

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860629

研究課題名(和文) 心臓におけるBKCaの生理的意義の解明および治療応用の検討

研究課題名(英文) Investigation of physiological role of cardiac BKCa channel and its practical application for medical treatment

研究代表者

矢田 浩崇 (Yada, Hirotaka)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・その他部局等・講師)

研究者番号：60338051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：BKCaチャネルは細胞内Ca濃度等により開口する特殊なKチャネルで、脳や血管に多く発現するが、心臓BKCaの発現は少ないとされてきた。しかし、心筋ミトコンドリアにはBKCaチャネルが発現しており、ミトコンドリア機能を調整し心筋を保護する可能性が示唆されている。本研究はBKCaノックアウトマウスを用いて大動脈、心機能、心電図、不整脈誘発性などの評価を行った。オーガンチャンバー、心機能、心電図、不整脈誘発性について、WTマウスとKOマウスで有意な変化は認めなかった。今後の研究課題はTACモデルや薬剤負荷による心不全モデルなどを用いて心機能、不整脈誘発性などに変化をきたすか検討していくことである。

研究成果の概要(英文)：BKCa channel is a unique K channel that activated by calcium and other various conditions. BKCa channel exists mainly in brain and arterioles. BKCa channel expression of cardiac cell membrane is small. However, myocardial mitochondria has BKCa channel and it protects cardiac myocytes via regulation of mitochondrial function. We assessed aorta, cardiac function, electrocardiogram and electrophysiological study of BKCa knock out (KO) mouse. Organ chamber assessment, ultrasonography of heart, electrogram and electrophysiological study showed no significant differences between WT mice and KO mice. We have to reexamine these parameters in TAC (Transverse Aortic Constriction) mouse model and other heart failure mouse models such as drug overload in the future.

研究分野：医歯薬学

キーワード：BKCa カルシウム

1. 研究開始当初の背景

冠動脈の血管平滑筋を弛緩し、拡張させる代表的なイオンチャネルは Large conductance Ca^{2+} activated K^{+} チャネル (BKCa) および ATP 感受性 K^{+} チャネルである (K_{ATP}) である (FEBS 2010: 584)。冠動脈においてこれらイオンチャネルは、低酸素血症、心筋虚血などで開口し、冠動脈を弛緩させ血流維持に作用することから、虚血病態下の冠循環における BKCa および K_{ATP} が果たしている役割は大きい。また、 K_{ATP} は心室筋にも発現しており、心筋虚血など ATP が枯渇する状態で活性化し、活動電位持続時間を短縮させる。活動電位持続時間を短縮することで心筋のエネルギー消費を減少し、心筋細胞に保護的に作用している。それに対して、BKCa は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇、電位、ガス分子 (NO、CO)、ROS、ヘム、Protein kinase 等さまざまな刺激で開口する特殊な K^{+} チャネルである (Physiology 2009:24) であるが、冠血流を介した作用に対して、心筋細胞膜への発現は少ないため心筋への直接作用は少ないと考えられてきた。しかし、BKCa チャネルは細胞膜のほかに細胞内器官にも発現し (intracellular BKCa: iBKCa) しており、ミトコンドリア、小胞体、核、ゴルジ体などにも局在している。すなわち、1-4 サブユニットの修飾を受けることで細胞膜、ミトコンドリア、小胞体、核などその局在を変化させていることが近年注目されている (J Physiol 2012)。通常、心筋細胞のイオンチャネルは多くが細胞膜に存在し、細胞内イオン、電位を維持しているが、BKCa チャネルの心臓における局在は特殊で、細胞膜には存在しないものの、細胞内のミトコンドリアの発現は多いとされる。Mito BKCa はグリオーマ細胞において初めて発見され (Biochem Biophys Res Commun 1999: 257)、心臓においては心筋虚血からの再灌流障害モデルにおいて、BKCa アゴニスト (NS1619, NS11021) による mito BKCa チャネル活性化が心筋を保護するとの報告が 2002 年以降多くなされており (Science 2002: 298, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006: 290, Pflugers Arch 2009: 457)、寒冷刺激による心筋停止後の心筋収縮回復に BKCa アゴニストが有効であったとの報告もされた (Circulation 2011; 124)。Mito BKCa チャネルが開口するとカリウムイオンの取り込みが進むことにより、ミトコンドリア膜電位 (ψ_m) が脱分極し、ミトコンドリアが活性化する (Biochim Biophys Acta 2010, 1797)。これは、ミトコンドリアによる代謝活性化が心筋虚血再灌流障害時の心筋へのダメージを軽減させると考えられている。

