

## 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と病態生理

## 教育・研究概要

## I. 拡張型心筋症マウス左室筋のスターリング効果

これまで当教室では、Frank-Starlingの心臓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ている。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(ΔK210)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、筋長効果におけるトロポニンT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 μmの筋標本を切り出し、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 μmに変化させると、pCa-張力関係の midpoint (pCa<sub>50</sub>) が約0.21 pCaユニット左方にシフトした(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(ΔpCa<sub>50</sub>)が約0.11 pCaユニットであった。トロポニン複合体を同一のもの(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。さらに、細いフィラメントの協同性の指標であるk<sub>tr</sub>はKI標本において有意に低値を示していた。そこで、KI標本を浸している溶液中に細いフィラメントの協同性を上昇させるMgADPを加えると、ΔpCa<sub>50</sub>

が約0.21 pCaユニットに上昇した。これらの結果は、KI標本では細いフィラメントの協同性が低下しているために伸展時にクロスブリッジ結合が抑制され、その結果、スターリング効果が減弱しているものと理解できる。

## II. 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 vitro*における心筋サルコメアの動的挙動の分子メカニズムは未だに明らかにされていない。我々は、*in vitro*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・空間分解能でリアルタイム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。まず、蛍光ビーズ(φ: 約1 μm)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100-200 μmの楕円を描くことが分かった。次に、α-actinin-GFP発現組み換えアデノウイルスをラットに投与し、100 fps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、2,3-butanedione monoximeを加えたタイロッド氏液で灌流すると、静止時のサルコメア長が約2.0 μmであることが見出された(単一サルコメアの計測精度: 10 nm)。次に、マウスをイソフルラン麻酔下、拍動中の心臓において左心室中央部の心筋細胞内の単一サルコメア長を計測すると、収縮、伸展時に、それぞれ約1.7および2.0 μmであることを見出した。収縮、伸展のいずれの相においても心筋細胞内のサルコメア長は一定ではなく、約0.3 μmのバラツキがあった。さらに我々は、心電図・左心室内圧という心臓のマクロ機能との同時測定にも成功し、心電図T波終了後にサルコメア収縮が生じ、それとともに左心室内圧が上昇することを見出した。我々が新たに開発した計測技術は、従来の研究では不可能であった分子、細胞、臓器・個体の階層をつなぐものであり、正常心筋のみならず病態心筋の機能解析にも有用であると期待される。

III. 熱パルスによる心筋細胞のCa<sup>2+</sup>非依存性収縮制御

近年、レーザー照射によって心筋細胞や心臓の拍

動を光で制御する技術開発が進行している。この現象に関わる細胞小器官・チャネルは、阻害剤を用いた研究から特定されつつあるが、どのような物理的パラメーターが収縮反応を引き起こしているかは未だに解明されていない。そこで我々は、成体ラットから心室筋細胞を単離し、顕微鏡下で熱パルスを与えた際の収縮および  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化の観察を行った。細胞外溶液に集光したレーザー光（波長 1,455 nm）は水に直接吸収され、集光点の周囲に同心円状の局所的な温度勾配を発生させた。その結果、心筋細胞は温度上昇時に収縮し、レーザー照射を止めると弛緩することが分かった。2.5 Hz の連続的な熱パルスは、周期的な収縮・弛緩を引き起こした。生体内温度に近い温度（36℃）では、約 3℃ の温度上昇に対して半数以上の細胞が収縮した。室温（25℃）では、半数以上の細胞が収縮するためには約 10℃ の温度上昇が必要であった。これらの結果は、生体の温度に近づくにつれ、心筋細胞は温度変化に敏感になることを意味する。電気刺激による収縮反応時には、Fluo-4 を用いた蛍光観察から、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が見られた。それに対して、加熱収縮時では細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇は確認されなかった。そこで  $\text{Ca}^{2+}$ -free の溶液中で、除膜した心筋細胞に熱パルスを与えたところ、収縮反応が観察された。これらの結果は、熱パルスによる収縮機構は、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを介さない点において、電気刺激による収縮機構とは異なることを示唆する。

#### IV. 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

心筋収縮系は、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 2 つのタイプがある。一つは低濃度（約  $10^{-6}$  M）の  $\text{Ca}^{2+}$  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。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 ( $\text{Ca}^{2+}$  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、自励振動が観察された。 $\text{Ca}^{2+}$  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ている。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、1 Hz）、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。

#### V. 心筋線維化が興奮収縮連関に及ぼす影響

病態心筋において、心筋線維化は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、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。しかしながら、興奮収縮連関においては、心筋線維化がどのような影響を及ぼすことになるのかは未だ明らかにされていない。これまで当教室では、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を中心とした興奮収縮連関に関する研究を行ってきた。本研究では、線維化心筋において興奮収縮連関がどのように変化するのかについてその詳細なメカニズムを解明することを試みた。

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、収縮張力の減弱を起こすことが明らかになった。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が同等にもかかわらず、張力の減衰が生じるのは有効な張力発生メカニズムが損なわれていることを示す。また、免疫組織染色にて、線維化心筋では介在板でのコネキシン 43 の集積が消失していることが認められた。これらの結果は、線維化により心筋細胞間の情報伝達が疎になり、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  を中心とした興奮収縮連関を破綻させていることを示唆している。

#### VI. 心臓の病態生理学に関する循環器内科との共同研究

循環器内科心筋細胞生理グループでは、細胞生理学教室との共同研究を中心に、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化による心筋収縮調節機構に加え、心筋症・心不全・心肥大などの病態生理学に関する研究を行っている。本年度は、ヒト拡張型心筋症の原因であるトロポニン 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) を用いた研究を継続し

て行った。レニン・アンジオテンシン (RA) 系の病態への関与を検討するため、これまで検討してきたアンジオテンシントイプ1受容体拮抗薬 (ARB) の効果とともに、新しい RA 系阻害薬である直接レニン阻害薬 (DRI) の効果についても検討を行っている。DRI は、ARB 同様に DCM の発症・予後に対して有効であることが明らかとなった。同じ RA 系阻害薬であるが、ARB と DRI ではその作用機序が異なる可能性が示唆され、詳細な分子メカニズムを解明するために更に検討を行っている。

## 【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、EBMⅠ、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、英語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教授と豊島裕子准教授、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

福田准教授は、正常心筋や病態心筋を使った伝統的な生理学研究の他、生きた小動物個体の心臓や単離心筋細胞から細胞内分子情報を長時間・空間分解能で正確に抽出し、“生きる仕組み”を物理学や化学、数学の言葉で記述する「ナノ生理学」の創成に取り組んでいる。このため顕微鏡開発を強力に推進しており、現在当教室で稼動している顕微鏡の精度は世界最高のレベルに達している。実験の他、心筋の収縮制御機構を定量的に説明する数理モデルの開発も行っている。研究は順調に進み、海外英文誌に論文が発表されている。草刈講師は、心筋の病態生理学の研究を小児科と共同で行い、線維化が心筋細胞の興奮収縮連関に与える影響を中心に検討している。研究は順調に進み、生理学のみならず医学の観点からも興味ある結果が得られている。循環器内科の本郷准教授らとの共同研究では、レニン・アンジオテンシン系の阻害によってどのような治療効果が得られるかを、拡張型心筋症モデルマウスを用いて検討している。研究は着実に進み、新たな知見が得られている。今後、治療効果の分子メカニズムについて一層掘り下げて研究する必要がある。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

緒に教室会を開いて研究の進捗状況を発表しており、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ことから、改善・充実に努めている。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Tanaka E, Konishi M, Kurihara S. Role of  $Ca^{2+}$  in the rapid cooling-induced  $Ca^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum in ferret cardiac muscles. *J Physiol Sci* 2012; 62(3): 241-50. Epub 2012 Mar 20.
- 2) Oyama K<sup>1)</sup>, Mizuno A<sup>1)</sup>, Shintani SA<sup>1)</sup>, Itoh H<sup>1)</sup>, Serizawa T<sup>1)</sup>, Fukuda N, Suzuki M<sup>1)</sup>, Ishiwata S<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Waseda University). Microscopic heat pulses induce contraction of cardiomyocytes without calcium transients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 417(1): 607-12.
- 3) Fukuda N, Inoue T, Yamane M<sup>1)</sup>, Terui T, Kobirumaki F, Ohtsuki I, Ishiwata S<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Waseda University), Kurihara S. Sarcomere length-dependent  $Ca^{2+}$  activation in skinned rabbit psoas muscle fibers: coordinated regulation of thin filament cooperative activation and passive force. *J Physiol Sci* 2011; 61(6): 515-23.
- 4) Serizawa T, Terui T, Kagemoto T, Mizuno A, Shimozawa T (Tokyo University), Kobirumaki F, Ishiwata S (Waseda University), Kurihara S, Fukuda N. Real-time measurement of the length of a single sarcomere in rat ventricular myocytes: a novel analysis with quantum dots. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 301(5): C1116-27.
- 5) Udaka J, Terui T, Ohtsuki I, Marumo K, Ishiwata S (Waseda University), Kurihara S, Fukuda N. Depressed contractile performance and reduced fatigue resistance in single skinned fibers of soleus muscle after long-term disuse in rats. *J Appl Physiol* 2011; 111(4): 1080-7.

