

平成 21 年 4 月 28 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19591088  
研究課題名（和文） 心筋の収縮とナトリウム利尿ペプチド分泌に対する濃度感受性ナトリウムチャンネルの関与  
研究課題名（英文） Involvement of concentration-sensitive Na<sup>+</sup> channels in mouse myocardial contraction and natriuretic peptide secretion  
研究代表者  
吉田 繁 (YOSHIDA SHIGERU)  
近畿大学・理工学部・教授  
研究者番号：60145224

## 研究成果の概要：

マウスの心臓に対して行った実験より、「心房は伸展されると ANP を分泌する」という定説を補完する以下の機能が分かった。

- (1) 心房からの ANP 分泌には、血漿中 Na<sup>+</sup>濃度を感知する「濃度感受性 Na<sup>+</sup>チャンネル (Na<sub>C</sub>)」が関与している。
- (2) 高濃度 Na<sup>+</sup>に反応して分泌された ANP は、低下した心機能を元に戻そうとする働きを持つ。
- (3) Na<sub>C</sub> と ANP は、進化の過程で水生動物が陸生動物となるのを手助けしたと考えられる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：心筋、濃度感受性ナトリウムチャンネル、ナトリウム利尿ペプチド、ANP、BNP、ミトコンドリア、ATP、マウス

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者(吉田 繁)が1980年に「細胞外Na<sup>+</sup>濃度が上昇すると活性化するNa<sup>+</sup>チャネル」という新概念のNa<sup>+</sup>チャネルの存在を報告した(*Brain Research* **196**:560-564, 1980)。このNa<sup>+</sup>チャネルは、岡崎市の基礎生物学研究所との共同実験により「濃度感受性Na<sup>+</sup>チャネル; concentration-sensitive Na<sup>+</sup> channel」であるとの結論に達し、Na<sub>c</sub>と略記(c = concentration)することを提唱した(*Nature Neuroscience* **5**:511-512, 2002)。この新概念のNa<sup>+</sup>チャネルであるNa<sub>c</sub>が「胎仔マウス心臓に存在しており、出生直前に2.5倍に急増した後、出生後7日目までに幼弱マウス心臓のNa<sub>c</sub>は20分の1に激減するが、成熟マウスにも存在している」という論文(Felipe *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **269**:30125-30131, 1994)に接したことが、この課題を考えるヒントのひとつとなった。もうひとつのヒントは、Na<sub>c</sub>がマウスの脳内で存在する部位(脳室周囲器官; circumventricular organs)と心房性ナトリウム利尿ペプチド(atrial natriuretic peptide; ANP)の分布が酷似していることであった。到底偶然とは思えない。また、Na<sub>c</sub>とANPの両者は心臓に共存している。

このようなヒントを踏まえて申請課題に取り組みようとしたのは、「ANPの心房からの分泌は、心房の伸展刺激による」という教科書にも書いているような基本事項が完全に正しいものであるかどうかを再考しなければならなかったからである。体液のNa<sup>+</sup>濃度を一定範囲内に保つという重要なホメオスタシス(homeostasis)機能が、「Na<sup>+</sup>を体外に排出するホルモンであるANPを、Na<sup>+</sup>濃度を測定することもなく無闇に分泌」しているであろうかという疑問である。即ち、心臓にNa<sub>c</sub>が存在しているからには、「心房はNa<sub>c</sub>が心臓に流れ込んでくる血液のNa<sup>+</sup>濃度をモニターして、その結果を元にANP分泌量が調節されているという要素も関与しているはずだ」という仮説を検証したいというのが申請課題に取り組みようとした動機である。

## 2. 研究の目的

「心房はNa<sup>+</sup>濃度をモニターしながらANP分泌量を制御しているのではないか、また、その分泌されたANPが心臓にフィードバックをかけて心機能の乱れを元に戻すのではないか」という仮説を立て、それを検証することを目的として研究を行った。

- (1) 細胞外Na<sup>+</sup>濃度変動時における心機能(特に右心房)変化に対する濃度感受性Na<sup>+</sup>チャネル(Na<sub>c</sub>)関与の可能性  
細胞外Na<sup>+</sup>濃度が増加したときに心機能

がどのような影響を受けるかをまず調べる。さらに、そのような状態に陥った心機能に対して、強心剤としての効果が知られているナトリウム利尿ペプチド(ANPおよびBNP)がどのように作用するかを調べる。

