

■
機関番号：35413

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20300162

研究課題名（和文） 心室壁の不均一性に基づく心筋分子モータ挙動と興奮収縮連関の統合的解析

研究課題名（英文） Analysis of myocardial molecular motor dynamics and excitation contraction coupling

研究代表者

清水 壽一郎（JUICHIRO SHIMIZU）

広島国際大学・保健医療学部・教授

研究者番号：80294403

■
研究成果の概要（和文）：

研究代表者である清水壽一郎は、心臓生理学、特に心筋の興奮収縮連関に関わる分野で研究を推進してきた。即ち臓器としての心臓の挙動を詳細に観察し、力学的エネルギー学的な解析あるいは理論的な解析を加え、心筋細胞内カルシウム動態の推測、心筋クロスブリッジ動態の推測を行ってきた。その結果、心筋細胞内カルシウム動態は心臓の容積に影響を受けず、心筋線維のカルシウム結合能も大きな変化を受けないこと、従って心臓の容積依存性の収縮力増加（Frank-Starlingの法則）はアクチン線維とミオシン線維との相互作用に大きく依存する可能性を示してきた。心筋のアクチン線維とミオシン線維との相互作用、即ちクロスブリッジ動態、を観察する手法はいくつか提案されているが、X線回折実験が最も生理的な条件下での観察方法であるものの、X線源の性能上の問題から乳頭筋標本を用いて相当数の収縮の加算平均によりようやく観察可能であった。しかし、世界最大の第三世代大型放射光施設である SPring-8の供用に伴い十分な数の光子と波長・位相が良く揃ったX線源が確立され、ラットの心臓（厚さ10mm）を透過してのX線回折実験により単収縮のクロスブリッジ動態解析を行う条件が整った。そこで本プロジェクトの最終目標をラット心臓におけるクロスブリッジ動態解析法の確立として研究を進め、さらに左心室壁外層と内層の筋線維構築の違い、新生児心筋組織の構造解析、そのほか病態時の心筋クロスブリッジ動態の解析を主眼として行った研究成果について報告する。

研究成果の概要（英文）：

We have studied cardiovascular physiology, especially in myocardial excitation contraction coupling. We have observed and studied the cardiac contractile performance and have made mechanical and energetical analysis. We have reported that load dependent increase in cardiac contractile performance depends on the actin-myosin interaction but not on alteration of the intramyocardial Ca^{2+} dynamics. The X-ray diffraction, provided by the SPring-8 synchrotron radiation facility, is the most useful experimental technique to observe the actin-myosin interaction in the beating whole heart. In this study, we established a method to observe actin-myosin interaction in the rat beating whole heart and analyzed it in the pathophysiological models.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・ 医用生体工学・ 生体材料学

キーワード：生体システム・フィジオーーム

1. 研究開始当初の背景

心臓の収縮弛緩はクロスブリッジの結合・解離を反映しているが、生理学的な臓器としての心臓におけるクロスブリッジ動態は、タンパクとして抽出された心筋アクチン・ミオシンの相互作用の解析や、乳頭筋でのX線回折実験によるクロスブリッジ動態の外挿や、理論解析による推測しか方法がなかった。

SPring-8の供用開始に伴い高輝度なX線源が利用可能となった。このX線はその十分な光量と良く揃った波長と位相から、約10mmの厚みを持つラット左心室をも透過可能であり、X線回折実験によるラット摘出心標本での単収縮クロスブリッジ動態解析も十分に為しえるものと考え研究を行った。

左心室が乳頭筋と大きく異なる点は、心筋線維の三次元配列である。乳頭筋では心筋細胞は長軸方向に整列しているが、左心室では心室壁の厚み方向に心筋細胞が層状に並んではいるがその方向は心外膜側から心内膜側へ向け連続的に変化していることが知られており、心筋線維の三次元配向とX線回折像との関係、および前負荷変化に対する心筋クロスブリッジ動態と心筋線維格子間隔との関係について解析した。

2. 研究の目的

生理的負荷および病態生理学的負荷により、左心室圧容積ループあるいは心室等容性発生圧の変化と、心筋アクチン・ミオシン相互作用（すなわちクロスブリッジ形成・解離過程）および心筋線維格子間隔の変化を解析し、負荷変化に伴う心筋収縮機能の制御機構についての解析を行う。

