

竹森 重, 中原直哉, 山口眞紀, 横溝駿矢 (東海大), 木村雅子. ミオシン阻害薬による平滑筋フィラメント配列の攪乱. 第1回物構研サイエンスフェスタ. つくば, 3月.

- 12) Yamaguchi M, Kimura M, Takemori S, Ohno T, Nakahara N, Yokomizo S (Tokai Univ), Yagi N (Spring-8). Mechanical and structural characteristics of cardiac muscle fibers with troponin-T mutant causing hypertrophic cardiomyopathy. 第90回日本生理学会大会. 東京, 3月. [J Physiol Sci 2013; 63(1): S123]
- 13) 大野哲生. ミオシンの金電極表面への吸着過程の粘弾性解析. 第6回 QCM 研究会. 東京, 8月.
- 14) Ohno T, Kimura M, Yamaguchi M, Takemori S. Spin-spin relaxation of ^1H NMR signals from myofibril suspension of rabbit skeletal muscle with or without ATP. 第90回日本生理学会大会. 東京, 3月. [J Physiol Sci 2013; 63(1): S274]
- 15) Yamazawa T, Oyamada H¹⁾, Maruyama T¹⁾, Nakano K¹⁾, Oguchi K¹⁾, Sakurai T¹⁾ (Showa Univ), Iino M (Univ Tokyo), Takemori S. Exploration of functional mutations of ryanodine receptor in malignant hyperthermia. 第86回日本薬理学会年会. 福岡, 3月. [J Pharmacol Sci 2013; 121(1): 152]
- 16) Yamazawa T, Oyamada H (Showa Univ), Maruyama T (Juntendo Univ), Iino M (Univ Tokyo), Takemori S. Identification of functional mutations of ryanodine receptor in malignant hyperthermia. 第90回日本生理学会大会. 東京, 2月. [J Physiol Sci 2013; 63(1): S200]
- 17) 山澤徳志子, 村山 尚 (順天堂大), 小山田英人 (昭和大), 飯野正光 (東京大), 竹森 重. 悪性高熱症におけるリアノジン受容体機能的変異の同定. 第129回成医会総会. 東京, 10月.
- 18) Nakahara N, Kimura M, Takemori S. Effects of polyethylene glycol on contactin in skinned skeletal muscle. 第90回日本生理学会大会. 東京, 2月. [J Physiol Sci 2013; 63(1): S275]
- 19) 山内秀樹, 竹森 重. ミオスタチンによる骨格筋代謝調節: 発育-運動モデルからの検証. 第129回成医会総会. 東京, 10月. [慈恵医大誌 2012; 127(6): 252-3]
- 20) 山内秀樹, 竹田夕希, 鶴岡志乃, 湊久美子, 竹森 重. 運動負荷の骨密度増加作用に対する食事制限の影響. 第67回日本体力医学会. 岐阜, 9月. [体力科学 2012; 61(6): 59]

細胞生理学講座

教授: 南沢 享 循環生理・病態学
 客員教授: 小西 真人 Mg^{2+} 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. 教育概要

2012年度に本講座は以下の課目を担当した。

医学科: 基礎医学Ⅱ (循環器ユニット・泌尿器ユニット), 機能系実習 (生理学実習), 症候学演習, 研究室配属, 英語論文抄読演習

看護学科: 解剖生理学Ⅲ

看護専門学校 (慈恵看護専門学校): 解剖生理学 講義

II. 研究概要

1. サルコメア収縮機構の解明

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。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, それぞれのマウスの左心室から直径約 $100\mu\text{m}$ 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, トロポニン複合体入れ替え実験や細いフィラメントの協同性に影響を及ぼす試薬を使った実験を行った。その結果, 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, スターリング効果が減弱していることを明らかにした。

2) 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・弛緩の機序解明研究において, *in vivo* 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 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。先ず,

α -actinin-GFP を発現する組換えアデノウイルスをラットまたはマウスに投与し、共焦点顕微鏡を用いて単一サルコメアの動きを観察した（カメラ速度 100fps）。その結果、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 $0.3\mu\text{m}$ のバラツキがあることがわかった。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。加えて、心臓の拍動による Z 軸方向のプレを軽減するために、対物レンズアクチュエータを使用して、Z 方向に $1\mu\text{m}$ 毎に心拍数サイクルのサルコメア動態を記録し、焦点面の画像を再構成することにより、心拍および呼吸器由来の振動の影響を排除する方法を確立した。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。

3) 小動物心臓における Ca^{2+} イメージング

本研究では、心臓（左心室）における心筋細胞内の Ca^{2+} の動きを高精度で直接観察することにより、*in vivo* において心筋の興奮収縮連関がどのように生じているのかを探った。 Ca^{2+} 蛍光指示薬を用いて、麻酔したマウスの心臓における Ca^{2+} の直接観察を試みたが、心臓自体の動きが激しく、それを凌駕する蛍光強度の変化を観察できなかった。そこで、摘出後に灌流した心臓の表面から細胞内 Ca^{2+} 動態を観察し、アクトミオシン ATPase 阻害薬 (BDM) 存在下で心筋細胞内 Ca^{2+} トランジェントを捉えることに成功した。摘出心臓において、心筋組織内の複数の細胞からランダムな Ca^{2+} ウェーブが観察され、そこに外部電極から電気刺激（強制振動）を与えると刺激に同調した細胞内 Ca^{2+} の上昇（ Ca^{2+} トランジェント）が観察された。また Ca^{2+} 蛍光試薬の導入時および観察時の温度差が *in vivo* での Ca^{2+} 観察を困難にする原因の一つであることを突き止めた。*In vivo* における心筋細胞内 Ca^{2+} イメージングは、正常状態のみならず病態における興奮収縮連関の分子メカニズムを明らかにするものと考えられる。

4) 幼若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

心筋の発生張力はサルコメア長に依存して大きく変化する。このため、心筋細胞内においてサルコメア長と細胞内 Ca^{2+} 濃度を高空間・時間分解能で同時に計測する技術を確立することは非常に重要であ

る。本研究において我々は、ラットの幼若心筋細胞の Z 線 (α アクチニン) に GFP を発現させ、興奮収縮連関におけるサルコメアの運動を nm の精度で計測することのできる実験系を構築した。そこで先ず、この実験系を用いることによってサルコメアの自励振動現象 (SPOC) の解析を行った。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。電気刺激や薬物を使った実験により、本研究において開発した幼若心筋細胞の実験系は心筋興奮収縮連関の解析に幅広く応用可能であるとわかった。

2. 心臓リモデリング・線維化を促す病態解明

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。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、肺動脈絞扼術による圧負荷右室肥大乳頭筋モデルを用いて、線維化の有無と細胞内 Ca^{2+} トランジェント時間の延長が一致することが明らかになった。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。一方で線維化心筋では収縮張力の減弱を起こすことが明らかになった。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 Ca^{2+} を中心とした興奮収縮連関を破壊させていることを示唆している。本モデルは線維化の進展が非常に明瞭であることから、今後は線維化決定因子・バイオマーカーの同定を目指している。本研究は本学小児科循環器グループとの共同研究の成果である。

3. 心筋筋小胞体機能の制御機構の解明

心機能を維持する上で、心筋筋小胞体を介した Ca^{2+} 調節は中心的な役割を担う。我々は心筋筋小胞体 Ca^{2+} 再取り込みを制御する筋小胞体 Ca^{2+} ATPase (SERCA2) 活性調節機構を調べることによって、心不全等の病態解明・治療応用を目指している。2012 年度は筋小胞体内にあって、SERCA2 と相互作用をもつ Ca^{2+} 結合タンパク質 sarcalumenin について、ノックアウトマウスを使った解析を行った。その結果、sarcalumenin は加齢に伴う SERCA2 活性低下を抑制する役割があることが判明した。本研究は京都大学竹島研究室との共同研究の成果である。

4. 大血管の発生と機能獲得・維持の機序解明

1) 動脈管閉鎖機序の解明

動脈管は肺動脈から大動脈へ血液をバイパスする胎生期特有の大血管である。我々は動脈管が生後に閉鎖する機序、特に血管の構造変化をきたす分子機序について、ラット胎仔、ニワトリ胚を用いて検討した。thromboxane A₂は血小板の凝集や、血管壁の収縮を引き起こすエイコサノイドであり、その受容体 TP の動脈管閉鎖への作用を検討した。TP 特異的的刺激薬や阻害剤を使ったラット動物実験において、動脈管は TP 特異的的刺激薬に感受性が高く、他の血管収縮を来さない少量の TP 特異的的刺激においても強い収縮が得られることが判明した。

2) 大動脈弾性線維形成・維持の機序解明

大動脈は弾性を有することで、末梢組織まで一定量の血液を送ることが可能であり、弾性線維の劣化は動脈硬化や大動脈瘤などの疾病を生じる。我々はプロスタグランジン E の特異的受容体のひとつ EP₄ が、大動脈瘤の病態進行に深く関与しており、EP₄ 刺激を遮断することで大動脈瘤の発症を予防することが可能であることをマウス・ラット動物実験によって明らかにした。

以上、1)、2)の研究は横浜市立大学石川研究室との共同研究の成果である。

「点検・評価」

2012年度は講座担当教授の交代が5月に行われた。他の教員スタッフによって、これまで築かれてきた教育・研究体制を維持しつつ、教室のさらなる発展・充実をめざすため、新たな可能性を探る1年となった。

1. 教育

基本的には2011年まで行われていた教育方針を踏襲し、生理学実習において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た。一部の実習項目において、学生数が集中し、効率よく実習がなされていない危惧があったため、2013年度には学生のグループ分けやローテーションの方法に工夫する必要がある。また、講義が完了していない実習項目においては、内容を十分に理解しないまま、受動的に実習を行う学生がみられることから、如何に講義と実習の連携をとってゆくかが課題と考えられた。

研究室配属は宇宙航空医学研究室との合同指導を取り入れ、10名の学生を指導した。6週間で個々の学生に研究テーマを持たせて取り組ませるととも

に、10名全員の学生に対し、各教員によるキャリア形成のためのセミナーや配属開始と終了時に研究プレゼンテーションを行わせるなど、新たな試みも取り入れた。研究現場に直接触れる研究室配属はリサーチマインドを早い段階で身につけさせるために有効な科目であり、学生からも好評を得ていた。

2. 研究

講座担当教授の交代により研究体制はより複合化した。従来の本講座伝統である心筋・骨格筋収縮機序を筋原線維・カルシウム制御から観察する研究を、分子レベルから生体レベルまでより広汎に観察する研究体制へと強化してゆくとともに、心血管発生や機能・構造発達の視点も取り入れた研究活動が新たに展開された。各教員が自身の研究テーマにおける独自性を保ちつつ、相互連携を図って、協力的・補完的に研究活動を行うことが、各自の研究内容を高めるために必要不可欠である。

講座内での複合化とともに、各教員が独自で連携する学内外での共同研究が活発化して、多くの人的交流が生まれている。その一環として、本講座主催の「心血管研究の最前線セミナー」を6回開催し、国内外から計8名の外部講師が講演を行った。さらに海外(中国)や早稲田大学・創価大学など他大学からの研究者・学生を多く受け入れることで、マンパワーの底上げが図られた。

新たな研究テーマの展開のため、講座内研究施設・居室のリノベーション・設備の拡充が行われ、講座教員・職員の協力のもと、2012年末までにはほぼ不自由なく、研究活動が行える体制を整えることが出来た。研究内容の広がりとともに実験スペースの確保などが今後の課題となり得るが、共同利用スペースなどの有効活用などで現時点では対応可能である。

2012年度は文科省科研費などの獲得によって、資金面では比較的安定した研究活動を行うことが出来た。しかし、研究内容の高度化・緻密化に伴い、支出の増大、測定機器など研究機材をさらに整える必要性などがあり、今後、外部資金の獲得を一層目指してゆく必要がある。

研究活動の成果として、2012年は原著英文論文7編、総説2編、学会報告53編を発信することが出来た。しかし、学会報告の数が論文に反映できていないこと、原著論文をより高いレベルの雑誌に掲載してゆく必要があることなどが、今後の課題として残った。

3. その他

受賞：照井貴子先生(麻酔科)が日本生理学会入

澤宏・彩記念若手研究奨励賞、宇高 潤先生（整形外科から再派遣）が東京慈恵会医科大学大学院優秀論文賞、井上天宏先生（心臓外科から再派遣）が東京慈恵会医科大学第129回成医会優秀ポスター賞を、福田准教授との共同研究によって受賞した。

講座の活動を学内外に広く知ってもらうことも大学機関の責務と考え、講座独自のホームページを開設した。内容の充実や適宜更新などが今後の課題である。

医学教育の啓蒙（アウトリーチ）活動も重要な課題である。しかし、2012年度においては取り組む事が出来なかった事を反省し、2013年度に講座内で議論し、方針を決めてゆく必要がある。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Jiao Q, Takeshima H (Kyoto Univ), Ishikawa Y (Yokohama City Univ), Minamisawa S. Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity. *Cell Calcium* 2012; 51(1) : 31-9.
- 2) Yokoyama U¹⁾, Ishiwata R¹⁾, Jin MH¹⁾, Kato Y¹⁾, Suzuki O¹⁾, Jin H¹⁾, Ichikawa Y¹⁾, Kumagaya S¹⁾, Katayama Y¹⁾, Fujita T¹⁾, Okumura S¹⁾, Sato M¹⁾, Sugimoto Y (Kumamoto Univ), Aoki H (Kurume Univ), Suzuki S¹⁾, Masuda M¹⁾, Minamisawa S, Ishikawa Y¹⁾ (¹Yokohama City Univ). Inhibition of EP4 signaling attenuates aortic aneurysm formation. *PLoS One* 2012; 7(5) : e36724.
- 3) Yokota T¹⁾, Aida T¹⁾ (¹Waseda Univ), Ichikawa Y (Yokohama City Univ), Fujita T, Yokoyama U, Minamisawa S. Low-dose thromboxane A2 receptor stimulation promotes closure of the rat ductus arteriosus with minimal adverse effects. *Pediatr Res* 2012; 72(2) : 129-36.
- 4) Aoyagi T¹⁾, Kusakari Y, Xiao CY²⁾, Inouye BT¹⁾, Takahashi M²⁾, Scherrer-Crosbie M²⁾, Rosenzweig A²⁾, Hara K (Kobe Univ), Matsui T^{1,2)} (¹Univ Hawaii, ²Harvard Medical School). Cardiac mTOR protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 303(1) : H75-85.

II. 総説

- 1) Kobirumaki-Shimozawa F, Oyama K, Serizawa T¹⁾, Mizuno A, Kagemoto T, Shimozawa T (Tokyo Univ), Ishiwata S¹⁾ (¹Waseda Univ), Kurihara S, Fukuda N. Sarcomere imaging by quantum dots for the study of

cardiac muscle physiology. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 313814.

- 2) 横山詩子¹⁾, 石渡 遼²⁾, 大島登志男²⁾ (²早大), 南沢 享, 石川義弘¹⁾ (¹横浜市大). 三次元血管モデルを用いた動脈硬化性疾患の機序解明. *科学と工業* 2012; 86(9) : 329-35.
- 3) 宇高 潤, 福田紀男, 栗原 敏, 丸毛啓史. 筋委縮に伴うサルコメアの質的变化. *Bone Joint Nerve* 2013; 3(1) : 33-8.

III. 学会発表

- 1) Jiao Q, Sanbe A (Iwate Med Univ), Minamisawa S. Overexpression of R120G $\alpha\beta$ -Crystallin causes cardiac arrhythmias, reduced heart rate variability, alteration in the expression of Ca²⁺ handling proteins and ER stress in mice. 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. Matsumoto, Mar.
- 2) Liu N¹⁾, Yokota T¹⁾, Maekawa S¹⁾, Yokoyama U (Yokohama City Univ), Kato T¹⁾ (¹Waseda Univ), Minamisawa S. The endothelial cells of ductus arteriosus have a unique gene profile to control vascular morphology. *Experimental Biology* 2012. San Diego, Apr.
- 3) 梶村いちげ, 横山詩子¹⁾, 石川義弘¹⁾ (¹横浜市大), 南沢 享. ラット動脈管リモデリングにおける prostaglandin E2- Nuclear Factor kappa B 経路の活性化. 第48回日本小児循環器学会総会・学術集会. 京都, 7月.
- 4) Shimura D, Nakai G, Jiao Q, Kashiwakura K, Endo K, Soga T, Goda N, Minamisawa S. Metabolomic profiling of the heart reveals chamber-specific metabolite patterns. *New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences*. Tokyo, Sept.
- 5) Ohmori E, Minamisawa S, Goda N (Waseda Univ). Histological and genetic analyses of remodeling in chick ductus arteriosus. 第20回日本血管生物医学学会学術集会. 徳島, 12月.
- 6) 福田紀男. マウス *in vivo* の心臓内筋節の動きを観る. 分子モーター討論会. 東京, 6月.
- 7) Mizuno A, Kobirumaki-Shimozawa F, Oyama K, Terui T, Hirokawa E, Simozawa T, Ishiwata S, Fukuda N. Real-time measurement of sarcomere length in the mouse heart *in vivo* by using α -actinin-GFP. 第50回日本生物物理学会年会. 名古屋, 9月.
- 8) Kusakari Y, Urashima T, Kurihara S, Minamisawa S. Estimation of E-C coupling in cardiac papillary muscle with fibrosis. 29th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section. Fukuoka, Oct.

