

平成21年 5月27日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007年度 ～ 2008年度
 課題番号：19591801
 研究課題名（和文） 心筋虚血時に細胞外に蓄積するKイオンは、細胞内Caイオンの上昇を抑制するか
 研究課題名（英文） Does extracellular potassium ion, which accumulates during myocardial ischemia, suppress the increase of intracellular calcium ion?
 研究代表者 大下 修造（OSHITA SHUZO）
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
 研究者番号60144945

研究成果の概要：

培養新生児ラット心筋細胞を用いて高カリウムイオン（ K^+ ）環境が模擬虚血による拡張期細胞内カルシウムイオン濃度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）上昇に及ぼす影響について Ca^{2+} 感受性色素であるFluo-4を用いて検討を行った。結果から心筋虚血時に細胞外に蓄積する K^+ は、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制することが示唆された。 Na^+-K^+ ポンプ活性の抑制は上昇を促進するが、高 K^+ 環境の保護作用はポンプ抑制下でも認められた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：心筋虚血、細胞外カリウムイオン濃度、細胞内カルシウムイオン濃度、 Na^+-K^+ ATPase

1. 研究開始当初の背景

われわれは、これまで、ATP感受性カリウムイオン（ K^+ ）チャネルを介したプレコンディショニングという観点から、虚血時の心保護作用及び麻酔薬の影響に関して研究を続けてきた。

今回は、心筋虚血時に細胞外に蓄積する K^+ 濃度（ $[K^+]_o$ ）と細胞内カルシウムイオン濃

度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）の関連という観点から、虚血時の心保護作用に関して検討した。

心筋虚血時、 Na^+-K^+ ATPase（ Na^+-K^+ ポンプ）の抑制により $[K^+]_o$ が上昇し、細胞内 Na^+ イオン濃度（ $[Na^+]_i$ ）が上昇する。生体は、 Na^+-Ca^{2+} 交換体を活性化することにより上昇した $[Na^+]_i$ を正常に維持するよう努めるが、その結果 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、心筋細胞が傷害される。

一方、 Na^+-K^+ ATPaseの活性は $[K^+]_o$ に依存し、

Kurachiら (Pflugers Arch, 1981) およびEisnerら (J Physiol, 1980) によれば、 $[K^+]_o$ 5-6 mM において Na^+-K^+ ポンプの約50%が活性化されており、 $[K^+]_o$ の低下により Na^+-K^+ ポンプ活性は抑制され、 $[K^+]_o$ の上昇により Na^+-K^+ ポンプ活性は促進される。すなわち、心筋虚血時、細胞外に蓄積する $[K^+]_o$ が高ければ Na^+-K^+ ポンプ活性は促進され、 $[Na^+]_i$ の上昇、およびそれに伴う $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は抑制されることになる。

以上述べてきたことから判断すると、心筋虚血時に上昇する $[K^+]_o$ は、興奮の伝導を遅延させてリエントリー不整脈を誘発するという悪い面を有する (Gettes LS, Oshita S, et al. In Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias, 1985) 一方、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇による細胞傷害という観点からみると、心筋を保護するように作用している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

(1) $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は心筋傷害において重要な役割を果たしている。また、 Na^+-K^+ ポンプは高 K^+ 濃度を始めとする種々の因子の影響を受ける。高 K^+ 環境が虚血時の拡張期細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼす影響を培養新生児ラット心筋細胞において、 Ca^{2+} 感受性色素であるFluo-4を用いた蛍光イメージプロセッシング法を用いて、模擬虚血の影響を検討した。電子伝達系を抑制し、好氣的ATP産生を抑制するシアン化ナトリウム、ならびにグルコース非存在下に解糖系による嫌氣的ATP産生を抑制するデオキシグルコースを用いることにより、模擬虚血を作り出した。さらに、 $[Ca^{2+}]_i$ 変動から自発的興奮活動の検討を試みた。検討項目は以下の点である。①模擬虚血により、拡張期 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇するか否か、②模擬虚血による拡張期 $[Ca^{2+}]_i$ が細胞外高 K^+ により影響を受けるか否か、③模擬虚血による拡張期 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が、 Na^+-K^+ ポンプを抑制するウアバインの存在により影響を受けるか否か、④高 K^+ 、虚血、ウアバイン、ならびにそれらの組み合わせが自発的興奮活動に及ぼす影響。

