

細胞生理学講座

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：草刈洋一郎	心筋の興奮収縮連関
講師：福田 紀男	心筋・骨格筋の収縮制御の分子メカニズム

教育・研究概要

I. 心筋の興奮収縮連関に関する研究

1. エンドセリン刺激による心筋L型Ca²⁺電流の細胞内調節機構に関する研究

エンドセリンは、21のアミノ酸から構成される強力な血管収縮作用を有する生理活性物質（ペプチド）である。近年、このペプチドは心筋細胞に対する直接効果を有することも明らかにされた。エンドセリンは細胞内一過性Ca²⁺濃度の上昇を介した陽性変力作用を示すことが報告されているが、その効果発現の細胞内メカニズムは明らかでない。今回、我々はパッチクランプ法と生化学的手法を用いて、エンドセリンは、ET_A受容体を介してGq, PKC, CaMKIIを活性化し、L型Ca²⁺電流を上昇させることを明らかにした。この結果より、エンドセリンは、L型Ca²⁺チャンネルを介した細胞内へのCa²⁺流入量を上昇させ、細胞内一過性Ca²⁺濃度の上昇を惹起し、陽性変力作用を示すことが示唆された。

2. βアドレナリン受容体刺激による筋小胞体(SR)からのCa²⁺リーク量増加の細胞内調節機構に関する研究

心不全時の慢性的なカテコールアミン濃度上昇は、筋小胞体に存在するCa²⁺放出チャンネル、リアノジン受容体(RyR)からのCa²⁺リーク量を増加させ、心筋収縮力の低下と不整脈を誘発することが示唆されている。βアドレナリン受容体刺激によるRyRからのCa²⁺リーク量増加のメカニズムは、PKAとCaMKIIの活性化を介することが考えられているが、その詳細は明らかでない。今回我々は、サポニンでスキンド処理した多細胞標本を用いて、どちらの酵素活性がCa²⁺リーク量増加に関与しているのかを検討した。βアドレナリン受容体刺激によるRyRのリン酸化量は、RyRに存在するPKAあるいはCaMKII特異的なリン酸化部位に対する抗体を用いて検出した。βアドレナリン受容体刺激により

PKAが活性化されるとRyRのPKA特異的リン酸化部位のリン酸化量が増大し、Ca²⁺リークも増加することが分かった。一方、CaMKIIによるRyRのリン酸化は、Ca²⁺リーク量に影響しないこともわかった。この結果により、βアドレナリン受容体刺激時における心筋小胞体からのCa²⁺リーク量増加には、少なくともPKAの活性化が関与していることが明らかになった。

3. 拡張型心筋症に関する研究

九州大学との共同研究で、変異トロポニンをノックインした拡張型心筋症モデルマウスの研究を進めている。アンジオテンシンタイプ1受容体拮抗薬であるカンデサルタンの投与によって、拡張型心筋症マウスの予後が著明に改善された。我々は、このメカニズムとして、心筋組織内線維化の抑制と心電図異常の改善が重要であると考えている。

4. 心筋の筋長効果に関する研究

Frank-Starlingの心臓法則は、摘出心筋において活性張力が筋長とともに増大するという「筋長効果」に置き換えて考えることができる。その分子メカニズムとして、巨大弾性タンパク質タイチン（別名：コネクチン）が格子間隔（太いフィラメントと細いフィラメントの間隔）を調節することによりアクチンミオシン形成確率を調節している可能性が指摘されている。我々は、筋長効果がトロポニンのアイソフォームに依存して変化することを報告しているが（2008, 2009年）、今回、この概念を細いフィラメントのレベルに拡張して検討を行った。一般に、細いフィラメントの協同性は、ATPの分解産物であるADPや無機リン酸を加えることにより変化することが知られている。今回、ブタの心筋線維において、細いフィラメントの協同性を上昇させるADPにより筋長効果が減弱し、逆に、協同性を低下させる無機リン酸により増大することを見出した。一方、協同性を変化させることなくトロポニンCへのCa²⁺結合を上昇させるCa²⁺センシタイザー（ピモベンダン）では、筋長効果に変化は認められなかった。さらに、Ca²⁺依存性のon-off制御機構およびタイチン依存性の格子間隔調節機構を組み入れた数理モデルを独自に開発し、実験結果を定量的にシミュレートすることに成功した。以上、筋長効果は、タイチンを介したサルコメアの構造変化（格子間隔の変化）により惹起されるが、これにより形成されるクロスブリッジの数は細いフィラメントの協同性と逆相関していると考えられた。

