

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24614015

研究課題名(和文) 低マグネシウム血症に伴う心血管機能不全はマグネシウム補充療法によって改善するか？

研究課題名(英文) Is the cardiovascular dysfunction with hypomagnesemia improved by magnesium supplemental treatment?

研究代表者

渡邊 マキノ (Watanabe, Makino)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00255655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性的Mg欠乏ラットを作製し、心血管機能とMg補充の有効性について検討した。本研究によりMg欠乏ラットにおいて心血管機能が低下していることが示されたが、心機能についてはミトコンドリア機能の障害、血管機能についてはGタンパク共役受容体を介した細胞内シグナル伝達機構の障害が考えられた。Mg補充は心血管機能低下の改善に有効である可能性が示され、今後、心血管機能障害およびMg補充の詳細な検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：To assess the cardiovascular function of chronic magnesium (Mg) deficient rat and effect of supplementation with Mg, we generated chronic Mg deficient rat model. In chronic Mg deficient rat, cardiovascular function was decreased. Cardiac and vascular dysfunctions were caused by the mitochondrial dysfunction and by the failure of intracellular signaling mechanism through the G protein-coupled receptor, respectively. Mg supplementation will be effective in the improvement of cardiovascular dysfunction by Mg deficiency. It is necessary to detailed studies about the cardiovascular dysfunction and Mg supplementation by Mg deficiency.

研究分野：生理学

キーワード：低マグネシウム血症 心血管機能不全 ミトコンドリア マグネシウム補充

1. 研究開始当初の背景

(1) マグネシウム(Mg)はコファクターとして 300 種類以上の酵素反応に関与するとともに、Ca²⁺拮抗作用、膜安定化作用を持つ。これらの作用が複合的に働くことにより、Mg は心筋・血管平滑筋の収縮・弛緩反応、インスリン抵抗性や脂質代謝、酸化ストレス調節などの多くの生体機能に複合的に寄与する。これら生理機能の維持には、体内の Mg 濃度が正常に保たれる必要があるが、近年の日本人の食習慣の欧米化・脱日本化は低 Mg 血症発症のリスクを増加させている。低 Mg 血症は様々な病態を惹起し、例えばメタボリックシンドローム発症の一因とされるが、臨床現場における経験的な報告が多く、メカニズムの解明に必要なエビデンスはほとんど得られていないのが現状である。

(2) Mg 欠乏と循環器疾患については、飲料水や土壌中の Mg 含有量が低い地域で虚血性心疾患の罹患率や死亡率が高いとの疫学的事実があるほか、実験系においても Mg 欠乏動物で高血圧が認められることや、心筋梗塞発症モデル動物の心筋内 Mg 含有量の低下などが報告されている。

(3) 虚血や低酸素による心筋障害に対して Mg が心筋保護効果を持つことが経験的に知られており、実際、St. Thomas 液などの心筋保護液の Mg 濃度は血漿中より 10 倍以上高い。しかしながらその心筋保護効果のメカニズムの詳細は不明であった。研究代表者らのグループは高濃度の細胞外 Mg は、Mg の Ca 拮抗作用のみならず、ミトコンドリア ATP 感受性 K チャネル (mK_{ATP} チャネル) の開口を介して心筋保護効果をもたらすことを見出した。またラット胎仔では成体に比して心筋 Mg 含有量が高く、低酸素 - 再酸素化障害に対する耐性も高いことを見出しており、Mg は心機能の維持に重要であり、さらに虚血 - 再灌流障害の抑制に効果があることを明らかにした。

2. 研究の目的

上述のように、心機能の維持や心筋保護に Mg が重要な役割を果たしていることは明らかであるが、国内外において心機能と Mg、さらには低 Mg 血症と関連を病態生理学的に検討している研究はほとんどない。食習慣の変化により今後増加する可能性が高い慢性的低 Mg 血症患者に対する心血管病の予防や治療効果の促進には Mg 補充療法が有効であると考えている。その有効性を立証するには病態生理学的手法を用い、

- (1) 慢性的低 Mg 血症の心・血管機能に対する Mg 補充療法の効果
 - (2) 虚血 - 再灌流障害時の Mg による心筋保護効果のメカニズム
- を明らかにする必要がある。これらを明らか

