様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 6 月 7 日現在

機関番号：３５３０３
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2008～2010
課題番号：20300160
研究課題名（和文） 冠循環・心臓メカニクス連関：分子進化から心機能、心不全発症機構までの医工学的解析

研究課題名（英文） Coronary Circulation – Cardiac Mechanics Coupling

研究代表者
毛利 聡（MOHRI SATOSHI）
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：00294413

研究成果の概要（和文）：脊椎動物の心臓は大別して冠循環を有するものと、心室内腔から直接血液が流入するタイプがある。冠循環心臓（ラット）と非冠循環心臓（カエル）の心機能を可変弾性の概念で評価すると、冠循環心臓は拡張期優位の血流を維持するために心室の拡張を制限して収縮性優位の構造を実現していた。また、心肥大・心不全時における心室形態制御を検討するために薬物投与により Na-Ca 交換体を心臓に強発現できるモデルマウスを作成し、内腔拡大を伴わない求心性肥大と拡張性の低下を確認した。

研究成果の概要（英文）：In vertebrates, there are two kinds of myocardium, compacta and spongiosa, which are associated with blood supply systems i.e. coronary and sinusoidal circulation. We analyzed the ventricular end-diastolic pressure-volume relationships in rat and frog heart that include integrated expression of chamber geometry and passive material properties of myocardial wall. Frog spongy ventricles showed higher expandability than rat left ventricles composed of compact myocardium. To assess how left ventricular geometry is regulated in heart failure, we generated an animal model of inducible and cardiac specific over-expression of Na^+/Ca^{2+} exchanger (NCX1) which is up-regulated in failing cardiac myocyte. We found that NCX1 over-expressing mice developed concentric hypertrophy with relaxation abnormality.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総 計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：心臓生理学、冠循環、生体医工学
科研費の分科・細目：人間医工学
キーワード：収縮能、拡張能、冠循環、心肥大、Ca トランスポータ、

１．研究開始当初の背景

心臓は全身を繋ぐ血液循環システムの中核であり、そのポンプ機能は生体としての恒常性を支えている。生物進化の結果、哺乳類は恒温性や胎生などの特徴を獲得してきたが、エネルギー消費の多いシステムの実現には高い心臓ポンプ機能を持つ循環システムが必要である。ヒトにおける最大の特徴は発達した脳であるが、10 秒の心停止でも意識を消失してしまう程、高度に発達した中枢神経系は高出力且つ確実な循環系のサポートが前提となっている。

心臓の血液ポンプとしての機能は、収縮能と拡張能に区分される。これらには心室を構成する心筋細胞の機械特性だけでは無く、心筋の配列、つまり心室形態が重要な因子とな

る。臨床的にも心不全は収縮不全と拡張不全に大別されているが、心筋細胞の肥大に関する研究が進む一方で心室形態制御のメカズムに関する知見は殆どない。そこで心室形態を規定する因子として心臓に血液を供給する冠循環に注目した。冠循環は脊椎動物に遍く認められるシステムでは無く、両生類や活動性の低い魚類では心室内腔から直接血液を供給されている。生物進化の過程で哺乳類に先行した魚類、両生類、爬虫類が、心房・心室や肺循環の形態を変化させてきたことは良く知られているが、冠循環と心臓形態にはどのような関係があるのかはあきらかになっていない。

また、心臓は高血圧など、機械的負荷に対して心筋量を増加させると共に心室の形態も変化させて適応することが知られている。機械的負荷にも大別して圧力負荷と容量負荷があり、圧力負荷は高い動脈圧に対して血液を拍出する状態で、容量負荷は多量の血液を拍出する状態である。圧力負荷に対応した求心的変化は、壁厚を増加させ心室内径を減少させせることで高い圧力発生に有利な形態である。一方、容量負荷に対応した遠心的変化は、心室内径を増加させ一回の収縮で多量の血液を拍出するのに有利である。スポーツ心臓は過大な機械的負荷に対して適応した状態であるが、ウェイトリフティングの選手とマラソン選手の心臓がそれぞれ圧力負荷と容量負荷に該当する。このような制御がどのようなメカニズムで行われているかが明らかになれば心不全治療へも貢献する事が出来るが、その分子基盤は不明である。

