



Title	ミトコンドリアへのカルシウム取り込み亢進による心室性不整脈の抑制に関する研究
Author(s)	萩原, 光
Description	配架番号 : 2619
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14498号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14498
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96785
Type	doctoral thesis
File Information	Hikaru_Hagiwara.pdf



学位論文

ミトコンドリアへのカルシウム取り込み亢進
による心室性不整脈の抑制に関する研究
(Enhanced calcium uptake into mitochondria
mitigates ventricular arrhythmia
in heart failure)

2021 年 3 月

北海道大学

萩原 光

学位論文

ミトコンドリアへのカルシウム取り込み亢進
による心室性不整脈の抑制に関する研究
(Enhanced calcium uptake into mitochondria
mitigates ventricular arrhythmia
in heart failure)

2021 年 3 月

北海道大学

萩原 光

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1 頁
1. 要旨.....	2 頁
2. 略語表.....	5 頁
3. 緒言.....	6 頁
4. 実験方法.....	10 頁
4.1 心不全モデルマウスの作製.....	10 頁
4.2 心エコー.....	11 頁
4.3 免疫ブロット法.....	12 頁
4.4 ミトコンドリアのカルシウム取り込みの評価.....	15 頁
4.4.1 ミトコンドリア単離.....	15 頁
4.4.2 ミトコンドリアタンパク質濃度測定.....	16 頁
4.4.3 蛍光吸光度計.....	17 頁
4.5 カルシウムイメージング.....	18 頁
4.5.1 心筋細胞単離.....	18 頁
4.5.2 カルシウム色素染色.....	19 頁
4.5.3 落射蛍光顕微鏡.....	19 頁
4.5.4 共焦点レーザー顕微鏡.....	20 頁
4.6 不整脈誘発性の検討.....	21 頁
4.6.1 ランゲンドルフ灌流心.....	21 頁
4.6.2 電気刺激による不整脈誘発性.....	21 頁
4.6.3 高濃度 β -アドレナリン受容体刺激による不整脈誘発性.....	22 頁
4.7 電気生理学的記録.....	22 頁
4.7.1 心筋細胞単離.....	22 頁
4.7.2 穿孔パッチクランプ法.....	22 頁
4.8 血行動態測定.....	23 頁
4.9 ミトコンドリア呼吸能測定.....	23 頁
4.9.1 ミトコンドリア単離.....	23 頁
4.9.2 ミトコンドリアタンパク質濃度測定.....	23 頁
4.9.3 高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置.....	23 頁
4.10 ミトコンドリア活性酸素測定.....	24 頁

4.10.1	ミトコンドリア単離	24 頁
4.10.2	ミトコンドリアタンパク質濃度測定	24 頁
4.10.3	活性酸素種測定	24 頁
4.11	統計学的検討	25 頁
5.	実験結果	26 頁
5.1	動物特性、心エコーデータ	26 頁
5.2	Mitochondrial Calcium Uniporter のタンパク質発現	29 頁
5.3	Mitochondrial Calcium Uniporter の活性化によるミトコンドリアへの カルシウム取り込みの比較	30 頁
5.4	カルシウムウェーブの比較	32 頁
5.5	カルシウムスパークの比較	38 頁
5.6	小胞体内のカルシウム量の比較	41 頁
5.7	電気刺激によるカルシウムトランジェント	43 頁
5.8	穿孔パッチクランプ法による膜電位記録	45 頁
5.9	Mitochondrial Calcium Uniporter の活性化による持続性心室性不整脈 への影響	48 頁
5.9.1	sham 群における連続ペーシング刺激下での 持続性心室性不整脈の誘発性	48 頁
5.9.2	HF 群における連続ペーシング刺激下での 持続性心室性不整脈の誘発性	50 頁
5.9.3	HF 群における高濃度 β -アドレナリン受容体刺激 による不整脈誘発性	52 頁
5.10	Mitochondrial Calcium Uniporter の活性化による血行動態の評価	54 頁
5.11	ミトコンドリア呼吸能に対する効果	55 頁
5.12	ミトコンドリア活性酸素種に対する効果	57 頁
6.	考察	58 頁
7.	総括及び結論	64 頁
8.	謝辞	65 頁
9.	利益相反	66 頁
10.	引用文献	67 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