調査する項目は、培養心筋細胞内Na<sup>+</sup>濃度、培養心筋細胞の拍動、心臓の拍動と収縮力、心筋細胞の活動電位、心筋細胞内ATP濃度、である。

- (2) 細胞外Na<sup>+</sup>濃度変化時における心機能変化に対するANPおよびBNPの役割

細胞外Na<sup>+</sup>濃度([Na<sup>+</sup>])変動時に、それを感知した培養心筋細胞および心臓がどのようなナトリウム利尿ペプチド(ANP・BNP)分泌を示すかを調べる。また、心臓にはナトリウム利尿ペプチドに対する受容体が存在しているため、心臓自身が分泌したANPやBNPが自己の機能にフィードバックをかけて心機能調節に関与していることが考えられるので、それを検証する。

## 3. 研究の方法

- (1) 画像解析法による心筋細胞内Na<sup>+</sup>濃度の測定

妊娠16日目の母体から得た胎仔マウスおよび出生直後のマウスの心臓をトリプシン処理することによって培養単離心筋細胞を得る。この細胞をNa<sup>+</sup>感受性蛍光色素(SBFI)で染色し、浜松ホトニクス社の画像解析装置(ARGUS-50)によって細胞内Na<sup>+</sup>濃度([Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>)を測定する。また、培養心筋細胞をCa<sup>2+</sup>感受性蛍光色素(Fura-2)で染色することによって、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)も測定する。

- (2) ビデオカメラによる培養心筋細胞収縮様式の観察

培養心筋細胞の拍動数とリズムを、位相差顕微鏡にビデオカメラ(SONY HANDYCAM DCR-TRV70)を接続することによって観察し記録した。

- (3) トランスデューサーによる心臓収縮力の測定

成熟マウスの右心房に先端をヤスリで丸くした注射針を接触させ、その僅かな撓みをトランスデューサーで電気信号に変換して右心房の収縮力を測定した(図1)。

- (4) 電気生理学的技法による心筋細胞活動電位記録

成熟マウス右心房の収縮の基となる心筋細胞活動電位の振幅とmaximum rate of rise(心筋細胞内へのNa<sup>+</sup>流入量に比例)を、吸引電極法という電気生理学的技法によって

測定した (図 2)。

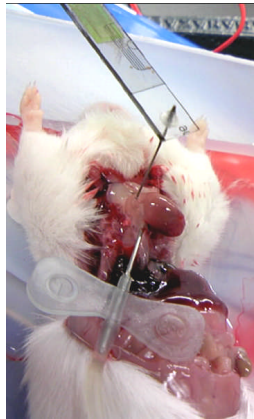


図 1 : 成熟マウス右心房の収縮力を歪みセンサーで測定。下方の翼状針は、灌流用に下大静脈内に留置している。

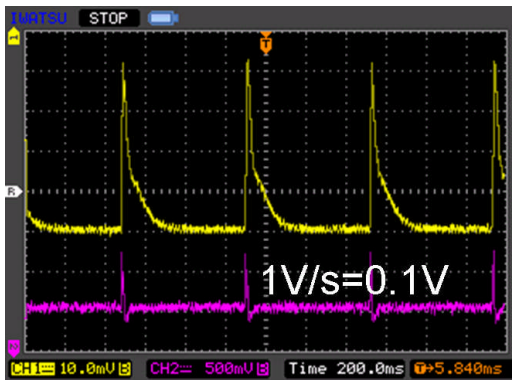


図 2 : 成熟マウス右心房から吸引電極法で得た活動電位 (黄色) とその微分波形 (ピンク)

#### (5) ELISA 法によるナトリウム利尿ペプチド分泌量の測定

市販の ANP 量測定キット (ANP EIA Kit EK-005-24; Phoenix Pharmaceuticals) を使用して、成熟マウスの右心房を灌流して得られる液内に含まれる ATP 量を測定した。

#### (6) 心筋細胞内 ATP 濃度の測定

成熟マウス右心房心筋細胞内の ATP 量を、市販の ATP 測定キット (東洋ビーネット株式会社: LL-100-1、LL-100-2) を使用して測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞外 $\text{Na}^+$ 濃度変動による培養心筋細胞の細胞内イオン濃度と収縮様式の変化

定説が述べている「心筋の伸展」要因を除去した条件下で、細胞外  $\text{Na}^+$  濃度 ( $[\text{Na}^+]_o$ ) が変動した場合に心筋細胞がどのような挙動を示すかを調べるために、胎生後期 (16 日以降) および新生仔から得た培養心筋細胞を実験材料として使用した。この時期の心筋細胞は多量の  $\text{Na}_c$  を含んでいるので、「 $[\text{Na}^+]_o$  変動時における心機能変化に対する  $\text{Na}_c$  関与の可能性」を探る上でも適切かつ重要な実験材料である。