基礎医学的な知見を臨床へフィードバックするためには、評価系の確立も欠かせない要素となる。心不全においては、様々な原因による収縮力の低下は臨床的に用いられる指標によって比較的鋭敏に検出されるが、拡張能の低下に関しては診断基準が明らかでなく、判断が困難である。近年精度向上の著しい超音波機器による心室容積計測を心臓拡張機能の可変弾性モデルによる解析に応用し、心室拡張のメカニクスに関する知見を得ることができれば、拡張機能障害の性格な病態生理の把握が可能になる。

２．研究の目的

心臓収縮機能評価の指標は数多く提唱されているが、心筋量や心室形態の変化を情報として含む指標としては最大弾性率(Elastance max: Emax)が適している。心臓の前負荷（循環血漿量）・後負荷（血管抵抗）に依存しない指標として世界的に認知されている。ここでは心室を弾性（バネ定数）の変化する袋と考え、収縮期末における圧-容積関係(ESPVR)の傾きを心臓の収縮性・最大弾性率(Emax)として評価に用いる（図１上参照）。この概念では心筋量の少ないラットの心室は、短いバネに相当するため、心室の単位容積増加に対する圧力増加が大きく現れているのである（図 1 下参照）。この可変弾性モデルの概念は心臓エネルギー学にも繋がり大きな研究成果を納めた一方、弾性体としての心室拡張機能に関しては着目されて来なかったが、本研究では主にこの指標を用いて解析し、正確な心機能評価の把握を目指した。

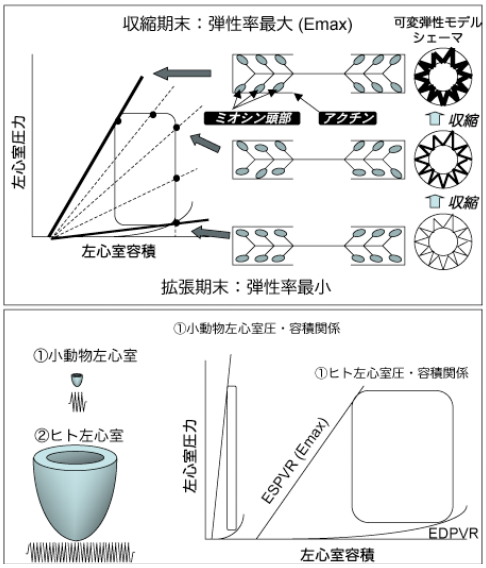


図 1：可変弾性モデルによる心臓の収縮・弛緩特性の表現

具体的には 1)冠循環心臓と非冠循環心臓の機械特性の比較、2)心不全時に発現が増加する Ca^{2+}トランスポータ：NCX1 の強発現モデルマウスの解析、3)三次元超音波法を用いた可変弾性モデルを用いたヒト左心室の収縮能および拡張能の定量的評価の確立、である。

３．研究の方法

1) 冠循環心臓と非冠循環心臓の機械特性の比較では、ランゲンドルフ灌流を用いてラットおよびウシガエルの心室圧-容積関係を検討した。また、心室壁構造の要素を除外するために乳頭筋での長さ-張力関係も計測し、それぞれ心筋重量で正規化することで弾性率を評価した。

2) NCX1 強発現モデルマウスの解析ではドキシサイクリン(DOX)投与により心筋細胞のみに NCX1 を強制発現させて超音波による機能評価を行った。

3) ヒト左心室の収縮能および拡張能の定量的評価の確立では左心室圧と容積曲線を同時に記録し、圧-容積ループを描くために左心室内にピッグテールカテーテルを挿入し、同時に経胸壁的に三次元心臓超音波法による心室容積および心筋容積の計測を行った。

４．研究成果

1) 冠循環心臓と非冠循環心臓の機械特性

ラットの冠微小循環とカエルの心室洞様構造を比較すると、冠循環を持たないカエルの心臓では拡張期の低圧時に心室壁に血液を供給する必要があるため冠毛細血管に比べて大きな溝構造を有していた。(図２上段)

