

平成 21 年 4 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700385

研究課題名 (和文) 心肥大のエネルギー消費機構とカルシウム動態の経日的解析

研究課題名 (英文) Analyses of cardiac energy metabolism and intracellular Ca^{2+} handling in hypertrophic hearts

研究代表者

三澤 裕美 (MISAWA HIROMI)

奈良県立医科大学・医学部・教務職員

研究者番号：50281275

研究成果の概要：

心筋スライス標本を用いた心筋細胞内カルシウム動態の計測法を確立し、摘出拍動心標本で観察される現象のメカニズムをより詳細に解明することを目的とした。まず、心筋スライス標本を用い、中心部にあるコア心筋も含めた細胞機能を確認するため、NMRによるリン酸代謝について解析し、心筋細胞は十分な呼吸機能を持つことが確認できた。さらに Fluo-3 をロードした心筋スライス標本での心筋細胞内カルシウム動態解析法を確立し、病態時の心筋収縮力低下の原因を探った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野：循環生理学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：心筋スライス標本、心筋細胞内カルシウム動態解析、X線回折実験、NMR

1. 研究開始当初の背景

加齢やメタボリックシンドローム

に伴う動脈硬化など心臓への後負荷の増大や、交感神経系の緊張、全身および局所レニン-アンジオテンシン系の賦活化により心肥大など心筋リモデリングを引き起こす。このような心筋リモデリングは最終的に心不全に至り生命予後を脅かすため、治療・予防へ向けた

発症メカニズムについて細胞内情報伝達系を中心に詳細に研究されてきた。また心筋リモデリングに伴い、心筋代謝基質の変化や細胞内カルシウム動態に関わるタンパク (SERCA2a、 Na^+/Ca^{2+} exchanger など) の発現異常などによる、心筋のエネルギー効率低下も心不全患者の予後を増悪させる因子となるため、心筋

リモデリング時の心筋エネルギー代謝についての検討も急務である。

正常心においても心収縮に伴う心筋細胞へのメカニカルストレスは心内膜側・心外膜側で異なり、冠微小循環動態についても心内膜側ではより虚血に陥りやすいなど、心室壁の構造的な因子も関与する。肥大心では壁厚の増大により、このような心室壁の構造的な因子の違いはより顕著になると推定される。すなわち、肥大心では心内膜側・心外膜側の心筋細胞にかかるメカニカルストレスや冠血流の状態の違いが正常心よりはるかに大きいため、心室壁の心内膜・外膜側心筋で異なる心筋リモデリングのステージにある可能性が示唆される。従って、局所心筋レベルでのエネルギー代謝、カルシウム動態の把握とリモデリング過程に関連する心筋線維の微細構造変化の解明により、心筋リモデリング・心不全の予防・治療に新たな知見を加えるものと考ええる。

本申請者を含む研究グループでは、血圧を上昇させない程度の持続的 β 刺激をラットに加えることで、結合組織の増生を伴う心肥大を来すことを見だし、またこれらの心肥大・結合組織の増生は β 刺激の休止により正常状態に復する可逆的な変化であることを確認しており (Kitagawa et al. The reversible effects of isoproterenol-induced hypertrophy on in situ left ventricular function in rat hearts. Am J Physiol 287: H277-H285, 2004)、心筋肥大の進行過程および刺激除去後の回復過程を詳細に解析することが可能である。本研究課題では、持続的 β 受容体刺激により作成したラット肥大心モデルから、心外膜側、心内膜側それぞれの心筋スライス標本を作成し、エネルギー代謝、カルシウム動態およびナノオーダー筋線維構造の評価を行い、正常心との比較

検討および心筋リモデリング過程の詳細な理解を深める。

2. 研究の目的

左心室の心内・外膜側での差異について、電気生理、冠循環の分野では以前から盛んに研究されているが、力学的、エネルギー学的な検討は未だ十分ではない。これまでのところスライス心筋標本は無負荷状態での計測のみが可能であり、力学的な評価は工夫を要するが、心筋細胞の生命維持に必要な基礎代謝および興奮収縮連関を担うカルシウム動態を預かるSERCA2a、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangerそれぞれの酸素消費量の計測法は確立しており、不全心の病態の把握に新しい知見を加える。

3. 研究の方法

浸透圧ミニポンプをラットの皮下に埋め込み、イソプロテレノール (Iso) を持続投与することにより心肥大を誘導する。経過中のラットの血圧を測定し、血圧上昇がないことを確認する (圧負荷による心肥大でないとの確認)。また、心エコーにより経時的な左室ディメンジョン変化および心機能についても適宜計測する。

