

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300167

研究課題名(和文) 心筋細胞内小器官の機械感受性と動的心筋バイオメカニクスの関係

研究課題名(英文) role of mechanosensitive response of organelle in dynamic biomechanics of cardiomyocytes

研究代表者

入部 玄太郎 (Iribe, Gentaro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：90284885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで心筋細胞の伸展刺激によってカルシウムスパーク(筋小胞体カルシウム放出チャネルであるリアノジン受容体からの局所的で自発的なカルシウム放出現象)頻度が増加することを報告してきた。これまでこの現象には細胞膜上のNADPHオキシダーゼ由来の活性酸素が関わっているとされてきたが、今回の研究により、この現象は伸展刺激によるミトコンドリアからの活性酸素産生上昇がリアノジン受容体を刺激することによるものであることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Calcium spark is diastolic spontaneous calcium releasing event from ryanodine receptors (RyR) on sarcoplasmic reticulum. We have previously reported that myocardial stretch increases calcium spark rate. It has been regarded that stretch-induced increase in reactive oxygen species (ROS) production from NADPH oxidase stimulates RyR to cause the phenomenon. However, the present study revealed that stretch-induced increase in ROS production is derived from mitochondria.

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：機械感受性 ミトコンドリア膜電位 活性酸素 カルシウムスパーク 心筋細胞

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 心筋バイオメカニクス特性は細胞骨格構造及び心筋カルシウムハンドリングと密接に関係している。これまで心筋カルシウムハンドリングにおいて重要な役割を担う細胞内小器官である筋小胞体における新しい機械感受性現象をいくつか報告してきた。これらの現象には細胞内小器官を含めて細胞内に機械刺激を伝達する細胞骨格構造が必要なが分かっている。これらを統合理解するためには動的な心筋バイオメカニクスとカルシウムハンドリングの関係における細胞内小器官の機械感受性をさらに明らかにする必要がある。

### 2. 研究の目的

(1) 心筋細胞では伸展などの機械刺激によりさまざまな機械受容チャネルが活性化され、その生理機能を修飾する(機械電気相互作用)。機械受容チャネルは細胞膜上だけでなく、筋小胞体をはじめとした細胞内小器官にも存在し、複雑な機械電気相互作用を介して心筋バイオメカニクスを修飾しているものと思われるがその全容は明らかでない。本研究では、細胞内小器官の機械電気相互作用と心筋バイオメカニクスの関係を統合的に研究しその全容を明らかにしていくことを目的とする。

(2) 現在用いている細胞伸展システムはカーボンファイバーの静電気を利用した吸着力で細胞上面から保持するシステムであり、比較的小さな機械的負荷に最適化されている。今後伸展範囲や伸展速度などの機械負荷範囲を広げるために空気駆動のソフトアクチュエータ技術を用いたマイクログリッパーで、上下両面から細胞を保持するシステムを確立する。

### 3. 研究の方法

単離心筋細胞標本は機械的刺激の負荷が技術的に難しい。我々はカーボンファイバーを用いた単離心筋細胞長さ張力制御技術を保有しており、全心臓力学実験とほぼ同等の力学実

験を単離細胞で行うことができる。このシステムを用い、伸展刺激誘発性の筋小胞体のカルシウムハンドリング変化がリアノジン受容体の直接的な活性化なのか、それとも他の伸展感受性メカニズムによって引き起こされる現象なのかを解明した。