以上のことから、BKCa は冠血流の調節作用、mito BKCa を介した心筋細胞への直接作用の 2 つの心筋保護作用を持つことが予想される。血管平滑筋および心筋細胞の低酸素状態、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇、ガス分子や ROS

放出増加は BKCa を活性化すると考えられる。このような病態においては心筋の収縮低下や頻拍発作が細胞内 Ca^{2+} 過負荷が重要な因子となる。しかし、虚血再還流や心不全における BKCa の役割について冠血流および心筋への直接作用についても十分な解明がされておらず、特に心臓への直接作用についてはほとんど検討されていないが、上述した背景より BKCa が慢性心不全や頻拍性不整脈において果たしている役割は大きいと想定される。

2. 研究の目的

Ca^{2+} 過負荷が関与する慢性心不全において mito BKCa が冠血流維持や心筋代謝で果たしている役割は大きいと考えられるが、未だ詳細は解明されていない。本研究の目的は、BKCa の心不全における役割を解明し、BKCa 活性化を介した新たな治療法を検討することである。

3. 研究の方法

BKCa の全身ノックアウトマウス (BKCa KO マウス) を飼育しており、これを用いて実験を行う。野生型 (WT) マウスおよび BKCa KO マウスにおいて、血圧測定、BNP・アミノ酸・酸化ストレスマーカーなどの血液検査、オーガンチャンバーによる血管機能評価、エコーによる心機能評価、ランゲンドルフによる冠血流・左室圧の評価、心電図記録による心拍数・PQ・QRS・QT・不整脈発生の評価、心筋細胞の Ca トランジェント/ Ca スパーク、パッチクランプ法による mito BKCa を含めた血管平滑筋・心筋イオンチャネルの測定、電気生理学的検査による不整脈の誘発性評価などを行い、BKCa KO マウスにおいて冠血流、左室収縮能、致死的不整脈の誘発があるか確認を行う。

WT と比較し、BKCa KO マウスにおいて心機能や不整脈誘発性などに変化を認めなければ、心不全ストレスを与えた後の評価を同様に施行する。Bimer ら (J Cardiac Failure 2012: 16) の報告によると、ラットにおける高頻度ペーシング心不全モデルにおいてプロテオーム解析をするとミトコンドリアの機能不全を示唆する所見であった。我々もこの報告と同様に心室の高頻度ペーシングを用いた心不全モデルの解析を行う予定であり、初年度にペーシングによる心不全モデルをマウスで確立するための予備実験を行う。作成が困難な時はドキシソルピシン心筋症での検討や、ランゲンドルフでの虚血再灌流実験も考慮する。

4. 研究成果

- (1) ベースラインでの血圧、血液検査マーカーの数値に有意差を認めなかった。
- (2) オーガンチャンバーによる血管評価
マウスの腹部大動脈を剥離してオーガンチ

ランゲンドルフによる冠動脈、心機能評価を行った。アセチルコリン (Ach) 負荷および Spermin による NO への反応性を評価した。図 1 に結果を示すが、本来であれば Slo^{-/-} (BKCa KO) は血管拡張作用をもつ BKCa チャンネルがノックアウトされており、NO への血管拡張反応が低下するはずであるが、WT と比較して NO への反応は維持されていた。

Ach 負荷の結果についても Slo^{-/-}の方が血管拡張は低下すると予想していた。しかし、予想と反して有意差はつかなかったものの、Ach への血管拡張反応は Slo^{-/-}の方が強く、より血管が拡張する傾向を認めた。

NO の血管平滑筋への作用は有意差なく、Ach の血管内皮細胞への作用も機序は不明であるが、BKCa でより血管が拡張する傾向があるという予想外の結果となり、その解釈が困難であった。今後は高血圧などの病態モデルを作成して血管機能につき解析する必要がある。また、Ach の反応性をみると、特に血管内皮において予想と反した反応が起きている可能性があり、パッチクランプによるイオンチャンネルの解析が今後必要と考えられた。

