

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19500357
 研究課題名（和文） 心筋変異トロポニン T が収縮と細胞内 Ca²⁺調節障害を誘起する分子機序
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of contractile dysfunction and the alteration of intracellular Ca²⁺ handling caused by mutation of cardiac troponin T
 研究代表者
 栗原 敏（KURIHARA SATOSHI）
 東京慈恵会医科大学・医学部・教授
 研究者番号：90057026

研究成果の概要（和文）：心筋変異トロポニン T（TnT）が拡張型心筋症の発症及び突然死を招来するメカニズムを細胞内 Ca²⁺調節障害との関係から調べた。変異 TnT を導入した遺伝子改変マウスはヒトと同様の拡張型心筋症を発症し、生後まもなく突然死することが明らかになった。変異 TnT 導入マウス心筋では収縮障害と細胞内 Ca²⁺調節障害が起こり、Ca²⁺感受性が低下した。アンギオテンシン II 受

容体阻害薬（ARB）は、突然死率を低下させ心機能を改善したが、Ca²⁺感受性は改善されなかった。ARB は心筋組織の線維化と心電図異常を改善し、これらが突然死率の低下と心機能の改善に重要な役割を果たしていることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：We explored the mechanism of pathogenesis and sudden death in dilated cardiomyopathy using knock-in mouse model with mutant troponin T (DCM mouse). DCM mouse died suddenly from age of 1 month old. In DCM mouse, cardiac chamber was dilated and contractile functions were impaired. A blocker of angiotensin II receptor (ARB) significantly increased survival rate and improved the cardiac functions without changing the decreased Ca²⁺ sensitivity in DCM mouse. ARB also improved the fibrosis and electrocardiogram, which were considered as critical for the beneficial effects of ARB.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：心筋、トロポニン T、Ca²⁺感受性、アンジオテンシン II 受容体、Ca²⁺

1. 研究開始当初の背景

心筋の収縮・弛緩は細胞内 Ca イオン (Ca²⁺) が Ca²⁺受容蛋白トロポニン (Tn) と結合・解離することで調節されている。我々はこれまで温血動物心筋の細胞内 Ca²⁺ transient と収縮の関係、筋小胞体を中心とした細胞内 Ca²⁺ ハンドリングを Ca²⁺指示薬を使って研究してきた。また、心筋の Ca²⁺電流と収縮調節に主要な役割を担っている自律神経伝達物質による調節機序の細胞内メカニズムを分子レベルで研究してきた。最近、心筋の収縮不全に関する研究が進み、これまで注目されてきた細胞内 Ca²⁺調節の中心的役割を担っている筋小胞体だけではなく、収縮調節蛋白トロポニン (Tn) のサブユニット TnT のアミノ酸点変異が重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。

2. 研究の目的

共同研究者の森本らにより、ヒトの家族性拡張型心筋症の原因遺伝子変異である TnT の点変異 ($\Delta K210$) を、遺伝子操作により、正常 TnT 遺伝子を破壊した後に導入したノックインマウスが作成された。このモデルマウス (DCM マウス) は、ヒトと同様に拡張型心筋症を発症し、多くの個体が明らかな心不全を発症する前に突然死することが明らかになった。DCM マウス心筋では収縮蛋白系の Ca²⁺感受性は低下しているが、分子レベルにおける突然死との因果関係は明らかでない。我々は、Ca²⁺感受性低下が収縮障害だけではなく、細胞内 Ca²⁺調節機構の破綻をも誘起し、それが致死性不整脈を発生させるという仮説を立て研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 心エコーによる生体内心機能評価

アロカ社製 SSD-500 を使用し、13MHz プロブにて心機能評価を行った。B-mode での評価と共に、M-mode 測定下に、左室拡張末期径、収縮末期径、駆出率及び内径短縮率などを計測した。