3. 研究の方法

SPring-8のビームラインBL40XUのチャンパー内に作成したラット開胸拍動心標本あるいはラット摘出ランゲンドルフ灌流心標本を設置した。マウントはX線ビームが左心室自由壁の前壁側から後壁側に抜けるように、また右心室では後壁側から前壁側へ抜ける様に設置した。

(1) X線回折実験

本研究に用いたX線のエネルギーは15.0 keVで、 7×10^{14} 個の光子の一部をアルミニウムに吸収させた後の 2×10^{12} 個の光子からなるビームを用いた。X線ビームのサイズは水平方向が0.25 mm、垂直方向が0.10 mmというサイズである。撮像はベリリウムイメージインテンシファイア（V5445P, Hamamatsu

Photonics）をもった高速CCDカメラ（C4880-80-24A, Hamamatsu Photonics）を用いて記録した。

(2) X線回折像の解析

X線回折像を解析する際には、X線ビーム位置を中心とし、回折像を30度ずつ12個のセクタに分割し、垂直軸は12時方向・6時方向のセクタを含むように設定した。心筋からのX線回折像は基本的にX線ビームを中心として点対称の関係を持つため、12時方向・6時方向のセクタのように対向する二つのセクタは結晶学的には等価である。また、骨格筋ではアクチン線維、ミオシン線維による六角格子構造からの赤道反射のほか、アクチンやミオシンの繊維の長軸方向の繰り返し構造からの子午反射、アクチンのらせん構造からの層線が観察されるが、心筋では赤道反射のうち(1,0)、(1,1)反射のみが観察される。各セクタ内の(1,0)、(1,1)反射を円周方向に積分して輝度分布曲線を得た後、背景放射を表す四次関数と(1,0)、(1,1)反射の分布を表す二つのガウス関数からなる曲線でカーブフィッティングし、それぞれのガウス関数の係数から(1,0)、(1,1)反射強度を求めた。この反射強度からそれらの比 $I(1,0)/I(1,1)$ からクロスブリッジ形成量を推定することができる。

また、(1,0)、(1,1)反射の位置が筋線維六角格子の格子間隔を反映することが知られており、六角格子上の(1,0)平面間の間隔((1,0)格子間隔、 $d_{1,0}$)は(1,0)反射の位置から求められる。格子間隔を求める上でのキャリブレーションにはカエル骨格筋

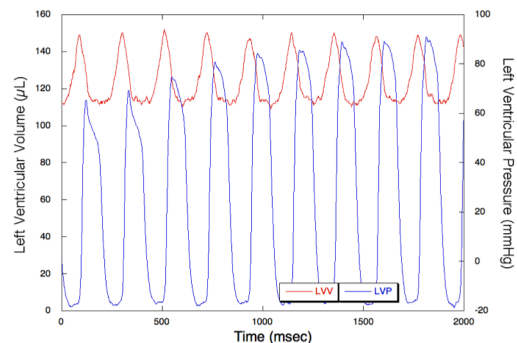


図1 駆出性拍動時に後負荷を変化させた時の左心室圧（青線）と左心室容積（赤線）の経時的変化。一心拍目の直後に後負荷を増大させると、左心室収縮期末圧は明らかな増大を示す。一方、左心室容積は後負荷の増大によっても有意な変化は示さない。

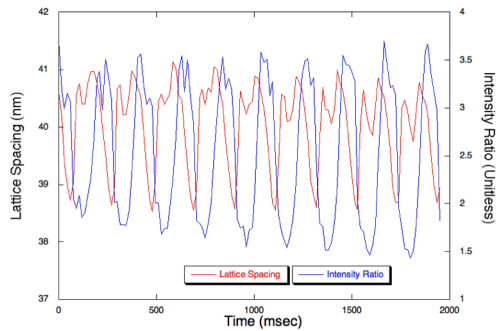


図2 駆出性拍動時に後負荷を変化させた時の輝度比(青線)筋線維格子間隔(赤線)の経時的变化。一心拍目の直後に後負荷を増大させている。輝度比の最低値は左後負荷の増大に伴い低下し、クロスブリッジ形成量が増加を示している。収縮に伴う筋節の短縮を示す各心拍の筋線維格子間隔の最大値は後負荷の増大後低下傾向を示している。