①  $[\text{Na}^+]_o$  上昇によって心筋細胞の  $[\text{Na}^+]_i$  が上昇し、続いて  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が観察された (図 3)。また、心筋細胞の拍動リズムに乱れを生じた (図 4)。

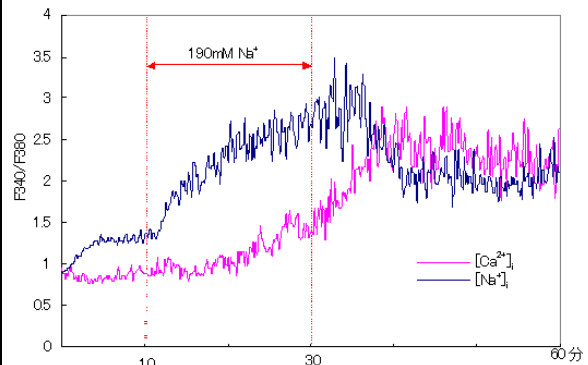


図 3 :  $\text{Na}^+$  感受性蛍光色素 SBF1 で染色した培養マウス心筋細胞の高濃度  $\text{Na}^+$  に対する応答。青 :  $[\text{Na}^+]_i$ 、赤 :  $[\text{Ca}^{2+}]_i$

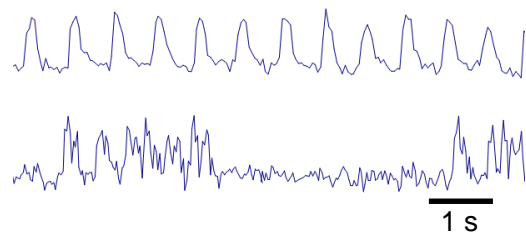


図 4 : 培養マウス心筋細胞の高濃度  $\text{Na}^+$  に対する拍動様式の変化。  
上 : Standard solution  
下 : 190 mM  $\text{Na}^+$  solution

② 生理的溶液に  $\text{Na}^+$  ionophore (monensin) を加えて強制的に細胞内に  $\text{Na}^+$  を流入させても、同様の現象が観察された。

③ 浸透圧を上昇させただけでは、高濃度  $\text{Na}^+$  溶液灌流時のような変化は見られなかった。

④ ミトコンドリア機能阻害剤 (CCCP) 投与で、高濃度  $\text{Na}^+$  溶液と同様の事象が引き起こされた。

⑤ このような実験結果より、高濃度  $\text{Na}^+$  によって  $[\text{Na}^+]_i$  が上昇することによって心筋細胞内ミトコンドリア機能が低下するこ

とと、 $[Ca^{2+}]_i$ の持続的上昇が心筋細胞機能の乱れの原因であると考えられる。

(2) 細胞外  $Na^+$ 濃度変動による心収縮機能の変化

成熟マウスの下大静脈に翼状針を刺入留置して各種溶液を灌流し、右心房の収縮力をトランスデューサーで測定した(図5)。

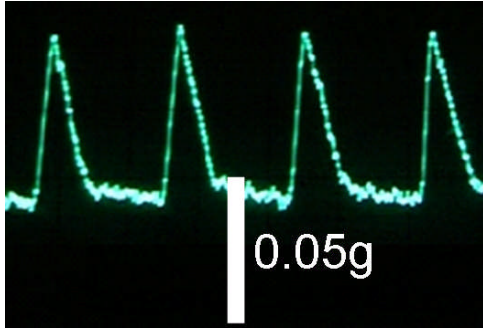


図5：成熟マウス右心房の収縮力を歪センサーで測定。

① 細胞外  $Na^+$ 濃度を上昇させると、右心房の収縮力は  $Na^+$ 濃度依存性に可逆的に有意に低下した。しかし、単に浸透圧をマニトールで上げただけでは収縮力変化は起こらなかった。

② ANP または BNP (1–100 nM)は、高濃度  $Na^+$ によって低下した右心房収縮力を元の正常の値に戻そうとした。ANP は BNP よりも即効性を示したが、収縮力の回復度は BNP の方が上であった。CNP には、このような回復作用は認められなかった。一方、標準溶液下では、ANP または BNP による収縮力増強作用は僅かであった。

(3) 細胞外  $Na^+$ 濃度変動による心筋細胞活動電位の変化

成熟マウスの右心房にプラスチック電極を押し当て、陰圧をかけて細胞膜を破る「吸引電極法(細胞内記録法の一つ)」で活動電位を記録した。

①  $[Na^+]_o$ を標準濃度(145 mM)から190 mMまで増大させると、濃度依存性に活動電位の振幅は増大した。しかし、それ以上に $[Na^+]_o$ を上げると、振幅はかえって減少した。