(2) 左室乳頭筋にエクオリン法を適用した細胞内 Ca²⁺ transient と収縮張力の同時測定

左室乳頭筋を摘出して、表層細胞内に Ca²⁺感受性発光蛋白エクオリンを圧注入して、光信号 (Ca²⁺ transient) と張力を同時測定した。

(3) 心室筋細束をトリトン処理したスキンド

標本を用いた pCa-張力関係の測定

左室から摘出した細い肉柱を弛緩液中でトリトン処理し、細胞膜を全て破壊して収縮蛋白系を温存したスキンド標本を作成し、溶液中の Ca²⁺濃度を変化させ pCa-張力関係を測定した。この関係を用いて収縮蛋白系の Ca²⁺感受性を評価した。

(4) 組織標本を用いた心筋線維化の評価

開胸下に心尖部より穿刺を行い、ホルマリンによる灌流固定を行った。その後、左室心筋切片を作成し、H-E 染色による形態評価と共に、Masson's trichrome 染色法によって心筋の線維化を評価した。

(5) Western immunoblotting 法を用いた心筋組織 BNP 発現量の評価

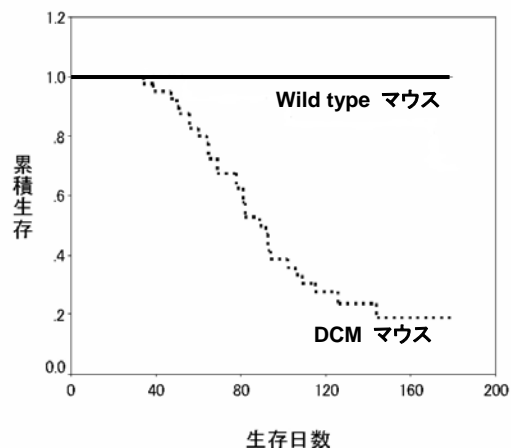
心室凍結標本を用いて、蛋白質を抽出し、BNP 特異抗体による Western immunoblotting を行い、心筋組織内の BNP 量を定量評価した。

(6) テレメトリーシステムを用いた心電図モニター

マウスにイソフルレンによる吸入麻酔を行い、皮下にテレメトリーシステムを装着する。自由行動下の心電図波形 (第 II 誘導相当) を記録し解析した。

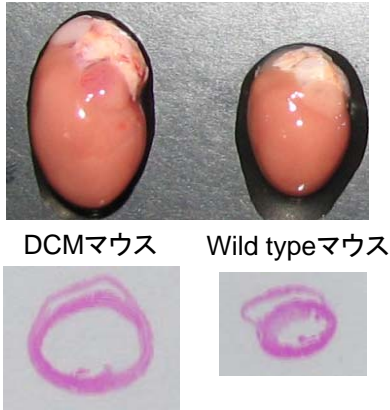
(7) アンジオテンシン受容体拮抗薬による効果の検討

DCM マウスの病態におけるレニン・アンジオテンシン系の関与について検討するため、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬であるカンデサルタンを経口投与し、上記項目を評価し



(2) DCM マウス心臓の肉眼所見

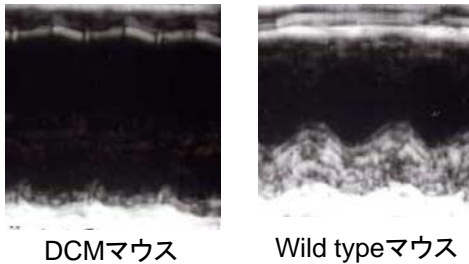
8 週令のマウス心臓の肉眼所見を示す。Wild type マウス (WT) に比し、DCM マウス (DCM) 心臓は明らかに大きく、心重量も有意に増加していた。H-E 染色による組織標本においても、左室内腔の著明な拡大所見が認められた。



