

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460287

研究課題名(和文) 心筋虚血再灌流傷害における容量性カルシウム流入機構の関与の検討

研究課題名(英文) Involvement of store-operated calcium entry in ischemia/reperfusion injury in the heart

研究代表者

松浦 博 (Matsuura, Hiroshi)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：60238962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、虚血心筋の再灌流時に発生するCa<sup>2+</sup>過負荷を原因とする虚血再灌流傷害に、容量性カルシウム流入機構(store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, SOCE)を介するCa<sup>2+</sup>流入が関与していることを明らかにした。マウスランゲンドルフ灌流心を用いた実験で、30分の全虚血後の再灌流時に発生する収縮能の低下を、SOCEの阻害剤である2-aminoethoxydiphenyl borateやLaCl<sub>3</sub>が軽減した。さらに、フレカイニドもまた虚血再灌流傷害を軽減したため、筋小胞体からのCa<sup>2+</sup>リークを阻害する薬剤もまた虚血再灌流傷害に対して保護作用を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The present investigation provides experimental evidence to support that the store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) is involved in ischemia/reperfusion injury in the heart. For example, in Langendorff-perfused mouse heart model, reperfusion following 30 min of global ischemia was associated with contractile dysfunction such as elevation of left ventricular end-diastolic pressure and reduction of left ventricular developed pressure. These dysfunctions were partially but significantly attenuated by the SOCE blockers 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) and LaCl<sub>3</sub>. In addition, flecainide, which blocks Ca<sup>2+</sup> leak through type2 ryanodine receptor and thereby preserves Ca<sup>+</sup> content in SR, was also effective in preventing the contractile dysfunction associated with ischemia/reperfusion injury in the heart. These observations suggest that the drugs that block Ca<sup>2+</sup> leak from SR have protective effects against ischemia/reperfusion injury in the heart.

研究分野：心臓生理学

キーワード：虚血再灌流傷害 容量性カルシウム流入機構 Ca<sup>2+</sup>過負荷 筋小胞体 リアノジン受容体 2-APB フレカイニド ランゲンドルフ灌流

### 1. 研究開始当初の背景

心筋を栄養する冠状動脈の狭窄・閉塞により虚血に陥った心筋を救済するには、血流の再開(再灌流)が必須であるが、虚血心筋の再灌流は必ずしも細胞機能の回復につながるとは限らず、逆に収縮機能の回復遅延(気絶心筋)、不整脈(再灌流不整脈)さらには心筋細胞過拘縮(致死性再灌流傷害)などの心筋傷害を伴うことが知られている(心筋虚血再灌流傷害)。これらの心筋虚血再灌流傷害には、再灌流時に発生する心筋細胞の  $Ca^{2+}$  過負荷により惹起された細胞機能障害を主な原因としているが、その発生機転については十分に解明されていない。さらに、虚血再灌流傷害は狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患に加えて、高血圧や糖尿病など広く生活習慣病に合併することも知られており、その発生機転の解明や予防・治療法の開発は、これらの生活習慣病の予後を改善するための喫緊の課題である。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、再灌流に伴って発生する細胞内  $Ca^{2+}$  過負荷の主たる原因として、筋小胞体内の  $Ca^{2+}$  含量の減少により活性化される容量性(ストア調節性)  $Ca^{2+}$  流入機構(store-operated  $Ca^{2+}$  entry, SOCE)に新たに着目して、その関与を広く正常心臓から病態心臓(肥大心)を用いて生理学的・分子生物学的に検討を行う。得られた知見は虚血性心疾患における閉塞冠動脈の再疎通療法時など虚血再灌流傷害が発生しうる状況下での心筋保護法の開発に役立て、虚血性心疾患の予後改善に寄与することを目的とする。

### 3. 研究の方法

心筋虚血再灌流傷害の発生における SOCE の関与を、ランゲンドルフ灌流下でのマウス単離心臓および酵素処理により得られたマウス単離心室筋細胞を用いて行う。虚血再灌流傷害に対する SOCE 阻害剤の効果により評価する。さらに、心筋細胞の  $Ca^{2+}$  ストアである筋小胞体のリアノジン受容体(ryanodine receptor 2, RyR2)の阻害剤であるフレカイニドの虚血再灌流傷害に対する保護効果も検討する。

