

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16013

研究課題名（和文）酸化ストレスが心筋拡張機能障害に関与する機序の解明

研究課題名（英文）Mechanism of the effect of reactive oxygen species on cardiac diastolic dysfunction

研究代表者

浜口 正悟（HAMAGUCHI, Shogo）

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：80747767

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）：本研究は、心不全の一種である拡張機能障害と酸化ストレスとの関連性に注目した。抗酸化活性を持つとされる天然物のうちellagic acid、gingerol、quercetinがマウス摘出心室筋組織標本において弛緩時間短縮作用を示すことが明らかとなった。これらの弛緩時間短縮作用は拡張機能障害を示す糖尿病モデルマウスにおいても観察された。この作用機序として、筋小胞体カルシウムポンプによるカルシウム取り込みを促進し、細胞内カルシウム動態を是正することで、拡張機能障害に奏効する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、心不全は心ポンプ機能のうち駆出機能に焦点が当てられ、収縮機能の低下が病態の主体であると考えられてきた。しかし、心収縮力機能低下を伴わない拡張機能障害に基づく心不全の患者数は近年増加傾向にあり、糖尿病、高血圧、加齢などが増悪因子となる。このタイプの心不全の治療では、高血圧の是正やうっ血軽減を目的として利尿薬や血管拡張薬が用いられるが、病態の根底にある拡張機能の改善に焦点をあてた治療薬は存在しない。したがって、心筋の拡張メカニズムの詳細な解明と拡張機能をターゲットとした薬物の創出は、拡張機能障害の新たな治療戦略の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the relationship between oxidative stress and diastolic dysfunction, a type of heart failure. Among natural products with antioxidant activity, ellagic acid, gingerol, and quercetin were found to shorten relaxation time in mouse isolated ventricular tissue preparations. These relaxation time shortening effects were also observed in a diabetic mouse model of diastolic dysfunction. The mechanism of action was suggested to be the enhancement of Ca²⁺ uptake by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump and correction of intracellular Ca²⁺ dynamics, which may be helpful for the treatment of diastolic dysfunction.

研究分野：循環薬理学

キーワード：酸化ストレス 拡張機能障害 SERCA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来、心不全は心ポンプ機能のうち駆出機能に焦点が当てられ、収縮機能の低下が病態の主体であると考えられてきた。しかし、Senni らによって心不全症例のうち、約 40% が左室駆出率が保持されているにも関わらず、予後不良であることが報告された^(引用文献)。この病態は心収縮機能低下を伴わない拡張機能障害に基づく心不全 (heart failure with preserved ejection fraction: HFpEF) と呼ばれている。糖尿病、高血圧、加齢などが増悪因子であり、近年患者数が増加している病態である。このタイプの心不全の治療では、高血圧の是正やうっ血軽減を目的として利尿薬や血管拡張薬が用いられるが、病態の根底にある拡張機能の改善に焦点をあてた治療薬は存在せず、心筋の拡張メカニズムの詳細な解明と拡張機能をターゲットとした治療戦略の確立が望まれている。

2. 研究の目的

糖尿病を含めた様々な病態時に発生する拡張機能障害の発生機序を解明し、新たな治療戦略の開発につなげることを目指す。拡張機能障害が引き起こされる原因として、酸化ストレスを介した筋小胞体カルシウムポンプ(SERCA)の機能障害ならびに細胞内カルシウム動態異常に着目し、その関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ddY 系雄性マウスから素早く心肺を摘出し、右心室壁組織標本を作製した。また、単離心筋細胞は、ランゲンドルフ灌流心を作成し、コラゲナーゼ処置することで作成した。張力測定ではアイソメトリックトランスデューサーを用いて心室筋組織標本の張力変化を測定した。細胞内 Ca^{2+} 動態は単離細胞に蛍光プローブを負荷し、共焦点顕微鏡法により可視化・定量した。Streptozotocin(200mg/kg)を腹腔内に単回投与し、6-8 週間後、高血糖を呈したマウスを糖尿病マウスとして実験に使用した。対照群として、streptozotocin の溶媒であるクエン酸緩衝液を同量投与したマウスを正常マウス群として使用した。