DCMマウス Wild typeマウス

(3) 心エコーによる生体内心機能評価

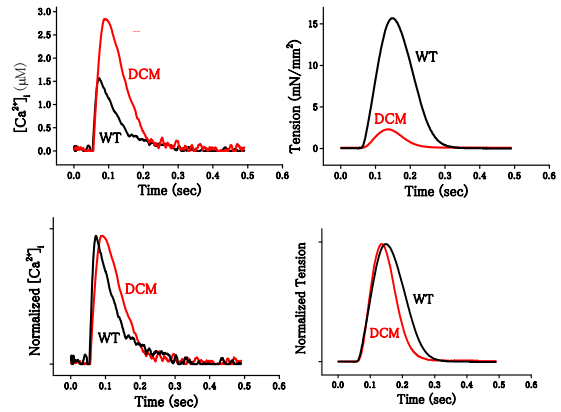
M モードのトレースより、DCM マウス心において、左室内腔の著明な拡大、及び心機能の低下が認められた。左室拡張末期径及び収縮末期径は有意に拡大していた。また、左室駆出率及び内径短縮率は有意に低下しており、定量的にも DCM マウスにおける低左心機能が証明された。



DCMマウス Wild typeマウス

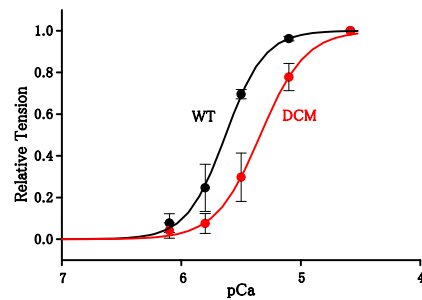
(4) エクオリン法による細胞内 Ca^{2+} transient と収縮張力の評価

DCM マウス心筋 (DCM) では、wild type マウス心筋 (WT) に比し、細胞内 Ca^{2+} transient の増大が認められたが (上段左)、収縮張力は著しく低下していた (上段右)。ピークを揃えて時間経過を比較したところ、DCM マウスにおいて細胞内 Ca^{2+} transient の時間経過は延長しており (下段左)、一方で収縮張力の時間経過は短縮していた (下段右)。



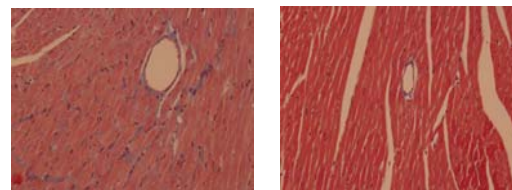
(5) トリトン処理スキンド標本による pCa-張力関係の評価

Wild type マウス心筋 (WT) において、pCa-張力関係は下図のように S 字状曲線を呈するが、DCM マウス心筋 (DCM) ではこの曲線が右方に偏位しており、DCM では収縮蛋白系の Ca^{2+} 感受性が低下していることが示された。



(6) Masson's trichrome 染色を用いた心筋線維化の評価

DCM マウス左心室筋標本において、心筋組織内線維化が有意に進行しており、特に血管周囲の線維化の亢進が顕著であった。

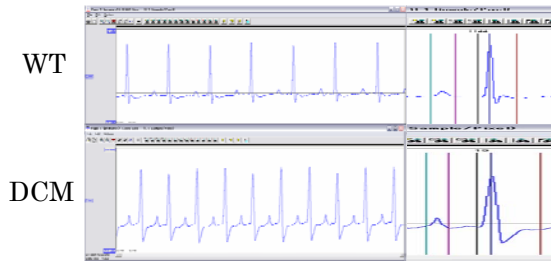


DCMマウス Wild typeマウス

(7) Western immunoblotting による心筋組織内 BNP 発現の評価

DCM マウス心筋組織では、BNP 蛋白質の発現量は有意に増加しており、心不全状態であると推測された。

(8) テレメトリーシステムによる心電図評価
測定した心電図について、種々のパラメータを比較検討したところ、QRS幅とQT時間がDCMマウスで有意に延長しており、心筋興奮の再分極過程での異常が示唆された。



(9) DCMマウスに対するアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) 投与の効果

① Kaplan-Meier 法による生存率に関する検討

ARB投与によりDCMマウスの予後は著明に改善し、6ヶ月後も約60%のDCMマウスが生存していた。

② 心臓の外観に関する検討

ARB投与によってDCMマウス心臓の重量は有意に減少し、また組織所見においても左室内腔の縮小傾向が認められた。

③ 心エコーによる検討

心エコー上、ARB投与により拡大した左室の縮小傾向が認められ、左室駆出率も有意に改善していた。

④ 細胞内 Ca^{2+} transient と収縮張力の検討

DCMマウスにおいて増大した Ca^{2+} transient と減少した収縮張力は、ARB投与により改善しなかった。同様に Ca^{2+} transient と収縮張力の時間経過もARBの影響を受けなかった。

⑤ pCa-張力関係に関する検討

DCMマウスで著明に低下した収縮蛋白系 Ca^{2+} 感受性は、ARB投与によって改善されなかった。

⑥ 心筋線維化の評価

DCMマウスで増大した心筋組織内線維化は、ARB投与により著しく改善した。

⑦ 心筋組織内 BNP 発現の評価

DCMマウス心筋組織内で増加していたBNP発現量は、ARB投与により減少した。

⑧ 心電図評価

DCMマウスで有意に延長していたQRS幅とQT時間は、ARB投与により改善を認めた。

以上の結果より、ARB投与によりDCMマウスの予後は改善し、このメカニズムとして、心筋組織内線維化の改善と心電図所見の改善が重要であると考えられた。

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10件)

- ① Fukuda N, Terui T, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S, Titin and troponin : central players in the Frank-Starling mechanism of the heart. Current Cardiology Reviews, 査読有、5 (2), 2009, 119-124
- ② Mizuno J, Morita S, Otsuji M, Arita H, Hanaoka K, Robert E, Hirano S, Kusakari Y, Kurihara S, Half-logistic time constants as inotropic and lusitropic indices for four sequential phases of isometric tension curves in isolated rabbit and mouse papillary muscles. Int Heart J, 査読有、50(3), 2009, 389-404
- ③ Matsuba D, Terui T, O-Uchi J, Tanaka H, Ojima T, Otsuki I, Ishiwata, Kurihara S, Fukuda N, Protein kinase A-dependent modulation of Ca^{2+} sensitivity in cardiac and fast skeletal muscles after reconstitution with cardiac troponin, J Gen Physiol, 査読有、133(6), 2009, 571-581
- ④ Morimoto S, O-Uchi J, Kawai M, Hoshina T, Kusakari Y, Komukai K, Sasaki H, Hongo K, Kurihara S, Protein kinase A-dependent phosphorylation of ryanodine receptors increases Ca^{2+} leak in mouse heart, BBRC, 査読有、390, 2009, 87-92
- ⑤ 水野 樹、森田茂穂、大辻幹哉、花岡一雄、栗原 敏、左室圧、張力、筋細胞内カルシウムトランジェントのハイブリッド・ロジスティック関数を用いた波形解析による収縮弛緩過程の推定、臨床麻酔、査読有、33(9)、2009、1479-1488
- ⑥ O-Uchi J, Sasaki H, Morimoto S, Kusakari Y, Shinji H, Obata T, Hongo K, Komukai K, Kurihara S, Interaction of alpha1-adrenoceptor subtypes with different G proteins induces opposite effects on cardiac L-type Ca^{2+} channel,

Circ Res, 査読有、
102(11), 2008, 1378-1388

- ⑦ Fukuda N, Granzier HL, Ishiwata S, Kurihara S, Physiological functions of the giant elastic protein titin in mammalian striated muscle, J Physiol Sci, 査読有、58(3), 2008, 151-159

[学会発表] (計 13 件)

