

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 10 日現在

機関番号：35303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2013

課題番号：23800067

研究課題名（和文）心臓の機械的負荷への適応機構解明：カルシウム動態と冠微小循環リモデリング

研究課題名（英文）Exploring the mechanisms for adaptation to mechanical forces in the heart : Ca²⁺ handling and coronary microcirculation remodeling

研究代表者

氏原 嘉洋 (UJIHARA YOSHIHIRO)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80610021

研究成果の概要（和文）：

Na⁺/Ca²⁺交換体は、心臓の拍動ごとに流入してくる Ca²⁺を細胞外へと汲み出す実質上唯一の Ca²⁺排出系として働くことが知られている。心不全発症と重篤化における Na⁺/Ca²⁺交換体の病態生理学的役割を検討するために、圧力負荷による心不全モデルを作製した。心不全モデルマウス心臓では、心機能の低下に依存して、Na⁺/Ca²⁺交換体の活性が低下していることがわかった。このことは、細胞外への Ca²⁺排出機能の低下が心不全増悪因子となりうることを示している。

研究成果の概要（英文）：

The cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger is the predominant mechanism for the extrusion of Ca²⁺ from beating cardiomyocytes. To investigate the role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger during progression of heart failure, I generated pressure-overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction. The Na⁺/Ca²⁺ exchanger activity decreased as the cardiac function failed, suggesting that a decrease in the extrusion of cytoplasmic Ca²⁺ may cause heart failure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：リモデリング、心筋細胞、心肥大、心不全、カルシウム、Na⁺/Ca²⁺交換体、機械的負荷、冠微小循環

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞は、生後速やかに分裂能を失い、その後の心臓の血液ポンプ機能は心筋細胞が構造や形態を機能的に再構築（リモデリング）することによって調節されている。高血圧など長期的な機械的負荷に対して、心筋細胞はダイナミックにリモデリングして心機

能を最適化している。この適応機構が破綻した状態が心不全であり、心肥大から心不全への移行に関わる因子として情報伝達物質としての Ca²⁺と、増大した酸素需要をまかなうための冠微小循環のリモデリングが重要であることが明らかになってきた。

心臓の律動的な収縮・弛緩は Ca²⁺によって

制御されている。一心拍ごとの心筋細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化は Ca^{2+} トランジェントと呼ばれ、T 管（細胞内外の Ca^{2+} の出入りを効率良く行うための形質膜の陥入構造）や筋小胞体（細胞内の Ca^{2+} ストア）に存在する Ca^{2+} ハンドリング分子によって細胞内 Ca^{2+} 濃度は厳密に制御されている。最近の研究から、長期にわたる機械的負荷に対する適応反応として出現する肥大リモデリングは、 Ca^{2+} 依存性脱リン酸化酵素カルシニューリンの活性化による肥大応答遺伝子群の発現により引き起こされることが明らかとなってきた（Molkentin et al., Cell, 1998）。しかしながら、心筋細胞の収縮・弛緩に必要な Ca^{2+} トランジェントが絶えず起こっている中で、カルシニューリンがリモデリングに必要な Ca^{2+} 濃度の上昇をどのように感知するのか依然として不明である。心筋細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇は、 Ca^{2+} の流入系の異常のみならず、 Ca^{2+} 汲み出し系の機能の低下によっても起こりうる。したがって、心筋細胞形質膜における実質上唯一の Ca^{2+} 排出系である $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体や筋小胞体へ細胞内 Ca^{2+} を汲み出す Ca^{2+} ポンプ (SERCA) についても注目する必要がある。

Ca^{2+} ハンドリング分子のうち、形質膜に発現している $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体は、心臓の拍動ごとに流入してくる Ca^{2+} を、細胞膜を介した Na^+ の濃度勾配を利用して細胞外へと汲み出す実質上唯一の Ca^{2+} 排出系として働くことが知られている。これまでの研究より、不全心筋細胞では $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の発現量が増加していることが報告されており、この現象は細

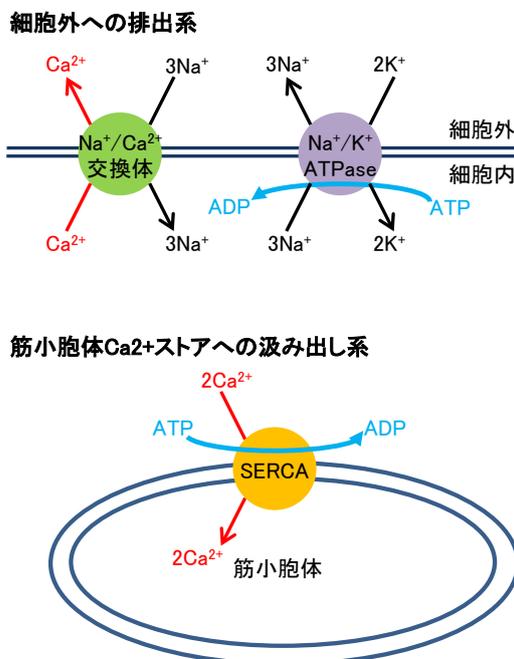


図1 心筋細胞内に備わった2つの異なる Ca^{2+} 排出系

胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に対する適応応答であると考えられている (Studer et al., Circ. Res., 1994)。しかしながら、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体は、状況に応じて Ca^{2+} 流入系としても働きうること、さらに筋小胞体上の SERCA に比べてエネルギー効率の悪い Ca^{2+} 排出系であることを考慮すると、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の発現量の増加が心不全増悪因子となる可能性も否定できない。

2. 研究の目的

本研究では、大動脈結紮手術によって心不全モデルを作製した。このモデルを用いて、心肥大応答時における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の移送とその結果としての Ca^{2+} トランジェントの変化を時間的・空間的に解析し、心不全発症と重篤化における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の病態生理学的役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 圧力負荷モデルマウスの作製

機械的負荷が心臓に作用した時の継時的な心機能、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体活性、 Ca^{2+} トランジェントの変化を調べるために、圧力負荷により求心的な形態変化をしたマウス心臓を研究の対象とする。胸部大動脈を細径針と同時に結紮後、細径針を引き抜くことで狭窄を生じさせ、左心室に圧力負荷の掛かるモデルを作製する。

(2) 心肥大・心不全の進行度の評価

心肥大・心不全の進行度の評価は、心臓形態、心体重比、心エコーによる左心室の収縮率、肥大マーカー (ANP, BNP) の発現量を調べることにより行う。

(3) 心筋細胞の単離

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の活性や Ca^{2+} トランジェントを計測するために、Shioya (J. Physiol. Sci., 2007) の方法を参考にして心臓から心筋細胞を単離する。細胞は 37°C で保存し、単離後 8 時間以内に使用する。

(4) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の活性の計測

細胞外液を通常濃度の Tyrode 液から低 Na^+ 液に置換することにより、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の Ca^{2+} 流入系による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が起こる。この細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fura-2 を用いて計測し、細胞全体の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の活性を評価する。

(5) Ca^{2+} トランジェントの計測

単離した心筋細胞に電気刺激を与えたときの細胞全体の Ca^{2+} トランジェントを観察する。観察には時間分解能に優れた Ca^{2+} 蛍光指示薬 Indo-1 と高感度冷却 CCD カメラを用い

ることにより、毎秒 50 フレームの画像を取得する。Ca²⁺の排出速度の比較する際には、Indo-1 ratio が最大値から半分まで減少する時間 (T_{1/2}) を用いた。

4. 研究成果

図 2 に、正常心と圧力負荷心のマッソントリクローム染色像と心エコー像を示す。圧力負荷 16 週間の心臓では、左心室の顕著な拡張と繊維化が認められ、収縮率が有意に低下していた。このとき、圧力負荷モデルの心体重比、肥大マーカー (ANP, BNP) の発現量は、正常心と比較して増大しており、圧力負荷により心肥大・心不全が生じていることを確認した。

単離した心筋細胞の細胞外液を通常濃度の Tyrode 液から低 Na⁺液に置換すると、Na⁺/Ca²⁺交換体を介した細胞内への Ca²⁺流入が生じた。置換直後から、Fura-2 ratio は直線的に上昇し、その後一定の値になった。直線部分を線形近似したときの傾きを比較することにより、圧力負荷モデルの時間経過に伴う細胞全体の Na⁺/Ca²⁺交換体の活性を比較した。その結果、心機能が低下するにつれて、Na⁺/Ca²⁺交換体の活性が低下していることが明らかになった。

続いて、正常心と不全心における Ca²⁺トランジェントを計測した。細胞に 1 Hz の電気刺激を与えたときの Indo-1 ratio の変化の典型例を図 3 に、T_{1/2}を図 4 に示す。圧力負荷によって引き起こされた不全心においては、Ca²⁺排出速度が有意に低下していることが分かった。