にした上で

(3) 低 Mg 血症に伴う心・血管機能不全を最も効果的に予防・抑制する Mg 補充および Mg 投与のプロトコルを決定することを目標とする。

本申請研究の結果は低 Mg 血症による心臓機能不全の予防・治療の基礎となるだけでなく、心臓手術あるいは蘇生に関係する患者の栄養管理にも直結し、栄養学と臨床医学の橋渡しになることが期待できる。また臓器・細胞組織・細胞内小器官という様々な階層での実験を同一条件で行い、常に細胞・細胞内小器官レベルでの詳細な分析と、その結果を臓器レベルで適応可能かを検討し、統合を繰り返しながら研究を進めることで、科学的エビデンスに基づいた Mg 補充・投与プロトコル作成が可能となり、栄養学から臨床現場への多面的な研究の礎になり得る。

3. 研究の方法

(1) 慢性的 Mg 欠乏モデルの作製

雄性 Sprague-Dawley ラット (5 週齢) に Mg 欠乏食 (日本クレア製: Mg 含有量 4.5 mg/100 g) と脱イオン水を 8 週間給餌し、Mg 欠乏群とした。Mg 補充群は、8 週間の欠乏食期間後、通常食および水道水でさらに 8 週間飼育した。

(2) ラングENDORF 摘出灌流心モデルによる低酸素 - 再酸素化の影響の検討

ラットを麻酔下にて開腹し、下大静脈より採血をした後、開胸し、心臓を摘出し定流量ラングENDORF 灌流を行った。安定化後、低酸素灌流 (30 分) - 再酸素化 (30 分) を行った。灌流中は左心室内にラテックス製のバルーンを挿入し、心拍数 (HR)、左室発生圧 (LVDP) をモニターした。心機能は圧・心拍数積 (PRP = LVDP × HR) で評価した。

(3) 単離心室筋細胞を用いた Mg 流入路の検討

心筋の Mg 流入路として一過性受容体電位メラスタチン 7 (Transient receptor potential Melastatin 7: TRPM7) が知られている。蛍光イメージング法を用い、細胞内 Mg イオン動態を観察し、Mg 流入路の検討を行った。

ラット心臓をコラゲナーゼで酵素的に処理し、心室筋細胞を単離した。単離された心室筋細胞に蛍光 Mg 指示薬である mag-fura 2 を負荷し、2 波長 (350 nm および 380 nm) で励起し、500 nm の蛍光を検出した。380 nm 励起と 350 nm 励起による蛍光強度 (F₃₈₀、F₃₅₀) の比から細胞内 Mg イオン濃度を求めた。

mag-fura 2 を負荷した心室筋細胞を蛍光顕微鏡にセットしたチャンバーに置き、低酸素灌流 (30 分) - 再酸素化 (30 分) を行い、細胞内 Mg イオン動態を観察した。

TRPM7 の阻害剤には Spermin (300 μM)

および NS8593 (10 μ M)を用いた。

(4) ミトコンドリア機能の検討

虚血 - 再灌流障害の病態としてミトコンドリア透過性遷移孔 (mitochondrial permeability transition pore; mPTP)が知られている。mPTP 開孔を指標として各群のラット心臓のミトコンドリア機能を比較する。

各群のラット心臓から遠心分離法によって単離した。ミトコンドリア浮遊液に蛍光 Ca^{2+} 指示薬である Ca-Green 5N を添加し、1 波長励起 (488 nm) による蛍光を 510 nm で検出した。

ミトコンドリア浮遊液に Ca を添加するとミトコンドリア外液の Ca 濃度が上昇するが、外液の Ca は直ちにミトコンドリアに取り込まれるために、すぐにミトコンドリア外液の Ca 濃度は低下する。一定量の Ca を一定間隔で添加するうちに Ca 過負荷状態となり、ミトコンドリア内に取り込まれていた Ca が一気にミトコンドリア外液に流出し、ミトコンドリア外液の Ca 濃度が急上昇する。この時点をも mPTP 開孔とし、mPTP 開孔に要する Ca 量を各群で比較した。