### 4. 研究成果

i) 心筋虚血再灌流傷害の発生に SOCE が関わっているかを、マウス摘出灌流心を用いて検討した。ランゲンドルフ灌流下に虚血(30分間の灌流停止)および再灌流(60分間)を行い、バルーンカテーテルを用いて左心室機能(左室拡張末期圧; LVEDP, 左室 developed pressure; LVDP)を計測した。

a) 対照群では、再灌流 60 分後の LVEDP は  $33.7 \pm 13.4$  mmHg と虚血前値 ( $9.0 \pm 2.7$  mmHg) と比較して有意に上昇し、また、LVDP は  $42.8 \pm 12.0$  mmHg と虚血前値 ( $80.7 \pm 22.5$  mmHg) と比較して有意に低下した。

この虚血再灌流傷害に起因する左心室機能低下は、SOCE の阻害剤である 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB, 10  $\mu$ M) もしくは  $LaCl_3$  (10  $\mu$ M) の投与により有意に改善した。

b) フレカイニド (1  $\mu$ M) を投与すると、虚血再灌流後の左心室機能低下を有意に改善することが明らかとなった。

ii) パッチクランプ法を用いた電気生理学的検討により、マウス心室筋細胞に SOCE 電流の存在が確認できた。

iii) 免疫細胞化学法により、マウス心室筋細胞に TRPC (transient receptor potential canonical)1、TRPC3、TRPC4 の発現が認められた。

これらの実験結果により、マウス心室筋細胞には TRPC チャネルが発現・機能しており、この TRPC チャネルを基盤とする SOCE が、心筋虚血再灌流傷害の発生に関わっていることが明らかとなった。

iv) 心肥大モデルマウスを作成して心筋虚血再灌流傷害の発生機転について解析を行った。具体的には、成体 C57BL/6J マウスを実体顕微鏡下に左第 2 肋間より開胸して大動脈弓部に到達して、腕頭動脈と左総頸動脈の間に 7-0 絹糸を用いて banding を行い大動脈狭窄を作成した (TAC 手術群)。別のマウスに対しては、banding を除く同様の手術操作を行った (Sham 手術群)。肥大心における虚血再灌流傷害の発生機転を解明する目的で、虚血心筋の再灌流時に産生される過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) による左室心筋細胞への効果を生細胞型パッチクランプ法を用いて検討した。その結果、以下のことが明らかとなった。

a) TAC 手術群から得られた左室心筋細胞では、正常タイロード液で灌流中でも、振動性膜電位やそれから発生する異常自動能が出現していた (図 1)。

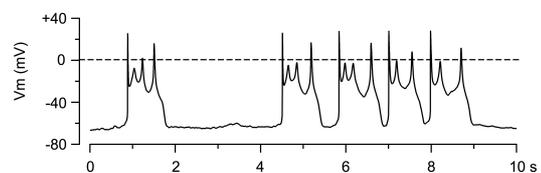


図 1. TAC 心室筋細胞から記録された異常自動能

$H_2O_2$  (10  $\mu$ M) を投与するとこれらの電気生理学的異常はさらに増強され、投与後 10 分以内に不可逆的細胞拘縮(細胞死)を呈した。

b) Sham 手術群から得られた左室心筋細胞では、振動性膜電位や異常自動能の発生頻度やそれらに対する  $H_2O_2$  による増強作用は有意に少なかった。これらの実験結果は、肥大

心においては筋小胞体 RyR2 から  $\text{Ca}^{2+}$  リークが増強しており、それが形質膜の  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換機転を介して細胞外へ排出されていることを示唆している。さらに、肥大心においてこれらの電気生理学的異常が  $\text{H}_2\text{O}_2$  により増悪したということは、RyR2 からの  $\text{Ca}^{2+}$  リークが  $\text{H}_2\text{O}_2$  により増強されやすいと考えることができる。このように、肥大心における虚血再灌流傷害の発生機転として、RyR2 からの  $\text{Ca}^{2+}$  リークの亢進とその活性酸素種による増強作用が関わっていることが明らかとなった。

#### 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 24 件)

1. Kojima A, Bai JY, Ito Y, Ding WG, Kitagawa H, Matsuura H. Serum albumin attenuates the open-channel blocking effects of propofol on the human Kv1.5 channel. *Eur J Pharmacol* 2016;783:117-26. (査読有)
2. Maeda T, Toyoda F, Imai S, Tanigawa H, Kumagai K, Matsuura H, Matsusue Y. Lidocaine induces ROCK-dependent membrane blebbing and subsequent cell death in rabbit articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2016;34:754-62. (査読有)
3. Bai JY, Ding WG, Kojima A, Seto T, Matsuura H. Putative binding sites for arachidonic acid on the human cardiac Kv1.5 channel. *Br J Pharmacol* 2015;172:5281-92. (査読有)
4. Kojima A, Ito Y, Ding WG, Kitagawa H, Matsuura H. Interaction of propofol with voltage-gated human Kv1.5 channel through specific amino acids within the pore region. *Eur J Pharmacol* 2015;764:622-32. (査読有)
5. Kojima A, Ito Y, Kitagawa H, Matsuura H. Ionic mechanisms underlying the negative chronotropic action of propofol on sinoatrial node automaticity in guinea-pig heart. *Br J Pharmacol* 2015;172:799-814. (査読有)
6. Xie Y, Ding WG, Matsuura H.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin potentiates  $I_{\text{Ks}}$  in sinoatrial node cells by activating  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *Pflugers Arch* 2015;467:241-51. (査読有)
7. Kubo T, Ding WG, Toyoda F, Fujii Y, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase prevents the decrease in the HERG potassium current induced by Gq protein-coupled receptor stimulation. *J Pharmacol Sci* 2015;127:127-34. (査読有)
8. Omatsu-Kanbe M, Nishino Y, Nozuchi N, Sugihara H, Matsuura H. Prion protein- and cardiac troponin T-marked interstitial cells from the adult myocardium spontaneously develop into beating cardiomyocytes. *Sci Rep* 2014;4:7301. (査読有)
9. Fukuyama M, Wang Q, Kato K, Ohno S, Ding WG, Toyoda F, Itoh H, Kimura H, Makiyama T, Ito M, Matsuura H, Horie M. Long QT syndrome type 8: novel CACNA1C mutations causing QT prolongation and variant phenotypes. *Europace* 2014;16:1828-37. (査読有)
10. Omatsu-Kanbe M, Matsuura H. Novel intracellular mediator of adiponectin secretion from adipocytes. *J Physiol* 2014;592:5141. (査読有)
11. Wu J, Ding W-G, Zhao J, Zang W-J, Matsuura H, Horie M. Irbesartan-mediated  $\text{AT}_1$  receptor blockade attenuates hyposmotic-induced enhancement of  $I_{\text{Ks}}$  current and prevents shortening of action potential duration in atrial myocytes. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2014;15:341-7. (査読有)
12. Kojima A, Ito Y, Kitagawa H, Matsuura H, Nosaka S. Direct negative chronotropic action of desflurane on sinoatrial node pacemaker activity in the guinea pig heart. *Anesthesiology* 2014;120:1400-13. (査読有)
13. Hasegawa K, Ohno S, Itoh H, Makiyama T, Aiba T, Nakano Y, Shimizu W, Matsuura H, Makita N, Horie M. A rare *KCNE1* polymorphism, D85N, as a genetic modifier of long QT syndrome. *Journal of Arrhythmia* 2014;30:161-6. (査読有)
14. Wang Q, Ohno S, Ding WG, Fukuyama M, Miyamoto A, Itoh H, Makiyama T, Wu J, Bai J, Hasegawa K, Shinohara T, Takahashi N, Shimizu A, Matsuura H, Horie M. Gain-of-function *KCNH2* mutations in patients with Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2014;25:522-30. (査読有)