からの 14.3 nm の子午反射を利用した。

4. 研究成果

駆出性拍動時に後負荷を変化させたときの左心室圧・容積の経時的变化を図1に示す。一心拍目の直後に胸部大動脈横隔膜直上部をクランプし、後負荷を増大させている。後負荷の増大に伴い、左心室収縮期末圧は8心拍にわたって増大傾向を示し、これ以降はプラトーに達している。後負荷の増大にもかかわらず、左心室拡張期末圧は有意な変化を示さず、左心室容積も収縮期末、拡張期末ともに明らかな変化は示さなかった(青線)。

この心拍動時のX線回折像の解析結果を図2に示す。ここで、アクチン・ミオシン相互作用によるクロスブリッジの形成・解離過程を表す輝度比(Intensity Ratio)は、収縮期にクロスブリッジが形成されると輝度比が低下し、拡張期にクロスブリッジが解離すると輝度比が増加することに注意が必要である。また心筋線維の伸展を反映する筋線維格子間隔(Lattice Spacing)も、心筋線維が伸展されると筋線維格子間隔は狭小化し、心筋線維が短縮すると筋線維格子間隔は増大する。

まずクロスブリッジの形成・解離のダイナミクスを表す輝度比(青線)に注目すると、左心室圧の変化と同様、2心拍目以降に輝度比の最低値が低下傾向を示し、8心拍目ではほぼプラトーに達していることが解る。従って、後負荷の増大に伴う左心室圧の増加は、クロスブリッジの形成量自体が増大しているためであると考えられる。一方、クロスブリッジが解離した状態である輝度比の最大値は有意な変化を示さず、収縮期のクロスブリッジの増大も、拡張期には影響を及ぼさないことが推察される。

一方、心筋線維の格子間隔(赤線)は、拡

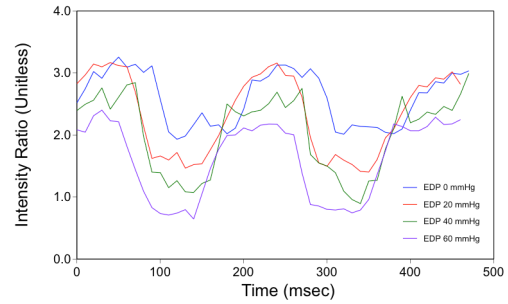


図3 右室肥大心における輝度比の解析結果。拡張期末圧の増大に伴い、輝度比の最低値及び最大値がともに減少していることが解る。

張期(最小値)には2心拍目から4心拍目にかけてやや低下傾向を認めるものの、その後は一心拍目と同程度であり、有意な変化は認めないものとする。収縮期の格子間隔(最大値)については2心拍目以降徐々に低下する傾向を示している。これは収縮に伴う格子間隔の増大、即ち筋節の短縮が後負荷により制限された結果であると理解できる。

後負荷の増大に伴う左心室圧の増大は、筋節の短縮が制限されることにより、クロスブリッジの短縮による解離も抑えられ、結果としてクロスブリッジの総量が増大した結果であると考えられる。この実験の成果は、現在発表に向けて準備中であり、結果の詳細についてはそちらを参照して頂きたい。

右室肥大心の輝度比の解析結果を図3に示す。右心室での輝度比の変化も、左心室自由壁からの輝度比の変化と同様に収縮期に低下する。拡張期末圧の増大に伴い、収縮期輝度比の最低値は低下傾向を示しており、クロスブリッジの形成量自体が増加していることを示している。一方、拡張期末圧が20mmHgまでは拡張期輝度比に変化がないものの、40mmHg、60mmHgへと増大すると共に拡張期輝度比も低下傾向を示し、残存クロスブリッジが存在するのか、アクチン線維格子からミオシン線維が引き抜かれたための変化

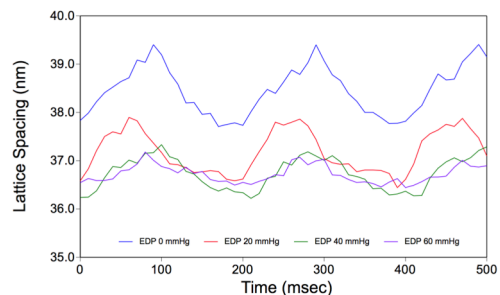


図4 右室肥大心における筋線維格子間隔の解析結果。拡張期末圧を増大させると、拡張期筋線維格子間隔は有意に狭小化する。収縮に伴う筋線維格子間隔の変化量も拡張期末圧の増大につれて減少した。