②  $[Na^+]_o$ の増大につれ、活動電位の微分波形である maximum rate of rise (最大上昇率)も上昇した。この率は心筋細胞内に流入する  $Na^+$ 量に比例することが分かっているため、 $[Na^+]_o$ 増大で $Na^+$ 流入も(190 mM 濃度までは)増えると言える。

③  $[Na^+]_o$ を変えずに浸透圧だけを mannitol を追加して上昇させた場合には、活動電位の振幅も maximum rate of rise も有意には増大せず、むしろやや減少する傾向が認められた。

(4) ELISA 法によるナトリウム利尿ペプチド分泌量の測定

右心室からの灌流溶液を回収して得た溶液中の ANP 濃度を ELISA 法で測定した。

細胞外  $Na^+$ 濃度を 165 mM または 190 mM に上昇させると、約 5 分の潜時で ANP 分泌量が有意に増大した。しかも、 $Na^+$ 濃度が高いほど増大量は大きかった。

灌流する溶液の速度は一定にしていたので「右心房の伸展度」もほぼ一定であったと考えられる。よって、 $[Na^+]_o$ を右心房が感知したことが ANP 分泌につながったと考えられる。

(5) 心筋細胞内 ATP 濃度の測定

成熟マウス右心房を高濃度  $Na^+$ 溶液で灌流し、直後に心筋細胞内 ATP 量を測定すると、 $Na^+$ 濃度依存性に ATP 含有量は減少していた(図6)。

一方、 $Na^+$ 上昇に見合う高浸透圧溶液(mannitol で調整)を灌流した場合にも細胞内 ATP 量は減少したが、 $Na^+$ による場合よりも減少度はかなり小さかった。

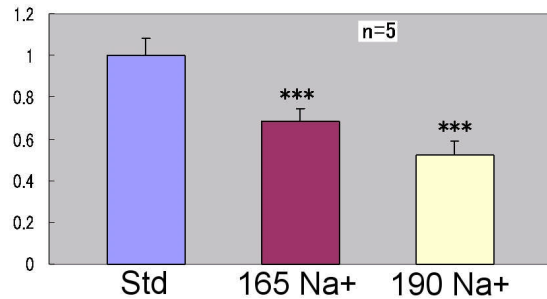


図6：成熟マウス右心房を高濃度  $Na^+$ 溶液で灌流し、直ちに心筋細胞内 ATP 濃度を測定した。

《結果のまとめ》

(A) 細胞外  $Na^+$ 濃度上昇によって活動電位はより活性化されるものの、心筋細胞内の持続的 $Na^+$ 濃度上昇に続いて起こる $[Ca^{2+}]_i$ 。持続上昇によって心臓の収縮力が低下し拍動リズムが乱れる。心筋細胞内 $Na^+$ 濃度の上昇がミトコンドリア機能を障害して ATP 産生量が低下するためであると考えられる(図7)。

(B) 細胞外  $Na^+$ 濃度が上がると、濃度感受性  $Na^+$ チャネル ( $Na_c$ ) の  $Na^+$ 濃度感知を介して心房から ATP (場合によっては BNP も)

が分泌され、心機能を正常に戻そうとするフィードバック機構が働く (図8)。

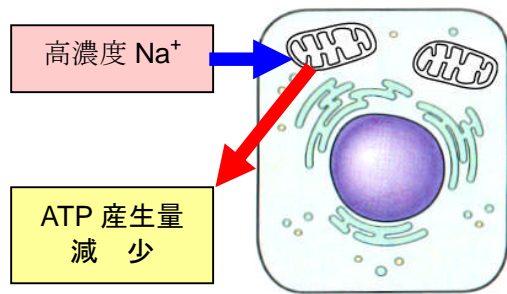


図7：細胞外の高濃度  $\text{Na}^+$ による $[\text{Na}^+]_i$ 上昇がミトコンドリアの機能低下を起し、ATP産生量が減少する。

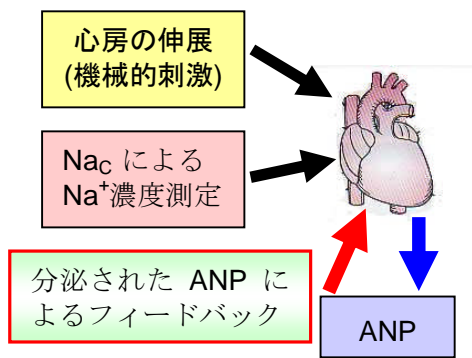


図8：ANP分泌機構に関する申請者の仮説。従来の「心房伸展」以外に「 $\text{NaC}$ 」がANP分泌に関与していると考えられる。

「水生動物が陸生動物へと進化する過程で濃度感受性  $\text{Na}^+$ チャネル ( $\text{Na}_c$ ) と ANP が果たした役割を考える」