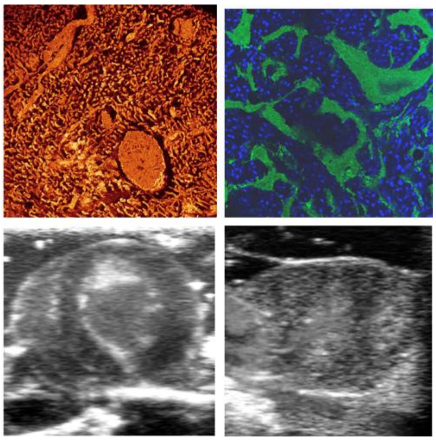


図２：ラットおよびカエルの心臓血液供給路
上段左：ラット冠微小血管、上段右：カエル心室内洞様構造（緑）青色は心筋細胞の核。下図はそれぞれの超音波像。

カエルの洞様構造は心室壁の伸展に伴って変形が容易であり、心室圧の上昇を容積の増加によって緩衝していると考えられた。これは高い拡張能として心室圧-容積関係として表された。(図３上）また、心筋細胞の配列による洞様構造だけでなく、心筋そのものの機械特性を評価するために心筋細胞が整に配置される乳頭筋でも張力-長さ関係を評価した。(図３下)

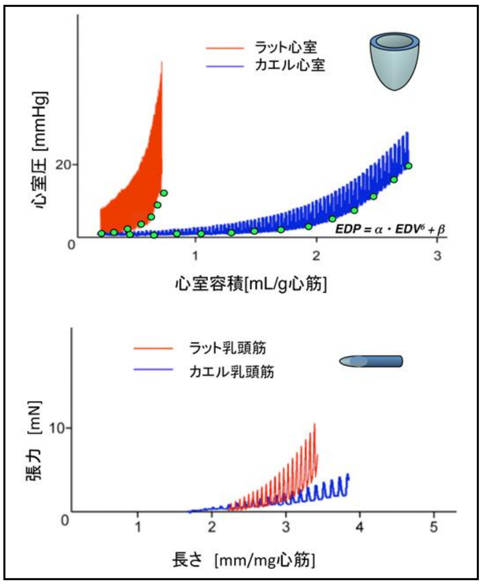


図３：心筋量で補正したラットおよびカエル心室圧−容積関係（上段）と乳頭筋張力−長さ関係（下段）
カエルの非冠循環心臓は拡張性が高く、ラットの冠循環心臓は低い拡張能と高い収縮能が認められる。

心室重量は同程度であったが､心室が 10 mmHg の圧力の時の容積はラットが 0.6 mL/g 心筋、カエルが 2.5 mL/g 心筋であった。拡張能を定量評価するために、

$EDP = \alpha \cdot EDV^6 + \beta$　（EDP は拡張期末圧、EDV は拡張期末容積、α、βはパラメータ）の式でカーブフィッティングした。また、心筋弛緩能を評価するために等容性弛緩期の圧下降の時定数をロジスティック関数によるカーブフィッティングより求めた。(図４)

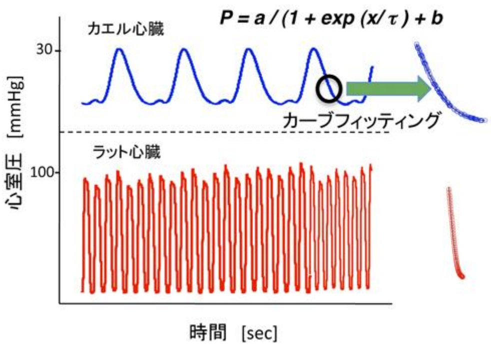


図４：カエル、ラットの心室内圧と下降脚カーブフィッティングによる弛緩能評価

これらの結果を表１に示す。心筋重量で正規化した拡張期末圧−容積関係は、ラット、カエルにおいて心室の拡張性を表すα値で 0.7 と 349 と有意な差があった。弛緩能を表す時定数τはそれぞれ 15 と 209 秒であり、弛緩能に関してはラットの冠循環心臓の方が有意に高かった。

	ラット冠循環心臓	カエル非冠循環心臓
拡張性：α	0.677 ± 0.120	349 ± 39 *
弛緩：τ (msec)	15 ± 3	209 ± 31 *

表１：ラットおよびカエルの心臓拡張性：拡張期末圧容積関係におけるαと弛緩能：心室圧下降脚のカーブフィッティングによる時定数τ。n=3, *$P < 0.01$ vs Rat heart

ラット心筋は興奮収縮連関における Ca^{2+}を筋小胞体から供給しているのに対し、カエル心筋は細胞質からの排出を Na^{+}-Ca^{2+}交換体に大きく依存しており弛緩能が低い原因であると考えられる。カエルは心室内腔から直接血液を供給されており、心拍数が高くなると血液交換に障害が生じる。冠循環心臓は動脈から毛細管、静脈と一方向に血液を送り、しかも大動脈の高い圧で駆動するためにラットのように頻拍でも血液供給が可能になっていると考えられた。