(2) 心筋虚血傷害においては、bleb形成などが起こり、最終的に膜の破綻が起こる。高 K^+ 環境が虚血・再還流時の細胞膜傷害に及ぼす影響を培養新生児ラット心筋細胞において、カルセインを用いた蛍光イメージプロセッシング法により検討した。カルセインは生細胞にのみ取り込まれ、膜傷害により消失するので細胞膜の完全性を検討する蛍光色素として持ちうるができる (Thorpe WP, Biophysical J, 1995)。検討項目は以下の点である。①模擬虚血により、細胞膜傷害が起

こるか否か、②その細胞膜傷害が細胞外高 K^+ により影響を受けるか否か、③模擬虚血による細胞膜傷害が、 Na^+-K^+ ポンプを抑制するウアバインの存在により影響を受けるか否か。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

徳島大学動物実験委員会で承認を受けた後、生後2日齢のSDラットの心筋細胞を新生児心筋細胞分離システム (Worthington Biochemical Corp) を用いて分離し、ガラスボトムディッシュ上で3日間培養した。

(2) $[Ca^{2+}]_i$ 測定

①Fluo-4染色

Ca^{2+} 感受性の蛍光色素であるFluo-4を用いた。5 μ MのFluo-4 AMを常温で20分間負荷した後、リン酸緩衝液で洗浄し、37°Cで20分間維持することにより、細胞内にFluo-4を取り込んだ。

②実験群

ランダムに5ディッシュずつ、以下の7群に割り当てた。

- 1: コントロール群
- 2: 高K(16mM)群
- 3: ウアバイン(100mM)群
- 4: 虚血 (シアン化ナトリウム: 5mM とデオキシグルコース: 5.5mM) 群
- 5: 虚血+高K群
- 6: 虚血+ウアバイン群
- 7: 虚血+高K+ウアバイン群

③灌流方法

緩衝塩類溶液であるアール液に準じた液をコントロール液とした。溶液のpHは7.3-7.4に調整した。温度管理できる灌流システムを用い、37°Cで灌流を行った。

④Fluo-4 蛍光強度測定 (図1参照)

操作開始前10分、開始後45分にわたり、5分毎に露光時間334ms、500ms間隔で30回ずつ撮影を行い、連続した画像ファイルとして記録した。

測定終了後コンピュータモニタ上で操作開始前に、リズミカルに蛍光が変動している関心部位を1ディッシュあたり3-7部位選び、拡張期と思われる値で評価した。Fluo-4 蛍光

は操作開始直前の値を 100%として相対値で評価した。

自発的興奮活動に関して、5分毎の15秒間に、少なくとも1回大きな蛍光の変動があれば、自発的興奮活動ありとした。

(3) 細胞膜傷害測定 (図2参照)

①カルセイン染色

生細胞のみに取り込まれる蛍光色素であるカルセインを用いた。1 μ MのカルセインAMを常温で30分間負荷した。

②実験群

35ディッシュをランダムに5-6ディッシュずつ、以下の6群に割り当てた。

- 1: コントロール群 (n=6)
- 2: ウアバイン (100mM) 群 (n=5)
- 3: 虚血 (シアン化ナトリウム: 5mM とデオキシグルコース: 5.5mM) 群 (n=6)
- 4: 高K (16mM) + 虚血群 (n=6)
- 5: 虚血 + ウアバイン群 (n=6)
- 6: 虚血 + 高K + ウアバイン群 (n=6)

③灌流方法

[Ca²⁺]_i 測定に準じた。

④カルセイン蛍光強度測定

操作開始前10分、開始後15分虚血、再灌流後30分、にわたり30秒毎に露光時間778msで撮影を行い、連続した画像ファイルとして記録した。

測定終了後コンピュータモニタ上で画像全体を関心部位とした。カルセイン蛍光は操作開始直前の値を100%として相対値で評価した。

(5) 統計分析

結果は平均±標準偏差で表した。統計は分散分析法を用い、群間比較は Student-Newman-Keuls post hoc test で行い、p<0.05を有意とした。