(5) 摘出大動脈標本による血管収縮・弛緩反応の評価

各群のラットから胸部大動脈を摘出し、リング標本作製し、収縮反応は高濃度 K (60 mM K^+)、 α_1 アゴニストであるフェニレフリン (PE) により検討した。また弛緩反応は PE によって最大収縮を惹起した後、アセチルコリン (ACh)、ニトロプルシドナトリウム (SNP) を適用し、各群の差異を検討した。

4. 研究成果

(1) ラットに対する Mg 欠乏の影響

Mg 欠乏食の給餌を開始して 2 週目あたりから死亡する個体が発生し、8 週時点での生存率は約 80%であった。8 週間の Mg 欠乏食の給餌により、ラットの成長が有意に阻害され、また重篤な低 Mg 血症および貧血が引き起こされた。また実験に供した Mg 欠乏ラットのうち約 60%に胸水や腹水の貯留が認められた。さらにテールカフ法により測定した血圧も収縮期、拡張期血圧とも著明に上昇していた。

(2) 低酸素-再酸素化障害に対する Mg 欠乏の影響

ランゲンドルフ摘出灌流心モデルを用い、低酸素-再酸素化の影響を検討した。安定化後の PRP は Mg 欠乏群で正常群 (図 1-A;) と比して有意に低かった (図 1-A;)。これは HR、LVDP ともに正常群より Mg 欠乏群で低値であることが原因であった。また安定化後の PRP を 100%として標準化した結果、Mg 欠乏群において再酸素化後の心機能の回復が有意に低下していた (図 1-B;)。

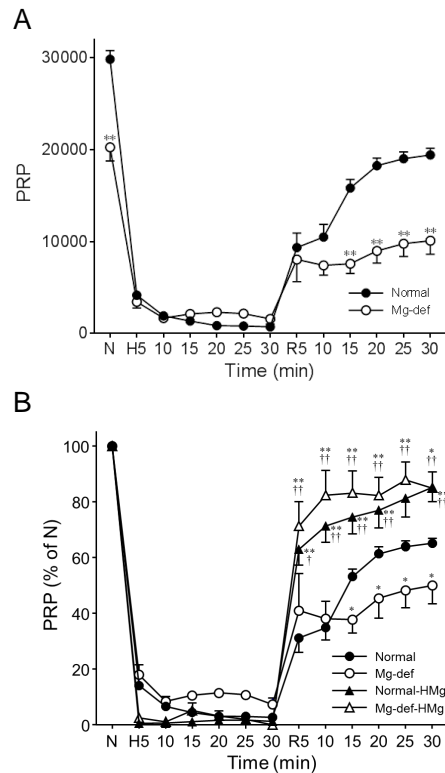


図 1 心機能に対する Mg 欠乏の影響

(3) mPTP 開孔に対する Mg 欠乏の影響

図 2 に示すように Mg 欠乏群では正常群に比して少量の Ca 負荷によって mPTP が開孔することが明らかとなった。Mg 欠乏群において再酸素化障害が大きかったのは、mPTP 開孔が起こりやすいためであることが示唆された。

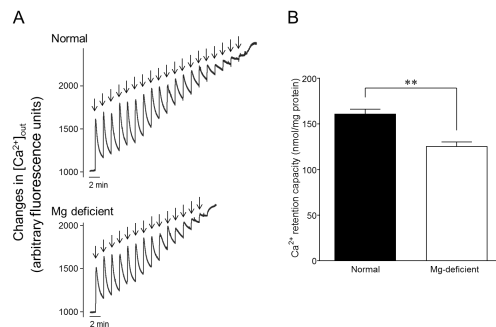


図 2 mPTP 開孔に対する Mg 欠乏の影響

(4) Mg 欠乏群における高濃度 Mg による心筋保護効果

正常群では低酸素灌流中に灌流液の Mg 濃度を 1.2 mM から 12 mM に上昇させておくと (高濃度 Mg) 心筋保護効果が得られる (図 1-B;)。Mg 欠乏群について同様の検討をしたところ、高濃度 Mg による心筋保護効果が認められ、再酸素化による心機能回復の時間経過、レベルとも正常群と同等であった (図 1-B;)。

