経過より亢進していることが明らかとなった。



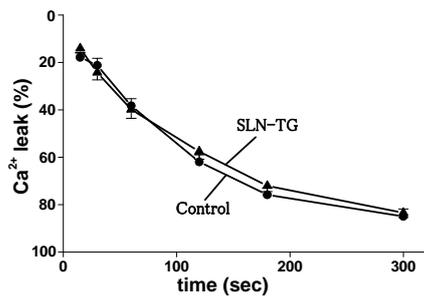
一方で、筋小胞体内に十分に Ca を取り込ませた後に、標本を無 Ca 溶液で灌流すると、時間依存性に  $\text{Ca}^{2+}$  leak が增大してくる (Control)。同様に SERCA-TG を用いて実験を行ったところ、時間依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  leak は Control と差が無いことが明らかとなった。



次に、 $\text{Ca}^{2+}$  uptake について SLN-TG を用いて検討したところ、時間依存性  $\text{Ca}^{2+}$  uptake の増加は、SLN-TG では特に速い取込み時間において減少していることが明らかとなった。



$\text{Ca}^{2+}$  leak における検討では、SERCA-TG の場合と同様に、SLN-TG においても  $\text{Ca}^{2+}$  leak は Control との差は認められなかった。

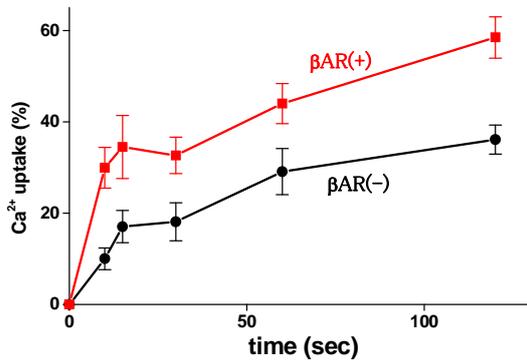


以上の結果より、筋小胞体機能調節においては、筋小胞体への Ca 取り込み ( $\text{Ca}^{2+}$  uptake) と筋小胞体からの Ca リーク ( $\text{Ca}^{2+}$  leak) はそれぞれ独立して調節されており、 $\text{Ca}^{2+}$  uptake のみならず、 $\text{Ca}^{2+}$  leak も心収縮調節の重要な要因となりうることが示唆された。

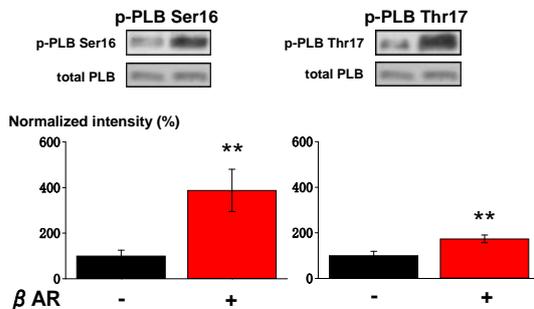
(5) 交感神経β受容体刺激による筋小胞体機能調節に関する検討

心筋収縮力調節において、交感神経β受容体刺激は非常に重要であり、心機能低下における代償機序としての交感神経機能亢進時にも中心的な役割を果たしている。一方で、慢性的な交感神経機能亢進が、心筋虚血や心不全状態では更なる心機能低下を来す要因ともなっている。そこで、サポニンスキンド標本を用いて交感神経β受容体刺激の筋小胞体機能に対する効果を検討した。

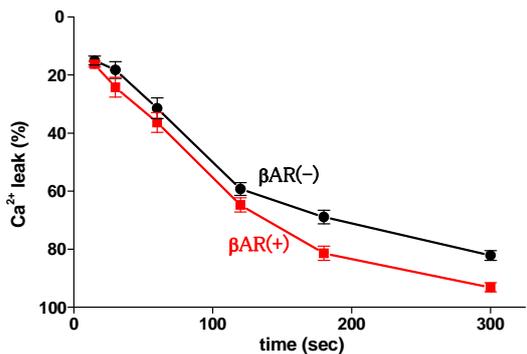
β受容体刺激(βAR)として、イソプロテレノール(1μM)を用いた。βARにより、時間依存性Ca<sup>2+</sup> uptakeは速い時間経過より亢進していた。



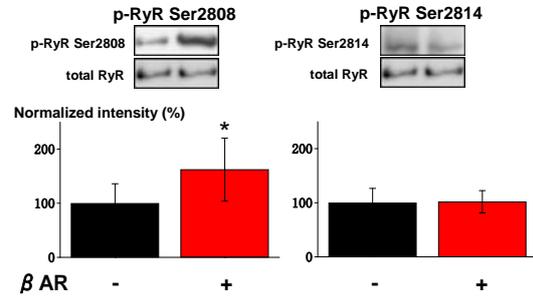
この際の phospholamban のリン酸化を Western immunoblotにて評価したところ、PKA依存性リン酸化(p-PLB Ser16)及びCaMK II依存性リン酸化(p-PLB Thr17)共にβARにより亢進していることが明らかとなった。



次に、βARのCa<sup>2+</sup> leakへの影響につき検討した。βARにより、時間依存性Ca<sup>2+</sup> leakは亢進していた。



βAR時のRyRのリン酸化状態をWestern immunoblotにより評価した。RyRのPKA依存性リン酸化(p-RyR Ser2808)の亢進が認められたが、CaMK II依存性リン酸化(p-RyR Ser2814)の亢進は認められなかった。



以上の結果より、慢性的交感神経β受容体刺激時には、RyRのPKA依存性リン酸化が生じており、その結果として筋小胞体よりのCa<sup>2+</sup> leakが増大して、心機能低下の一因となっている可能性が示唆された。

