

## 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 <sup>2+</sup> の輸送
准教授	福田 紀男	心筋・骨格筋の収縮制御の分子メカニズム
講師	草刈洋一郎	心筋の興奮収縮連関

## 教育・研究概要

## I. 心筋に関する研究

## 1. 拡張型心筋症マウス左室筋のスターリング効果

これまで、心臓の基本的な特性である Frank-Starling の心臓の法則の分子メカニズムの解明に努めてきた。Frank-Starling の心臓法則は、摘出心筋レベル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に関しては、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）を調節していること、細いフィラメントの“on-off”平衡が格子間隔変化時のクロスブリッジ結合を調節していることを明らかにした。本年度は、これまでの研究成果を更に発展させ、トロポニン T に変異 ( $\Delta K210$ ) を持つノックイン (KI) モデルマウスの心筋を用い、筋長効果がどのように変化しているかを詳細に調べることによって、筋長効果に対するトロポニンの関与を明らかにすることを試みた。KI マウス、ワイルドタイプ (WT)、それぞれのマウスの左心室から直径約 100 $\mu$ m の筋標本を切り出し、Triton X-100 によりスキンド処理を行った試料を対象として実験に供した。WT 標本では、サルコメア長 (SL) を 1.9 から 2.2 $\mu$ m に変化させると、pCa-張力関係の midpoint (pCa50) が約 0.2pCa ユニットの左方にシフトした (Ca<sup>2+</sup>感受性の上昇)。それに対して KI 標本では、いずれの SL においても Ca<sup>2+</sup>感受性が低く、SL の伸展にともなう pCa<sub>50</sub> の移動度が約 0.1pCa ユニットの左方であった。我々が報告している方法にしたがって、トロポニンを同一のもの (ウサギ骨格筋由来) で置換すると、Ca<sup>2+</sup>感受性ならびに筋長効果は、WT 標本、KI 標本において同程度となった。ところで、WT 標本と KI 標本ではプロテインキナーゼ A (PKA) に依存した収縮タンパク質 (トロポニン

I など) のリン酸化レベルが異なっており、それによって筋長効果に差がもたらされた可能性がある。PKA によってリン酸化レベルを規格化して実験を行ったが、筋長効果は KI 標本において有意に小さかった。WT 標本と KI 標本では同じアイソフォームのタイチンが発現しており、静止張力レベルはほぼ等しいことから、KI 標本における筋長効果の減弱は細いフィラメントの“on-off”平衡の変化に由来しているものと考えられる。

## 2. 幼弱心筋細胞におけるサルコメアの自励振動現象 (SPOC) の顕微鏡解析

細胞膜を除去した心筋スキンドファイバーは、中間活性化条件において自発的振動現象 (SPOC) を示すことを報告してきた。SPOC には 2 つのタイプがある。一つは低濃度 (約 10<sup>-6</sup>M) の Ca<sup>2+</sup> 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た。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、蛍光観察することによって SPOC の振動特性を解析した。イオノマイシン (Ca<sup>2+</sup>イオノフォア) 処理した幼弱心筋細胞に Ca-SPOC 溶液 (pCa6.0; 10mM EGTA) を加えると、周期約 3Hz の自励振動が観察された。なお、Ca<sup>2+</sup>濃度も Fluo-4 によって同時に計測し、その振動がないことを確認した。成熟心筋細胞における観察結果と同様に、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 相から成る鋸歯状波であった。さらに、無傷幼弱心筋細胞に電気刺激を加え、波形解析を試みた。刺激頻度が低い場合 (例えば、1Hz)、収縮にともなう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、波形がイオノマイシン処理細胞における SPOC に類似していた。これらの結果は、生理的な拍動条件下では、心筋細胞にはサルコメアの自励振動特性を介して隣接するサルコメアに収縮・弛緩が有効に伝達されている仕組みが備わっていることを示唆している。

## 3. 小動物心臓における単一サルコメアのリアルタイムイメージング

心筋の収縮・弛緩の分子メカニズムを解明する目的で、これまで多くの研究が摘出した細胞や組織を用いて行われてきた。しかし、*in vitro* と *in vivo*