Hikaru Hagiwara, Masaya Watanabe, Yoichiro Fujioka, Taro Koya, Motoki Nakao, Rui Kamada, Taro Tenma, Hisakata Sabe, Yusuke Ohba, and Toshihisa Anzai. Mitochondrial Calcium Uniporter Stimulation Compensates Diastolic Calcium Dysregulation to Mitigate Ventricular Arrhythmia in Heart Failure Mice. *Circulation*

本研究の一部は以下の学会・研究会において発表した。

- 1) Hikaru Hagiwara, Masaya Watanabe, Yoichiro Fujioka, Taro Koya, Motoki Nakao, Yumi Takahashi, Rui Kamada, Yusuke Ohba and Toshihisa Anzai 虚血性不全心における Mitochondrial calcium uniporter を介した calcium leak の抑制 第 27 回 北海道カルディアックセミナー、2019 年 9 月 28 日、札幌
- 2) Hikaru Hagiwara, Masaya Watanabe, Taro Koya, Motoki Nakao, Yumi Takahashi, Rui Kamada and Toshihisa Anzai 虚血不全心における、ミトコンドリア・カルシウム取り込み亢進を介した心室性不整脈の抑制効果の検討 第 7 回 Heart Science Club、2019 年 11 月 30 日、東京
- 3) Hikaru Hagiwara, Masaya Watanabe, Yoichiro Fujioka, Taro Koya, Motoki Nakao, Yumi Takahashi, Rui Kamada, Yusuke Ohba and Toshihisa Anzai Suppression of ventricular arrhythmia by mitochondrial calcium uptake via mitochondrial calcium uniporter in the ischemic heart failure mice. ESC Congress 2020 29 August to 1 September, online
- 4) Hikaru Hagiwara, Masaya Watanabe, Yoichiro Fujioka, Taro Koya, Motoki Nakao, Yumi Takahashi, Rui Kamada, Yusuke Ohba and Toshihisa Anzai Mitochondrial Calcium Uptake via Mitochondrial Calcium Uniporter Suppress Ventricular Arrhythmia in the Ischemic Heart Failure Mice American Heart Association Scientific Sessions November 13、 2020、 Moderated Digital Posters session、 online
- 5) Hikaru Hagiwara, Masaya Watanabe, Yoichiro Fujioka, Taro Koya, Motoki Nakao, Yumi Takahashi, Rui Kamada, Yusuke Ohba, Hisakata Sabe and Toshihisa Anzai A compensatory role of mitochondrial calcium uniporter against sarcoplasmic reticulum calcium leak to suppress heart failure-related ventricular arrhythmia 第 4 回日本循環器学会基礎研究フォーラム、2020 年 9 月 26-27 日、ウェブ開催

1.要旨

【背景と目的】

人口の高齢化、生活習慣病に伴う冠動脈疾患の増加などにより、本邦の心不全患者は増加しており、今後も増加していくことが予測されている。心不全患者の予後改善のために、致死的な心室性不整脈への治療法の確立が望まれる。しかし、これまでの薬剤は心不全患者への使用において有害事象が多く、効果的な抗不整脈薬の開発は依然として今後の課題である。心不全で起きる心室性不整脈の原因の一つに、再分極終了直後に活動電位を伴う遅延後脱分極が知られている。遅延後脱分極とは、細胞内カルシウム濃度上昇の代償過程での、ナトリウムーカルシウム交換を介する脱分極である。そのような細胞内カルシウム上昇の一因として、カルシウムウェーブが知られている。カルシウムウェーブは、小胞体からのカルシウム漏出に起因するが、まず、ライアノジンレセプター II の構造的、機能的障害によって小胞体からのカルシウム漏出が起き、それが他の小胞体のライアノジンレセプターに結合し、カルシウム放出をさらに誘起させ、カルシウム放出が次々に伝播する現象である。細胞内カルシウムの調整は、小胞体、細胞膜のナトリウムーカルシウム交換機構以外にも、ミトコンドリアが関与する。カテコラミン誘発性多型性心室頻拍モデルマウスは、ライアノジンレセプター II 機能障害に起因したカルシウムウェーブによる心室性不整脈を主要原因とする。最近、この動物モデルを用いて、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みを促進することによってカルシウムウェーブが抑制され、抗不整脈作用を示すことが報告された。一方、心不全患者の心室性不整脈に対して、このようなカルシウム取り込み促進が効果的であるか否かはわかっていない。本研究は、心不全においてライアノジンレセプター II から漏れ出たカルシウムをミトコンドリアに取り込ませることによる心室性不整脈への影響について明らかにすることを目的とする。

