

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790262

 研究課題名（和文） 肺静脈心筋における細胞内カルシウムオシレーションの  
時間的・空間的解析

 研究課題名（英文） Spatio-temporal analysis of intracellular calcium oscillation  
in the pulmonary vein myocardium

研究代表者

行方 衣由紀（NAMEKATA IYUKI）

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：30510309

研究成果の概要（和文）：

左心房筋と肺静脈心筋を比較し、肺静脈心筋における異所性自動能の発生機序を明らかにすることを目的とした。Ca<sup>2+</sup>動態を観察した結果、肺静脈心筋では左心房筋に比べ、Ca<sup>2+</sup> transientが多く発生していた。しかし、細胞形態、筋小胞体の量や分布の違いは見られなかった。また活動電位を比較すると、肺静脈心筋で静止膜電位が浅かった。これは内向き整流性K<sup>+</sup>電流量が小さいことで説明が可能であった。以上の結果から、肺静脈心筋では再分極を担う内向き整流性K<sup>+</sup>電流量が小さいためにCa<sup>2+</sup>による自発活動が顕在化しやすいことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We assessed the electrophysiological properties of pulmonary vein myocardium and analyzed its arrhythmogenic activity. Some of the pulmonary vein cardiomyocytes, but not atrial cardiomyocytes, showed sustained spontaneous Ca<sup>2+</sup> transients. But morphology and the sarcoplasmic reticulum content of pulmonary vein cardiomyocytes were the same as those of atrial myocytes. The pulmonary vein myocardium had a less negative resting membrane potential and lower density of inwardly rectifying potassium current than atrial. These results suggest that the lower density of repolarizing currents in pulmonary vein cardiomyocytes appears to play a permissive role for depolarization induced by elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup>.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：薬理学、肺静脈心筋、カルシウムイメージング、自動能、心房細動

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 心房細動は臨床で最も多く見られる不整脈の一つである。患者数が多く（日本に 130

万人）、心原性脳梗塞や心不全を誘発するなど患者のQOLを損なうことから、治療意義の大きい疾患と考えられている。これまで心房

細動は心房筋の異常興奮が主原因と考えられていたため、現在も治療薬は心臓にターゲットをおいたI群およびIII群の抗不整脈薬が使用されている。しかし近年、心房細動患者の9割以上は左心房に隣接する肺静脈が不整脈の発生源であり、さらに肺静脈に迷入している心筋組織から発生する異所性自動能が原因であることが判明した。従ってこの肺静脈自動能を抑制する薬物を見出すことができれば、心房細動の新たな治療戦略に繋がりが、社会に大きく貢献できる。現在まで、肺静脈心筋に存在する個々のイオンチャネルに注目した基礎的検討は海外の研究者のグループによりなされているが、肺静脈心筋の異所性自動能の発生機序や薬物応答性については未解明の点が多く、治療戦略を構築するための情報が極めて少ない。

(2) これまで不整脈の発生機序については細胞膜のイオンチャネルを介して生じる電気現象で説明されてきた。しかし細胞内Ca<sup>2+</sup>過負荷を引き起こすウアバインやアコニチンにより電氣的異常興奮が誘発されることから、不整脈発生機序の解析には細胞膜の電気現象と細胞内Ca<sup>2+</sup>動態の両者を考慮することが重要である。特に肺静脈心筋では心室筋に比べて細胞内で自発的Ca<sup>2+</sup>オシレーションが発生しやすく、さらに細胞内Ca<sup>2+</sup>動態の調節に関するNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換機構が肺静脈心筋の自発活動発生に関与する結果を得たことから、肺静脈心筋を対象とした研究ではチャネルやトランスポーターを介して生じる電気現象を細胞内Ca<sup>2+</sup>動態との関連性から検討することにより、肺静脈心筋の自発活動発生機序の本質に迫ることができるという着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、電気現象とCa<sup>2+</sup>動態の両視点から、肺静脈心筋における異所性自動能の発生機序をイオンチャネルやトランスポーターのレベルで解明し、さらに治療ターゲット分子を見出すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

