

2006; 46(Suppl) : S205]

- 9) Kimura S (千葉大), Kimura M, Takemori S. Primary structure of connectin and passive tension generation in striated muscle. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl) : S34]
- 10) Takemori S, Kimura M, Yamaguchi M, Ohno T, Okuyama H¹⁾, Toyoda H¹⁾ (川崎大), Tanishima Y, Yagi N (SPring-8). Transient of lattice shrinkage of thick filament lattice induced by sarcomere elongation of striated muscle. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl) : S66]
- 11) Kimura M, Tanaka H (柴又駅前クリニック), Takemori S. Reconsideration of MRI images based on tissue water states resolved by ¹H-NMR. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl) : S93]
- 12) Yamaguchi M, Otsuka Y. Structural change of mutant troponin related to hypertrophic cardiomyopathy. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl) : S93]

生理学講座第2

教授: 栗原 敏	心筋の興奮収縮連関 体力医学
客員教授: 大槻 磐男	トロポニンによる心筋の収縮制御
客員教授: 小西 真人	Mg ²⁺ の輸送
講師: 須田 憲男	骨格筋・心筋の興奮収縮連関, 副甲状腺細胞の生理
講師: 草刈洋一郎	心筋の興奮収縮連関

研究概要

I. 心筋の興奮収縮連関に関する研究

1) α_1 アドレナリン受容体のサブタイプによる L 型 Ca²⁺ 電流の調節に関する研究

我々は, α_1 アドレナリン受容体刺激により L 型 Ca²⁺ 電流が二相性変化(初期の一過性の低下に続く増加)を示すことを報告した。本年度は, α_1 アドレナリン受容体サブタイプ(α_{1A} , α_{1B})の詳細な細胞膜上の局在と, サブタイプ選択的的刺激による L 型 Ca²⁺ 電流変化を誘起する細胞内情報伝達機序を調べた。 α_1 アドレナリン受容体刺激によって惹起される細胞内情報伝達系は, 受容体サブタイプと受容体に結合している G タンパク質のレベルで2経路に分かれ, α_{1A} と α_{1B} 受容体はそれぞれ異なる G タンパク質, G_{q/11} と G_o に結合していることを明らかにした。 α_{1A} 受容体刺激は, G_{q/11} を介してその下流の PKC, CaMKII を活性化し, Ca²⁺ 電流を増加させ, α_{1B} 受容体刺激は G_o を介して直接 L 型 Ca²⁺ チャネルを抑制する。

2) マウス心室筋における筋小胞体 (SR) Ca²⁺ ハンドリングに関する研究

筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum; SR) は心筋細胞内 Ca²⁺ 濃度調節の中心的役割を担っている。心不全などの病態時には SR の Ca²⁺ 制御タンパクや微細構造に異常がみられることが報告されている。これまで SR 機能評価に用いてきたサポニン処理スキンド標本の, SR の Ca²⁺ 制御タンパク量と細胞構造をウェスタン免疫染色法と電子顕微鏡を用いて調べた。サポニン処理は細胞膜にのみ細孔を開けるが SR は無傷に保持されることを確認した。

SR の Ca²⁺ 放出, Ca²⁺ 取り込みに加えて, SR からの Ca²⁺ リークが病態と関係していることが指摘されている。我々は SR の Ca²⁺ ポンプ機能の変化が, Ca²⁺ 取り込みと SR からの Ca²⁺ リークに与える影響を検討した。Ca²⁺ ポンプ機能を変化させるた