ラットを麻酔後、開胸し心臓を摘出する。大動脈よりクロスブリッジサイクリング阻害薬の2,3-butanedione monoxime (BDM)を含む冷却タイロード液を灌流する。左心室をブロックに切り分け、マイクロスライサーによりスライスし、心内・外膜側心筋スライス標本を作成する。スライス標本は計測まで2,3-BDMを含む冷却タイロード液中に浮遊させた状態でストックする。

ラット心筋スライス標本を用い、Ca蛍光指示薬(Fluo-3)を用い、細胞内Ca濃度測定装置(AQUACOSMOS/RATIO:既設)により、正常心と肥大心それぞれにおいて心内・外膜側心筋の Ca^{2+} トランジェントを比較する。同じ心臓の心

内・外膜側心筋のSERCA2、NCX、phospholamban、RyRの発現量が心内・外膜側で差があるか確認する。

本実験は大型放射光施設 (SPring-8) において遂行する。ラット心内・外膜側心筋スライス標本にX線を照射し、心筋線維からのX線回折像から心筋線維の走行方向、無負荷時の心筋線維格子間隔に関する情報を導き解析する。左心室壁の心筋細胞が一元方向に配向した層をなしており、本研究で用いる心筋スライスの心筋層は平行に配列していると推定できる。すると正常心のスライス心筋では心筋線維の走行もほぼ一様であると推定され、スポット状のX線回折像が期待できる。しかし、肥大心において心筋細胞の錯綜配列などがある場合には、心筋線維の重なり合いの結果、円弧状～リング状のX線回折像を呈すると考えられる。ミオシン線維格子から得られる(1, 0) 反射のX線ビームからの距離と心筋からカメラまでの距離、X線の波長からミオシン線維の格子間隔を算出できる。

4. 研究成果

まず、心筋スライス標本を用いて、NMRによるリン酸代謝機能の評価法を確立した。この解析により、心筋スライス標本の³¹Pスペクトルは、摘出心標本のそれと同様の分布を示し、スライス心筋においても摘出心と比べ遜色のないリン酸代謝を持つことが示唆された。即ち、心筋スライスにおけるコア部分にある心筋細胞群は、十分な酸化的リン酸可能を持ちこの標本を用いた心筋細胞内カルシウム動態観察などが、十分生理的な計測手段であることを示した。

次いで、ラット摘出心標本を用いて、心拍数を増加させたときに観察される、心筋収縮力低下の原因を探るため、左心室自由壁からのX線回折像を解析したところ、心拍数の増加に応じて心筋のアクチン-ミオシン相互

作用の低下、即ちクロスブリッジ形成量の減少が観察された。一方、心筋スライス標本を用いた心筋細胞内カルシウム動態観察でも、刺激頻度の増加による、カルシウムトランジェントの高さに有意さは無かったものの、その持続時間は有意に短縮する傾向を示した。これらの知見から、心拍数の増大に伴うラット心筋収縮力の低下は、心筋線維と心筋細胞内に放出されたカルシウムとの相互作用時間の短縮が一つの原因であることが示唆された。しかし、心拍数の増加に伴う心筋細胞内液のpH低下や、トロポニンIやCタンパクのリン酸化レベルの変化も示唆されており、その点についての検討を加えているところである。

同じく、ラット摘出心標本を用いたX線回折実験にて、低酸素灌流時の左心室圧低下について前負荷が及ぼす影響について解析を行った。正常酸素灌流時には前負荷の増大に伴い左心室発生圧は有意な増大傾向を示し、Frank-Starlingの法則が成り立つことを確認した。一方、低酸素灌流時では、前負荷が低いときには正常酸素灌流時と同じ程度の左心室発生圧とクロスブリッジの形成が認められたが、前負荷が増大すると左心室発生圧の低下およびクロスブリッジ形成量の減少が観察された。このときも、心筋線維のカルシウム感受性を規定する因子の一つである心筋線維格子間隔は前負荷の増大により短縮する傾向を示し、低酸素灌流時のクロスブリッジ形成量の低下の原因が筋線維格子間隔には無いことを示した。一方、心筋スライス標本を用いた心筋細胞内カルシウム動態観察では、前負荷を増大させることはできないものの、カルシウムトランジェントの高さには有意差はないものの、持続時間は有意に延長していることが観察された。これは、心筋線維とカルシウムの作用時間の延長を示すが、一方で心筋線維のカルシウム感受性の低下により、細胞質カルシウム濃度の高値

