

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300159

研究課題名(和文) ヒト心筋細胞の興奮収縮連関制御における機械的負荷の役割

研究課題名(英文) Role of mechanical load in human myocardial excitation contraction coupling

研究代表者

入部 玄太郎 (IRIBE GENTAROU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90284885

研究成果の概要(和文)：

正常な心臓の心拍はたくさんの細胞が協調、影響しあって行われている。そこに伸展や衝撃といった物理的な外乱が加わるとその調和が乱れ、不整脈などの原因となるが、そのような物理的な刺激の心臓への影響はよくわかっていなかった。今回の研究では細胞が急激に伸展されたときに起こる細胞内外で起こるさまざまなイオンの流入や流出の変化を詳細に調べ、そのときに起こる不整脈の発生メカニズムを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：

The normal heartbeat is the results of complex interactions of individual cardiomyocytes in the heart. Any mechanical disturbance in their interaction could be the risk of heart rhythm disturbances. In the present study, we revealed the underlying mechanisms that cause mechanically-induced arrhythmic beat by investigating mechanically-induced influx and efflux of ions via mechano-sensitive channels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：医用工学・心臓生理学

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：生体システム・フィジオーム、数理モデル

1. 研究開始当初の背景

(1) 心筋細胞は常に機械的負荷にさらされており、機械的負荷は心筋細胞の生理的環境の

一つであるが、心筋細胞生理研究のほとんどは機械的無負荷の状態で行われている。

(2) 心筋細胞の電氣的興奮は機械的収縮を発生させる（興奮収縮連関）。一方で心筋の機械的活動によって変化した機械的負荷は逆に興奮収縮連関過程を修飾する（機械電気帰還現象）が、その全容はよくわかっていない。

2. 研究の目的

(1) 我々が持つ、カーボンファイバーを用いた単離心筋細胞伸展技術およびランゲンドルフ灌流心を用いた左心室内容量制御技術を用い、ヒト心筋細胞バイオメカニクスにおける機械電気相互作用現象の役割を明らかにする。

①心筋細胞の興奮収縮連関において重要な役割を担っている筋小胞体機能の機械負荷に対する反応を明らかにする。

②近年ヒト心筋遺伝子ライブラリーからクローニングした伸展刺激依存性 K^+ （SAKCA）チャネルの生理学的意義はほとんど分かっていないため、これを明らかにしていく。

(2) 得られた知見を我々が開発している心筋数理モデルへ統合し、心筋バイオメカニクスのフィジオーム的研究に有用なツールとして発展させる。

3. 研究の方法

(1) 標本：臓器機能実験のためのランゲンドルフ灌流心標本にはトリ心を用いる。トリ胚から単離した培養心筋細胞で発見されたカルシウムおよび伸展刺激依存性の K^+ （SAKCA）チャネルはBKチャネルの一種であるが、このチャネルはヒトとトリで共通するアミノ酸配列を持ち、ヒトとトリのみで伸展感受性を示すことがわかっている。そのため、臓器レベルの機械刺激に対する反応はヒトとトリとで共通する部分がある可能性がある。単離心筋標本には先天性心疾患のファロー四徴症手術における右室流出路狭窄解除手術に伴う切除心筋組織から単離したヒト心筋細胞を用いる。

ヒト心筋細胞の供給量が確保できない場合はトリ及びラット心筋細胞を用いる。

(2) 全心臓実験：ランゲンドルフ灌流トリ心の左心室内に挿入したラテックスバルーン内容量をコントロールすることにより左心室壁に伸展刺激を与え、その時の伸展刺激誘発性の不整脈から既知の機械受容チャネルとSAKCAチャネルの生理的役割を検討する。

(3) 単離心筋細胞実験：一対のカーボンファイバーを用いて単離した心筋細胞の両端を保持して伸展刺激を加え、そのときのSAKCAチャネル電流の変化を測定する。

4. 研究成果

(1) 筋小胞体に対する伸展刺激の影響：本研究はヒト心筋の供給が十分でなかったためにラット心筋細胞で行った。

①心筋細胞は静止状態でも筋小胞体からの自発的で局所的なカルシウム放出（カルシウムスパーク）が観察されるが、細胞両端にカーボンファイバーを装着し、細胞を伸展するとカルシウムスパークの頻度が直ちに上昇することが観察された（図1）。

②この伸展刺激誘発性のカルシウムスパークの上昇は、伸展感受性陽イオンチャネル（SAC）などからの細胞外カルシウムの流入やNOを介さない現象であり、細胞骨格の破壊のみがこの現象を抑制した。

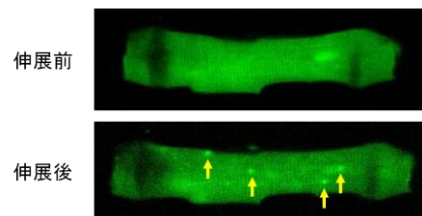


図 1

③伸展刺激誘発性のカルシウムスパークの急

性増加はこれまでに報告されていない現象で、フランク・スターリングの心臓法則の一端を担うメカニズムとして注目されている。

(2) SAKCAチャンネルの生理的役割

① 孵化後2週間のトリ心をランゲンドルフ灌流し、左心室内に挿入したバルーン内に短いパルス状の容量変化を与えることにより左心室壁に伸展刺激を与え、図2のような伸展刺激誘発性の期外収縮を得ることが出来た。この伸展刺激が大きいほど期外収縮の発生頻度は高かった。

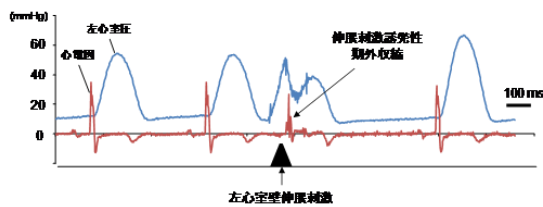


図 2

この伸展刺激誘発性期外収縮の発生頻度は、伸展感受性陽イオンチャンネル (SAC) の特異的な阻害薬であるGsMTx-4の投与により有意に減少し、また、BKチャンネルの特異的な阻害薬であるIbTxの投与により有意に増加したことから、SACを介した内向き電流による脱分極をSAKCAを介した外向きのカリウム電流が打ち消している可能性が示唆された。

② 上記実験の外向きカリウム電流の伸展感受性を詳細に調べるために、孵化後2週間のトリ単離心筋細胞を用いた電気生理実験を行った。カーボンファイバーを用いた伸展実験では細胞保持力の制限のために急激な伸展刺激を加えることができない。そこで10秒ほどかけて緩徐な伸展刺激を加えると、IbTx感受性外向きカリウム電流は直ちには増加しないが、伸展状態をそのまま保持すると数分かけて上昇することがわかった。この反応は伸展依存性に流入した細胞内カルシウムの増加による二次的なBKチャンネルの活性化であることが示唆

された。この数分の時間スケールでの電流上昇は前記①の急激な反応を説明できないため、SAKCAチャンネルは伸展速度依存性に活性化されるのではないかと考えられた。今後、急激な伸展刺激を負荷できるよう、伸展刺激装置の細胞保持機構を改良する必要がある。

(3) 新しい伸展感受性数値モデル

従来からある伸展量依存の伸展感受性モデルでは上記(2)の結果を説明することができないため、細胞表面の粘弾性を考慮することにより進展速度依存性に活性化される新しい伸展感受性モデルを開発した。このモデルを用いて(2)①で行った実験と同じ伸展刺激をシミュレーションすると、SACを介した内向き電流により伸展刺激誘発性期外収縮を得ることができた(図3、赤)。

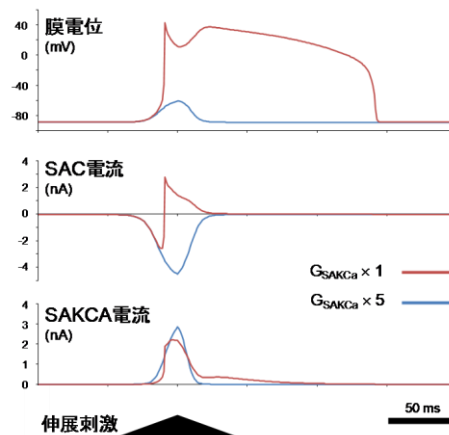


図 3

また、SAKCAチャンネルのコンダクタンスを増加させると伸展刺激誘発性期外収縮を抑制することができ、(2)①の実験結果を再現することができた(図3、青)。さらに同じモデルを用いて伸展速度を落として同量の伸展刺激を加えると、SAC電流は大幅に減少し、期外収縮を引き起こすような脱分極は起こらなかったが、伸展状態を維持するとSACを介したナトリウムの流入がナトリウム・カルシウム交換体を介して細胞内のカルシウム濃度を数分かけ

て上昇させ、それがSAKCAチャネルを活性化させて外向きカリウム電流を増加させ、(2) ②の実験結果をも併せて再現することができた。このモデルは急激な伸展刺激と緩徐な伸展刺激によっておこる現象を説明することができる初の機械感受性モデルであり、機械電気相互作用現象の統合研究に有用なツールとなる。

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2件)

① Iribe G, Jin H, Kaihara K, Naruse K. Effects of axial stretch on sarcolemmal BKCa channels in post-hatch chick ventricular myocytes. *Exp Physiol*. Jun 2010;95(6):699-711. 査読有。

② Iribe G, Ward CW, Camelliti P, Bollensdorff C, Mason F, Burton RA, Garny A, Morphew MK, Hoenger A, Lederer WJ, Kohl P. Axial stretch of rat single ventricular cardiomyocytes causes an acute and transient increase in Ca²⁺ spark rate. *Circ Res*. Mar 27 2009;104(6):787-795. 査読有。

[学会発表] (計4件)

① Iribe G, Jin H, Naruse K. Effects of bepridil on stretch-induced arrhythmia in isolated chick ventricles. *European Society of Cardiology Congress 2009*, 2009/8/29-9/2, Barcelona, Spain.

② Iribe G. Mechanical modulation of cardiac calcium handling. 36th International Congress of Physiological Sciences, 2009/7/27-8/1, Kyoto, Japan.

③ Iribe G. Mechano-electric interaction via calcium handling. 36th International Congress of Physiological Sciences Satellite symposium #8, 2009/7/27-8/1,

Kyoto, Japan.

④ Iribe G. New Insight into Acute Stretch Effects on Cardiac Calcium Handling. *European Society of Cardiology Congress 2008*, 2008/8/30-9/3, Munich, Germany.

[図書] (計2件)

① Iribe G and Kohl P. Chapter 5 “Non-Sarcolemmal Stretch-Activated Channels” in “Cardiac Mechano-Electric Coupling & Arrhythmias 2nd edition” in press.

② 片野坂友紀、入部玄太郎、山田章、成瀬恵治、第5章 心血管系細胞への機械刺激負荷技術、バイオテクノロジーシリーズ 細胞分離・操作技術の最前線、pp265-275 (2008年4月発行、(株)シーエムシー出版)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入部 玄太郎 (IRIBE GENTAROU)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号: 90284885

(2) 連携研究者

成瀬 恵治 (NARUSE KEIJI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号: 40252233

毛利 聡 (MOURI SATOSHI)

川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00294413

片野坂 友紀 (KATANOSAKA YUKI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号: 60432639

佐野 俊二 (SANO SHUNJI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号: 50235438

大島 祐 (OOSHIMA YUU)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号: 80364347