なのか確認作業中である。

右室肥大心における拡張期末圧増大に伴う菌背に格子間隔の解析結果を図4に示す。これも左心室自由壁と同様に拡張期に最低値を示し、収縮により筋が短縮すると格子間隔は増大する。拡張期末圧 0mmHg から 20mmHg へ増大させると、拡張期筋線維格子間隔は狭小化し、筋節の伸展を表している。拡張期末圧を 20mmHg 以上へ増大させても拡張期筋線維格子間隔の明らかな変化は認められないが、収縮期の筋線維格子間隔の拡大量は拡張期末圧に応じて減少しており、筋節の短縮が制限されていることを示している。

図3、4は右室肥大心の一例であるが、対照群、右室肥大心群の比較で、輝度比および筋線維格子間隔の有意な変化は認められなかった。この比較において、筋線維格子間隔のばらつきの程度については両者の間に有意な差を確認しており、現在筋線維格子間隔を規定する因子について解析を行っている。従って、本実験の詳細については、後日あらためて詳報する予定である。

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)

[雑誌論文] (計8件)

Isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts: does short-term treatment correspond to long-term treatment? Takeshita D, Shimizu J, Kitagawa Y, Yamashita D, Tohne K, Nakajima-Takenaka C, Ito H, Takaki M J Physiol Sci. 2008 Jun;58(3):179-88. 査読有り

Effects of Formaldehyde on Cardiovascular System in In Situ Rat Hearts. Takeshita D, Nakajima-Takenaka C, Shimizu J, Hattori H, Nakashima T, Kikuta A, Matsuyoshi H, Takaki M. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2009;58:179-188. 査読有り

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

Increased O₂ consumption in excitation-contraction coupling in hypertrophied rat heart slices related to increased Na⁺-Ca²⁺ exchange activity. Shimizu J, Yamashita D, Misawa H, Tohne K, Matsuoka S, Kim B, Takeuchi A, Nakajima-Takenaka C,

Takaki M J Physiol Sci. 2009 Jan;59:63-74. 査読有り

The opposite roles of nNOS in cardiac ischemia-reperfusion-induced injury and in ischemia preconditioning-induced cardioprotection in mice. Lu XM, Zhang GX, Yu YQ, Kimura S, Nishiyama A, Matsuyoshi H, Shimizu J, Takaki M J Physiol Sci. 2009 Jul;59:253-62 査読有り

Altered nano/micro-order elasticity of pulmonary artery smooth muscle cells of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. Nakamura K, Shimizu J, Kataoka N, Hashimoto K, Ikeda T, Fujio H, Ohta-Ogo K, Ogawa A, Miura A, Mohri S, Nagase S, Morita H, Kusano KF, Date H, Matsubara H, Mochizuki S, Hashimoto K, Kajiya F, Ohe T. Int J Cardiol. 2010 Apr 1;140(1):102-7 査読有り

Role of neuronal NO synthase in regulating vascular superoxide levels and mitogen-activated protein kinase phosphorylation. Zhang GX, Kimura S, Murao K, Shimizu J, Matsuyoshi H, Takaki M. Cardiovasc Res. 2009 Feb 1;81:389-99 査読有り

Rescue of Ca²⁺ overload-induced left ventricular dysfunction by targeted ablation of phospholamban. Tsuji T, Del Monte F, Yoshikawa Y, Abe T, Shimizu J, Nakajima-Takenaka C, Taniguchi S, Hajjar RJ, Takaki M. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009 Feb;296(2):H310-7 査読有り

[学会発表] (計20件)

Shimizu J Increasing pre-load reduced actin-myosin interaction in isolated beating rat whole heart under hypoxia. Biophysical Society 53rd Annual Meeting 2009/3/3 Boston

Tamura Y Increasing pre-load attenuates crossbridge formation under hypoxia. Biophysical Society 53rd Annual Meeting 2009/3/3 Boston