Hartley系モルモットから素早く心肺を摘出し、左心房および肺静脈組織標本作製した。細胞内活動電位の測定は定法に従い、3Mの塩化カリウムで満たしたガラス微小電極(抵抗値20~30Ω)を電極内に刺入し行った。細胞内Ca<sup>2+</sup>動態は組織標本あるい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。心筋細胞の単離は、肺をつけたままランゲンドルフ灌流心を作成し、コラゲナーゼ処理により行った。電流測定はwhole-cell patch clamp法を適用し行った。

## 4. 研究成果

(1) 共焦点顕微鏡を用いてモルモット単離肺静脈心筋細胞および心房筋細胞のCa<sup>2+</sup>イメージングを行い、細胞内Ca<sup>2+</sup>オシレーションによる肺静脈自発活動の発生機序の解明を目指した。まず肺静脈心筋細胞および心房筋細胞の細胞単離法を確立し、安定的に細胞を単離することに成功した。肺静脈心筋細胞と心房筋細胞の形態的比較を行ったところ、両者のサイズや形態は類似していた。また、Ca<sup>2+</sup>放出の引き金となる筋小胞体の量や分布にも心房筋と肺静脈心筋で違いは見られなかった。次にこれらの細胞のCa<sup>2+</sup>動態を比較し、検討を行った。肺静脈心筋細胞では、Ca<sup>2+</sup> transient、Ca<sup>2+</sup> spark、Ca<sup>2+</sup> waveの3種類のCa<sup>2+</sup>オシレーションが観察できた。Ca<sup>2+</sup> transientとは活動電位発生に伴う細胞質全体のCa<sup>2+</sup>濃度上昇である。Ca<sup>2+</sup> sparkは細胞質内の微小領域で生じる非伝播性のCa<sup>2+</sup>濃度上昇、Ca<sup>2+</sup> waveは局所的なCa<sup>2+</sup>濃度上昇が細胞質内を伝播する動きであり、これらは活動電位の発生を意味しない。肺静脈では自発的なCa<sup>2+</sup> transientすなわち自発活動の直前にCa<sup>2+</sup> sparkやCa<sup>2+</sup> waveが発生している傾向が見られた。この3種のCa<sup>2+</sup>オシレーションの発生率を心房筋細胞と肺静脈心筋細胞で比較してみると、Ca<sup>2+</sup> spark、Ca<sup>2+</sup> waveは心房、肺静脈で同程度発生していたが、Ca<sup>2+</sup> transientは肺静脈心筋細胞で多く発生していた。

以上の結果より、肺静脈心筋にはCa<sup>2+</sup> spark、Ca<sup>2+</sup> waveによりCa<sup>2+</sup> transientすなわち自発活動が誘発され易い性質があることが示唆された。

(2) これまでにモルモット肺静脈心筋で電氣的自発活動を観測し、この自発活動が筋小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出とNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換機構によって惹起されていることを明らかにした。しかし、なぜ肺静脈でのみこのような自発活動が見られるのかは分かっていない。そこで、ガラス微小電極法、patch-clamp法を用いて左心房筋と肺静脈心筋を比較し、肺静脈で自発活動が発生する原因を明らかにすることを目指した。

モルモットの肺静脈と左心房の活動電位波形を比較すると、肺静脈心筋で静止膜電位が浅い傾向が見られた。そこで静止膜電位を維持する内向き整流性K<sup>+</sup>電流量をwhole-cell patch clamp法を用いて測定した結果、内向き整流性K<sup>+</sup>電流量は肺静脈で小さく、左心房で大きい傾向が見られた。

このことから、肺静脈心筋では再分極を担う内向き整流性K<sup>+</sup>電流量が小さいために筋小胞体からのCa<sup>2+</sup>放出とNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換機構による自発活動が顕在化し得ることが示唆された。

(3) 肺静脈心筋自発活動に影響を与えると考えられる神経伝達物質に焦点を当て、肺静脈心筋自発活動への交感神経系の関与を明らかにすることを目的とした。

カルシウム蛍光色素を導入したモルモット単離肺静脈心筋細胞に交感神経の伝達物質である noradrenaline を処置すると、細胞内カルシウム濃度の上昇に続いて、カルシウムオシレーションが観察された。次に薬理的検討を迅速に行うことができる収縮力測定法を肺静脈組織標本に適用した。摘出したモルモット肺静脈組織の一端をアイソメトリック・トランスデューサーに接続し、肺静脈の輪走筋方向に 100 mg 程度の静止張力を与えると 50 mg 以上の収縮力が検出でき、薬理的検討が可能であった。およそ 4 割の標本で自発活動(自発的収縮)が見られたが、この自発活動は頻度が不安定(約 1 Hz)であり持続しなかった。自発活動を示さない標本に noradrenaline を処置すると、高頻度(約 3 Hz)かつ 30 分以上持続する自発活動が誘発された。また神経終末から noradrenaline の遊離を促す tyramine を処置しても自発活動が誘発された。この自発活動は propranolol または prazosin により抑制された。さらに、isoproterenol または methoxamine によっても自発活動が誘発されたことから、自発活動の発生には  $\alpha_1$  および  $\beta$  受容体が重要であることが判明した。以上の結果から、肺静脈心筋の交感神経終末から放出された noradrenaline は  $\alpha_1$  および  $\beta$  受容体を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させ、自発活動を惹起することが判明した。

#### 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 16 件)

① Iyuki Namekata, Yayoi Tsuneoka, Hikaru Tanaka.

Electrophysiological and pharmacological properties of the pulmonary vein myocardium. Biol Pharm Bull. 査読有 2013; 36 (1):2-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b212020>

② Yayoi Tsuneoka, Yuka Kobayashi, Yoriko Honda, Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka.

Electrical activity of the mouse pulmonary vein myocardium. J. Pharmacol Sci. 査読有 2012;119(3):287-292. DOI: <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.12062SC>

③ Akira Takahara, Kiyoshi Takeda, Yayoi Tsuneoka, Miyoko Hagiwara, Iyuki Namekata,

Hikaru Tanaka.

Electrophysiological effects of the class Ic antiarrhythmic drug pilsicainide on the guinea-pig pulmonary vein myocardium.

J. Pharmacol Sci. 査読有 2012;118 (4):506-511.

DOI:<http://dx.doi.org/10.1254/jphs.12022FP>

④ Akira Takahara, Takahiko Sugimoto, Takuma Kitamura, Kiyoshi Takeda, Yayoi Tsuneoka, Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka  
Electrophysiological and pharmacological characteristics of triggered activity elicited in the guinea-pig pulmonary vein myocardium. J. Pharmacol Sci. 査読有 2011;115(2):176-81. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1254/jphs.10232FP>

⑤ Hikaru Tanaka, Yayoi Tsuneoka, Iyuki Namekata.

Electropharmacological properties of the pulmonary vein myocardium.

Current Topics in Pharmacology. 査読無 2011; 15 (2):19-24.

<http://www.researchtrends.net/tia/abstract.act.asp?in=2&vn=15&tid=11&aid=3475&pub=2011&type=>

⑥ Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka.

Cardioprotective effects of  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  exchanger inhibition. Recent Research Developments in Pharmacology. 査読無 2011; Vol2 115-126.

<http://ressign.com/UserArticleDetails.aspx?arid=11370>

⑦ Iyuki Namekata, Yayoi Tsuneoka, Akiko Akiba, Hideki Nakamura, Hideaki Shimada, Akira Takahara Hikaru Tanaka.

Intracellular calcium and membrane potential oscillations in the guinea-pig and rat pulmonary vein myocardium. Bioimages. 査読有 2010;18:11-22. DOI: <http://dx.doi.org/10.11169/bioimages.18.11>

⑧ Hikaru Tanaka, Iyuki Namekata, Toru Ogawa, Yayoi Tsuneoka, Chisa Komikado, Akira Takahara, Naoko Iida-Tanaka, Hiroko Nakaseko, Hiromichi Tsuru, Satomi Adachi-Akahane.

Effects of S(+)-efonidipine on the rabbit sinus node action potential and calcium channel subunits  $\text{Ca}_{\text{V}1.2}$ ,  $\text{Ca}_{\text{V}1.3}$  and  $\text{Ca}_{\text{V}3.1}$ . Eur J Pharmacol. 査読有 2010; 649 (1-3):263-267.