- ① Hongo K, Morimoto S, O-Uchi J, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Yoshimura M, Morimoto S, Ohtsuki I, Takeda N, Kurihara S, Renin-angiotensin system plays an important role in the pathogenesis of DCM in mouse, The XXXVI International Congress of Physiological Sciences, 2009 年 7 月 27~8 月 1 日、京都
- ② Komukai K, O-uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Yoshimura M, Kurihara S, Endothelin-1 potentiates L-type Ca^{2+} current by activating CaMKII in rat ventricular myocytes, The XXXVI International Congress of Physiological Sciences, 2009 年 7 月 27~8 月 1 日、京都
- ③ Morimoto S, O-uchi J, Kawai M, Komukai K, Sasaki H, Yoshimura M, Hongo K, Kurihara S, β -Adrenoceptor stimulation increased Ca^{2+} leak from sarcoplasmic reticulum without dissociation of FKBP12.6 under physiological condition, The XXXVI International Congress of Physiological Sciences, 2009 年 7 月 27~8 月 1 日、京都
- ④ Terui T, Shimamoto Y, Sodnomtseren M, Yamane M, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N, Thin filament-based regulation of length-dependent activation in skinned porcine ventricular muscle, The XXXVI International Congress of Physiological Sciences, 2009 年 7 月 27~8 月 1 日、京都
- ⑤ 照井貴子、福田紀男、大槻磐男、上園晶一、栗原 敏、トロポニン再構成による Frank-Starling 機構の分子メカニズムの解明、日本麻酔科学会第 56 回学術集会、2009 年 8 月 17~18 日、神戸
- ⑥ Komukai K, O-Uchi J, Hongo K, Kawai M, Morimoto S, Yoshimura M, Kurihara S, Endothelin-1 increases L-type Ca^{2+} current of rat ventricular myocytes via an activation of protein kinase C and Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase II, American Heart Association,

2009 年 11 月 14~18 日, Orlando, USA

- ⑦ Terui Y, Sodnomtseren M, Ishiwata S, Ohtsuki I, Fukuda N, Kurihara S, Thin filament-based regulation of length dependent activation in skinned porcine ventricular muscle, 第 31 回心筋代謝研究会、2008 年 7 月 13 日、東京
- ⑧ O-Uchi J, Hongo K, Morimoto S, Komukai K, Kawai M, Ohtsuki I, Morimoto S, Kurihara S, Decreased Ca^{2+} affinity of thin filament is an important factor for the development of cardiac dysfunction in mouse model of dilated cardiomyopathy, Thick and thin filament regulation in striated muscle, 2008 年 5 月 4~6 日、Madison, USA
- ⑨ Kurihara S, Fukuda N, Ohtsuki I, Terui T, Hongo K, Komukai K, Ishikawa T, Molecular basis for the Frank-Starling mechanism of the heart, 心臓循環器系調節機構の病態生理学に関する国際シンポジウム、2008 年 5 月 24 日、山形
- ⑩ Serizawa T, O-Uchi J, Fukuda N, Kurihara S, Ishiwata S, Kurihara S, Microscopic analysis of sarcomeric oscillations by quantum dots in skinned rat ventricular myocytes, 第 46 回日本生物物理学会年会、2008 年 12 月 3~5 日、福岡
- ⑪ Hongo K, (Kurihara S), Decreased Ca^{2+} sensitivity of the myofilament is critical for the development of cardiac dysfunction in mouse model of dilated cardiomyopathy, 第 72 回日本循環器学会総会・学術集会、2008 年 3 月 28 日、福岡
- ⑫ Hongo K, (Kurihara S), Changes in Ca^{2+} transient and contraction of left ventricular papillary muscles in mouse model of dilated cardiomyopathy, The 24th annual meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section, 2007 年 6 月 21 日, Ferrara, Italy
- ⑬ Hongo K, (Kurihara S), Altered Ca^{2+} handling could contribute to the cardiac sudden death in knock-in mouse of dilated cardiomyopathy, 第 30 回心筋代謝研究会、2007 年 7 月 15 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 敏 (KURIHARA SATOSHI)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：90057026

(2) 研究分担者

本郷 賢一 (HONGO KENICHI)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00256447

(H20→H21 : 連携研究者)

小武海 公明 (KOMUKAI KIMIAKI)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：60360145

(H20→H21 : 連携研究者)

佐々木 博之 (SASAKI HIROYUKI)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60170693

(H20→H21 : 連携研究者)

福田 紀男 (FUKUDA NORIO)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：30301534

(H20→H21 : 連携研究者)

森本 幸生 (MORIMOTO SACHIO)
九州大学・医学研究科・准教授
研究者番号：50202362

(H20→H21 : 連携研究者)