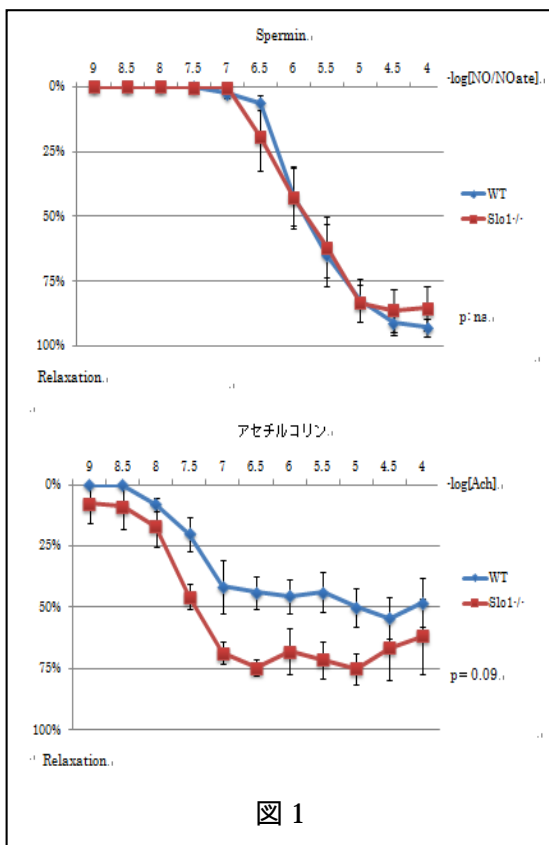


図 1

(3) エコーによる評価

ベースラインでの心エコーによる評価は、WT マウスと BKCa マウスにおいて左室収縮能に有意は変化を認めなかった。

(4) ランゲンドルフによる冠血流、左室圧評価

ランゲンドルフによる冠動脈、心機能評価は、マウスの繁殖不良などもあり、十分な評価を施行できなかった。

(5) 心電図記録

ベースラインの安静時心電図は心拍数、PQ 間隔、QRS 間隔、QT 間隔に有意差を認めなかった。また、長時間 (30 分) の心電図記録においても不整脈発生に有意差を認めなかった。

(6) Ca スパーク/トランジエント、パッチクランプ

心筋における Ca スパーク/トランジエント、パッチクランプの測定は他のデータで有意差がないことから優先順位は低いと考え、今回の研究期間中には施行できなかった。また血管平滑筋・血管内皮細胞におけるイオンチャンネルの測定は不可欠と考えており、今後の課題である。

(7) 電気生理学的検査

マウスは高心拍数 (400 - 600 / 分) の小動物であり、不整脈が誘発されにくい。今回の検査でも WT マウスおよび BKCa KO マウスにおいて、上室・心室より不整脈誘発を試みたが、両群ともに有意な不整脈誘発を認めなかった。不整脈の評価については、TAC・薬剤負荷などの心負荷が加わらなければ、誘発性に有意差は出ないと考えられ、今後の検討課題である。

(8) 高頻度ペーシングモデル、心不全モデル

過去の高頻度ペーシングモデルはラットでの報告であった。そのため、マウスにおいて高頻度ペーシングモデルの確立を試みた。心臓抽出後に評価を行うランゲンドルフモデルは除神経されてしまい生理的な環境とはいえないため、鎮静下、人工呼吸器下にペーシングモデルの作成を行い、電極カテーテルを心内に留置したまま ~ 1 時間程度の高頻度ペーシング (800ppm) を施行した。しかし、マウスのベースラインの心拍数が早いため、1 時間程度のペーシングでは十分な心負荷がかからず、心不全モデルとしては不十分であると考えられた。1 時間以上のペーシングを施行したが、長時間の麻酔、人工呼吸不良によるマウスの死亡例なども認めため、1 時間以上のマウス高頻度ペーシングモデルの確率は今回成功した。

当初予定していたドキシソルピシン心筋症モデルでの検討は今回の研究期間では施行できなかった。TAC (Transverse Aortic Constriction) モデルなども含めた心不全モデルで、今後、検証していく予定である。

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 1 件)

Yamakawa H, Murata M, Suzuki T,
Yada H, ishida H, Aizawa Y,
Adachi T, Kamiya K, Fukuda K.
Suppression of Rad leads to
arrhythmogenesis via PKA-mediated
phosphorylation of ryanodine receptor
activity in the heart. Biochemical and
Biophysiological Research
Communications, Vol 452, 2014, 701-707.
DOI 10.1016/j.bbrc2014.08.126

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

矢田 浩崇 (YADA Hirotaka)
防衛医科大学校・循環器内科・講師
研究者番号：60338051

(2) 研究分担者

足立 健 (ADACHI Takeshi)
防衛医科大学校・循環器内科・教授
研究者番号：50231931

(3) 連携研究者

()

研究者番号：