5. 収縮蛋白系の自励振動現象 (SPOC) に関する研究

細胞膜を除去した心筋スキンド線維のサルコメアは、中間活性化条件において自発的振動現象 (SPOC) を示す。SPOC には二つのタイプがある。一つは低濃度 ($\sim 10^{-6}$ M) の Ca^{2+} 存在下で生じる Ca-SPOC であり、他の一つは ADP と無機リン酸共存下で生じる ADP-SPOC である。我々は、SPOC 中のサルコメアの振動周期が、各種動物の静止時の心拍数と正の相関を示すことを報告している (2005, 2006年)。本研究では、ラットの幼弱心筋細胞の Z 線に GFP を発現させ、蛍光イメージングによって SPOC の振動特性を解析した。イオノマイシン (Ca^{2+} イオノフォア) 処理した幼弱心筋細胞に Ca-SPOC 溶液 (pCa 6.0; 10 mM EGTA) を加えると、周期約 3Hz の自励振動が観察された。アダルト心筋細胞における観察結果と同様、SPOC 中のサルコメア振動は、ゆっくりとした shortening 相と素早い relengthening 相から成る鋸波であった。さらに、インタクトの幼弱心筋細胞に電気刺激を加え、サルコメアの波形解析を試みた。刺激頻度が低い場合 (例えば、1 Hz)、サルコメア長変化は SPOC と逆位相であり、素早い shortening 相とゆっくりとした relengthening 相が観察された。ところが、刺激頻度を生理的なレベル (3~5 Hz) に上げると、relengthening 速度の著しい上昇とともに shortening/relengthening の位相が変化し、イオノマイシン処理細胞における SPOC に類似した波形が観察された。これらの結果は、生理的な拍動条件下、自励振動の特性を利用して、サルコメアの収縮・弛緩が隣接するサルコメアに有効に伝達されていることを示唆している。

6. *In vivo* 心筋ナノイメージングの基盤技術の開発

心筋の収縮・弛緩のメカニズムを分子レベルで解明する目的で、現在、多くの研究が摘出した細胞や組織を用いて行われている。しかしながら、*in vitro* と *in vivo* では実験条件に多くの違いがあるため、*in vivo* における心筋サルコメアの動的挙動の仕組みは未だに明らかにされていない。この問題を克服するために我々は、小動物 *in vivo* で心筋局所のサルコメアの収縮動態を高い時間・空間分解能でライブイメージングできる技術を開発することを試みた。すなわち、心筋線維の最小ユニットであるサルコメアの Z 線に存在する α アクチニンの抗体と明るい蛍光を長時間発する量子ドット (Qdot) の複合体をトランスフェクション試薬と混合し、これ

を *in vivo* ラットの心臓に作用させた。その結果、生理的条件下、サルコメア長が約 $2\mu\text{m}$ で収縮、弛緩を繰り返していることを見出した。電子顕微鏡を用いた組織観察結果は、Qdot が心筋細胞の T 管ならびに Z 線に集積していることを示している。さらに、より確実に Z 線をイメージングするため、GFP に α アクチニンを融合させた遺伝子をウイルスベクターに組み込み、これを単離したラットのアダルト心筋細胞に投与することによって Z 線に GFP を発現させることに成功した。現在、Qdot と GFP を併用し、長時間・空間分解能で *in vivo* 心筋サルコメアイメージングを行っている。

「点検・評価」

細胞生理学講座では、心筋の興奮収縮連関に関する研究を中心に行っている。上述した 1~6 の研究は順調に進み、海外英文誌に論文が発表されつつある。毎週、金曜日の午前中に教室会を開き、研究の進捗状況を発表することにしており、大学院の単位として認めている。

細胞生理学講座が担当している教育は、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。また、英文論文抄読演習や情報科学の講義・演習も担当しており多忙を極めている。

生理学実習は宇宙航空医学研究室の須藤正道准教授、豊島裕子講師と、臨床検査医学講座の鈴木政登教授らの協力を得て行われている。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いる。