では実験条件に多くの差異があるため、*in vivo*における心筋サルコメアの動的挙動は未だに明らかにされていない。我々は、*in vivo*心臓において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し、生体内の心筋収縮・弛緩の分子メカニズムを解明することを試みた。蛍光ビーズ ( $\phi$ : 約  $1\mu\text{m}$ ) を麻酔下で開胸したラットの心臓(左心室)表面に結合させ、局所心筋の動きをイメージングした。その結果、血圧・心拍数が正常範囲にある時、局所心筋の軌道が直径  $100\text{--}200\mu\text{m}$  の楕円を描くことが分かった。次に、 $\alpha$ -actinin-GFP 発現組み換えアデノウイルスをラットに投与し、30fps のカメラ速度で単一サルコメアの動きを共焦点顕微鏡を用いて観察した。心臓を摘出し、BDM (2, 3-butanedione monoxime) を加えたタイロイド液で灌流すると、静止時のサルコメア長が約  $2.00\mu\text{m}$  であることが見出された。この値は、他のグループが異なる実験系を使って報告している値 [X線回折 (Yagi et al., 2004), 2光子励起顕微鏡 (Bub et al., 2010)] と矛盾しない。また我々は、拍動中のマウス摘出心臓の単一 SL の測定に成功し、収縮、弛緩時に、それぞれ約 1.7 と約  $2.2\mu\text{m}$  であることを見出した。

#### 4. 心筋線維化が興奮収縮連関に及ぼす影響に関する研究

病態心筋では心筋の線維化が心臓の電氣的興奮や収縮に大きな影響を及ぼすことが知られており、心筋の線維化は病態診断のバイオマーカーとしての可能性も示唆されている。しかし、心筋線維化が興奮収縮連関に対してどのような影響を及ぼすのかについては、未だ明らかにされていない。当研究室はこれまで細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を中心とした興奮収縮連関について研究してきた。そこで、線維化心筋では興奮収縮連関がどのように変化しているのか、その分子メカニズムの解明を試みた。

これまでの研究で、肥大心筋乳頭筋を用いた組織染色と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態について検討したところ、線維化の進展が  $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントのピークを延長させ、収縮張力を減弱することが明らかになった。この結果は、線維化によって有効な張力発生メカニズムが損なわれていることを示唆している。線維化が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を中心とした興奮収縮連関の破綻を招来していることが考えられる。

#### 5. 循環器内科との共同研究

##### 1) ラット心室筋の L 型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの調節機序に関する研究

本年度は、ラット心室筋 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに対

するエンドセリン-1 の効果とそのメカニズムについて検討した。ET<sub>A</sub> 受容体を介して効果が発現していること、また細胞内情報伝達系として蛋白キナーゼ C と  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモデュリンキナーゼ II が関与していることを明らかにした。

##### 2) マウス心室筋の筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ リークに関する研究

マウス心室筋の筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネル (RyR) からの  $\text{Ca}^{2+}$  リークは交感神経  $\beta$  受容体刺激で増大し、その効果には、蛋白キナーゼ A を介する RyR のリン酸化が関与することに加えて、RyR の修飾蛋白質である FKBP12.6 の結合は関与しないことを明らかにした。

##### 3) トロポニン T 遺伝子変異マウス心筋に関する研究

トロポニン T 遺伝子変異を導入した拡張型心筋症モデルマウス (DCM マウス) を用い、レニン-アンジオテンシン (RA) 系の関与について検討した。アンジオテンシントイプ 1 受容体拮抗薬 (ARB) は、予後および心機能改善効果があることを明らかにした。また、ARB の効果には  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みポンプ調節蛋白 (フォスフォランバン) や RyR のリン酸化は直接関与していないことが明らかとなった。

#### 「点検・評価」

##### 1. 教育

細胞生理学講座が担当している教育は、医学科の医学総論演習、基礎医科学 II、症候学演習、EBM I、機能系実習 (生理学実習)、研究室配属、看護学科の解剖生理学 III の講義、看護専門学校 (慈恵看護専門学校) の解剖生理学講義などである。また、英文論文抄読演習も担当している。

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。

看護学専攻修士課程の講義にも協力している。

##### 2. 研究

研究は福田准教授を中心に、筋長効果の分子メカニズム、自励振動現象のメカニズム、拡張型心筋症モデルマウス心筋の特性、骨格筋の萎縮の分子メカニズムなどについて行われている。これら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。また、草刈講師が米国から帰国し、心筋の病態生理学の研究を小児科と共同で行っている。病態生理学的な研究は、今後、どこに焦点を当てて進めるかが問題となる。トロポニン変異心筋に関する循環器内

科の本郷准教授らとの共同研究は、歩みは遅いが新たな知見を得ており、一層掘り下げて研究する必要がある。臨床との共同研究の推進は教室の目標でもある。毎週、金曜日の午前中に宇宙航空医学研究室、臨床医学講座と一緒に教室を開き、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定している。