生命は古代の海中で誕生したことが知られている。やがて、水生動物が進化して陸に上がることになったのだが、それを促進した因子は推測の域を出ていない。重要な事実は何億年にもわたって海水の  $\text{Na}^+$ 濃度が上昇の一途を辿ったことである。今回の実験で、細胞外  $\text{Na}^+$ 濃度が高いと心機能は低下するが、ナトリウム利尿ペプチド (ANP・BNP) によって機能が戻ることが分かった。これは、進化的に魚類にナトリウム利尿ペプチドが初めて出現したことと、魚類の祖先が陸に進出することに成功したことに関係すると思われる。即ち、鰓を捨て肺呼吸を選んで陸に進出しようとした動物にとっては高濃度  $\text{Na}^+$ に打ち勝つことが重要であり、体外に  $\text{Na}^+$ を排出するだけでなく心機能を亢進させるナトリウム利尿ペプチドは不可欠のものであった。また、最高度に進化していると考えられている哺乳動物は、体液の  $\text{Na}^+$ 濃度をモニターする「濃度感受性  $\text{Na}^+$ チャネル ( $\text{Na}_c$ )」を

備えるに至り、ますます濃度のホメオスタシスを強固なものにしている。

(参考：吉田 繁、 $\text{Na}^+$ チャネルと生物進化、生体の科学 56:164-174, 2005)

「得られた成果の国内外における位置づけとインパクト」

定説訂正の可能性

どの教科書にも「心房の伸展が刺激となってナトリウム利尿ペプチドが分泌される」ということが「定説」として記載されている。しかし、今回の研究によって、「定説は正しいが、それ以外の重要な因子として濃度感受性  $\text{Na}^+$ チャネル ( $\text{Na}_c$ ) の関与を考慮すれば、身体機能としてのホメオスタシスをより合理的に説明できる」ということが判明した。

すなわち、「長年にわたって信じられて来た定説を修正する」という意味で、本研究は国内外において大きなインパクトを持つと考えている。

「今後の展望」

研究代表者である吉田 繁が1980年に新型  $\text{Na}^+$ チャネルの存在を示し2002年に概念を確立した「濃度感受性  $\text{Na}^+$ チャネル ( $\text{Na}_c$ )」の研究は、まだ始まったばかりと言える。 $\text{Na}_c$ が身体機能において果たしている役割を解明していくことは、将来にわたっての我々の責務と考える。

### 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)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 吉田 繁、郷原友哉、横田亜悠美、萩原央記、横井佐代子  
マウス心筋細胞機能に対する細胞外  $\text{Na}^+$ 濃度変化の作用  
日本動物学会第78回大会 (弘前市)、2007年9月
- 2) 吉田 繁、郷原友哉、横田亜悠美、萩原央記、横井佐代子  
細胞外  $\text{Na}^+$ 濃度変動に対する培養マウス心筋細胞の応答  
第54回中部日本生理学会 第100回近畿生理学談話会 合同大会 (津市)、2007年10月
- 3) 吉田 繁・郷原 友哉・横田 亜悠美・石島 善江・久保 尚子・萩原 央記・横井佐代子  
マウス心機能に対する細胞外  $\text{Na}^+$ 濃度変動の影響

第 85 回日本生理学会大会（東京）、2008 年  
3 月

- 4) Yoshida, S., Fuwa, N., Ishijima, Y.,  
Mukai, R., Yamaguchi, J., Tsuchikura, T.  
and Hagiwara, T.  
In search of the evolutionary meaning of  
natriuretic peptides for cardiac  
function in terrestrial animals.  
XX<sup>th</sup> International Congress of Zoology  
(Paris, France), August 2008
- 5) 吉田 繁・不破直人・石島善江・向井瑠璃  
子・山口純司・土蔵隆雄・萩原央記  
ナトリウム利尿ペプチドと心機能の関係を  
動物進化の観点から考える

日本動物学会第 79 回大会（福岡）、2008 年  
9 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 繁 (YOSHIDA SHIGERU)  
近畿大学・理工学部・教授  
研究者番号：60145224

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし