

令和 7 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22H02803・23K24065

研究課題名（和文）心臓の代謝・自動能連関の恒常性と破綻の統合的解明

研究課題名（英文）Integrative study on homeostasis and pathophysiology of cardiac metabolism-automaticity coupling

研究代表者

松岡 達（Matsuoka, Satoshi）

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：00263096

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：高濃度グルコース（25 mM, HG）が心臓自動能に及ぼす影響をマウス心臓で解析した。単離洞房結節細胞の収縮間隔をポアソンプロット解析すると、短期間変動を示す短軸方向標準偏差（SD1）と長期間変動を示す長軸方向標準偏差（SD2）ともにHG投与で増大した。HG投与は局所的Ca²⁺放出（LCR）の振幅を増大し収縮周期早期のLCRを増加した。またHG投与はミトコンドリア活性酸素（ROS）を増加した。ランゲンドルフ灌流心へのHD灌流は、心電図RR間隔変動（SD1）を増大した。マウス心臓へのHG投与は、洞房結節細胞のROSを増加しLCR動態を変化させて自動能を障害し心拍変動を増加させると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はマウス心臓を用いて、高濃度グルコースが心臓自動能を障害し大きな心拍数変動を誘発することを初めて明らかにした。ヒトにおいては、食後に高血糖が起こることがあるが、本研究成果は、食後高血糖が心臓洞房結節自動能を直接障害し大きな心拍変動を引き起こす可能性を示す。

研究成果の概要（英文）：Effects of high glucose (25mM, HG) on the cardiac automaticity was investigated using mice hearts. In the analysis of cell contraction interval in isolated sinoatrial myocytes using Poincare plot, the HD application augmented both standard deviation along short axis which indicates short-term variation (SD1) and the one along long axis which indicates long-term variation (SD2). The HD application increased the amplitude of local Ca²⁺ release (LCR) and the frequency of LCR which appeared in early phase of cardiac cycle, and increased mitochondrial reactive oxygen species (ROS). In Langendorff heart experiments, the HD perfusion increased SD1 of RR interval. Taken together, it was suggested that the HD application to mouse heart increases ROS and alters LCR dynamics in sinoatrial myocytes, leading to impairment of automaticity and to heart rate variability.

研究分野：生理学

キーワード：心臓 代謝 グルコース 自動能

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓拍動のリズムは、洞房結節の内因性興奮リズム(自動能)を基礎に自律神経系により調節されている。洞房結節自動能には、細胞膜イオンチャネルの協調作用(Irisawa et al., *Physiol Rev*, 1993)のみならず、筋小胞体リアノジン受容体からの局所的Ca²⁺放出“local Ca²⁺ release (LCR)”が関与する(Maltsev et al., *Biophys J*, 2004; Torrente et al., *Cardiovasc Res*, 2016)。申請者らは、ミトコンドリアNa⁺/Ca²⁺交換(NCXm)を介する筋小胞体へのCa²⁺供給経路を発見し、洞房結節細胞の“ミトコンドリア-筋小胞体-細胞膜Ca²⁺連関”が自動能発生に関与するとの仮説を提唱した(Takeuchi et al., *J Physiol Sci*, 2015)。一連の研究過程で、申請者らは、マウスの洞房結節細胞とランゲンドルフ灌流心臓において、高濃度グルコース投与により洞房結節機能不全が発生するとの新しい知見を得た。

高血糖状態が続く糖尿病患者では心房細動や心室性期外収縮などの不整脈合併率が高く、自律神経系異常や冠動脈の動脈硬化による心筋虚血が関連すると考えられているが、心臓の興奮性や興奮伝導性自体の傷害も指摘されている(Grisanti, *Front Physiol*, 2018)。しかし、ヒトまたは実験動物で、高血糖状態が洞房結節機能不全を誘発することは、今までに報告はない。また、糖尿病性不整脈発生機序としては、心臓の線維化、慢性炎症、酸化ストレスなどが指摘されているが、未だ全容は解明されていない。高濃度グルコースによる洞房結節機能不全は、数十分で発現することから、申請者らが提唱する洞房結節細胞の“ミトコンドリア-筋小胞体-細胞膜Ca²⁺連関”の異常が関連するものと強く示唆される。本研究を通じて、糖尿病の新たな病態解明と不整脈治療に貢献できると考える。

2. 研究の目的

本研究は1)洞房結節の代謝-自動能連関の解明、2)高血糖が洞房結節機能不全を誘発する機序の解明、3)数理モデル解析によるヒト心臓における高血糖誘発洞房結節機能不全の検討を行うことで、“洞房結節の代謝-自動能連関”の生理的及び病態的意義を解明することを目的とする。

高濃度グルコースにより洞房結節機能不全が誘発されるという発見は、申請者らの独自の発見であり、これまで報告がない。この研究により、ヒトの高血糖病態の解明へと発展することが期待される。