【材料と方法】

C57BL/6J マウスの左冠動脈前下行枝を結紮し心筋梗塞モデルマウスを作製した。結紮 4 から 6 週間後のマウスを心不全モデルマウス (HF 群) とし、偽手術をしたマウスをコントロール群 (sham 群) とした。エコーで心機能や心室内腔、壁厚を計測した。Mitochondrial calcium uniporter (MCU) タンパク質発現量をポリアクリルアミドゲル電気泳動法で評価した。ミトコンドリアへのカルシウム取り込みの促進は、主要なカルシウム流入経路である MCU を活性化するケンペロールを用いた。単離ミトコンドリアでケンペロールによるミトコンドリアへのカルシウム取り込み能の変化を評価した。単離心筋細胞を用い、落射蛍光顕微鏡でカルシウムウェーブを、共焦点レーザー顕微鏡でカルシウムスパーク、活動電位に伴う細胞質内全体のカル

シウムイオン濃度の上昇であるカルシウムトランジェントを、穿孔パッチクランプ法で活動電位の発生を評価した。ランゲンドルフ灌流心で心室性不整脈の発症について検討した。頸動脈から左室に挿入したマイクロマノメータチップカテーテルで左室内圧を測定し、血行動態を評価した。

【結果】

HF 群は sham 群と比較して、左室の拡大と収縮率低下を認め、心重量、肺重量の増加を認めた。MCU タンパク質発現は、HF 群と sham 群で有意差がなく、いずれの群もケンペロールによって、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みは促進した。sham 群では、拡張期のカルシウムウェーブは β アドレナリン受容体刺激薬であるイソプロテレノールの添加、イソプロテレノールとケンペロールの添加により変化しなかった。しかし、HF 群では、イソプロテレノールの添加により拡張期のカルシウムウェーブを認める細胞の割合、1 細胞あたりで認められるカルシウムウェーブの平均回数が増加した。イソプロテレノールに加え、ケンペロールを添加すると、カルシウムウェーブを認める細胞の割合に有意差はなかったが、1 細胞あたりで認められるカルシウムウェーブの平均回数は、有意に低下した。また、HF 群において、イソプロテレノール、ケンペロール、MCU 阻害薬を添加すると、カルシウムウェーブの回数は再度増加した。HF 群でのカルシウムスパークの頻度は、イソプロテレノールで増加するが、ケンペロールの追加によって低下した。拡張期にみとめる自発的な活動電位の回数は、イソプロテレノールで増加し、ケンペロールの添加により抑制された。小胞体カルシウム貯蔵量と関連しているカルシウムトランジェントの振幅は変わらなかった。ケンペロールは、心室性不整脈の発生を抑制し、血行動態への急性効果を認めなかった。

【考察】

本研究では、HF 群と sham 群で MCU タンパク質発現量に変化がなかった。圧負荷誘発心不全では、MCU タンパク質発現の増加が報告されている。虚血性心不全と、圧負荷誘発心不全では、MCU タンパク質への影響が異なることが示唆される。HF 群の単離心筋細胞において、MCU 作動薬であるケンペロールが、イソプロテレノールによるカルシウムウェーブ、カルシウムスパークの発生頻度を抑制した。これは、カテコラミン誘発多形性心室頻拍モデルマウスと同様であり、ライアノジンレセプターからのカルシウム漏出を、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みが代償する点で同様である。ケンペロールは、MCU 選択的活性化剤ではないが、MCU 阻害薬をケンペロールの存在下に追加投与すると、カルシウムウェーブが抑制できなかったことから、ケンペロールによるカルシウムリークの代償は、MCU の活性化に起因すると考えられる。