めに、SR-Ca²⁺ ATPase (SERCA2a) あるいは SERCA2a の活性を特異的に抑制する sarcolipin (SLN) をそれぞれマウス心室筋に特異的に過剰発現させた (SERCA-TG, SLN-TG)。これらのマウス心室筋細束をサポニン処理して SR 機能を調べた。SERCA-TG では、初期 Ca²⁺ 取り込み速度は亢進していたが、Ca²⁺ 放出、Ca²⁺ リーク、および最大 Ca²⁺ 取り込み量に変化はなかった。一方、SLN-TG では初期 Ca²⁺ 取り込み速度が低下していたが、Ca²⁺ 放出、Ca²⁺ リークや最大 Ca²⁺ 量に変化はなかった。次いで、マウス左室乳頭筋にエクオリンを注入して、単収縮時の Ca²⁺ トランジェントと等尺性張力の同時測定を行った。SERCA-TG では Ca²⁺ トランジェントのピークと最大張力が増大し、Ca²⁺ トランジェントの減衰時間と張力の弛緩時間が短縮した。一方、SLN-TG では Ca²⁺ トランジェントのピークと最大張力が低下し、Ca²⁺ トランジェントの減衰時間と張力の弛緩時間が延長した。以上の結果から、Ca²⁺ ポンプ機能の変化は定常状態の Ca²⁺ リーク、最大 Ca²⁺ 取り込み量や Ca²⁺ 放出には影響を与えないが、各心拍における Ca²⁺ 供給には重大な影響を与えることが示唆された。

3) 心筋の自発的振動現象に関する研究

心筋のスキンドファイバーは、低活性状態において自発的振動現象 (SPOC) を示す。SPOC は、低濃度 Ca²⁺ 存在下 (Ca-SPOC)、または、ADP と無機リン酸共存下 (ADP-SPOC) で生じる。我々は、SPOC 中のサルコメア振動周期が各種動物の心拍数と正の相関を示すことを報告した。さらに、SPOC が単一筋原線維においても生じ、その周期がスキンドファイバーにおいて観察されたものとはほぼ等しいことも確認した。ラットの心室よりコラゲナーゼを用いて単離した心筋細胞を用いて SPOC の解析を試みた。単一スキンド心筋細胞においても SPOC は生じ、その周期はスキンド心筋や単一筋原線維において観察されたものとはほぼ等しかった。これらの結果は、サルコメア (筋原線維) の自発的振動特性が生体における心臓の拍動と何らかの関係がある可能性を示唆している。

4) 拡張型心筋症に関する研究

拡張型心筋症 (dilated cardiomyopathy: DCM) は、左心室の拡張と収縮不全を特徴とする心筋症で、九州大学大学院・森本らが開発した変異トロポニン・ノックインマウスを用いて、Ca²⁺ 感受性変化が収縮不全に関与している可能性を調べている。

5) 心筋の筋長効果におけるトロポニンの役割に関する研究

心筋の発生張力は筋長によって著しく変化する (筋長効果)。我々はブタ心筋のトロポニンをウサギ骨格筋トロポニンと入れ替え、筋長効果にトロポニンが関与している可能性を検討した。心筋に骨格筋のトロポニンを入れ替えると、心筋で観察された筋長効果は減弱し、骨格筋における筋長効果とほぼ同様となった。従って、筋長効果はトロポニンのレベルで調節されていることが示唆された。また、太いフィラメント・細いフィラメント間でのクロスブリッジのキネティクスも関与していると考え、クロスブリッジの形成速度を表す k_{tr} (時定数) の測定を行ったところ、骨格筋のトロポニンを入れ替えると低 Ca²⁺ 濃度で k_{tr} は上昇し、筋長効果にはクロスブリッジのキネティクスも影響していることが示唆された。

II. 骨格筋の萎縮に伴う構造および機能変化に関する研究

1) ラットの不動化筋における構造変化と機能低下の関係に関する研究

ラット後肢をギブス固定により長期不動化したヒラメ筋では、湿重量・筋断面積の減少といった形態的变化のみならず、最大張力および Ca²⁺ 感受性低下などの機能的変化が生じる。萎縮筋の格子間隔を小角 X 線回折法により測定すると、対照群と比べて格子間隔が拡大していた。デキストランによる浸透圧圧縮によって萎縮筋の格子間隔を対照群と同程度に調節したところ低下した Ca²⁺ 感受性は回復した。これらの結果から、格子間隔の拡大が萎縮筋における Ca²⁺ 感受性低下の一因であることが考えられた。また、生化学的実験から、タイチンの減少が著明であった。