15. Wu J, Naiki N, Ding W-G, Ohno S, Kato K, Zang W-J, Delisle BP, Matsuura H, Horie M. A molecular mechanism for adrenergic-induced long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:819-27. ( 査読有 )
16. Zhou J, Ding WG, Makiyama T, Miyamoto A, Matsumoto Y, Kimura H, Tarutani Y, Zhao J, Wu J, Zang WJ, Matsuura H, Horie M. A novel HCN4 mutation, G1097W, is associated with atrioventricular block. *Circ J* 2014;78:938-42. ( 査読有 )
17. Hasegawa K, Ohno S, Ashihara T, Itoh H, Ding WG, Toyoda F, Makiyama T, Aoki H, Nakamura Y, Delisle BP, Matsuura H, Horie M. A novel *KCNQ1* missense mutation identified in a patient with juvenile-onset atrial fibrillation causes constitutively open  $I_{Ks}$  channels. *Heart Rhythm* 2014;11:67-75. ( 査読有 )
18. Kato K, Makiyama T, Wu J, Ding WG, Kimura H, Naiki N, Ohno S, Itoh H, Nakanishi T, Matsuura H, Horie M. Cardiac channelopathies associated with infantile fatal ventricular arrhythmias: from the cradle to the bench. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2014;25:66-73. ( 査読有 )
19. Ding WG, Xie Y, Toyoda F, Matsuura H. Improved functional expression of human cardiac kv1.5 channels and trafficking-defective mutants by low temperature treatment. *PLoS One* 2014;9:e92923. ( 査読有 )
20. Kiyonaka S, Kajimoto T, Sakaguchi R, Shinmi D, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Imamura H, Yoshizaki T, Hamachi I, Morii T, Mori Y. Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells. *Nat Methods* 2013;10:1232-8. ( 査読有 )
21. Kojima A, Ito Y, Kitagawa H, Matsuura H, Nosaka S. Remifentanyl has a minimal direct effect on sinoatrial node pacemaker activity in the guinea pig heart. *Anesth Analg* 2013;117:1072-7. ( 査読有 )
22. Kumagai K, Kubo M, Imai S, Toyoda F, Maeda T, Okumura N, Matsuura H, Matsusue Y. The COX-2 selective blocker etodolac inhibits TNF  $\alpha$ -induced apoptosis in isolated rabbit articular chondrocytes. *Int J Mol Sci* 2013;14:19705-15. ( 査読有 )
23. Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S. Sevoflurane protects ventricular myocytes against oxidative stress-induced cellular  $Ca^{2+}$  overload and hypercontracture. *Anesthesiology* 2013;119:606-20. ( 査読有 )
24. Omatsu-Kanbe M, Matsuura H. Ischemic survival and constitutively active autophagy in self-beating atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs): characterization of a new subpopulation of heart cells. *J Physiol Sci* 2013;63:17-29. ( 査読有 )
- [学会発表](計23件)
- 尾松 万里子、西野 裕香、野土 希実、松浦 博 ヒト梗塞心筋組織におけるプリオンタンパク質を発現する心筋前駆細胞の局在 第93回日本生理学会大会 平成28年3月22日~24日 札幌
  - 豊田 太、丁 維光、松浦 博 心臓ペースメーカー細胞の緩徐脱分極相におけるジヒドロピリジン感受性ナトリウム電流の寄与 第93回日本生理学会大会 平成28年3月22日~24日 札幌
  - 上田 梨加、狭川 浩規、松浦 博 細胞外 ATP は P2X 受容体チャネルを活性化して洞房結節細胞の自動性を抑制する 第93回日本生理学会大会 平成28年3月22日~24日 札幌
  - 小野 真由子、豊田 太、松浦 博 マウス心房筋 HL-1 細胞における Pitx2c の過剰発現がカリウムチャネルの発現パターンに及ぼす影響 第93回日本生理学会大会 平成28年3月22日~24日 札幌
  - 丁 維光、白 佳玉、豊田 太、ベリエ ジャンピエル、松浦 博 ヒト心筋 Kv1.5 チャネルに及ぼすプロテインキナーゼ C の調節作用 第93回日本生理学会大会 平成28年3月22日~24日 札幌
  - 狭川 浩規、上田 梨加、松浦 博 心臓 L 型  $Ca^{2+}$ チャネルのベラパミル感受性の生後変化 第93回日本生理学会大会 平成28年3月22日~24日 札幌
  - 松原 一樹、丁 維光、白 佳玉、松浦 博 ヒト Kv1.5 チャネルと抗不整脈薬ベプリジルとの相互作用について 第93回日本生理学会大会 平成28年3月22日~24日 札幌