草刈講師が米国より帰国し、教室員が一致協力して研究・教育にあたっている。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Kusakari Y, Xiao CY¹⁾, Himes N¹⁾, Kinsella SD¹⁾, Takahashi M¹⁾, Rosenzweig A¹⁾, Matsui T¹⁾ (¹Harvard Medical School). Myocyte injury along myofibers in left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2009; 9(6): 951-5.
- 2) Morimoto S, O-Uchi J, Kawai M, Hoshina T, Kusakari Y, Komukai K, Sasaki H, Hongo K, Kurihara S. Protein kinase A-dependent phosphorylation of ryanodine receptors increases Ca^{2+} leak in mouse heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390(1): 87-92.
- 3) Yokoyama K, Matsuba D, Adachi-Akahane S,

- Takeyama H, Tabei I, Suzuki A¹⁾, Shibasaki T¹⁾ (¹ Keio University), Iida R, Ohkido I, Hosoya T, Suda N. Dihydropyridine- and voltage-sensitive Ca²⁺ entry in human parathyroid cells. *Exp Physiol* 2009; 94(7) : 847-55.
- 4) Matsuba D, Terui T, O-Uchi J, Tanaka H¹⁾, Ojima T¹⁾ (¹Hokkaido University), Ohtsuki I, Ishiwata S (Waseda University), Kurihara S, Fukuda N. Protein kinase A-dependent modulation of Ca²⁺ sensitivity in cardiac and fast skeletal muscles after reconstitution with cardiac troponin. *J Gen Physiol* 2009; 133(6) : 571-81.
- 5) Mizuno J¹⁾, Morita¹⁾ (¹Teikyo University School of Medicine), Otsuji M²⁾, Arita H²⁾, Hanaoka K²⁾ (²University of Tokyo), Robert E (Alfred I. duPont Hospital for Children), Hirano S, Kusakari Y, Kurihara S. Half-logistic time constants as inotropic and lusitropic indices for four sequential phases of isometric tension curves in isolated rabbit and mouse papillary muscles. *Int Heart J* 2009; 50(3) : 389-404.
- 6) Fukuda N, Terui T, Ohtsuki I, Ishiwata S (Waseda University), Kurihara S. Titin and troponin: central players in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Curr Cardiol Rev* 2009; 5(2) : 119-24.
- LR¹⁾, Coeli ML¹⁾ (¹University of Rochester Medical Center). Slow rate of ion channel activation identifies high cardiac risk for type 1 long QT syndrome patients with moderate QTc prolongation. American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2009. Orlando, Nov. [Circulation 2009; 120 : s660-1]
- 4) Komukai K, O-Uchi J, Hongo K, Kawai M, Morimoto S, Yoshimura M, Kurihara S. Endothelin-1 increases L-type Ca current of rat ventricular myocytes via an activation of protein kinase C and Ca/calmodulin dependent protein kinase II. American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2009. Orlando, Nov. [Circulation 2009; 120 : s695]
- 5) 照井貴子, 福田紀男, 大槻啓男, 上園晶一, 栗原 敏. トロポニン再構成による Frank-Starling 機構の分子メカニズムの解明. 日本麻酔科学会第 56 回学術集会. 神戸, 8月.
- 6) Udaka J, Fukuda N, Marumo K. Disuse-induced changes in fatigability in rat soleus muscle. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009). Kyoto, July. [J Physiol Sci 2009; 59 (Suppl. 1) : 440]
- 7) Terui T, Shimamoto Y¹⁾, Sodnomtseren M¹⁾, Ohtsuki I, Ishiwata S¹⁾ (¹Waseda University), Kurihara S, Fukuda N. Thin filament-based regulation of length-dependent activation in skinned porcine ventricular muscle. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009). Kyoto, July. [J Physiol Sci 2009; 59 (Suppl. 1) : 361]
- 8) Toshima H, Tokuji T¹⁾, Kobayashi Y¹⁾ (¹All-Japan Karuta Association), Kurihara S. New event-related potential (ERP) induced by loading of auditory and visual stimuli. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009). Kyoto, June. [J Physiol Sci 2009; 59 (Suppl. 1) : 193]
- 9) Morimoto S, O-Uchi J, Kawai M, Komukai K, Sasaki H, Yoshimura M, Hongo K, Kurihara S. β -Adrenoceptor stimulation increased Ca leak from sarcoplasmic reticulum without dissociation of FKBP12.6 under physiological condition. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009). Kyoto, July. [J Physiol Sci 2009; 59 (Suppl. 1) : 129]
- 10) Tanaka E (Yokohama National University), Kurihara S. Na⁺, Mg²⁺, and adenine nucleotides modulate the Ca²⁺-, caffeine-, and rapid cooling-induced Ca²⁺ release in skinned ferret cardiac muscles. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009). Kyoto, July. [J Physiol Sci 2009;