4. 研究成果

(1) 高K⁺環境が虚血時の細胞内Ca²⁺濃度に及ぼす影響の検討から得られた主な成果 (図1参照)

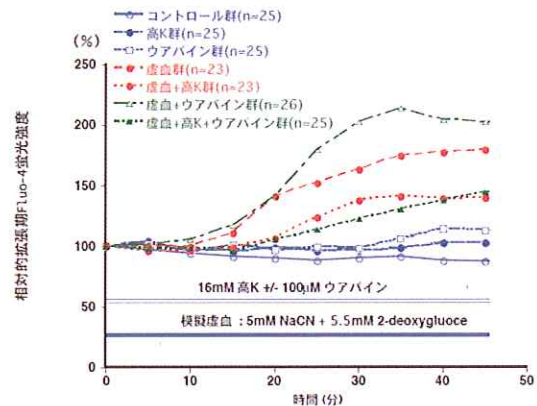


図1: 相対的拡張期Fluo-4蛍光強度の経時変化

①高K⁺群においてFluo-4蛍光は全経過に渡ってコントロール群と比較して有意の変化を示さなかった。自発的興奮活動は平均5分程度で停止した。高K⁺環境は、自発的興奮活動を停止させるが、細胞内Ca²⁺濃度上昇を起こさない可能性が高い。

②ウアバイン群において拡張期Fluo-4蛍光は増加傾向にあったが、全経過に渡ってコントロール群と比較して有意の変化を示さなかった。60%以上の細胞において自発的興奮活動は全経過に渡って続いた。これは70%以上の細胞において続いたコントロール群と大差なかった。100mMウアバインは、高度の拡張期細胞内Ca²⁺濃度上昇を起こさない可能性が高い。

③虚血群において拡張期Fluo-4蛍光は、灌流15分後からコントロール群と比較して有意の増加を示した。自発的興奮活動は平均10分程度で停止した。心筋虚血により、自発的興奮活動の停止と細胞内Ca²⁺濃度上昇が起こることが示唆された。

④虚血+高K群において拡張期Fluo-4蛍光は、灌流25分後からコントロール群と比較して有意の増加を示した。虚血群と虚血+高K群間は灌流20分から有意な差を認めた。自発的興奮活動は平均5分程度で停止した。高K⁺環境では心筋虚血による細胞内Ca²⁺濃度上昇の始まる時期が遅れ、程度が抑制される可能性が高い。心筋虚血のみでも自発的興奮活動は停止するが、高K⁺環境でより早く、自発的興奮活動が停止することが示唆される。

⑤虚血+ウアバイン群において拡張期Fluo-4蛍光は、灌流10分後からコントロール群と比較して有意の増加を示した。虚血群と虚血+ウアバイン群間は灌流25分後から

有意な差を認めた。自発的興奮活動の虚血群より若干早かった。ウアバイン存在下では心筋虚血による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の始まる時期が早まり、程度が大きくなる可能性が高い。心筋虚血のみでも自発的興奮活動は停止するが、ウアバイン存在下で若干早く、自発的興奮活動が停止することが示唆される。

⑥虚血+高 K^+ ウアバイン群において拡張期 Fluo-4 蛍光は、灌流 35 分後からコントロール群と比較して有意の増加を示した。虚血群と虚血+ウアバイン群間は灌流 15 分から有意な差を認めた。自発的興奮活動は平均 5 分程度で停止した。ウアバイン存在下でも、高 K^+ による保護効果は認められた。心筋虚血による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の始まる時期が遅くなり、程度が抑制される可能性が高い。ウアバイン存在下でも高 K^+ 環境でより早く、自発的興奮活動が停止することが示唆される。ウアバイン存在下でも、高 K^+ 環境による虚血時の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇抑制作用が認められる可能性が示唆された。

(2)高 K^+ 環境が虚血・再還流時の細胞膜傷害に及ぼす影響の検討から得られた主な成果 (図 2 参照)

