

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590253

研究課題名(和文)トロポニンCのカルシウム親和性が不整脈の頻拍周期の決定に果たす役割の解明

研究課題名(英文)Effect of troponin C affinity for Ca²⁺ on the frequency of arrhythmias

研究代表者

三浦 昌人(MIURA, Masahito)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30302110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：心室筋における収縮蛋白のカルシウム感受性の変化は、カルシウム波伝播速度を決定した。不全心筋においても、収縮蛋白のカルシウム感受性の増加は、カルシウム波伝播速度を増加させた。高カリウム局所灌流心筋では収縮の不均一性によるカルシウム感受性の変化がカルシウム波伝播速度を増加させた。収縮蛋白のカルシウム親和性の変化は、カルシウム波伝播速度の変化を介して不整脈の発生とその頻拍周期の決定に重要である。

研究成果の概要(英文)：In cardiac ventricular muscle, the affinity of the myofilaments for Ca²⁺ determined the propagation velocity of Ca²⁺ waves. Also in the failing muscle, an increase in their affinity increased the propagation velocity. In the muscle with a regional increase in [K⁺]_o, the increase in their affinity due to nonuniform muscle contraction increased the propagation velocity. These results suggest that the affinity of the myofilaments is an important determinant for the initiation and the frequency of ventricular arrhythmias probably by changing the velocity of Ca²⁺ waves.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：カルシウム波 カルシウム親和性

1. 研究開始当初の背景

心筋はアクチン・ミオシン間の滑り運動によって収縮し、この収縮は調節蛋白であるトロポニンとカルシウムとの結合/解離によって制御される。そのため、トロポニンの構成要素であるトロポニンCのカルシウム親和性は、心筋収縮力の決定因子となる。トロポニンCのカルシウム親和性は、温度、サルコメア長、PH、マグネシウムなどの電解質、トロポニンIのリン酸化、カルシウム増感剤などで変化し、サルコメアの伸展はカルシウム親和性を増加させ、短縮はカルシウム親和性を低下させる。このため、一過性の心筋伸展は、伸展終了後の心筋長短縮によってトロポニンCのカルシウム親和性を低下させることとなり、トロポニンCからの解離カルシウムによって細胞内カルシウム濃度を一過性に上昇させる。これまでの研究成果に基づき、我々はこの解離カルシウムが不整脈の発生と持続に深く関与するという仮説を提唱してきた。これは、心臓内に障害心筋(梗塞などによる線維組織など)が混在する場合、健康心筋のより強い収縮と弛緩によって、収縮力の低下した障害心筋とその周辺では受動的伸展とそれに引き続いた短縮が起これ、この弛緩期の短縮が、カルシウム解離を引き起こし、不整脈の発生と持続に関与するというものである。このように、トロポニンCのカルシウム親和性の変化は、不均一収縮を呈している病的な心筋において、不整脈発生の一因となっている可能性があるにもかかわらず、このような不整脈の発生機序に関する研究は、電位依存性カルシウムチャンネル、ホスホランパン、筋小胞体カルシウム放出チャンネルなどの研究に比して大きく立ち遅れている

2. 研究の目的

不均一収縮を呈する心筋組織において、収縮蛋白のカルシウム親和性がカルシウム波の発生とそれに伴う撃発性不整脈の発生にどのように関与するかを、まずは正常心室筋を用いて、次に不全心筋と高カリウム局所灌流心筋(心筋虚血類似モデル)を用いて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

正常あるいはモノクロタリン投与ラットの右心室より、多細胞心室筋であるトラベクラを摘出し(図1)発生張力、サルコメア長、細胞内カルシウム画像、膜電位を記録した。局所の心筋特性を可逆的に変化させる場合は、心筋の局所領域を2,3-butanedione monoxime(BDM、ミオシンATPase活性阻害薬)あるいは低カルシウム液(0.2 mMカルシウム)で灌流した(ジェット幅 \sim 0.3 mm)。一方、高カリウム局所灌流心筋を作製する場合には、心筋の局所領域を30mMの高カリウム液で灌流した。トロポニンCのカルシウム親和性を変化させるために、心筋伸展を加えるか、あるいは10 μ M blebbistatin(ミオシンATPase活性阻害薬)投与により収縮力を低下させた。カルシウム波を誘発するために、0.3、0.4、0.6秒間隔の電気刺激を7.5秒間行った。