生理学、特に植物機能に関する生理学は臨床医学の基礎であるので、改善・充実に努めている。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Terui T, Shimamoto Y, Yamane M, Kobirumaki F, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Regulatory mechanism of length-dependent activation in skinned porcine ventricular muscle: role of thin filament cooperative activation in the Frank-Starling relation. *J Gen Physiol* 2010; 136(4): 469-82.
- 2) Song X<sup>1)</sup>, Kusakari Y, Xiao CY<sup>1)</sup>, Kinsella SD<sup>1)</sup>, Rosenberg MA<sup>1)</sup>, Scherrer-Crosbie M<sup>1)</sup>, Hara K (Kobe University), Rosenzweig A<sup>1)</sup>, Matsui T<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Harvard Medical School). mTOR attenuates the inflammatory response in cardiomyocytes and prevents cardiac dysfunction in pathological hypertrophy. *Am J Physiol* 2010; 299(6): C1256-66.
- 3) Irving T<sup>1)</sup>, Wu Y<sup>2)</sup>, Bekyarova T<sup>1)</sup>, Farman GP<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Illinois Institute of Technology), Fukuda N, Granzier H<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>University of Arizona). Thick filament strain and inter-filament spacing in passive muscle: effect of titin-based passive tension. *Biophys J* 2011; 100(6): 1499-508.

### II. 総説

- 1) Fukuda N, Terui T, Ishiwata S, Kurihara S. Titin-based regulations of diastolic and systolic functions of mammalian cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48(5): 876-81.
- 2) Komukai K, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Yoshimura M, Kurihara S. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in the regulation of the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> current during endothelin-1 stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298(6): H1902-7.
- 3) 水野 樹<sup>1)</sup>, 森田茂穂<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>帝京大学), 大江幹哉 (東京大学大学院), 花岡一雄 (JR東京総合病院), 栗原 敏. ハーフロジスティック関数適合を用いた心臓および心筋の収縮・弛緩機能の評価. *麻酔* 2010; 59(4): 422-31.

### III. 学会発表

- 1) Morimoto S, O-Uchi J, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Hongo K, Kurihara S. Cardiac remodeling and survival were improved by angiotensin receptor blocker in mouse of dilated cardiomyopathy. 第88回日本生理学会大会. 横浜 (誌上開催), 3月. [*J Physiol Sci* 2011; 61 (Suppl. 1): S204]
- 2) Hongo K, Morimoto S, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Yoshimura M, Kurihara S. Role of direct renin inhibition on myocardial fibrosis of dilated cardiomyopathy in mice. 第88回日本生理学会大会. 横浜 (誌上開催), 3月. [*J Physiol Sci* 2011; 61 (Suppl. 1): S203]
- 3) Inoue T, Kusakari Y, Hongo K, Morimoto S (Kyushu University), Ohtsuki I, Kurihara S, Fukuda N. Depressed length-dependent activation in skinned left ventricular muscles from a mouse of dilated cardiomyopathy. 第88回日本生理学会大会. 横浜 (誌上開催), 3月. [*J Physiol Sci* 2011; 61 (Suppl. 1): S193]
- 4) O-Uchi J, Kusakari Y, Fujiwara E<sup>1)</sup>, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Komukai K, Coeli L<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>University of Rochester), Kurihara S. Tyrosine kinase activated by  $\alpha$ 1-adrenergic stimulation inhibits cardiac contractility by directly phosphorylating  $\beta$ 1-adrenoceptor. 第88回日本生理学会大会. 横浜 (誌上開催), 3月. [*J Physiol Sci* 2011; 61 (Suppl. 1): S108]
- 5) Terui T, Kobirumaki F, Shimozaawa T (Tokyo University), Ishiwata S (Waseda University), Kurihara S, Fukuda N. Single sarcomere imaging in the living heart. 第88回日本生理学会大会. 横浜 (誌上開催), 3月. [*J Physiol Sci* 2011; 61 (Suppl. 1): S191]
- 6) Shintani S<sup>1)</sup>, Yamane M<sup>1)</sup>, Oyama K<sup>1)</sup>, Kurihara S, Ishiwata S<sup>1, 2)</sup> (<sup>1</sup>Waseda University, <sup>2</sup>Waseda Bioscience Research Institute in Singapore), Fukuda N. Microscopic analyses of sarcomeric oscillations during electrical stimulation and SPOC in rat neonatal cardiomyocytes. 第88回日本生理学会大会. 横浜 (誌上開催), 3月. [*J Physiol Sci* 2011; 61 (Suppl. 1): S191]
- 7) Udaka J, Kurihara S, Fukuda N. Enhanced depressant effect of inorganic phosphate or hydrogen ion on active force production in single fibers of soleus muscle after long-term disuse in rats. 第88回日本生理学会大会. 横浜 (誌上開催), 3月. [*J Physiol Sci* 2011; 61 (Suppl. 1): S189]
- 8) 栗原 敏. 体力医学研究の倫理と法. 第65回日本体力医学会大会. 市川, 9月.
- 9) 栗原 敏. 脚気の予防を巡って. 第51回日本人間ドック学会学術大会. 旭川, 8月. [*人間ドック* 2010; 25(2): 160]