### 4. 研究成果

(1) 我々は心筋細胞の伸展刺激によってカルシウムスパーク(筋小胞体カルシウム放出チャネルであるリアノジン受容体からの局所的で自発的なカルシウム放出現象)頻度が増加することを報告してきた。過去の報告では、この現象には伸展刺激誘発性のNADPHオキシダーゼ(NOX2)由来の活性酸素(reactive oxygen species: ROS)増加が関与していることが分かっているが、我々はマウス単離心筋細胞を用いてオリゴマイシンとミトコンドリアの脱共役剤であるFCCPの併用によりATPの枯渇を防ぎつつミトコンドリア機能を抑制した標本を用い、これに伸展刺激を加えることによって引き起こされるカルシウムスパークの反応を解析することによりミトコンドリアと伸展誘発性のカルシウムスパーク増加との関連を検討した。その結果、比較的高濃度のFCCPによりミトコンドリア機能をブロックした場合には伸展刺激誘発性のカルシウムスパーク増加は抑制されたことから、この現象にはミトコンドリアが関与していることが明らかとなった。筋小胞体とT管との接合部(リアノジン受容体が存在する場所)はミトコンドリアから十分近いため、機械的刺激によるミトコンドリアからのカルシウム放出が筋小胞体のCalcium-induced calcium release (CICR)を引き起こす可能性は十分にある。しかし、ミトコンドリアからのカルシウム放出経路であるミトコンドリア $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体をブロックしてもスパークの増加が起こることから、CICRは関与して

いないことがわかった。さらなる検討の結果、ミトコンドリアからのROS産生が伸展刺激誘発性に増加し、ミトコンドリア膜電位も伸展刺激誘発性に過分極することを見出した。これは前負荷の増大した収縮（収縮に伴うエネルギーが大きい）に対してミトコンドリアでのATP産生増大に備えた反応である可能性がある。また、さらにNOX2をブロックした時にも伸展刺激誘発性のミトコンドリア過分極が起こることから、伸展に伴うミトコンドリア過分極によるROS産生、さらにそれによるカルシウムスパークの増加、という一連の流れが解明された。我々は初めてミトコンドリアの機械感受性現象を捉えることに成功したことになる。

(2) 上下両面から細胞を保持する新方式の細胞伸展システムは空気駆動のソフトアクチュエータ素材のシリコンの塑性が大きく影響することが判明したため、油圧マニピュレータを使用するシステムに変更して実用システムを完成することが出来た。実験の結果、伸展率は従来システムの3倍近くとなり、今後の心筋細胞力学実験に大きく貢献するであろうシステムとなった。

#### 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4件）

Iribe G, Kaihara K, Ito H, Naruse K.  
Effect of azelnidipine and amlodipine on single cell mechanics in mouse cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol.* 2013; 715:142-146. 査読あり DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.05.030

Iribe G, Jin H, Naruse K. Role of Sarcolemmal BKCa Channels in Stretch-Induced Extrasystoles in Isolated Chick Hearts. *Circ. J.* 2011; 75:2552-2558.

査読あり DOI: 10.1253/circj.CJ-11-0486

〔学会発表〕（計12件）

Iribe G, Kaihara K, Naruse K.  
Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production causes stretch-induced increase in calcium spark rate. Venice Arrhythmia 2013, 27-29th Oct 2013, Venice, Italy.

Iribe G, Kaneko T, Yamaguchi Y, Kaihara K, Naruse K. Improvement in carbon fiber technique for cardiomyocyte mechanics and mechano-electric coupling study. 35<sup>th</sup> Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. 03-07 Jul 2013, Osaka, Japan.

Iribe G. Non-sarcolemmal stretch-activated channels. 6<sup>th</sup> International Workshop, Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmias (招待講演) 12-15 Sep 2013, Oxford, UK

〔図書〕（計1件）

Iribe G, Kohl P. Non-sarcolemmal stretch-activated channels. In: Kohl P, Sachs F, Franz MR, editors. *Cardiac mechano-electric coupling and arrhythmias*. Oxford: Oxford University Press; 2011.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

〔その他〕

無し

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

入部 玄太郎 (IRIBE GENTARO)

岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：90284885

(2)研究分担者

脇元 修一 (WAKIMOTO SHUICHI)

岡山大学大学院・自然科学研究科・准教授

研究者番号：40452560

(3)連携研究者

成瀬 恵治 (NARUSE KEIJI)

岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40252233