

平成 22 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890233
 研究課題名（和文）イメージングによる心筋虚血再灌流障害とナトリウム・カルシウム交換機構の役割の解明
 研究課題名（英文）Fluorescence imaging analysis of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger dynamics in myocardial ischemia reperfusion injury
 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）：本研究では $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構(NCX)とミトコンドリアの観点から、心筋虚血-再灌流障害の機序を解明することを目的とした。細胞膜とミトコンドリアの各NCXの選択的阻害薬等を用いた薬理学的手法に加え、生細胞内の事象を捉える蛍光イメージング技術を適用して検討した結果、心筋虚血-再灌流障害時には、ミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度の上昇を防ぐために、ミトコンドリア上のNCXに作用せずに、細胞膜上のNCXを選択的に抑制する薬物が心保護薬として有用であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：I studied the regulation of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) and mitochondrial dynamics during ischemia-reperfusion in the heart. I concluded that a selective inhibition of plasmalemmal NCX but not mitochondrial NCX appears to be a promising therapeutic strategy for myocardial ischemia-reperfusion injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬理学一般

キーワード：心筋、虚血再灌流障害、ナトリウム・カルシウム交換機構、イメージング、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

(1) 狭心症や心筋梗塞として知られる虚血性心疾患は、生活習慣病が基礎疾患となるため、患者数は増加の一途をたどっている。この心

臓の虚血-再灌流障害に対し、心筋障害の結果を組織レベルで評価する研究が数多くなされているが細胞内事象を観察し細胞障害機序に踏み込んだ研究は少ない。また治療薬

候補の探索も数多くなされているが、心筋保護効果を示す化合物のほとんどが心収縮力を減少させる作用を有している。

(2) 申請者は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) 阻害薬 SEA0400 が、正常および虚血心筋の収縮力や活動電位に影響を与えずに再灌流時の収縮の回復を著明に増大させるという画期的な心保護作用を示すことを発見した。このとき虚血-再灌流障害時に起こるNCXを介した Ca^{2+} 過負荷が抑制されており、ミトコンドリアのATP合成能が保持されていることが明らかになった。以上の結果から、細胞膜のNCXを抑制してミトコンドリアを保護することが、薬理的に心筋を保護する有効な手段なのではないかという仮説に至った。しかし以下の点が未解決である。

- ①ミトコンドリアの内膜上にもNCXの存在が報告されており、ミトコンドリアの Ca^{2+} 制御に関与している可能性が考えられるが、未だその役割は不明な点が多い。
- ②虚血時に細胞膜NCXを介して細胞内に流入してきた Ca^{2+} がミトコンドリアにどのように障害を与えるのかは明らかではない。

2. 研究の目的

細胞膜とミトコンドリアの $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構に対する選択的阻害薬等を用いた薬理学的手法に加え、機能を保った生細胞を高い空間分解能で観察・解析することのできる蛍光イメージング法によりミトコンドリア機能障害時の様々な変化を同時に観測し、それらの因果関係を明らかにすることで、心筋虚血-再灌流障害機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア移行性 Ca^{2+} 蛍光タンパク (Yellow Cameleon) を導入した心筋培養細胞 (H9c2 細胞) の細胞膜をジギトニンで透過性にし、ミトコンドリア外液のイオン濃度 (Na^+ , Ca^{2+} , H^+ 等) を変化させ、そのときのミトコンドリアの Ca^{2+} 動態を観測する。さらにミトコンドリア $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) 選択

的阻害薬CGP-37157 の作用を検討する。

(2) 細胞質とミトコンドリア移行性 Ca^{2+} 蛍光プローブを導入し、それぞれの Ca^{2+} 動態を分離して測定できるようにしたintactな (細胞膜を保持した) 心筋細胞を実験的虚血-再灌流条件下に置き、細胞質内およびミトコンドリア内 Ca^{2+} 過負荷とそれに対する細胞質およびミトコンドリアNCX選択的阻害薬の作用を検討する。 Ca^{2+} 過負荷以外にも心筋細胞収縮の回復や不整拍動などを指標にし、障害の程度を検出する。

(3) 虚血時に細胞膜NCXを介して細胞内に流入してきた Ca^{2+} がミトコンドリアにどのように障害を与えるのかを明らかにするため、ミトコンドリア膜電位やフラボプロテイン自家といったミトコンドリア機能を評価するイメージング法を心筋の虚血-再灌流障害に応用する。その際各NCX選択的阻害薬やその他のチャンネルやトランスポーターの阻害薬を適用し、ミトコンドリア機能障害のメカニズム解明と、薬物によるミトコンドリア保護作用の検討を行う。