〔学会発表〕(計 46 件)

- ① 鶴田将人 マウス肺静脈心筋自発活動の発生機序に関する薬理的検討 日本薬学会第 133 年会 パシフィコ横浜 (神奈川) 2013 年 3 月 28 日
- ② 河原圭 モルモット肺静脈心筋の自発活動に対する vidarabine の作用 日本薬学会第 133 年会 パシフィコ横浜 (神奈川) 2013 年 3 月 28 日
- ③ **行方衣由紀** 心筋における局所カルシウムシグナル調節の多様性; 次世代の会シンポジウム、Ca<sup>2+</sup>チャネルマイクロドメインの分子制御基盤とその生理的意義 オーガナイザー兼シンポジスト 第 86 回日本薬理学会年会 福岡国際会議場 (福岡) 2013 年 3 月 22 日
- ④ 恒岡弥生 マウス肺静脈心筋の電気活動 第 29 回日本心電学会学術集会 幕張メッセ 国際会議場 (千葉) 2012 年 10 月 12 日
- ⑤ 白川亮 モルモット肺静脈心筋自発活動の交感神経による制御機構 第 126 回日本薬理学会関東部会 北里大学薬学部 (東京) 2012 年 7 月 14 日
- ⑥ **行方衣由紀** 肺静脈心筋の電氣的自発活動の発生機序: 心房細動治療標的としての可能性 特別シンポジウム: 次世代創薬に向けた新たなストラテジー オーガナイザー兼シンポジスト 日本薬学会第 132 年会 北海道大学 (北海道) 2012 年 3 月 29 日
- ⑦ 恒岡弥生 モルモット肺静脈心筋の電氣的自発活動とカリウム電流 第 85 回日本薬理学会年会 国立京都国際会館 (京都) 2012 年 3 月 14 日
- ⑧ **Iyuki Namekata** Membrane potential and intracellular calcium oscillations in the guinea-pig and rat pulmonary vein myocardium. The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section. Tokyo (Japan) 2011 年 12 月 3 日
- ⑨ 恒岡弥生 モルモット肺静脈心筋自発活動における細胞内 Ca<sup>2+</sup>動態と電気生理学的性質 第 125 回日本薬理学会関東部会 日本大学薬学部 (千葉) 2011 年 10 月 15 日

⑩ 疋田康 伸展刺激に起因するモルモット肺静脈心筋の高頻度自発活動について 第 55 回日本薬学会関東支部大会 東邦大学薬学部 (千葉) 2011 年 10 月 8 日

⑪ 秋葉明子 モルモットおよびラット肺静脈心筋の自発活動における細胞内 Ca<sup>2+</sup>の役割 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011 北里大学薬学部 (東京) 2011 年 8 月 31 日

⑫ 恒岡弥生 モルモットおよびラット肺静脈心筋の電氣的自発活動とカルシウム動態 第 84 回日本薬理学会年会 パシフィコ横浜 (神奈川) 2011 年 3 月 24 日

⑬ 高原章 モルモット肺静脈の興奮伝導に対するペプリジルの作用特性 第 27 回日本心電学会学術集会大分全日空ホテル (大分) 2010 年 10 月 9 日

⑭ 恒岡弥生 モルモット肺静脈心筋の組織・細胞の形態および自発活動 第 19 回日本バイオイメーjing学会学術集会 慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川) 2010 年 9 月 10 日

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.mnc.toho-u.ac.jp/v-lab/shinkin/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

行方 衣由紀 (NAMEKATA IYUKI)  
東邦大学・薬学部・講師  
研究者番号: 30510309

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

田中 光 (TANAKA HIKARU)  
東邦大学・薬学部・教授  
研究者番号: 40236617

高原 章 (TAKAHARA AKIRA)  
東邦大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 80377481

川西 徹 (KAWANISHI TORU)  
国立衛生試験所・部長  
研究者番号：40124383

田中直子 (TANAKA NAOKO)  
大妻女子大学・家政学部・教授  
研究者番号：40184353