II. 総 説

- 1) 水野 樹¹⁾, 森田茂穂¹⁾ (¹帝京大), 大辻幹哉 (東大), 花岡一雄 (JR 東京総合病院麻酔科), 栗原 敏, 左室庄, 張力, 筋細胞内カルシウムトランジェントのハイブリッド・ロジスティック関数を用いた波形解析による収縮弛緩過程の推定. *臨麻* 2009; 33(9) : 1479-88.

III. 学会発表

- 1) Terui T, Shintani S¹⁾, Ishiwata S¹⁾ (¹Waseda University), Kurihara S, Fukuda N. Single sarcomere imaging by quantum dots (QDOTS) in the heart. Biophysical Society 54th Annual Meeting. San Francisco, Feb. [Biophys J 2010; 98 (3 Suppl. 1) : 555a]
- 2) Fukuda N, Serizawa T¹⁾, Shintani S¹⁾, Terui T, Ishiwata S¹⁾ (¹Waseda University), Kurihara S. Single sarcomere imaging in cardiomyocytes with quantum dots (QDOTS) : Physiological significance of spoc in cardiac beat. Biophysical Society 54th Annual Meeting. San Francisco, Feb. [Biophys J 2010; 98 (3 Suppl. 1) : 555a]
- 3) O-Uchi J, Christian J¹⁾, Arthur JM¹⁾, Ilan G¹⁾, Wojciech Z¹⁾, Arthur AW (University of Amsterdam), Shimizu W (National Cardiovascular Centre), Jorgen KK (Gentofte Hospital), Scott M¹⁾, Jennifer

59 (Suppl. 1) : 129]

- 11) Fukuda N. Nonlinear properties of cardiac sarcomeres: novel insights into the physiology of the heart. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009). Kyoto, July. [J Physiol Sci 2009; 59 (Suppl. 1) : 25]
- 12) Hongo K, Morimoto S, O-Uchi J, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Yoshimura M, Morimoto S (Kyusyu University), Ohtsuki I, Takeda N, Kurihara S. Rennin-angiotensin system plays an important role in the pathogenesis of DCM in mouse. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009). Kyoto, July. [J Physiol Sci 2009; 59 (Suppl. 1) : 24]
- 13) Komukai K, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Yoshimura M, Kurihara S. Endothelin-1 potentiates L-type Ca current by activating CaMKII in rat ventricular myocytes. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009). Kyoto, July. [J Physiol Sci 2009; 59 (Suppl. 1) : 126]

生 化 学 講 座

教授：大川 清 がんの生化学，病態医化学
 准教授：高田 耕司 分子細胞生物学，病態生化学
 准教授：朝倉 正 がんの生化学，病態医化学

教育・研究概要

I. がんの生化学

1. 厚生労働科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糖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単クローン抗体(MAb12C3)産生hybridoma認識抗原である(Am J Clin Phathol, 1995; 103; 288-94)。その後，本抗原の主機能が転移・浸潤におけるmatrix metalloprotease (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を報告している。我々は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診断し，同時に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の動物実験モデルを作製中である。本研究でのマイクロ・ナノバブルの生体内動態はNEDO研究で開発した蛍光イメージングをモニターとして利用している。

同時に進められた分子の性格付けの研究からCD147分子は2つのイムノグロブリンドメインを有する1回膜貫通型の糖蛋白質で多種類の細胞に少量発現するが，癌細胞表面に特に高発現していることが判明，これを利用した癌細胞膜表面高発現CD147分子を標的とした癌化学療法の有効性を検討し，CD147イムノリポソーム封入GSH-DXRが強い標的抗腫瘍効果を示すことが判明した。またCD147の発現抑制[CD147ノックダウン(KD)]細胞を用いた抗癌活性物質効果のスクリーニングから細胞内物質移入へのCD147の役割が示唆され，抗癌性物質として注目されている3-プロモビルビン酸(3-BrPA)が嫌氣的代謝の亢進した癌細胞に対してのみ選択的殺細胞効果を発揮する機構の解析へと発展し3-BrPAがCD147-MCT1モノカルボン酸トランスポーター複合体を介して前立腺癌細胞株