が宣戦している可能性もある。実際、低酸素環境下では無酸素環境下とは異なり細胞質 pH の低下はそれほど強いとはいえず、それに伴うカルシウム感受性の変化も強くはないと考えられる。しかし、低酸素環境下で前負荷を増大させた場合、CP を有意に低下させ無機リン酸濃度が高まる可能性がある。これは、ミオシン ATPase やその他の ATPase 機能を抑制する可能性があり、低酸素灌流時に前負荷を増大させた場合に観察される左心室発生圧の低下およびクロスブリッジ形成量の低下は、無機リン酸の増大による可能性が高いことを示した。

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 3 件)

- ① Shimizu J, Yamashita D, Hiromi M, Tohne K, Matsuoka S, Kim B, Takeuchi A, Nakajima-Takenaka C, Takaki M: Increased O_2 consumption in excitation-contraction coupling in hypertrophied rat heart slices related to increased Na^+-Ca^{2+} exchange activity. *The Journal of Physiological Sciences* 59: 63-74, 2009. 査読有
- ② Takaki M, Misawa H, Shimizu J, Kuniyasu H, Horiguchi K: Inhibition of gut pacemaker cell formation from mouse ES cells by the c-kit inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 359: 354-359, 2007. 査読有
- ③ Uetani T, Yamashita D, Shimizu J, Misawa H, Tatematsu Y, Hamaguchi Y, Kato T, Katanosaka Y, Miyasaka T, Matsubara T, Furukawa K, Murohara T, Takaki M, Nakayama S: Heart Slice NMR. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 292: H1181-H1186, 2007. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① Tamura Y: Increasing heart rate

increased residual actin-myosin interaction without raising end-diastolic left ventricular pressure in beating rat heart. 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 大阪 2009/3/21

- ② Shimizu J: Increasing preroad reduced actin-myosin interaction in isolated beating rat whole heart under hypoxia. *Biophysical Society 53rd Annual Meeting*, in Boston, 2009/3/2.
- ③ Tamura Y: Transmurally different changes in nano-order myofilament lattice spacing and crossbridge dynamics with increasing left ventricular volume. *Biophysical Society 53rd Annual Meeting*, in Boston, 2009/3/2.
- ④ Miyako Takaki: Effects of BDNF on regeneration and differentiation of enteric nervous system. 1st World Congress of Regenerative Medicine and Stem Cell. 2008. Dec 2 in Forshan, China.
- ⑤ 國安弘基: 腸管吻合部における壁内神経再生に対する BDNF の効果 第 97 回日本病理学会 (2008 年 5 月 15 日、金沢)
- ⑥ 森若優希子: ES 細胞からの腸管様構造誘導における BDNF の効果 第 97 回日本病理学会 (2008 年 5 月 15 日、金沢)
- ⑦ 大森 齊: ES 細胞による腸管様組織構築と運動能の関係 第 97 回日本病理学会 (2008 年 5 月 15 日、金沢)
- ⑧ Shimizu J: Increasing preload attenuates crossbridge formation under hypoxia. 第 85 回日本生理学会大会 2008/3/27 京王プラザホテル
- ⑨ Sakata S: Decrease in oxygen cost of left ventricular contractility by SERCA2a overexpression. 第 85 回日本生理学会大会 2008/3/27 京王プラザホテル
- ⑩ 高木 都: マウス胚性幹細胞から分化誘導された腸管における c-kit 陽性細胞 (ICC) の形成の対する GIST 治療薬グリベックの効果 第 4 回日本消化管学会総会学術集会 トピックフォーラム 7 (TF-7-7) 大阪 2008/2/7
- ⑪ 柴田宗孝: 低酸素環境下での前負荷増大による心機能低下と心筋分子モータの挙動

異常 第 18 回日本病態生理学会大会 神戸
2008/1/26

⑫國安弘基：シンポジウム 1「ユビキタスペ
ースメーカー」ES 腸管における組織構築と運
動能 第 49 回日本平滑筋学会総会
2007/7/5 榎原

[その他]

<http://www.naramed-u.ac.jp/~2phy/Gyoseki.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三澤 裕美 (MISAWA HIROMI)
奈良県立医科大学・医学部・教務職員
研究者番号：50281275

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし