

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07282

研究課題名(和文) 糖尿病高血糖による洞房結節細胞Ca制御異常の解明

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms underlying impaired Ca handling in SA nodal cells during high glucose challenge

研究代表者

竹田 有加里 (Takeda, Yukari)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：20582159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病患者は心房細動や洞不全などの不整脈の発症率が高く、糖尿病患者の死亡率を著しく増加させている。我々は洞房結節細胞のCa制御異常が糖尿病患者の洞機能不全に関与するとの仮説をえた。本研究では、高グルコース(HG)刺激で洞房結節由来の不整脈が誘導されるか、またそのメカニズムにおけるLCR制御破綻の関与を明らかにすることを目的とした。HG刺激は、単離マウス洞房結節細胞の収縮間隔およびランゲンドルフ灌流心のR-R間隔の変動を増大させた。HGはまた、単離洞房結節細胞のROSレベルおよび筋小胞体からのCa放出を増加させた。これらの機序により糖尿病における高血糖が洞不全に関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、グルコース濃度を糖尿病レベルに上昇させることで、洞房結節由来の不整脈、つまり洞房結節機能不全を誘導することを、細胞レベルおよび臓器レベルで明らかにした。これは、世界で初めての発見である。また高グルコース刺激でROSおよび筋小胞体からのCa放出が増加することが、糖尿病における高血糖で洞不全を誘導するメカニズムに関与すると示唆された。さらに加齢では、高グルコースによる小胞体Ca放出および収縮の変則性がさらに増加することを明らかにし、加齢による洞不全への影響とそのメカニズムを世界で初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Patients with diabetes mellitus have a high prevalence of sinus node dysfunction (SND). We investigated if diabetic high blood glucose caused SND. Electrocardiogram of Langendorff-perfused hearts revealed that acute increase in glucose level from 5 mM to 25 mM elevated variability in R-R interval. The HG challenge also increased variability in interval of contraction and Ca transients monitored from isolated SA nodal cells. Simultaneously, cytosolic and mitochondrial ROS levels as well as spontaneous Ca release from SR were both increased after HG challenge. Together, acute increase in glucose levels to diabetic levels induces SND, which is associated with increased ROS levels and impaired SR Ca²⁺ handling.

研究分野：生理学

キーワード：洞房結節 洞不全 ROS Ca handling

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は心房細動や洞不全などの不整脈の発症率が高く、糖尿病患者の死亡率を著しく増加させている。その病因には高血糖による心筋細胞の Ca^{2+} handling 異常が関与すると示唆されている。我々は、心自動能を司る洞房結節細胞の Ca^{2+} 制御異常が糖尿病患者の洞機能不全に関与するとの仮説をえた。

2. 研究の目的

我々は、マウス洞房結節細胞の筋小胞体からの自発的かつ局所的な Ca^{2+} 放出 local calcium release, LCR の記録に成功し、LCR が心拍制御に関与することを明らかにした。本研究では、高グルコース(HG)刺激で洞房結節由来の不整脈が誘導されるか、また、そのメカニズムにおける LCR 制御破綻の関与を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) HG が洞房結節由来の不整脈発症に関与するか否かを細胞レベルで検討するため、単離したマウス洞房結節細胞に 25 mM グルコース刺激を行い、収縮リズムに対する作用を検討した。
- (2) HG が洞房結節由来の不整脈発症に関与するか否かを臓器レベルで検討するため、ランゲンドルフ灌流心に 20 mM グルコース(2 型糖尿病 dbdb マウスの平均血糖値)を灌流し、ECG を記録した。
- (3) HG が洞房結節由来の不整脈発症に関与するか否かを固体レベルで検討するため、麻酔下でマウスに腹腔内のブドウ糖負荷試験 (2g/kg) を行い、血糖と ECG の同時記録を行った。
- (4) HG による変則性リズム形成における LCR 制御破綻の関与を検討するため、 Ca^{2+} 指示薬 Calbryte520 AM を負荷したマウス単離洞房結節細胞の Ca^{2+} イメージングを行い、5 mM と 25 mM グルコース存在下で惹起される LCR および Ca^{2+} transient を比較・検討した。

4. 研究成果

(1) HG の心リズムに対する作用を、細胞レベルで検討するため、単離したマウス洞房結節細胞に HG 刺激(5 mM (LG)から 25 mM (HG)に上昇)を行った結果、収縮間隔が一過性に延長または短縮する変則的収縮が誘発された。このことから、高血糖が洞房結節由来の不整脈発症に細胞レベルで関与すると考えられる(図1)。

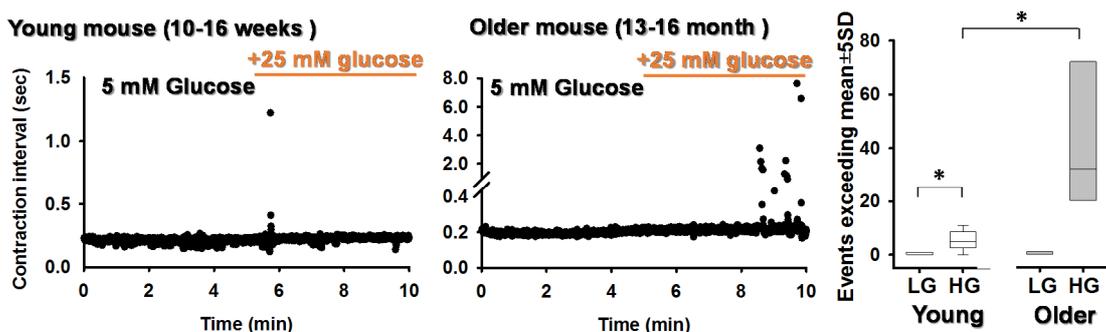


図1. 単離マウス洞房結節細胞の高グルコース刺激は変則的な収縮パターンを誘発させた。

(2) HG の心リズムに対する作用を、臓器レベルで検討するため、ランゲンドルフ灌流心に 20 mM グルコースを灌流した。その結果、これまでに報告されている心室性の期外収縮とは別に、R-R 間隔が一過性に延長または短縮する変則的リズムが誘発された。このことから、臓器レベルにおいても、高血糖が洞房結節由来の不整脈発症に関与することを見いだした(図2)。

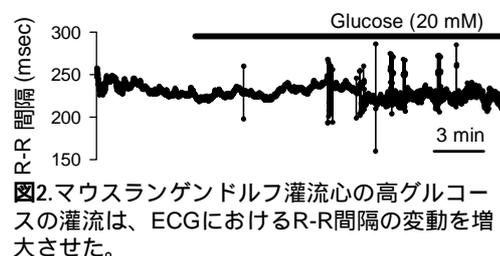


図2. マウスランゲンドルフ灌流心の高グルコースの灌流は、ECGにおけるR-R間隔の変動を増大させた。

(3) HG の心リズムに対する作用を、固体レベルで検討するため、麻酔下でマウスに腹腔内のブドウ糖負荷試験 (2g/kg) を行い、血糖と ECG の同時記録を行った。その結果、グルコースの

負荷で、血糖が 20 mM (2 型糖尿病 dbdb マウスの平均血糖値)以上に上昇しても、固体レベルは心リズムに大きな変動はみられなかった(図3)。このことから、個体レベルでは、血糖上昇による不整脈発症に抑制作用が働いていると考えられる。今後は、交感・副交感神経系の心拍変動抑制作用を遮断し、血糖上昇の作用を検討する必要がある。

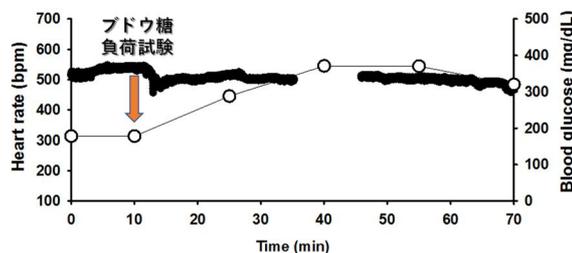


図3.血糖上昇の心リズムへの作用は認められなかった。

(4) HG による変則性リズム形成における LCR 制御破綻の関与を検討するため、Ca²⁺指示薬 Calbryte520 AM を負荷したマウス単離洞房結節細胞の Ca²⁺イメージングを行い、5 mM と 25 mM グルコース存在下で惹起される LCR および Ca²⁺ transient を比較・検討した。その結果、25 mM グルコースの負荷では Ca²⁺ transient に変化がみられなかったが、LCR の振幅および持続時間が増加することが明らかとなった(図4)。さらに、周期長の早期(<60%)で発生する LCR が増加したことから、リアノジン受容体(RyR)が活性化している可能性が考えられる(図4)。

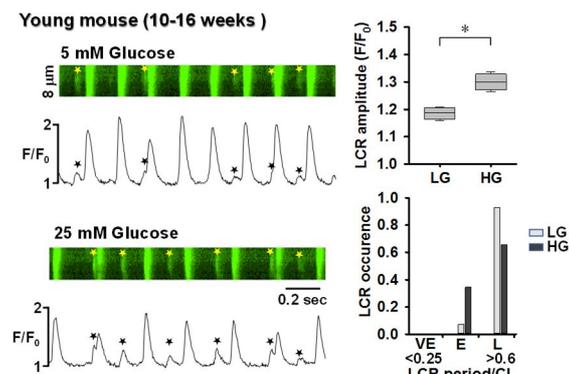


図4. 単離マウス洞房結節細胞の高グルコース刺激はLCRの振幅および周期長(CL)早期(<60%CL)におけるearly LCR (E)の発生確率を増加させた。

次に、25 mM グルコースの LCR 増強作用における CaMKII の関与を、阻害薬 KN-93 を用いて検討した。しかしKN-93 は、標準血糖レベル(5 mM)の自動能を著しく阻害したため、HGのLCRに対する作用におけるCaMKIIの関与について、KN-93 を用いた薬理的検討は妥当ではないと判断した。

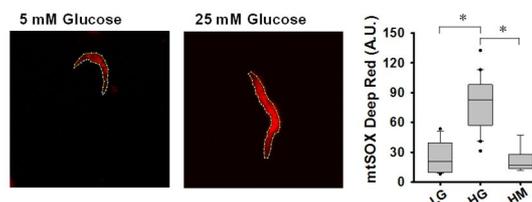


図5. 単離マウス洞房結節細胞の高グルコース刺激はミトコンドリアROSを増加させた(HM, High mannitol)。

一方で、心室筋細胞では、HG 刺激は、NOX2-ROS-PKC pathway を活性化し K⁺電流を抑制するとの報告がある。そこで、洞房結節細胞の細胞質及びミトコンドリア ROS レベルを ROS Assay Kit と mtSOX Deep Red を用いて検討した結果、25 mM グルコースの負荷は、細胞質とミトコンドリアの ROS を共に増加させた。このことから、25 mM グルコースの LCR 増強作用には、ROS の増加が関与すると考えられる(図5)。

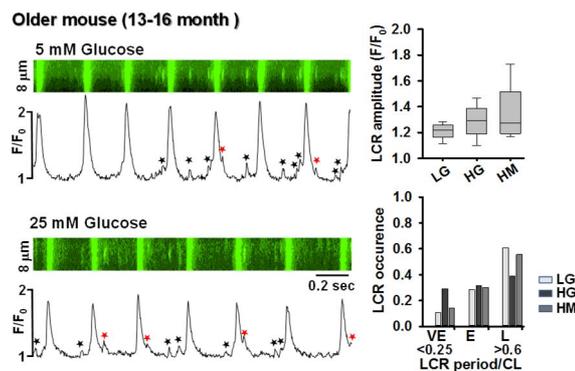


図6. Older mouseの単離洞房結節細胞では、超早期(<25%CL, VE) LCR(★)が認められ、高グルコース刺激はVE LCRの発生確率を増加させた。

一方、加齢によって心筋細胞の ROS が上昇すること、また、単離マウス洞房結節細胞では自動能が不規則になることが知られている。そこで、これまでの検討で用いた young mouse (3-4 month old) に対して、older mouse (13-16 month) の収縮および LCR、また LCR に対する HG の作用を検討した。その結果、5 mM グルコースでは、収縮頻度に有意な差は認められなかったが、25 mM グルコースの負荷で、収縮頻度のばらつきが有意に増加した(図1)。さらに older mouse では、young mouse ではみられなかった拡張期の超早期(<25%)で発生する LCR がみられ、それが、HG の負荷で増加することが明らかとなった(図6)。つまり、old mouse の洞房結節細胞では、RyR 活性が young mouse よりも高く、それが、HG 刺激で、さらに増強される可能性を示した。そのメカニズムの一つとして、加齢とグルコースによる ROS 活性の相乗作用が考えられるが、その詳細は今後検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeda Yukari、Matsuoka Satoshi	4. 巻 164
2. 論文標題 Impact of mitochondria on local calcium release in murine sinoatrial nodal cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 42～50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yjmcc.2021.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takeda Y. and Matsuoka S.
2. 発表標題 Impact of mitochondria on local calcium release in murine sinoatrial nodal cells
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会・第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeda Y. and Matsuoka S.
2. 発表標題 Spatial and functional associations of mitochondria and local calcium release in murine sinoatrial nodal cells
3. 学会等名 NIPS International Workshop 2020: HOLISTIC UNDERSTANDING OF CARDIOVASCULAR SYSTEM BY MECHANISTIC ANALYSIS OF PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹田有加里、松岡達
2. 発表標題 マウス洞房結節細胞におけるlocal Ca ²⁺ releaseとミトコンドリアの関係
3. 学会等名 第67回中部日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeda Y., and Matsuoka S.
2. 発表標題 Mitochondrial contribution to automaticity of murine sinoatrial nodal cells
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuoka S, Islam M. M., Takeda Y., Takeuchi A.
2. 発表標題 Property and roles of mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ exchange in heart
3. 学会等名 The 50th NIPS international symposium 「MIRACLES」 In Cardiovascular Physiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeda Y., and Matsuoka S.
2. 発表標題 Mitochondria are involved in automaticity of murine sinoatrial nodal cells
3. 学会等名 The 50th NIPS international symposium 「MIRACLES」 In Cardiovascular Physiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田有加里、佐藤さつき、鈴木仁弥、松岡達
2. 発表標題 洞房結節細胞内脂肪滴過剰蓄積による洞機能不全発症のメカニズム解析
3. 学会等名 第69回中部日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeda Y., Sato S., Suzuki J., and Matsuoka S.
2. 発表標題 Impaired automaticity of sinoatrial nodal cells in mouse model of myocardial steatosis
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Matsuoka S., Takeuchi A., Takeda Y.
2. 発表標題 Impact of mitochondrial Ca ²⁺ dynamics on cardiomyocyte function
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関