#### 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)

[雑誌論文] (計10件)

- ① Komukai K, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Yoshimura M, Kurihara S. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in the regulation of the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> current during endothelin-1 stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有. 2010. in press.
- ② 本郷賢一、吉村道博、カルシウム拮抗薬の心保護作用、*CLINICAL CALCIUM*、査読無、20巻、89-93.
- ③ 本郷賢一、Caと平滑筋収縮の関係(CaシグナルとRhoキナーゼ系を含めて)、*Modern Physician*、査読無、30巻、2010、343-5.
- ④ Morimoto S, O-Uchi J, Kawai M, Hoshina T, Kusakari Y, Komukai K, Sasaki H, Hongo K, Kurihara S. Protein kinase A-dependent phosphorylation of ryanodine receptors increases Ca<sup>2+</sup> leak in mouse heart. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有. 2009;390(1):87-92.
- ⑤ Kawai M, Hongo K, Komukai K, Morimoto S, Nagai M, Seki S, Taniguchi I, Mochizuki S, Yoshimura M. Telmisartan predominantly suppresses cardiac fibrosis, rather than hypertrophy, in renovascular hypertensive rats. *Hypertens Res*. 査読有. 2009;32(7):604-10.

- ⑥ Komukai K, Yagi H, Ogawa T, Date T, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Taniguchi I, Yoshimura M. Inhibition of the renin-angiotensin system prevents re-hospitalization of heart failure patients with preserved ejection fraction. *Circ J*. 査読有. 2008;72(12):2004-8.
- ⑦ Komukai K, Ogawa T, Yagi H, Date T, Sakamoto H, Kanzaki Y, Shibayama K, Hashimoto K, Inada K, Minai K, Ogawa K, Kosuga T, Kawai M, Hongo K, Taniguchi I, Yoshimura M. Decreased renal function as an independent predictor of re-hospitalization for congestive heart failure. *Circ J*. 査読有. 2008;72(7):1152-7.
- ⑧ O-Uchi J, Sasaki H, Morimoto S, Kusakari Y, Shinji H, Obata T, Hongo K, Komukai K, Kurihara S. Interaction of alpha<sub>1A</sub>-adrenoceptor subtypes with different G proteins induces opposite effects on cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Circ Res* 査読有. 2008;102(11):1378-88.
- ⑨ 本郷賢一、吉村道博、心血管疾患のバイオマーカー最前線、日本内科学会雑誌、査読無、137巻、2008、S327-S328.
- ⑩ Komukai K, Ogawa T, Yagi H, Date T, Suzuki K, Sakamoto H, Miyazaki H, Takatsuka H, Shibayama K, Ogawa K, Kanzaki Y, Kosuga T, Kawai M, Hongo K, Yoshida S, Taniguchi I, Mochizuki S. Renal insufficiency is related to painless myocardial infarction. *Circ J*. 査読有. 2007;71(9):1366-9.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Komukai K, O-Uchi J, Hongo K, Kawai K, Morimoto S, Yoshimura M, Kurihara S. Endothelin-1 Increases L-type Ca Current of Rat Ventricular Myocytes via an Activation of Protein Kinase C and Ca/calmodulin Dependent Protein Kinase II. AHA Scientific Sessions. Orlando USA. Nov 2009
- ② Hongo K, Morimoto S, O-Uchi J, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Yoshimura M, Morimoto S, Ohtsuki I, Takeda N, Kurihara S. Renin-angiotensin system plays an important role in the pathogenesis of DCM in mouse. XXXVIth International Congress of Physiological Sciences. Kyoto. July 2009.
- ③ Morimoto S, O-Uchi J, Kawai M, Komukai K, Sasaki H, Yoshimura M, Hongo K, Kurihara S.  $\beta$ -adrenoceptor

stimulation increased Ca leak from sarcoplasmic reticulum without dissociation of FKBP12.6 under physiological condition. XXXVIth International Congress of Physiological Sciences. Kyoto. July 2009.

- ④ O-Uchi J, Komukai K, Morimoto S, Hongo K, Kurihara S. Cardiac  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor stimulation inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> current in the presence of  $\beta$ -adrenoceptor stimulation through tyrosine kinase. Biophysical Society 53<sup>rd</sup> Annual Meeting. Boston USA. Feb 2009.
- ⑤ Hongo K, Morimoto S, Komukai K, Kawai M, O-Uchi J, Yoshimura M, Kurihara S. Decreased Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the myofilament is critical for the development of cardiac dysfunction in mouse model of dilated cardiomyopathy. 第 72 回日本循環器学会学術集会. 福岡. 2008 年 3 月.
- ⑥ Komukai K, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Yoshimura M, Kurihara S. Endothelin-1 increases L-type Ca current via an activation of Ca/calmodulin-dependent protein kinase II in rat ventricular myocytes. 第 72 回日本循環器学会学術集会. 福岡. 2008 年 3 月
- ⑦ Morimoto S, O-Uchi J, Kawai M, Komukai K, Hongo K, Sasaki H, Kurihara S.  $\beta$ -adrenoceptor stimulation accelerates Ca<sup>2+</sup> turnover through PKA-dependent phosphorylation in saponin-treated mouse myocardium. 第 84 回日本生理学会大会. 東京. 2008 年 3 月.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本郷 賢一 (HONGO KENICHI)  
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00256447

### (2) 研究分担者

川井 真 (KAWAI MAKOTO)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40277025  
小武海 公明 (KOMUKAI KIMIYAKI)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60360145  
大津 欣也 (OTSU KINYA)  
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：20294051  
(H19→H20：連携研究者)