### II. 総説

- 1) Higuchi S<sup>1)</sup>, Yoshikazu T<sup>1)</sup>, Fukuda N, Kurihara S, Fujita H<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Riken Quantitative Biology Center). Thin filament-reconstituted skinned muscle fibers for the study of muscle physiology. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 486021.
- 2) Ishiwata S (Waseda University), Shimamoto Y (Rockefeller University), Fukuda N. Contractile system of muscle as an auto-oscillator. *Prog Biophys Mol Biol* 2011; 105(3): 187-98.

### Ⅲ. 学会発表

- 1) 松尾知明<sup>1)</sup>, 須藤正道, 山田 深<sup>1)</sup>, 大島 博<sup>1)</sup>, 栗原 敏, 向井千秋<sup>1)</sup>(<sup>1)</sup>宇宙航空研究開発機構). 長期宇宙滞在中の心機能低下を予防する運動療法に関する研究(予備実験). 第128回成医会総会. 東京, 10月.
- 2) 栗原 敏. (シンポジウム4) 健康・スポーツ科学領域における人対象の調査・研究の倫理的問題. 第66回日本体力医学会大会. 下関, 9月. [体力科学 2012; 61(1): 26]
- 3) Kobirumaki F, Terui T, Mizuno A<sup>1)</sup>, Kagemoto T<sup>1)</sup>, Shimozawa T (RIKEN), Ishiwata S<sup>1)</sup>(<sup>1)</sup>Waseda University), Kurihara S, Fukuda N. Real-time measurement of sarcomere length in the rodent heart by using  $\alpha$ -actinin-GFP. 第49回日本生物物理学会年会. 姫路, 9月. [生物物理 2011; 51(Suppl. 1): S124]
- 4) Shintani S<sup>1)</sup>, Yamane M<sup>1)</sup>, Oyama K<sup>1)</sup>, Kurihara S, Ishiwata S<sup>1)</sup>(<sup>1)</sup>Waseda University). Unraveling the role of autonomous regulation in heartbeat: Analysis of self-oscillatory properties of rat neonatal cardiomyocytes. 第49回日本生物物理学会年会. 姫路, 9月. [生物物理 2011; 51(Suppl. 1): S125]
- 5) Hongo K, Morimoto S, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Yoshimura M, Kurihara S. Direct renin inhibition improved cardiac remodeling and survival in mouse model of dilated cardiomyopathy. American Heart Association Scientific Session 2011. Orlando, Nov. [Circulation 2011; 124(21): A10950]
- 6) 雨宮えりか, 宮坂玄樹, 横田俊介, 草刈洋一郎, 井上天宏, 浦島 崇, 栗原 敏. 線維化心筋における興奮収縮連関の生理学的特性. 第128回成医会総会. 東京, 10月.

## 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 (EMMPRIN) は早期転移・浸潤の癌表面マーカー糖蛋白質で本学産婦人科・山田恭輔, 生化学・大川 清, 病理学現仙台社会保険病院・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 認識抗原であり(Am J Clin Phathol 1995; 103: 288-94), CD147は癌微小環境の構築に寄与する糖タンパク質である。その機能はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の活性化や血管新生因子の誘導, モノカルボン酸トランスポーター (MCT) の細胞膜への輸送など多岐に及ぶ機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, 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CD147発現腫瘍に集積させ, 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でモニターしている。高分子ミセルはリポソームに比し血管内皮への取り込みが低く血液滞留時間を非常に長くすることができるので, 抗CD147抗体(aCD147ab)で標識しGSH-DXRを内封した本高分子ミセルのターゲティング療法の有効性を検討した。aCD147abの高発現しているヒト類表皮癌細胞A431およびヒト子宮癌細胞Ishikawaに, aCD147ab標識liposomeがCD147を特異的にターゲットにして集積することが確認された。さらに, GSH-DXRを内封したaCD147ab標識liposomeによる特異的な抗腫瘍効果が示された。

MCT1細胞膜発現への効果からCD147の分子シャペロンとしての機能をみるため共免疫沈降法を用いてCD147と相互作用するタンパク質の検索を行った。その結果, 既に知られているMMP1, MCT1, MCT4, PDLIM7の他に, 新規なものとし