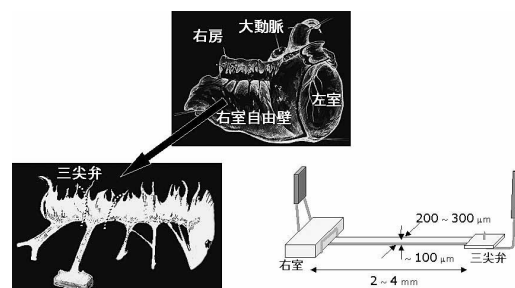


図1. 下段左図のように右室より多細胞心室筋(トラベクラ)を摘出し、下段右図のように固定した。

4. 研究成果

(1) 正常心筋における収縮蛋白のカルシウム感受性とカルシウム波伝播速度

低カルシウム液の局所灌流によって、灌流領域は非灌流領域の収縮によって受動的に伸展させられ、心筋は不均一収縮を呈した(図2A)。0.4秒間隔7.5秒間の電気刺激によって、収縮の境界領域よりカルシウム波が出現した(図2Ba 矢印)。心筋伸展による収縮蛋白のカルシウム親和性の増加は、心筋の発生張力を増加させ、カルシウム波伝播速度を増加させた(図2Ba 矢印、図2C)。また、10 μ M blebbistatin の投与による心筋収縮力の低下は、収縮の境界領域における収縮蛋白のカルシウム親和性の変化を低下させ、カルシウム波伝播速度を消失させた(図2Bc 矢印)。以上より、収縮蛋白のカルシウム親和性の変化は、カルシウム波伝播速度の変化を介して不整脈の発生と持続に深く関与していることが示唆された。

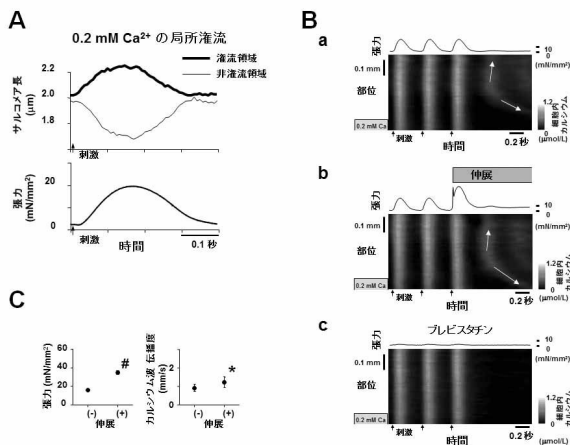


図2.低カルシウム液局所灌流によるサルコメア長の変化をAに、伸展とプレビスタチンの投与によるカルシウム波の変化の実例をBに、伸展による張力とカルシウム波伝播速度の変化のまとめをCに示す。2 mM $[Ca^{2+}]_o$, 24.6°C。(Miura M, et al. J Mol Cell Cardiol 2013,56:97-105 より引用、改変)

(2) 不全心筋における収縮蛋白のカルシウム感受性とカルシウム波伝播速度

ラットにモノクロタリンを皮下注すると、4週後には約25%のラットが心不全のため死亡し、生き残ったラットは右室肥大と右心不全を呈した。この生存ラット右室より摘出した心室筋は、不全心筋の特性を全て備えていることを我々は既に報告している(Endo H, Miura M, et al. J Pharmacol Exp Ther. 318:1102-1107, 2006)。不全心筋では図3に示すように、カルシウム波伝播速度が亢進し、遅延後脱分極が増高したが、その原因の一つとして、不全心筋における収縮蛋白のカルシウム親和性の亢進が考えられた。

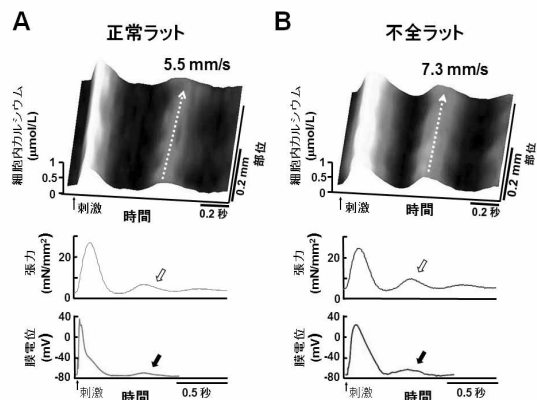


図3.不全心筋におけるカルシウム波と遅延後脱分極を示す。3 mM $[Ca^{2+}]_o$, 22.1°C。

(Miura M, et al. Circ J 2011; 75: 1343-1349 より引用、改変)