4. 研究成果

(1) イオン環境に応じたミトコンドリア $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) の回転方向の基礎的検討を行い、心筋虚血-再灌流障害時における細胞膜およびミトコンドリアNCXの役割の解明を目指した。単離心筋細胞の細胞膜を透過性にする技術によってミトコンドリア外液の環境を制御し、ミトコンドリアの活性を画像化によって検出する系を構築した。この系に脱共役剤のFCCPを適用した結果、虚血時ではミトコンドリア内に Ca^{2+} が流入することによってミトコンドリアの膜電位が消失し、ATP合成能が低下することが明らかになった。さらに外液 Ca^{2+} 濃度を変化させることで、ミトコンドリアでは正常時および虚血時ともに Ca^{2+} ユニポーターを介して Ca^{2+} が流入し、NCXを介して Ca^{2+} が排出されることを見出した。

(2) 単離モルモット心室筋細胞のミトコンドリア膜電位について高速走査型共焦点顕微鏡、落射蛍光顕微鏡を用いてミリ秒単位の速いオシレーションを観察するとともにCa²⁺動態、電子伝達系との関連を検討した。

① 単離心室筋細胞に、ミトコンドリア膜電位プローブのTMREを導入し、虚血時のミトコンドリア膜電位を測定した。その結果、虚血時に膜電位のオシレーションが見られる細胞があり、このオシレーションは細胞質内Ca²⁺濃度の上昇と共に不可逆的な脱分極状態で終了した。しかし膜電位オシレーションはCa²⁺ free栄養液中においては観測されなかった。

② ミトコンドリア膜電位と細胞質内Ca²⁺濃度を同時測定したところ、両輝度に逆相関性が見られた。すなわち先行する細胞質内Ca²⁺濃度の上昇をきっかけに膜電位が脱分極していることが判明した。

③ 電子伝達系の活動の指標として、酸化還元状態を反映するNADHやFAD、FMN等の自家蛍光を測定した結果、この自家蛍光にもオシレーションが観測される細胞があった。そこでミトコンドリア膜電位と同時測定したところ、その両輝度におおまかな相関性が見られることがあり、膜電位は電子伝達系の瞬間的な活性の後に毎回脱分極することが読み取れた。

以上の結果より、虚血時に見られたミトコンドリアの膜電位オシレーションにはCa²⁺の存在が不可欠であり、ミトコンドリアと細胞質間でCa²⁺の移動があることが示唆された。虚血再灌流時において、ミトコンドリア膜電位オシレーションのきっかけとなる細胞質、およびミトコンドリア内のCa²⁺濃度の上昇を防ぐことは、ミトコンドリアを介する心保護に重要だと考えられる。またミトコンドリア内のCa²⁺濃度の上昇を防ぐためには、ミトコンドリア上のNa⁺/Ca²⁺交換機構に作用せずに、細胞膜上のNa⁺/Ca²⁺交換機構を選択的に抑制する薬物が心保護薬として有用であることが明らかになった。

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7件)

① Iyuki Namekata, Yayoi Tsuneoka, Akira Takahara, Hideaki Shimada, Takahiko Sugimoto, Kiyoshi Takeda, Midori Nagaharu, Koki Shigenobu, Toru Kawanishi, Hikaru Tanaka.

Involvement of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the automaticity of guinea-pig pulmonary vein myocardium as revealed by SEA0400.

J. Pharmacol. Sci. 110(1): 111-116. 2009
査読有り

② Hikaru Tanaka, Iyuki Namekata, Hideaki Nouchi, Koki Shigenobu, Toru Kawanishi, Akira Takahara.

New aspects for the treatment of cardiac diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: diversity in the excitation-contraction mechanisms of the heart.

J. Pharmacol. Sci. 109(3):327-333. 2009
査読有り

③ Iyuki Namekata, Shinpei Fujiki, Yuko Kawakami, Rina Moriwaki, Kentaro Takeda, Toru Kawanishi, Akira Takahara, Koki Shigenobu, Hikaru Tanaka.

Intracellular mechanisms and receptor types for endothelin-1-induced positive and negative inotropy in mouse ventricular myocardium.

Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol. 376(6):385-395. 2008 査読有り

④ Hikaru Tanaka, Chisa Komikado, Iyuki Namekata, Hideki Nakamura, Mariko Suzuki, Yayoi Tsuneoka, Koki Shigenobu, Akira Takahara. Species difference in the contribution of T-type calcium current to cardiac pacemaking as revealed by

R(-)-efonidipine. J. Pharmacol. Sci.
107(1):99-102. 2008 査読有り

研究者番号：40124383

[学会発表] (計 27 件)

①Namekata Iyuki

Electrophysiological and pharmacological
properties of the isolated guinea-pig
pulmonary vein myocardium

The 36th Congress of the International
Union of Physiological Sciences
(IUPS2009). 2009年7月28日 京都

②行方衣由紀 モルモット肺静脈心筋に
おける自発的電気活動の発生機序：選択的
Na⁺/Ca²⁺交換機構阻害薬SEA0400 を用いた検
討 第18回日本循環薬理学会
2008年11月21日 千葉

[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