III. ヒト副甲状腺細胞に関する研究

2 次性副甲状腺機能亢進症患者から手術時に摘出された副甲状腺細胞の細胞内 Ca²⁺ トランジェントを測定した。脱分極 (150 mM K⁺ 溶液の投与) で誘起される細胞内 Ca²⁺ 濃度の一過性上昇 (Ca²⁺ トランジェント) を調べたところ、培養液の遊離 Ca²⁺ 濃度が高いほど Ca²⁺ トランジェントの大きさが増加し、遊離 Ca²⁺ 濃度の上限值 (1.8 mM Ca²⁺) と下限値 (0.9 mM Ca²⁺) に近い Ca²⁺ 濃度で培養された 2 群の細胞の Ca²⁺ トランジェントの平均値の差には有意差があった。もし、脱分極中に細胞内に流入する Ca²⁺ により運ばれる総電荷量 (リーク電流補正

を行った内向き Ca^{2+} 電流の時間積分)が Ca^{2+} トランジェントの大きさと高い相関性を示すのであれば、上記の結果は、高 Ca^{2+} 血症下では電位依存性 Ca^{2+} チャネルの発現量が増加することを強く示唆している。

「点検・評価」

研究は心筋の興奮収縮連関を中心に行われており、L型 Ca^{2+} 電流に対する α_1 受容体刺激効果発現の細胞内機序が受容体のサブタイプとG蛋白質との関係で明らかになりつつある。また、心筋の筋長効果がタイチンやトロポニンと関係していることが示唆され、新たな展開を見せている。病態生理学的研究として、拡張型心筋症マウスを用いた研究が、本学の内科学講座・循環器内科や、九州大学大学院、大阪大学大学院との共同研究として行われている。

萎縮筋の張力発生低下のメカニズムなどに関する研究は、本学生理学講座第1との共同で行われている。腎臓・高血圧内科との共同研究としてヒト副甲状腺細胞の Ca^{2+} チャネルの生理学的意義に関する研究が行われている。これらの研究は、臨床を支える基礎的研究の振興に繋がる。

教育として生理学講座第2が担当しているのは医学科の基礎医科学II、症候学演習、臨床疫学I、生理学実習、看護学科の講義、看護専門学校(慈恵看護専門学校、青戸看護専門学校、第三看護専門学校)の講義などである。

実習は宇宙航空医学研究室のスタッフと臨床検査医学講座・鈴木政登助教授の協力を得て行われた。また、大学院生がティーチングアシスタントとして協力してくれた。

草刈講師の留学に伴い教室員が減ったが、お互いに協力して教育・研究を推進している。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Ishikawa T, Mochizuki S, Kurihara S. Cross-bridge-dependent change in Ca^{2+} sensitivity is involved in the negative inotropic effect of nifedipine in aequorin-injected ferret ventricular muscles. *Circ J* 2006; 70(4): 489-94.
- 2) Sasaki D¹⁾, Fukuda N, Ishiwata S¹⁾ (早大). Myocardial sarcomeres spontaneously oscillate with the period of heartbeat under physiological conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 1146-52.
- 3) Mizuno J¹⁾, Otsuji M¹⁾, Takeda K¹⁾, Yamada Y¹⁾,

Arita H¹⁾, Hanaoka K¹⁾, Hirano S¹⁾, Kusakari Y¹⁾ (Univ Tokyo), Kurihara S. Superior logistic model for decay of Ca^{2+} transient and isometric relaxation force curve in rabbit and mouse papillary muscles. *Int Heart J* 2007; 48(2): 215-32.