(3) 高カリウム局所灌流心筋における収縮蛋白のカルシウム感受性とカルシウム波伝播速度

心筋虚血時に細胞外カリウム濃度は20mMを超えて上昇することが知られている。この細胞外カリウム上昇時の不整脈の発生機序を明らかにするために、心筋の局所領域を30mMの高カリウム液で灌流した。高カリウム液の局所灌流によって発生張力は低下し、灌流領域の収縮力は局所的に低下した。0.4

秒間隔、7.5 秒間の電気刺激によって、コントロールでは不整脈が誘発されなかったのに対し、高カリウムの局所灌流によって持続性不整脈が誘発された(図4)。不整脈の誘発は、コントロール群では14例中1例、高カリウム局所灌流心筋群では14例10例であった。不均一収縮の関与を明らかにするために、10 μ M blebbistatin の投与により収縮力を低下させたところ、高カリウム局所灌流心筋群での不整脈の誘発は9例中0例と減少した。この結果より、心筋虚血時の不整脈の発生に細胞外カリウムの上昇による不均一収縮が関与し、特に不均一収縮境界領域における収縮蛋白のカルシウム親和性の変化の関与が考えられた。

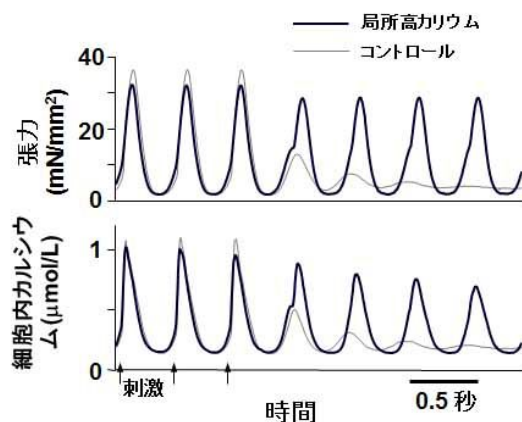


図4. 心筋局所の高カリウム時の張力と細胞内カルシウムの変化を示す。200 nM isoproterenol, 3 mM $[Ca^{2+}]_o$, 24.0°C。(Miura M, et al. Am J Physiol 2012;302:H2301-H2309 より引用、改変)

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. Miura M, Murai N, Hattori T, Nagano T, Stuyvers BD, Shindoh C. Role of reactive oxygen species and Ca^{2+} dissociation from the myofilaments in determination of Ca^{2+} wave propagation

in rat cardiac muscle. J Mol Cell Cardiol. 2013;56:97-105. 査読有

doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.12.011

2. Haq KT, Daniels RE, Miller LS, Miura M, ter Keurs HEDJ, Bungay SD, Stuyvers BD. Evoked centripetal Ca^{2+} mobilization in cardiac Purkinje cells: Insight from a model of three Ca^{2+} release regions. J Physiol. 2013; 591.17: 4301-4319. 査読有
doi: 10.1113/jphysiol.2013.253583
3. Shindoh C, Shishido R, Sasaki K, Narumi N, Murai N, Miura M. Inhalation of Budesonide/Formoterol Increases Diaphragm Muscle Contractility. Allergol Int. 2012;61:439-449. 査読有
doi: 10.2332/allergolint.11-OA-0409
4. Miura M, Hattori T, Murai N, Nagano T, Nishio T, Boyden PA, Shindoh C. Regional increase in extracellular potassium can be arrhythmogenic due to nonuniform muscle contraction in rat ventricular muscle. Am J Physiol 2012;302:H2301-H2309. 査読有
doi: 10.1152/ajpheart.01161.2011
5. Fukuda K, Watanabe J, Yagi T, Wakayama Y, Nakano M, Kondo M, Kumagai K, Miura M, Shirato K, Shimokawa H. A Sodium Channel Blocker, Pilsicainide, Produces Atrial Post-Repolarization Refractoriness through the Reduction of Sodium Channel Availability. Tohoku J Exp Med. 2011;225:35-42. 査読有
doi: 10.1620/tjem.225.35

6. Shindoh C, Shishido R, Sasaki K, Miura M. Effects of inhalation or incubation of oxitropium bromide on diaphragm muscle contractility in mice. *Allergol Int.* 2011;60: 365-372. 査読有 doi: 10.2332/allergolint.10-OA-0266
7. Miura M, Hirose M, Endoh H, Wakayama Y, Sugai Y, Nakano M, Fukuda K, Shindoh C, Shirato K, Shimokawa H. Acceleration of Ca²⁺ waves in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ J* 2011; 75: 1343-1349. 査読有 doi: 10.1253/circj.CJ-10-1050