2) NCX1 強発現モデルマウスの解析

臨床的に肥大心あるいは不全心では Ca^{2+}トランスポータである NCX1 の発現量が増加していることが報告されている。そこで NCX1 増加が何らかの適応反応を司っている

のではないかと考え、ドキシサイクリン(DOX)注射により心筋細胞のみに NCX1 を強発現させる遺伝子操作マウスを作成した。２週間の DOX 投与により心体重比はほぼ２倍となり、著明な心肥大を示した。(図 5)

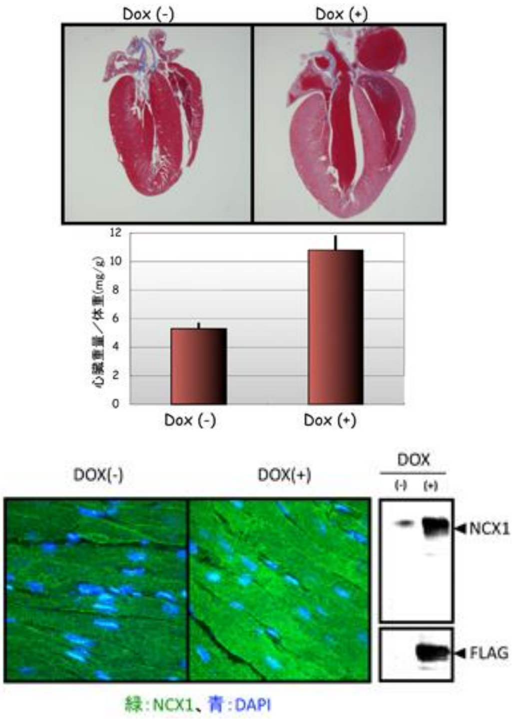


図５：DOX 投与による NCX1 強発現心臓（上段）と NCX1 による心筋の免疫染色像。マッソントリクローム染色では繊維化を認めない。

心臓超音波検査では、DOX(+)群で左心室壁の肥厚を認めた。収縮性を表す駆出率には差を認めず、左心室流入血流波形にて流入最高速度の低下と減衰時間の延長を認め、拡張能の低下が示唆された。過度な機械的負荷が無い状態での NCX1 強発現に対する心室形態の変化としては求心性肥大が認められた。

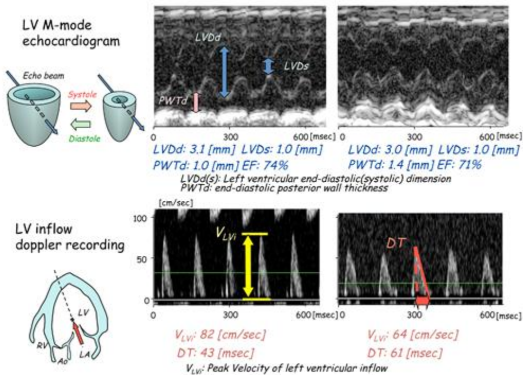
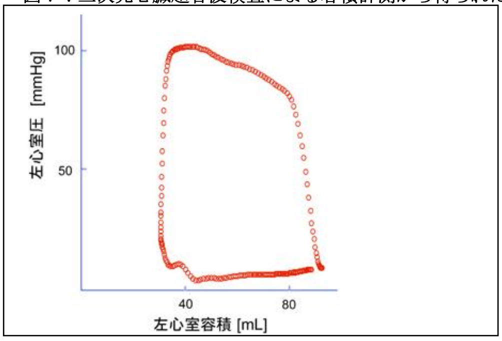


図６：心臓超音波による DOX 投与による心機能変化の評価 NCX1 強発現（右）では、駆出率は保たれていたが、左心室への流入血液速度が低下し、減衰時間が延長していた。

3) 左心室の収縮能及び拡張能の定量的評価

左心室カテーテル検査時に経胸壁超音波検査を行い、左心室圧−容積ループを求める事が出来た。（図７）下大静脈閉塞による左心室前負荷低下により収縮期末圧容積関係および拡張期末圧容積関係は技術的な問題により得られず今後の課題であるが、コンダクタンスカテーテルなどを用いずに三次元超音波検査により心室筋の容積を計測することが可能であることを確認出来た。

図７：三次元心臓超音波検査による容積計測から得られた左



心室圧−容積ループ

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８件）

①Yamada A, Mohri S, Nakamura M, Naruse K. Optimizing the conditions for pH measurement with an automated pH measurement system using a flow-through-type differential sensor probe consisting of pH-FETs. Journal of Robotics and Mechatronics, 22(2), pp. 197-203, 2010（査読有）

②Yamada A, Mohri S, Nakamura M, and Naruse K. A fully automated pH measurement system for 96-well microplates using a semiconductor-based pH sensor. “Sensors & actuators: B. Chemical., 143(2), pp. 464-469, 2010（査読有）

③Hashimoto K, Kataoka N, Nakamura E, Okamoto T, Kanouchi H, Minatogawa Y, Mohri S, Tsujioka K and Kajiya F. An Experimental Model for Studying Molecular Behavior of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 during Mechanical Interactions between Monocytes and Vascular Endothelial Cells, Journal of Biomechanical Science and Engineering, 5(4):281-290, 2010.（査読有）

④Fujino H, Ishihara A, Murakami S, Yasuhara T, Kondo H, Mohri S, Takeda I, Roy RR.Protective effects of exercise preconditioning on hindlimb unloading-induced atrophy of rat soleus muscle. Acta Physiol (Oxf). 2009 Sep;197(1):65-74. （査読有）

⑤Suemori T, Morimatsu H, Mizobuchi S, Morita K, Katanosaka Y, Mohri S, Naruse K. Impairment of leukocyte deformability in patients undergoing esophagectomy. Clin Hemorheol Microcirc. 2009;41(2):127-36. （査読有）

⑥Shimizu J, Mohri S, Ito H, Takaki M and Suga H. Mode of frequency distribution of external work efficiency of arrhythmic beats during atrial fibrillation remains normal in canine heart. J Physiol Sci, 2009, 59(1):75-80. （査読有）

⑦Yamada A, Katanosaka Y, Mohri S, Naruse K. A rapid microfluidic switching system for analysis at the single cellular level. IEEE Trans Nanobioscience. 2009 Dec;8(4):306-11. （査読有）

⑧Mohri S, Yamada A, Goda N, Naruse K, Kajiya F. Application of a flow-through type pH/CO_2 sensor system based on ISFET to evaluation of the glucose dependency of the metabolic pathways in cultured cells. Sensors and Actuators B: Chemical, 2008, Vol. 134, No. 2, 447-50（査読有）

〔学会発表〕（計 14 件）

①橋本 謙，片岡則之，辻岡克彦，梶谷文彦，毛利 聡．単球の内皮下浸潤により誘発される内皮細胞間隙分子の変化が次の単球浸潤を促進する．第 62 回日本生理学会中国四国地方会（2010.11.20-21，出雲）抄録集 p13

②橋本 謙，片岡則之，毛利 聡，辻岡克彦，梶谷文彦．単球の内皮下浸潤によって誘発される次の単球浸潤の促進．（第 25 回生体・生理工学シンポジウム, The 25th Symposium on Biological and Physiological Engineering，2010.9.23-25（岡山），オーガナイズドセッション「生体機能計測の新展開」，論文集, pp. 469-470

③橋本 謙，片岡則之，毛利 聡，辻岡克彦，梶谷文彦．動脈硬化における単球及び血管内皮細胞のダイナミクスー培養細胞を用いたバイオイメージングー（In vitro bioimaging of monocyte trans-endothelial migration in early atherogenesis)，バイオイメージング，Vol. 19 (2) [第 19 回日本バイオイメージング学会学術集会要旨集］p84-85，2010.9.9-11（横浜，シンポジウム）

④Ken Hashimoto, Noriyuki Kataoka, Emi Nakamura, Kimiko Hagihara, Takeaki Okamoto, Hiroaki Kanouchi, Yohsuke Minatogawa, Satoshi Mohri, Katsuhiko Tsujioka, and Fumihiko Kajiya. Monocyte trans-endothelial migration induces PECAM-1 accumulation and VE-cadherin reduction at the surface of vascular endothelial cells. (6th World Congress on Biomechanics, Singapore Suntec Convention Centre, 1 - 6 August 2010, abstract p148)