- 4) Kusakari Y, Hongo K, Kawai M, Konishi M (東京医大), Kurihara S. Use of the Ca-shortening curve to estimate the myofilament responsiveness to Ca^{2+} in tetanized rat ventricular myocytes. *J Physiol Sci* 2006; 56(3): 219-26.
- 5) Hirano S, Kusakari Y, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Kurihara S. Intracellular mechanism of the negative inotropic effect induced by α_1 -adrenoceptor stimulation in mouse myocardium. *J Physiol Sci* 2006; 56(4): 297-304.
- 6) 福田紀男, 宇高 潤, 栗原 敏. 萎縮骨格筋における筋力低下ならびに易疲労性の分子メカニズム—新しいリハビリテーション法の開発を目指して—。 *デサントスポーツ科学* 2006; 27(別冊): 164-70.

II. 総 説

- 1) O-Uchi J, Sasaki H, Kurihara S. Structural and functional relation of signal transduction in α_1 -adrenoceptor stimulation in cardiomyocytes. *医学生電顕技術誌* 2006; 20(2): 125-6.

III. 学会発表

- 1) 横山啓太郎, 須田憲男, 松葉道知, 鈴木章文¹⁾, 飯田里菜子, 武山 浩, 大城戸一郎, 赤羽悟美 (東邦大学), 浦島充佳, 柴崎敏昭¹⁾ (共立薬科大学), 細谷龍男. 機能亢進状態のヒト培養副甲状腺細胞に発現するL型 Ca^{2+} チャネルは生理的条件下で Ca^{2+} 流入経路として機能する. 第49回日本腎臓学会学術集会. 東京, 6月. [日腎会誌 2006; 48(3): 181]
- 2) O-Uchi J, Kurihara S. L-type Ca current is regulated via both PTX-sensitive and -insensitive pathways during α_1 -adrenoceptor stimulation. 28th Annual ISHR (International Society of Heart Research) North America Section Meeting. Toronto, June. [*J Mol Cell Cardiol* 2006; 40: 890-1]
- 3) O-Uchi J, Sasaki H, Kurihara S. Intracellular regulation mechanisms of the changes in L-type Ca channel induced by α_1 -adrenoceptor stimulation. 第29回心筋代謝研究会. 札幌, 7月. [*Exp Clin Cardiol* 2006; 11(2): 141]
- 4) Suda N, Matsuba D. Inhibition of caffeine-induced calcium release by tetanus. Gordon Research Conference—Muscle: Excitation-Contraction Coupling. New London, June.

- 5) O-Uchi J, Komukai K, Kusakari Y, Morimoto S, Hongo K, Sasaki H, Kurihara S. L-type Ca^{2+} current is oppositely regulated via different receptor-subtype and G-protein pathways during $\alpha 1$ -adrenoceptor stimulation in rat ventricular myocytes. Gordon Research Conference-Cardiac Regulatory Mechanisms. New London, July.
- 6) Morimoto S, Kawai M, Kusakari Y, O-Uchi J, Komukai K, Hongo K, Takeda T¹⁾, Asahi M¹⁾, Otsu K¹⁾ (¹Osaka Univ), Sasaki H, Mochizuki S, Kurihara S. Modulation of Ca^{2+} uptake by the over-expression of SERCA2a and sarcolipin does not affect Ca^{2+} content at steady state in mouse myocardium. Gordon Research Conference-Cardiac Regulatory Mechanisms. New London, July.
- 7) O-Uchi J, Morimoto S, Sasaki H, Kurihara S. Different roles of $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes in the regulation of cardiac L-type Ca^{2+} current. 6th Congress of the federation of Asian and Oceanian Physiological Societies. Seoul, Oct.
- 8) Udaka J, Ohmori S¹⁾, Ishiwata S¹⁾ (¹Waseda Univ), Ohtsuki I, Kurihara S, Fukuda N. Single soleus muscle fiber function after hindlimb immobilization in rats. 6th Congress of the federation of Asian and Oceanian Physiological Societies. Seoul, Oct.
- 9) Yokoyama K, Suda N, Takeyama H, Suzuki A¹⁾, Shibasaki T¹⁾ (¹共立薬科大), Adachi-Akahane S (東邦大), Iida R, Ohkido I, Yamamoto H, Hosoya T. Involvement of L-type calcium channels in high extracellular calcium induced increase in cytoplasmic calcium concentration in parathyroid cells isolated from the patients with secondary hyperparathyroidism. American Society of Nephrology Renal Week. San Diego, Nov. [J Am Soc Nephrol 2006; 17: 693A]
- 10) Morimoto S, Kurihara S. Maximal Ca^{2+} content and Ca^{2+} leakage at steady state is not affected by the modulation of Ca^{2+} uptake rate of sarcoplasmic reticulum in genetically manipulated mouse myocardium. 23rd Annual Meeting of ISHR (International Society of Heart Research) Japanese Section. Chiba, Dec. [J Mol Cell Cardiol 2006; 41: 1059]
- 11) Udaka J, Terui T, Ohmori S¹⁾, Ohtsuki I, Ishiwata S¹⁾ (¹Waseda Univ), Kurihara S, Fukuda N. Disuse-induced changes in Ca^{2+} sensitivity of force in skeletal muscle. 51st Biophysical Society Annual Meeting. Baltimore, Mar. [Biophys J Abstracts 2007: 299a]
- 12) Udaka J, Terui T, Ohmori S¹⁾, Ohtsuki I, Ishiwata S¹⁾ (¹Waseda Univ), Kurihara S, Fukuda N. Disuse-induced changes in length dependence of activation and sarcomere protein expression in skeletal muscle. 51st Biophysical Society Annual Meeting. Baltimore, Mar. [Biophys J Abstracts 2007: 300a]
- 13) O-Uchi J, Morimoto S, Komukai K, Shinji H, Kawai M, Hongo K, Sasaki H, Kurihara S. Molecular mechanisms of subtype-specific $\alpha 1$ -adrenoceptor stimulation effects on cardiac L-type Ca^{2+} channels. 51st Biophysical Society Annual Meeting. Baltimore, Mar. [Biophys J Addendum & Late Abstracts 2007: 2a]
- 14) Morimoto S, Kawai M, Kusakari Y, Komukai K, Hongo K, Takeda T¹⁾, Asahi M¹⁾, Otsu K¹⁾ (¹阪大), Mochizuki S, Kurihara S. Genetic modulation of Ca^{2+} uptake in sarcoplasmic reticulum does not affect maximal Ca^{2+} content and Ca^{2+} leakage in mouse myocardium. 第71回日本循環器学会総会・学術集会, 神戸, 3月. [Circ J 2007; 71(Suppl I): 121]
- 15) Suda N, Matsuba D, Yokoyama K, Hosoya T, Takeyama H, Adachi-Akahane S (Toho Univ). L-type calcium-channel activity of cultured human parathyroid cells is proportional to calcium concentration of the cell-culture medium. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl): S79]
- 16) Sodnomtseren M, Ohtsuki I, Ishiwata S (Waseda Univ), Fukuda N, Kurihara S. Troponin-based regulation of sarcomere length-dependence of activation in skinned porcine ventricular muscle. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl): S92]
- 17) Udaka J, Terui T, Ohmori S¹⁾, Ishiwata S¹⁾ (¹Waseda Univ), Ohtsuki I, Fukuda N, Kurihara S. Disuse-induced changes in length-dependence of activation in rat soleus muscle. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl): S96]
- 18) Udaka J, Ohmori S¹⁾, Terui T, Yamaguchi M, Ishiwata S¹⁾ (¹Waseda Univ), Ohtsuki I, Fukuda N, Kurihara S. Disuse-induced changes in Ca^{2+} sensitivity of force in rat soleus muscle. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl): S96]
- 19) Matsuba D, Yokoyama K, Takeyama H, Suzuki A¹⁾, Shibasaki T¹⁾ (¹Kyoritsu Univ), Hosoya T,