[学会発表](計 30 件)

1. Effect of the Affinity of Myofilaments for Ca²⁺ on Ca²⁺ Wave Propagation in Intact Rat Cardiac Trabeculae. Masahito Miura, Mai Sasaki, Tsuyoshi Nagano, Chiyohiko Shindoh. 86th AHA meeting (米国、Dallas) 2013 Nov 18.
2. ROS Generation during Muscle Stretch Modulates Ca²⁺ Wave Propagation in Intact Rat Cardiac Trabeculae. Masahito Miura, Mai Sasaki, Tsuyoshi Nagano, Chiyohiko Shindoh. 34th Annual Scientific Sessions of Heart Rhythm Society (米国、Denver) 2013 May 9.
3. Spatial Nonuniformity-Induced Ca²⁺ Waves and Arrhythmias. トピックス: Calcium handling and cardiac arrhythmia. Masahito Miura, Tsuyoshi Nagano, Chiyohiko Shindoh. 第 7 7 回 日本循環器学会 (横浜) 平成 2 5 年 3 月 1 5 日
4. ROS Generation Modulates Ca²⁺ Wave Propagation during Muscle Stretching in Intact Rat Trabeculae. Tsuyoshi Nagano, Masahito Miura, Natsu Narumi, Chiyohiko Shindoh. 第 7 7 回 日本循環器学会 (横浜) 平成 2 5 年 3 月 1 5 日
5. Membrane Excitation was Caused by Muscle Stretching Without Activation of Stretch-Activated Channels in Intact Rat Cardiac Trabeculae. Tsuyoshi Nagano, Masahito Miura, Natsu Narumi, Chiyohiko Shindoh. 第 7 7 回 日本循環器学会 (横浜) 平成 2 5 年 3 月 1 5 日
6. Expression and Function of the Ryanodine Receptor Subtype 3 in Cardiac Purkinje Fibers: Potential Target for Selective Treatment of Purkinje Ectopy? Rebecca E Daniels, Lawson Miller, Simran Arora, Elizabeth Chia, Masahito Miura, John McGuire, Bruno D Stuyvers. 85th AHA meeting (米国、Los Angeles) 2012 Nov 6.
7. Muscle Stretching Causes Membrane Excitation Without Activation of Stretch-Activated Channels in Intact Rat Trabeculae. Tsuyoshi Nagano, Masahito Miura, Naomi Murai, Chiyohiko Shindoh. 85th AHA meeting (米国、Los Angeles) 2012 Nov 5.
8. Ca²⁺ Wave Propagation was Modulated by ROS Generation During Stretching in Intact Rat Cardiac Trabeculae. Masahito Miura, Naomi Murai, Tsuyoshi Nagano, Chiyohiko Shindoh. 85th AHA meeting (米国、Los Angeles) 2012 Nov 5.
9. Carbenoxolone increases susceptibility to arrhythmias. Tsuyoshi Nagano,

Masahito Miura, Naomi Murai, Lawson Miller, Chiyohiko Shindoh, Bruno D. Stuyvers. 33rd Annual Scientific Sessions of Heart Rhythm Society (米国、Boston) 2012 May 10.

10. Regional But Not Global Increase in Extracellular Potassium Can be Arrhythmogenic in Rat Cardiac Muscle. Tsuyoshi Nagano, Masahito Miura, Naomi Murai, Chiyohiko Shindoh. 第76回日本循環器学会(福岡)平成24年3月17日

11. Permeability of Gap Junctions Affects the Velocity of Ca²⁺ Waves in Rat Cardiac Muscle. Tsuyoshi Nagano, Masahito Miura, Naomi Murai, Chiyohiko Shindoh. 第76回日本循環器学会(福岡)平成24年3月17日

12. Modulation of Propagation Velocity of Ca²⁺ Waves in Rat Cardiac Muscle with Uniform and Nonuniform Contraction. Naomi Murai, Masahito Miura, Tsuyoshi Nagano, Chiyohiko Shindoh. 第76回日本循環器学会(福岡)平成24年3月16日

13. Non-uniform Muscle Contraction Modulates Propagation Features of Ca²⁺ Waves in Intact Rat Cardiac Trabeculae. Masahito Miura, Naomi Murai, Taiki Hattori, Yumiko Izuhara, Tsuyoshi Nagano, Chiyohiko Shindoh. 32nd Annual Scientific Sessions of Heart Rhythm Society (米国、San Francisco) 2011 May 6.

〔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

三浦 昌人 (MIURA MASAHIITO)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30302110