4. 研究成果

マウス心室筋組織標本において、ellagic acid、gingerol、quercetin、edaravone、tocopherol、ascorbic acid の 6 つ抗酸化物質のうち ellagic acid、gingerol、quercetin の 3 つが弛緩時間の短縮作用を示すことが明らかとなった。膵臓の細胞を障害する streptozotocin を用いて作成した糖尿病モデルマウスの心室筋では正常マウスに比べて弛緩時間が延長しており、拡張機能障害が引き起こされていることが確認された。このマウスに ellagic acid、gingerol、quercetin を処置すると糖尿病マウス、正常マウスどちらも弛緩時間が短縮されたが、その短縮効果は糖尿病マウスのほうが顕著であった。以上の結果から一部の抗酸化物質には弛緩時間を短縮させる作用があり、拡張機能障害を改善し得ることが示唆された。

その作用機序を明らかにする目的で細胞内カルシウム動態に対する作用の評価を行った。マウス単離心室筋細胞において、蛍光色素を用いて細胞内カルシウム動態を可視化し、quercetin の作用評価を行った結果、quercetin は心筋の拡張機能と関連する細胞内カルシウム濃度の減衰時間を短縮させることが明らかとなった。また、糖尿病マウスの心室筋細胞では正常マウスに比べて細胞内カルシウム濃度の減衰時間が延長しており、細胞内のカルシウム制御の破綻が拡張機能障害に繋がっていることが示唆された。このマウス心室筋細胞に quercetin を処置すると糖尿病マウス、正常マウスどちらもカルシウム減衰時間が短縮された。以上の結果から quercetin には細胞内カルシウム動態のうち、特に細胞内カルシウム濃度の減衰を促進させる作用があり、quercetin の弛緩時間短縮作用の要因の一つであることが示唆された。

弛緩時間短縮作用のさらなる作用機序を明らかにするために、マウス心室筋組織標本において、細胞内カルシウム動態に重要な役割を果たす細胞膜上に存在するナトリウム/カルシウム交換機構と筋小胞体上に存在するカルシウムポンプ(SERCA)について弛緩時間短縮作用との関連を検討した。それぞれの阻害薬である SEA0400 および cyclopiazonic acid を用いたところ、quercetin による弛緩時間の短縮は、SEA0400 では抑制されず、cyclopiazonic acid により抑制された。したがって、quercetin による弛緩時間の短縮は、SERCA を介して引き起こされていることが明らかとなった。

酸化ストレスと弛緩機能の関連性を評価する実験系を構築する目的で、過酸化水素(H_2O_2)や、金属イオンと H_2O_2 とのフェントン反応によるヒドロキシラジカル($\cdot OH$)生成による酸化ストレス負荷を試みたが、弛緩時間に対する安定した作用が得られず、評価系として用いるには至らなかった。そこで、HeLa 細胞に細胞内の活性酸素(ROS)の検出が可能な蛍光色素を導入して ROS を可視化し、quercetin の抗酸化活性の評価を行った。ROS 発生薬である tert-Butyl Hydroperoxide(TBHP)の処置により HeLa 細胞での ROS の上昇が観察され、その ROS の上昇は quercetin により抑制されることが明らかとなった。ただし今回の実験条件では、抗酸化活性を

示した quercetin の濃度は、弛緩時間の短縮が確認された時よりも高濃度であった。

本研究全体の研究成果としては、ellagic acid、gingerol、quercetin に SERCA を介してマウス心室筋の弛緩時間を短縮させる作用が確認され、これらは糖尿病マウスで観察された拡張機能障害を改善し得ることが示唆された。その作用機序としては、筋小胞体カルシウムポンプによるカルシウム取り込みを促進し、細胞内カルシウム動態を是正することが示唆された。また、quercetin は抗酸化活性を示したが、弛緩時間短縮作用との関連については更なる検証が必要である。