高濃度 Mg による心筋保護効果には mKATP チャンネルの開口が関与していることが知られている。正常群において、mKATP チャンネル

開口薬である diazoxide を低酸素灌流中に適用すると高濃度 Mg と同等の心筋保護効果が得られ、mKATP チャンネル阻害薬である 5-hydroxydecanoic acid (5-HD) は高濃度 Mg による心筋保護効果を消失させた。しかし Mg 欠乏群では diazoxide、5-HD とも効果がなかった。これらの結果および(3)で示した mPTP の結果から、Mg 欠乏群ではミトコンドリア機能が障害されている可能性が示唆された。

(5) Mg 流入路の検討

正常群の単離心室筋細胞において、細胞外液が低酸素かつ高濃度 Mg (12 mM) 下で TRPM7 を介した Mg 流入があることが明らかとなり、この Mg の流入が心筋保護に重要な役割を果たしている可能性が示唆された (華藤等、順天堂醫事雑誌、2013)。Mg 欠乏群の単離心室筋細胞について、同じ条件で細胞内 Mg イオン動態を観察したところ、細胞内 Mg 濃度上昇の時間経過、程度とも正常群と差はなかった。また TRPM7 阻害剤である Spermin (300 μ M) および NS8593 (10 μ M) はどちらも Mg 流入量を約 65% 抑制し、Mg 欠乏群においても低酸素・高濃度 Mg 下における Mg 流入は TRPM7 を介しており、チャンネル機能は Mg 欠乏の影響を受けていないことが示唆された。

(6) 血管収縮・弛緩反応に対する Mg 欠乏の影響

収縮機能に関して、高濃度 K による収縮は正常群、Mg 欠乏群で差は認められなかったが、 α_1 アゴニストである PE による収縮は Mg 欠乏群で著明に減弱していた (図 3)。この結果は G タンパク共役受容体を介した細胞内シグナル伝達機構のいずれかの過程が障害され、収縮が減弱している可能性を示唆している。

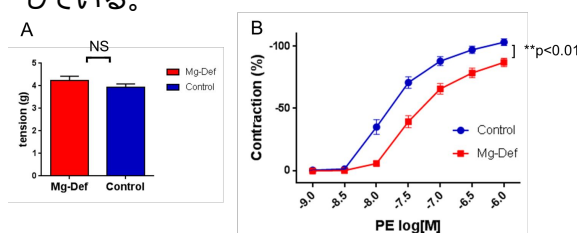


図 3 血管収縮に対する Mg 欠乏の影響

ACh および SNP による弛緩反応は Mg 欠乏群において正常群より増強していた。しかし Mg 欠乏群では PE 収縮は正常群より減弱していることから、正常群と同程度の弛緩刺激に対してより強く弛緩反応が見られたと考えられた。

(7) 慢性的 Mg 欠乏に対する Mg 補充の影響

Mg 補充により、Mg 欠乏群で認められた低 Mg 血症、貧血は完全に改善された。また Mg 欠乏群で観察された心血管機能の低下は完

全ではないが正常群に近いレベルまで改善される傾向が認められ、Mg の経口摂取が Mg 欠乏の治療に有効であることが示唆された。しかし、血圧上昇および胸水貯留は改善されておらず、さらに Mg 欠乏群では見られなかった歯牙の異常な伸長が認められる個体が多くあり、今後の検討が必要である。

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 1 件)

華藤恵美、中村京子、家崎貴文、岡田隆夫、代田浩之、渡邊マキノ：低酸素下における心筋細胞内マグネシウムの維持機構。順天堂醫事雑誌 59、260-266、2013 (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

華藤恵美、中村京子、家崎貴文、岡田隆夫、代田浩之、渡邊マキノ：低酸素下における Mg 流入経路 第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 29 日、タワーホール船堀 (東京都)

渡邊マキノ、柿木亮、家崎貴文、岡田隆夫：慢性的マグネシウム欠乏ラットにおける高濃度 Mg による心筋保護効果のメカニズムは正常ラットとは異なる。第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 17 日、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県)

Makino Watanabe, Kyoko Nakamura, Megumi Kato, Ryo Kakigi, Takafumi Iesaki, Takao Okada: Mechanisms of cardioprotective effects of high concentration of magnesium on hypoxia/reoxygenation injury in chronic magnesium deficient rat heart are differ from normal rat heart. Experimental Biology 2014, April 30, San Diego Convention Center (CA, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 マキノ (WATANABE, Makino)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：00255655

(2) 研究分担者

家崎 貴文 (IESAKI, Takafumi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：10348956