3. 研究の方法

10~16週齢のマウス心臓から洞房結節を取り出し、コレゲナーゼ処理により洞房結節細胞を単離した。1)自動能をもつ単離洞房結節細胞の細胞収縮を、コントロールTyrode液灌流下に高速イメージング法(2ミリ秒間隔, 256 × 256 pixels; 0.11 μm/pixel)を用いて記録し、NIS-Elements(Nikon)と自作の解析ソフトで収縮間隔の変動を解析した。2)単離洞房結節細胞にCa²⁺感受性色素Calbryte™ 520を負荷して、細胞質Ca²⁺を蛍光測定して計測した(2.5ミリ秒間隔, 512 × 512 pixels; 0.16 μm/pixel)。3)単離洞房結節細胞のミトコンドリア活性酸素(ROS)をmtSOX Deep Redを用いて測定した。4)マウスから心臓をとりだして、ランゲンドルフ灌流心臓を作成し心拍数変動を計測した。

4. 研究成果

1)細胞外液グルコース濃度5mMと25mMの条件で、単離洞房結節細胞の収縮を10分間計測し、自作のソフトで収縮間隔測定し、Poincaré plotを用いて収縮間隔の変動を解析した(図1A, B)。短期間の変動を示す短軸方向の標準偏差(SD1)及び長期間の変動を示す長軸方向の標準偏差(SD2)とともに、高濃度グルコースを投与することで収縮間隔の変動が有意に大きくなった(図

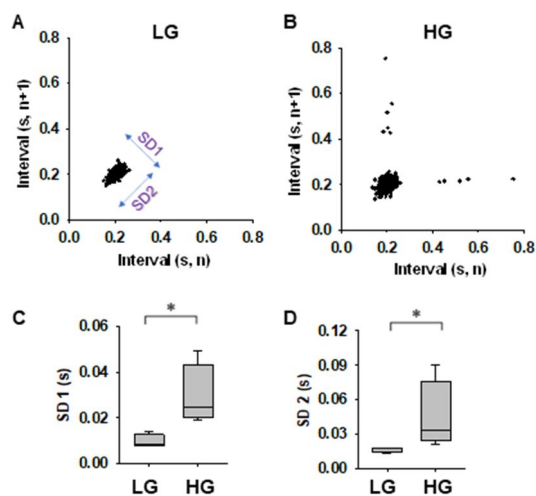


図1. 高濃度グルコースがマウス単離洞房結節細胞の収縮間隔に及ぼす影響 LG: 5 mM glucose, HG: 25 mM glucose *p<0.05

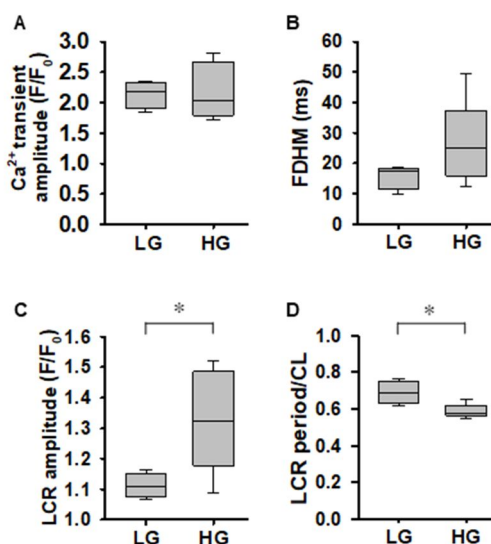


図2. 高濃度グルコースがマウス単離洞房結節細胞のLCR発生に及ぼす影響 LG: 5 mM glucose, HG: 25 mM glucose *p<0.05

1C,D)。

また、収縮間隔平均値の $\pm 5 \times$ 標準偏差(5SD)を超える収縮間隔を示した収縮の数が、高濃度グルコース(25 mM)を投与すると有意に増加した。そして、その効果は高齢マウス(13~16月齢)において幼弱マウス(10~16週齢)よりも著明であった。

2) 洞房結節細胞の Ca^{2+} 動態解析では、自発的な Ca^{2+} トランジエントの大きさに有意差は観られなかった(図2A)。筋小胞体から放出される局所的な Ca^{2+} 放出(Local Ca^{2+} release, LCR)を解析したところ、高濃度グルコース投与によりLCRの持続時間(Full duration at half maximum, FDHM)には変化が観られなかったが(図2B)、LCRの振幅が増大し(図2C)、収縮周期(Cycle length, CL)早期に発生するLCRの頻度が増加した(図2D)。

3) ミトコンドリア活性酸素(ROS)の発生を測定したところ、高濃度グルコース負荷によりミトコンドリア由来のROSが増加することが示された。

4) マウスランゲンドルフ灌流心を用いて、高濃度グルコース及び高浸透圧液(グルコースの代わりに20 mM マニトール添加)が、心拍数変動に及ぼす影響を測定した。高濃度グルコースTyrode液灌流時には、心電図RR間隔の変動(Poincaré plotにおけるSD1)が有意に増大した(図3A,B)。特に高濃度グルコース液灌流後5~10分で、心拍数が有意に変動した(図3C,D)。また、心房性補充収縮が観察されたので、高濃度グルコース負荷による洞房結節機能障害が推測された。一方、高浸透圧液(20 mM マニトール添加)灌流では心拍数変動に有意な差は観られなかった。