- 10) Kobirumaki F, Kobayashi T<sup>1)</sup>, Shimozawa T<sup>1)</sup>, Gonda K (Tohoku University), Higuchi H<sup>1)</sup> (University of Tokyo). Real-time imaging of MT dynamics *in vivo* using a MT plus-end binding protein: EB1 as a probe for the position of MT ends. 第87回日本生理学会大会. 盛岡, 5月. [J Physiol Sci 2010; 60 (Suppl. 1) : S207]
- 11) Kusakari Y, Urashima T, Kurihara S. Ca<sup>2+</sup> handling impairment in pressure-overload right ventricular hypertrophy. 第87回日本生理学会大会. 盛岡, 5月. [J Physiol Sci 2010; 60 (Suppl. 1) : S94]
- 12) Fukuda N, Serizawa T<sup>1)</sup>, Shintani S, Terui T, Shimozawa T (Tokyo University), Ishiwata S<sup>1)</sup> (Waseda University), Kurihara S. Sarcomere imaging in cardiomyocytes with quantum dots (Qdots) : physiological significance of SPOC in cardiac beat. 第87回日本生理学会大会. 盛岡, 5月. [J Physiol Sci 2010; 60 (Suppl. 1) : S41]
- 13) Hongo K, Morimoto S, O-Uchi J, Kusakari Y, Date T, Komukai K, Kawai M, Ohnuki Y<sup>1)</sup>, Saeki Y<sup>1)</sup> (Tsurumi University School of Dental Medicine), Urashima T, Motimoto S (Kyushu University), Yoshimura M, Kurihara S. Role of rennin-angiotensin system in heart failure due to decreased Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the myofilament. XXth World Congress of the International Society for Heart Research. Kyoto, May. [J Mol Cell Cardiol 2010; 48(5) : S109]
- 14) Kusakari Y, Urashima T, Kurihara S. Measurement of Ca<sup>2+</sup> handling in right ventricular hypertrophy induced by pressure-overload. XXth World Congress of the International Society for Heart Research. Kyoto, May. [J Mol Cell Cardiol 2010; 48(5) : S109-10]
- 15) Morimoto S, O-Uchi J, Kawai M, Kusakari Y, Komukai K, Hongo K, Kurihara S. Protein kinase A-dependent phosphorylation of ryanodine receptors is important for the increase in Ca<sup>2+</sup> leak from sarcoplasmic reticulum in mouse heart. XXth World Congress of the International Society for Heart Research. Kyoto, May. [J Mol Cell Cardiol 2010; 48(5) : S109]
- 16) Tanaka E (Yokohama National University), Kurihara S. Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and adenine nucleotides modulate the Ca<sup>2+</sup>-, caffeine-, and rapid cooling-induced Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum in skinned ferret cardiac muscles. XXth World Congress of the International Society for Heart Research. Kyoto, May. [J Mol Cell Cardiol 2010; 48(5) : S118]
- 17) Kusakari Y, Urashima T, Kurihara S. Ca<sup>2+</sup> handling impairment in papillary muscle with interstitial fibrosis. 第88回日本生理学会大会. 横浜(誌上開催), 3月. [J Physiol Sci 2011; 61 (Suppl. 1) : S200]
- 18) Kusakari Y, Urashima T, Kurihara S. Changes in Ca<sup>2+</sup> handling and contraction in pressure overload-induced right ventricular hypertrophy. International Academy of Cardiovascular Sciences Japan Section Meeting. Tokyo, July. [Exp Clin Cardiol 2010; 15(2) : 22]

## V. その他

- 1) 福田紀男. 心筋収縮系の運動特性: 自励振動現象 (SPOC) と心拍. 日本生物物理学会 (<http://www.biophys.jp/index.php>). 2010.