Adachi-Akahane S (Toho Univ), Suda N. Detection of L-type calcium channel activity in human normal parathyroid cells. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl): S173]

- 20) Morimoto S, Kawai M, Kusakari Y, O-Uchi J, Komukai K, Hongo K, Takeda T¹⁾, Asahi M¹⁾, Otsu K¹⁾(Osaka Univ), Sasaki H, Kurihara S. Properties of Ca²⁺ handling in sarcoplasmic reticulum of saponin-treated SERCA2a transgenic mouse myocardium. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl): S208]

V. その他

- 1) 大槻啓男. トロポニン発見四十周年記念国際シンポジウム. 生体の科学 2006; 57(2): 153-5.
- 2) 大内 仁. 研究の抱負: 研究課題: 心筋細胞 α_1 アドレナリン受容体サブタイプ特異的な細胞内情報伝達機構の解明 (Determination of intracellular signal transduction pathways after the subtype-specific α_1 -adrenoceptor stimulations in mammalian cardiomyocytes). 財団法人循環器学研究振興財団 平成17年度応募研究論文集・事業報告書 2006: 140-1.
- 3) 栗原 敏. サルコリピンによる心筋筋小胞体 Ca²⁺ 取り込みの分子調節機構 (平成16年度~平成18年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C)) 研究成果報告書. 2007.

生化学講座第1

教授: 大川 清 がんの生化学, 病態生化学
 助教授: 高田 耕司 分子細胞生物学, 病態生化学

講師: 朝倉 正 がんの生化学, 病態生化学

研究概要

I. がんの生化学

(1) 2005年度より始まった厚生労働科学研究の一環として癌表面転移・浸潤マーカー抗原 CD147 の生物学, 治療学的研究が多くなされた。CD147 は EMMPRIN ともいわれ早期より転移・浸潤を示す癌の表面マーカーとして確認出来た蛋白質であり産婦人科山田恭輔, 生化学大川清, 国立病院機構千葉東病院臨床センター城謙輔により樹立されたマウス hybridoma 認識抗原である (Am J Clin Pathol, 1995; 103; 288-94)。その後, 本抗原の主機能が転移・浸潤における matrix metalloproteinase (MMP) の inducer としての機能であり特に MMP2 に対しては強い誘導能を示すことが報告されている。我々はこの CD147 の悪性腫瘍細胞での性格を利用し, CD147 を癌標的分子とし, 新規開発高安全性の CD147 高親和性物質標識超音波造影剤 (マイクロ・ナノバブル以下バブルと略) を集積させ, 臨床で汎用の超音波診断法で高悪性度微小癌を超早期に画像化することを計画した。また抗癌剤等包含標識バブルを微小癌に集積, 収束超音波利用で加療する技術開発もする予定である。本年度は分子描出に適した新規超音波造影剤開発, 腫瘍モデルでのバブル超音波描出の検討, バブルの CD147 認識抗体 MAb12C3 標識法の改良, バブル高感度検出技術開発 (FMCW 法), 収束超音波治療技術の開発のため

- 1) 微小腫瘍における標的分子 CD147 蛋白発現と臨床有用性の確認
- 2) 超音波評価用腫瘍モデル (三次元培養癌浸潤モデルと担癌動物モデル) の確立
- 3) 新規界面活性剤を用いた超音波造影剤 (バブル) の創成とラベル化
- 4) FMCW 法利用バブル新規高感度検出技術の開発を進めた。

その結果

- 1) 超音波誘導針生検早期極微小肝癌 (平均腫瘍径 14.5 mm) や超音波内視鏡下針生検組織を始め婦人科, 消化器早期癌でも CD147 は高発現し診断に有用だった。