- 9) Akaike T, Lu G¹⁾, Wang Y¹⁾, Ruan H¹⁾(¹UCLA). A novel protein phosphatase exacerbates myocytes death and represses cardiac contractility under stress. American Heart Association Scientific Sessions 2012. Los Angeles, Nov. [Circ Res 2012; 111: e379-87]
- 10) Akaike T, Lu G¹⁾, Wang Y¹⁾, Ruan H¹⁾(¹UCLA). Protein phosphatase 2Ce is a novel phospholamban phosphatase that exacerbates cell death. Basic Cardiovascular Sciences 2012 Scientific Sessions. New Orleans, July. [Circ Res 2012; 111: A190]
- 11) Kusakari Y, Urashima T, Minamisawa S, Kurihara S. Impairment of E-C coupling in cardiac papillary muscle with fibrosis. 第90回日本生理学会大会. 東京, 3月. [J Physiol Sci 2013; 63(Suppl.1): S176]
- 12) Iwai K¹⁾, Nagasawa K¹⁾, Kato T¹⁾(¹Waseda Univ), Minamisawa S. Nov/CCN3 is a novel prostaglandin E2-induced secreted protein of the ductus arteriosus. American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco, Dec.
- 13) Aida T (Waseda Univ), Yokoyama U (Yokohama City Univ), Minamisawa S. Mechanical stretch promotes elastic fiber formation in rat aortic smooth muscle cells. American Society for Cell Biology Annual Meeting. San Francisco, Dec.
- 14) Shiraishi R¹⁾, Yokota T¹⁾(¹Waseda Univ), Minamisawa S. Stimulation of thromboxane A2 receptor induced the vascular remodeling of the rat ductus arteriosus. 第20回日本血管生物医学会学術集会. 徳島, 12月.
- 15) 小比類巻生, 大山廣太郎¹⁾, 水野紅理¹⁾, 照井貴子, 下澤東吾(学習院大), 石渡信一¹⁾(¹早大), 栗原 敏, 福田紀男. Real-time imaging of single sarcomere in the mouse heart *in vivo*. 第90回日本生理学会大会. 東京, 3月.
- 16) 井上天宏, 下澤 生, 藤井輝之, 草刈洋一郎, 本郷賢一, 照井貴子, 大槻磐男, 栗原 敏, 南沢 享, 福田紀男. 欠失変異トロポニンTによる拡張型心筋症マウスを用いたFrank-Starling機構減弱の分子メカニズム. 第129回成医会総会. 東京, 10月.
- 17) Nakai G, Shimura D, Jiao Q, Kashikura K¹⁾, Endo K¹⁾, Soga T¹⁾(¹Keio Univ), Goda N (Waseda Univ), Minamisawa S. Heart metabolic analysis in mice with monocrotaline-induced heart failure. 第35回心筋代謝研究会. 東京, 7月.
- 18) Shimura D, Nakai G, Jiao Q, Kashikura K¹⁾, Endo K¹⁾, Soga T¹⁾(¹Keio Univ), Goda N (Waseda Univ), Minamisawa S. The manner of metabolism is different between the atrium and the ventricle. *Experimental Biology* 2012. San Diego, Apr.
- 19) Yokota T¹⁾, Aida T¹⁾, Shiraishi R¹⁾(¹Waseda Univ), Ichikawa Y²⁾, Fujita T²⁾, Yokoyama U²⁾(²Yokohama City Univ), Minamisawa S. A stimulation of thromboxane A2 receptor induced the constriction and remodeling of the ductus arteriosus in the rat. *Experimental Biology* 2012. San Diego, Apr.
- 20) Hsieh YE¹⁾, Liu N¹⁾, Yokota T¹⁾(¹Waseda Univ), Jiao Q, Minamisawa S. Prostaglandin receptor EP4 may play a role in elastin distribution of patent ductus arteriosus in Brown-Norway rat. 76th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Fukuoka, Mar.

IV. 著 書

- 1) Minamisawa S, Yokoyama U. Chapter 3: Recent advances concerning the molecular mechanism of patent ductus arteriosus. In: Rao PS, editor. Congenital heart disease: Selected aspects. Rijeka: InTech, 2012. p.85-96.
- 2) 南沢 享. I. 基礎編 7. 遺伝子工学の基礎. 早稲田大学先進理工学部生命医科学科編. 生命科学概論: 環境・エネルギーから医療まで. 東京: 朝倉書店, 2012. p.61-74.