⑤Katanosaka Y, Mohri S, Naruse K. The temporal expression of TRPV2 improved in the myogenic differenciation of skeletal myoblast. XII International Congress on Neuromuscular Diseases. Naples, Italy 2010 July 17-22

⑥片岡則之, 橋本　謙, 毛利　聡, 梶谷文彦. Experimental Model for Studying Molecular Behavior in Endothelial Cells during Interaction with Monocytes. 第 49 回日本生体医工学会大会（2010.6.25-27，大阪，シンポジウム「細胞バイオメカニクスの新しい展開」，プログラム・抄録集 p. 219、CD-ROM S-10-4

⑦Katanosaka Y, Mohri S, Naruse K. The generation of a novel animal of inducible hypertrophy: Overexpression of NCX1 in the murine heart using the doxycycline-dependent promoter. Gordon Research Conference Colby-Sawyer College, New London, NH June 6-11

⑧橋本 謙，片岡則之，毛利 聡，梶谷文彦．細胞間隙を介する単球の浸潤により誘発される内皮細胞 PECAM-1 の浸潤部位への持続的集積．第 22 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集 p216，2010.1.9-10（岡山）

⑨Katanosaka Y, Iwasaki K, Mohri S, Naruse K. The generation of a novel animal model of inducible hypertrophy 54th Annual Meeting of The Biophysical Society's San Francisco, CA Feb. 18-22, 2010

⑩毛利　聡　X線位相差CTによる水晶体タンパク濃度勾配の可視化法開発と眼科領域疾患の病態生理解明への応用　SPring-8 重点メディカルバイオ領域課題　成果報告会　2010年3月15日　神戸　臨床研究情報センター

⑪ Noriyuki Kataoka, Ken Hashimoto, Satoshi Mohri, Fumihiko Kajiya. Role of dynamic recruitment of Endothelial PECAM-1 to Transmigrating Monocytes.（浸潤する単球への内皮細胞 PECAM-１の局所集積）. 生物物理，Vol49, Suppl.1, S-57, 2009（第 47 回日本生物物理学会，2009.10.30-11.1，徳島）

⑫Hashimoto K, Kataoka N, Nakamura E, Hagihara K, Okamoto T, Kanouchi H, Minatogawa Y, Mohri S, Tsujioka K, Kajiya F. Monocyte invasion induces redistribution and subsequent accumulation of endothelial PECAM-1 during para-, but not trans-cellular migration. J. Physiol. Sci. 59 (Suppl. 1), p324, 2009（36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009)，第86回日本生理学会大会，2009.7.27-8.1，京都）

⑬橋本 謙，片岡則之，中村恵美，萩原喜美子，毛利 聡，辻岡克彦，梶谷文彦．細胞間隙を通る単球の浸潤により誘発される内皮細胞PECAM-1の再配置及び浸潤後の持続的集積．生体医工学　Vol.47, Suppl.1, p331, 2009.（第 48 回日本生体医工学会大会，2009.4.23～25，東京，CD-ROM）

⑭Mohri S. Diastolic mechanical properties of vascular and avascular hearts 53rd Annual Meeting of Biophysical Society Boston, MA, Feb. 28-Mar. 4, 2009

〔産業財産権〕
○取得状況（計2件）
名称：pHまたは濃度の測定装置及びpHまたは濃度の測定方法
発明者：山田章、中村通宏、毛利聡、成瀬恵治
権利者：国立大学法人　岡山大学
種類：特許
番号：2009-194304
取得年月日：平成22年2月12日
国内外の別：国内

名称：pH測定装置及びpH測定方法
発明者：毛利聡、清水壽一郎、中村通宏、梶谷文彦
権利者：国立大学法人　岡山大学
種類：特許
番号：2004-319762
取得年月日：平成22年11月19日
国内外の別：国内

６．研究組織
(1)研究代表者
毛利　聡（MOHRI SATOSHI）
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：00294413

(2)研究分担者
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

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

中村　一文（NAKAMURA KAZUFUMI）
岡山大学・医歯（薬）学総合研究科・講師
研究者番号：10335630

宮坂　武寛（MIYASAKA TAKEHIRO）
姫路獨協大学・保健医療学部・教授
研究者番号：60308195

入部　源太郎（IRIBE　GENNTAROU）
岡山大学・医歯（薬）学総合研究科・助教
研究者番号：90284885

(3)連携研究者
橋本　謙(HASHIMOTO KEN)
研究者番号：80341080
川崎医科大学・医学部・講師