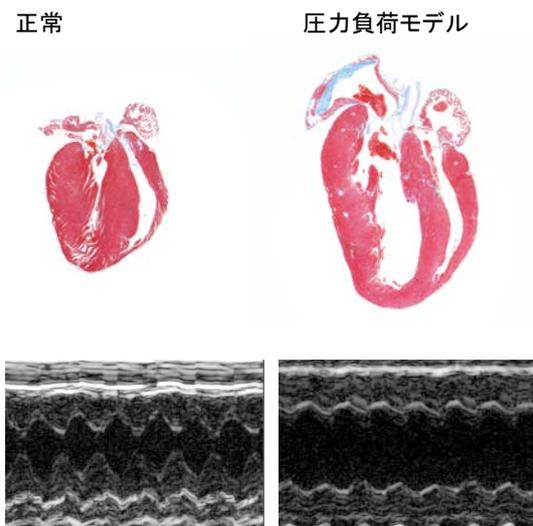


図 2 正常心臓と圧力負荷モデル心臓のマッソントリクローム染色像と心エコー像

以上のことから、細胞外への Ca²⁺排出機能の低下が心不全増悪因子となりうることが示唆された。

心臓は肥大により酸素需要が増加するため、新しい血管を形成 (リモデリング) する必要がある。今後、心筋組織の酸素環境を血管リモデリング誘導する低酸素誘導因子 (Hif-1 α) による評価を考えている。さらに、冠微小循環を評価するために、蛍光物質を混入したゼラチンによる血管鑄型標本を作製して血管構造評価を行い、血管機能評価として生体 CCD カメラにより冠血管予備能の評価を試みる予定である。

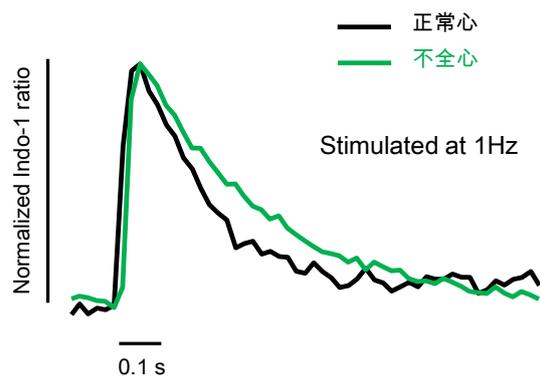


図 3 正常心と不全心から単離した心筋細胞の Ca²⁺トランジェント

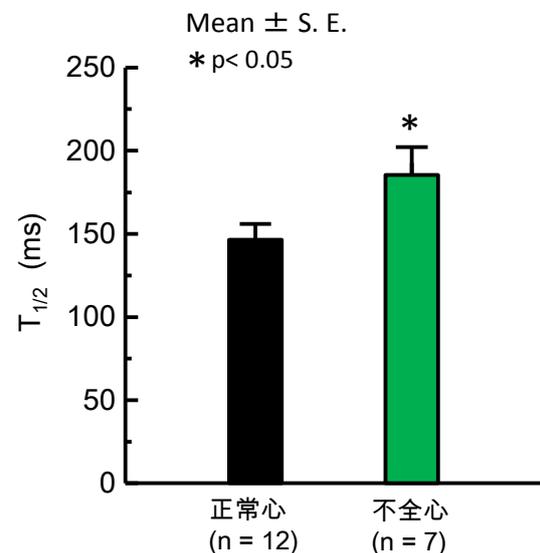


図 4 正常心と不全心から単離した心筋細胞の Ca²⁺排出速度の比較

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)

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Yoshihiro Ujihara, Masanori Nakamura, Hiroshi Miyazaki, Shigeo Wada, Segmentation and morphometric analysis of cells from fluorescence microscopy images of cytoskeletons, Computational and Mathematical Methods in Medicine, 査読有, vol. 2013, pp. 1-11, 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/381356>
- ② Yoshihiro Ujihara, Masanori Nakamura, Hiroshi Miyazaki, Shigeo Wada, Contribution of actin filaments to the global compressive properties of fibroblasts, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 査読有, vol. 14, 192-198, 2012, DOI:10.1016/j.jmbbm.2012.05.006
- ③ Masanori Nakamura, Yoshihiro Ujihara, Masatsugu Soga, Kenichiro Koshiyama, Hiroshi Miyazaki, Shigeo Wada, Effects of cytoskeletal orientations on deformation of a cell residing in a collagen gel construct, Journal of Biomechanical Science and Engineering, 査読有, vol. 7, pp. 2-15, 2012, DOI: 10.1299/jbse.7.2

[学会発表] (計 1 件)

- ① 橋本謙、氏原嘉洋、毛利聡、発生段階の心筋細胞の分化・分裂機構の解明に向けた予備的解析、第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/study/info.php?id=202>

6. 研究組織

(1)研究代表者

氏原 嘉洋 (UJIHARA YOSHIHIRO)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80610021