8. 谷川 仁土、豊田 太、前田 勉、熊谷 康佑、今井 晋二、松浦 博 ウサギ軟骨細胞における P2X7 受容体の機能的発現 第 93 回日本生理学会大会 平成 28 年 3 月 22 日～24 日 札幌
9. Nishino, Y., Omatsu-Kanbe, M., Nozuchi, N., Matsuura, H. Cardiac progenitor cells that spontaneously develop into beating cardiomyocytes in the adult mouse heart. 8th FAOPS Congress; Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress, Bangkok, Thailand, November 22-25, 2015.
10. Nozuchi, N., Omatsu-Kanbe, M., Nishino, Y., Matsuura, H. Human cardiac progenitor cells expressing prion protein and cardiac troponin T in the normal and infarcted heart. 8th FAOPS Congress; Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress, Bangkok, Thailand, November 22-25, 2015.
11. 丁 維光、白 佳玉、謝 宇、豊田 太、Bellier Jeanpierre、松浦 博 モルモット心筋の電気活動に及ぼす アドレナリン受容体の調節作用 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、第 92 回日本生理学会大会・合同大会 平成 27 年 3 月 21 日～23 日 神戸国際会議場・展示場
12. 前田 勉、豊田 太、今井 晋二、谷川 仁土、熊谷 康佑、松浦 博、松末 吉隆 リドカインはウサギ軟骨細胞に ROCK 依存性の膜プレブと細胞死を起こす 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、第 92 回日本生理学会大会・合同大会 平成 27 年 3 月 21 日～23 日 神戸国際会議場・展示場
13. 尾松万里子、野土 希実、西野 裕香、松浦 博 拍動する細胞 atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs) の心筋組織における起源：プリオンタンパク質と心筋型トロポニン T を共発現する間隙細胞 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、第 92 回日本生理学会大会・合同大会 平成 27 年 3 月 21 日～23 日 神戸国際会議場・展示場
14. 豊田 太、丁 維光、松浦 博 心臓ペースメーカー細胞における L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル (Cav1.3) と持続性内向き Na<sup>+</sup>電流の機能相関 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会、第 92 回日本生理学会大会・合同大会 平成 27 年 3 月 21 日～23 日 神戸国際会議場・展示場
15. Wang Q, Ohno S, Ding W-G, Bai J, Makiyama T, Matsuura H, Horie M. Functional analysis on a novel KCNH2 mutation identified in a Familial short QT syndrome. Cardiac Electrophysiology Society Meeting, Chicago, Illinois, USA, November 15, 2014.
16. 白 佳玉、丁 維光、謝 宇、松浦 博 ヒト心筋 Kv1.5 電流に及ぼすアラキドン酸の作用機構 第 91 回日本生理学会大会 平成 26 年 3 月 16 日～18 日 鹿児島
17. 丁 維光、白 佳玉、謝 宇、豊田 太、ベリエ ジャンピエル、松浦 博 洞房結節細胞のIKs に及ぼす 2 受容体刺激の調節作用 第 91 回日本生理学会大会 平成 26 年 3 月 16 日～18 日 鹿児島
18. 謝 宇、丁 維光、白 佳玉、松浦 博 心臓洞房結節細胞の IKs 電流に対する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の作用機序 第 91 回日本生理学会大会 平成 26 年 3 月 16 日～18 日 鹿児島
19. 豊田 太、Mesirca Pietro、Dubel Stefan、丁 維光、Striessnig Joerg、Mangoni E Matteo 松浦 博 マウス洞房結節細胞における Cav1.3 と持続性内向き Na<sup>+</sup>電流の関連 第 91 回日本生理学会大会 平成 26 年 3 月 16 日～18 日 鹿児島
20. 西野 裕香、野土 希実、尾松 万里子、松浦 博 マウス心室組織より同定された自動性を有する atypically-shaped cardiomyocytes (ACMs) の起源：Prion protein (PrP) をマーカーとする心筋前駆細胞の発見 第 91 回日本生理学会大会 平成 26 年 3 月 16 日～18 日 鹿児島
21. 野土 希実、西野 裕香、尾松 万里子、松浦 博 ヒト心室組織における prion protein (PrP) と cardiac troponin T (cTnT) を共発現する心筋前駆細胞の発見 第 91 回日本生理学会大会 平成 26 年 3 月 16 日～18 日 鹿児島
22. Jean-Pierre B, Ding W-G, Sakaue Y, Yasuhara O, Matsuura H, Tooyama I. GTP cyclohydrolase 1 and its regulatory protein (GFRP) in the rat brain stem 第 91 回日本生理学会大会 平成 26 年 3 月 16 日～18 日 鹿児島
23. 尾松 万里子、松浦 博 Prion protein (PrP) 陽性心筋前駆細胞の融合による新たな心筋細胞の形成：マウス心室組

織より同定された atypically-shaped  
cardiomyocytes (ACMs) の特徴 第 91  
回日本生理学会大会 平成 26 年 3 月  
16 日 ~ 18 日 鹿児島

〔図書〕(計 1 件)

Omatsu-Kanbe M, Matsuura H. The presence of LC3 and LAMP1 is greater in normal sino-atrial nodal cells than in ordinary cardiomyocytes, indicating a constitutive event. In Autophagy: Cancer, other pathologies, inflammation, immunity, infection, and aging. Ed. Hayat MA. pp 219-226, 2015, Academic Press, Amsterdam, Netherland.

〔その他〕

ホームページ等  
滋賀医科大学研究情報データベース  
<http://www.shiga-med.ac.jp/db/collab.php>  
p

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松浦 博 (MATSUURA, Hiroshi)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60238962

### (2) 研究分担者

小嶋 亜希子 (KOJIMA, Akiko)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50447877

豊田 太 (TOYODA, Futoshi)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90324574

### (3) 連携研究者

なし