清水壽一郎 低酸素環境下での前負荷の増大は心筋分子モーター機能を低下させる 第47回日本生体医工学会大会 2008/5/8 神戸

清水壽一郎 ラット摘出心標本における左心室等容性発生圧とナノオーダー心筋

分子モータ挙動の関係第 29 回日本循環制御
医学会総会 2008/5/10 横浜

吉川義朗 大動脈遮断解除後の再灌
流障害予防における水溶性カルパイン阻害
剤の効果：ラット血液交叉灌流摘出心臓標本
を用いて第 13 回病態と治療におけるプロテ
アーゼとインヒビター学会学術集会
2008/8/22 大阪

Guo-Xing Zhang Opposite roles of nNOS in
cardiac ischemia reperfusion -induced
injury and in ischemia
preconditioning-induced cardioprotection
in mice. 第 101 回近畿生理学談話会
2008/9/13 大阪

松吉 ひろ子 5-HT₄ 受容体作動薬によ
る排便反射（直腸-直腸反射と直腸-内肛門括
約筋反射）促進作用のメカニズム
第 7 回日本 Neurogastroenterology（神経消
化器病）学会 2008/9/30 東京

田村大和 高い心拍数ではアクチン-ミオシ
ンの架橋形成は減少する
第 61 回日本胸部外科学会定期学術集会
2008/10/13 福岡（福岡国際会議場）

Guo-Xing Zhang Role of nNOS in basal and
angiotensin II -induced vascular O₂
generation and MAPK phosphorylation.
第 19 回日本病態生理学会大会
2009/1/24 所沢

竹下大輔 心拍数の増加は、ラット左心室のア
クチン-ミオシン架橋形成を減少させる
第 19 回日本病態生理学会大会
2009/1/24 所沢

Shimizu J Increasing preload
reduced actin-myosin interaction in
isolated beating rat whole heart under
hypoxia
BBSRC UK-Japan collaboration: Satellite
Symposium for 2009 IUPS 2009/8/4
Okayama

Shimizu J Actin-myosin
interaction observed in beating whole
heart under physiological and
pathological states
Third Switzerland -Japan Workshop on
Biomechanics 2009 2009/9/4
Engelberg, Swiss

Shimizu J Increasing Preload
Reduced Actin-Myosin Interaction in

Isolated Beating Rat Whole Heart Under
Hypoxia
Medical Physics and Biomedical
Engineering World Congress 2009
2009/9/9 Munich, Germany

清水壽一郎 ラット摘出心標本にお
ける左心室等容性発生圧とナノオーダー心筋
分子モータ挙動の関係
第 29 回日本循環制御医学会総会
2009/6/12 鹿児島

宮坂武寛 心拍数の増加はアクチン-ミオシ
ンの架橋形成を減少させる
第 48 回日本生体医工学会大会
2009/4/25 東京

Shimizu J Increased Heart Rate
Reduced Crossbridge Formation
in Beating Rat Whole Heart
MEDICAL PHYSIOLOGY
2010/2/25 Cambridge, UK

田村大和 低酸素灌流時の前負荷の増大はラ
ット摘出心標本における心筋アクチンミ
オシン相互作用を減少させる。
Biophysical Society 53rd Annual Meeting
2010/1/15 東京

Shimizu J 低酸素環境下での前負荷
増大による心機能低下と
心筋分子モータの挙動異常
第 25 回生体・生理工学シンポジウム
2010/9/25 岡山

Tamura Y Increasing Preload Reduced
Actin-Myosin Interaction in Isolated
Beating Rat Whole Heart under Hypoxia
19th Cardiovascular System Dynamics
Society 2010/9/24 Fukuoka

Shimizu J Effects of heart rate on
Actin-Myosin interaction
BBSRC UK-Japan collaboration
2010/9/7 Oxford, UK

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水壽一郎 (SHIMIZU JUICHIRO)

広島国際大学・保健医療学部・教授

研究者番号：80294403

(2) 研究分担者

高木都 (TAKAKI MIYAKO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00033358

三澤裕美 (MISAWA HIROMI)

奈良県立医科大学・医学部・教務職員

研究者番号：50281275

(3) 連携研究者

八木直人 (YAGI NAOTO)

高輝度光科学研究センター・主席研究員

研究者番号：80133940

片岡則之 (KATAOKA NORIYUKI)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・准教授

研究者番号：20250681