< 引用文献 >

Circulation. 1998;98:2282-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Hamaguchi Shogo, Morinou Ikue, Shiseki Yuko, Mikami Ayako, Seki Maika, Namekata Iyuki, Tanaka Hikaru	4. 巻 24
2. 論文標題 Mechanisms for the β -Adrenoceptor-Mediated Positive Inotropy in Mouse Ventricular Myocardium: Enhancing Effect of Action Potential Prolongation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3926 ~ 3926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24043926	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiroyuki Haruhito, Hashimoto Tatsuki, Mizoguchi Makoto, Kaneko Mika, Deguchi Nanoka, Takahashi Yuna, Hamaguchi Shogo, Namekata Iyuki, Tanaka Hikaru	4. 巻 46
2. 論文標題 Negative Inotropic Effects of Class I Antiarrhythmics on Guinea Pig Ventricular Myocardium: Correlation with L-Type Ca^{2+} Channel Blockade	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 133 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00644	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Namekata Iyuki, Ryosuke Odaka, Shogo Hamaguchi, Hikaru Tanaka	4. 巻 30
2. 論文標題 Bioimaging for Study of the Myocardial Function: Fluorescence Microscopy Featuring the Na^{+} - Ca^{2+} Exchanger	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioimages	6. 最初と最後の頁 1 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11169/bioimages.30.1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hamaguchi Shogo, Abe Kohei, Komatsu Momoka, Kainuma Jun, Namekata Iyuki, Tanaka Hikaru	4. 巻 44(12)
2. 論文標題 Positive Lusitropic Effect of Quercetin on Isolated Ventricular Myocardia from Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological & pharmaceutical bulletin	6. 最初と最後の頁 1894 ~ 1897
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Namekata Iyuki, Odaka Ryosuke, Hamazaki Shunsuke, Nisaka Hina, Hamaguchi Shogo, Tanaka Hikaru	4. 巻 44
2. 論文標題 Fluorescence Discrimination of Pharmacological Effects on the Na ⁺ /Ca ²⁺ Exchanger and Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase in Mouse Ventricular Cardiomyocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 154 ~ 157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hamaguchi Shogo, Kariya Marin, Ozaki Aya F., Namekata Iyuki, Tanaka Hikaru	4. 巻 44
2. 論文標題 Contribution of ATP-Mediated Positive Feedback to Sympathetic Nerve-Induced Positive Inotropy in Guinea Pig Ventricular Myocardium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 458 ~ 460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 関舞香、三上絢子、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 新生仔マウス心室筋におけるアドレナリン 受容体刺激による陽性変力反応の機序解明 活動電位持続時間延長による増強作用
3. 学会等名 第147回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾高椋介、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 洞房結節自動能における細胞内Ca ²⁺ を介する機序の種差：マウスとモルモットの比較
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾高 椋介、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 細胞内Ca ²⁺ が心拍数に及ぼす影響：マウスとモルモットの比較
3. 学会等名 第31回 日本バイオイメーjing学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森川 菜、白土愛由美、尾高 椋介、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 マウス心房筋細胞におけるT管構造とCa ²⁺ transientの観察
3. 学会等名 第31回 日本バイオイメーjing学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三上 絢子、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 新生仔マウス心室筋における 受容体刺激の影響と機序解明
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中光、行方衣由紀、瀧口正悟、金江春奈、野口和雄
2. 発表標題 心筋弛緩の薬理学的研究：弛緩を促進する天然由来化合物の探索
3. 学会等名 第22回 応用薬理シンポジウム 2021年9月4日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井帆風、阿部滉平、瀨口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 Streptozotocin誘発糖尿病マウス心筋の弛緩機能に対するQuercetinの作用
3. 学会等名 第144回 日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀨口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 心筋興奮収縮機構の発達変化
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

心筋 "バーチャルラボラトリ" https://www.mnc.toho-u.ac.jp/v-lab/shinkin/index.html
--

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
---------	---------