これらの結果から、マウス心臓に対しての高濃度グルコース負荷は、1) 洞房結節細胞のROS増加とLCR動態を変化させることで、2) 洞房結節の自動能を障害し心拍変動を増加させることが明らかになった。

また、

5) 心筋細胞の膜興奮、 Ca^{2+} 動態、収縮、ミトコンドリア代謝及びミトコンドリアROS産生を統合した、心筋細胞モデルの数値モデル構築に成功した。論文発表の準備を進めている。

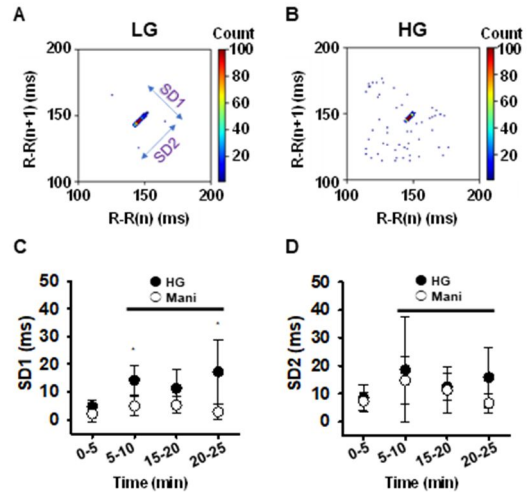


図3. 高濃度グルコースがマウスランゲンドルフ灌流心の心拍変動に及ぼす影響 LG: 5 mM glucose, HG: 25 mM glucose, Mani: 25 mM glucose+5 mM glucose *p<0.05

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 1件）

1. 著者名 Takeuchi Ayako, Matsuoka Satoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Spatial and Functional Crosstalk between the Mitochondrial Na ⁺ -Ca ²⁺ Exchanger NCLX and the Sarcoplasmic Reticulum Ca ²⁺ Pump SERCA in Cardiomyocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7948 ~ 7948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23147948	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11件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yukari Takeda, Satoshi Matsuoka
2. 発表標題 High glucose induced irregular rhythm of mouse sinoatrial node.
3. 学会等名 101st Annual Meeting of The Physiological Society of Japan
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ayako Takeuchi, Satoshi Matsuoka
2. 発表標題 Physiological impacts of spatial distribution of mitochondrial Ca ²⁺ transporters in cardiomyocytes.
3. 学会等名 101st Annual Meeting of The Physiological Society of Japan
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yukari Takeda, Satsuki Sato, Jinya Suzuki, Satoshi Matsuoka.
2. 発表標題 Dysfunction in pacemaker activity of sinoatrial nodal cells in a mouse model of myocardial steatosis.
3. 学会等名 IDF-WPR Congress 2023 / 15th Scientific Meeting of AASD. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yukari Takeda, Satsuki Sato, Jinya Suzuki, Satoshi Matsuoka.
2. 発表標題 Irregular pacemaking rhythm in mice with accumulation of lipid droplets in cardiomyocytes.
3. 学会等名 2023 年度 生理研心血管研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yukari Takeda, Satsuki Sato, Jinya Suzuki, Satoshi Matsuoka.
2. 発表標題 Impairment in pacemaker function of sinoatrial nodal cells in a mouse model of myocardial steatosis.
3. 学会等名 10th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satoshi Matsuoka, Ayako Takeuchi, and Yukari Takeda
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

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 心筋細胞内脂肪滴過剰蓄積マウスにおける洞機能障害
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 竹内 綾子, 松岡 達
2. 発表標題 マウス心筋および脳におけるミトコンドリアCa ²⁺ 動態特性の違い
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 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
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内綾子、松岡達
2. 発表標題 心筋細胞におけるミトコンドリアNa ⁺ -Ca ²⁺ 交換輸送体NCLXと筋小胞体Ca ²⁺ ポンプSERCAの構造的連関とその生理的役割
3. 学会等名 生理研研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Matsuoka, Takao Shimayoshi and Ayako Takeuchi
2. 発表標題 A simulation study on cardiac mitochondrial energetics during ischemia and reperfusion.
3. 学会等名 The 9th World Congress of Biomechanics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Department of Integrative and Systems Physiology
<http://isphysio.med.u-fukui.ac.jp/>

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
研究分担者	竹田 有加里 (Takeda Yukari) (20582159)	福井大学・学術研究院医学系部門・助教 (13401)	
研究分担者	長谷川 奏恵 (Hasegawa Kanae) (20770358)	福井大学・学術研究院医学系部門・講師 (13401)	

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