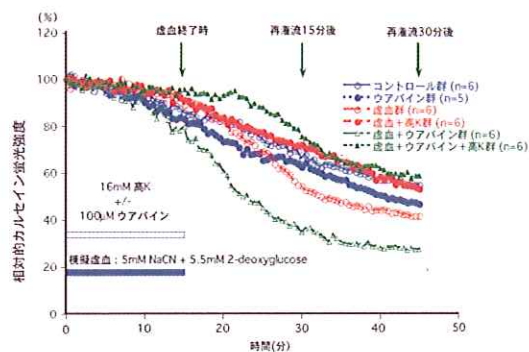


図 2 : 虚血・再灌流時における相対的カルセイン蛍光強度の経時変化

①虚血群においてカルセイン蛍光は、再灌流 5 分後からコントロール群と比較して低下する傾向を示したが有意差はなかった。ディッシュ間の結果のばらつきが大きかったことが有意差のない原因として考えられ、虚血による細胞膜傷害が示唆された。

②再灌流 15 分後において、虚血+ウアバイン群はコントロール群と比較してカルセイン蛍光の有意の減少を示した。ウアバインの存在下で虚血・再灌流による細胞膜傷害が増悪する可能性がある。

③灌流 15 分後と灌流 30 分後において虚血+ウアバイン群と虚血+高 K^+ ウアバイン群に

カルセイン蛍光の有意差があった。 Na^+-K^+ ポンプ活性が抑制された状態では、高 K^+ による細胞膜傷害に対する保護作用が強くなる可能性がある。

④結果のばらつきが大きく、条件による差が大きいことが示唆された。

(3)得られた成果の国内外における位置づけ、インパクト、今後の展望

①心筋虚血時に細胞外 K^+ が高いことが心筋傷害に及ぼす影響に関しては保護するとの報告と逆に悪化させるとの報告があり議論のあるところである。今回の結果は保護する説を支持する。

②細胞外 K^+ の心筋虚血への影響に関しては虚血の程度など実験条件の影響が大きいことが知られている。これまでの検討の多くは、成体ラットから単離された心筋細胞を用いているが、今回の我々の検討のように自発的興奮活動をしている新生児細胞で検討を行った研究は調べた限りではない。培養した新生児心筋細胞は、in vivo の心臓での虚血-灌流に相当する低酸素-再酸素化で、安定した収縮性形質を維持しているとされ、一方、成体ラットから単離された心筋細胞は、in vivo で見られるものとは異なる形質を有しているとされる (Yamashita N, J Clin Invest. 1994)。

③100mM ウアバインは細胞の生存に影響が少ない濃度とされる (Peng M, J Biol Chem. 1996)。研究開始時にはウアバイン存在下では保護効果が消失することを推定したが、予想に反し、ウアバイン存在下の方が、保護効果が明確となった。心筋虚血時において Na^+-K^+ ポンプは種々の因子により抑制されるが、抑制下でも保護効果が認められことは重要である。

④カルセイン蛍光を用いて心筋虚血時の細胞膜傷害を検討した研究は調べた限りではない。虚血時に bleb が形成された後、カルセインの漏出が起こることが観察された。結果のばらつきが大きく、統計上の有意差が出にくかった。しかしながら、細胞内 Ca^{2+} 濃度測定と異なる測定方法、かつ、虚血・再灌流という異なる実験で、高 K^+ 環境の保護作用、ならびにウアバインの影響が同様であったことは細胞内 Ca^{2+} 濃度測定から得られた結果を裏付ける。

⑤高 K^+ 環境による保護作用の機序までは明確にならなかった。今後、機序を明らかにしていきたい。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大下 修造 (OSHITA SHUZO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号 6 0 1 4 4 9 4 5

(2) 研究分担者

富山 芳信 (TOMIYAMA YOSHINOBU)
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・准教授
研究者番号 3 0 2 4 3 7 0 2

田中 克哉 (TANAKA KATSUYA)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師
研究者番号 3 0 2 6 3 8 4 1

(3) 連携研究者

なし