カルシウムトランジェントの振幅は小胞体カルシウム貯蔵量と関連しており、MCU 活性化によってカルシウムトランジェントの振幅に変化がなかったことから、小胞体内カルシウム貯蔵量に変化はないと考えられる。心筋収縮は小胞体からのカルシウム放出に依存しており、血行動態に変化がなかったことから、カルシウム貯蔵量に変化がなく、ケンペロール投与による安全性が期待される。

【結論】

不全心において、ケンペロールによるミトコンドリアへのカルシウム取り込みの促進は、小胞体からのカルシウムリークを代償し、致死性心室性不整脈を抑制する可能性が示唆される。これまでの抗不整脈薬の治療標的と異なる、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みに着目した治療戦略は、心不全患者における心室性不整脈治療の新たな選択肢になることが期待される。

2.略語表

ANOVA: analysis of variance

APD: action potential duration

APD₉₀: action potential duration at 90% repolarization

BSA: bovine serum albumin

BW: body weigh

CICR: calcium induced calcium release :

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid

LV: left ventricle

LVAWT: left ventricular anterior wall thickness

LVDd: left ventricular diastolic diameter

LVDs: left ventricular systolic diameter

LVEDD: left ventricular endo-diastolic diameter

LVESD: left ventricular endo-systolic diameter

LVPWT: left ventricular posterior wall thickness

MCU: mitochondrial calcium uniporter

OXPHOS: oxidative-phosphorylation

RyRII: ryanodine receptor II

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis

SVA: sustained ventricular arrhythmia

TBS: Tris-buffered saline

TBST: Tris-buffered saline with Tween 20

3.緒言

不整脈の成因には、三つの機序がある。何らかの異常により洞結節以外で自発性の活動電位が発生する異所性自動中枢、回路の形成により旋回するリエントリー型、そして、活動電位の発生から再分極終了直後までにおきる一過性の脱分極である撃発活動である。撃発活動は、活動電位の初期の段階に起こる早期後脱分極または、再分極終了直後に起こる遅延後脱分極が、活動電位を伴うことで不整脈の原因となる（図 1-1）。

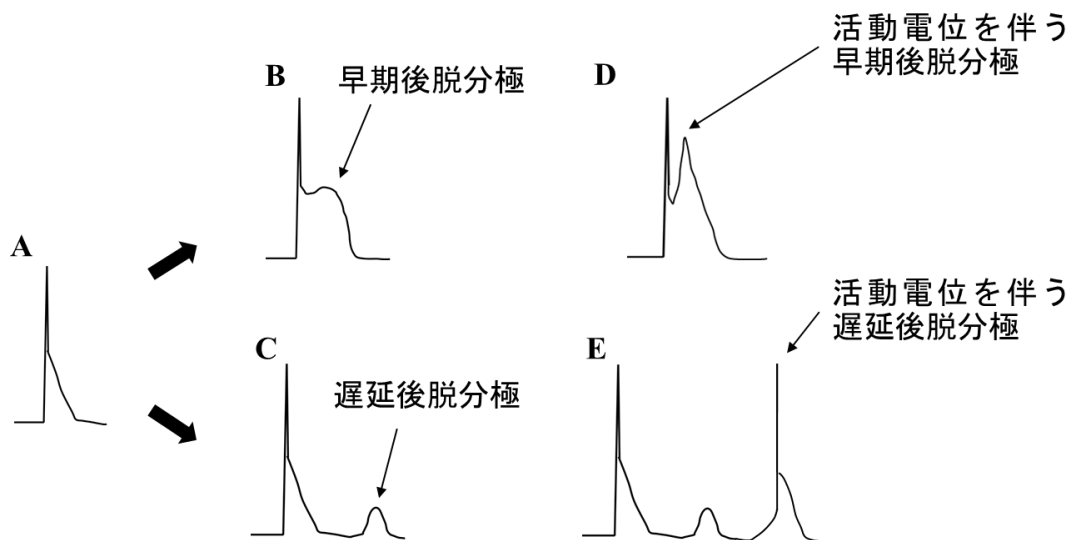


図 1-1 早期後脱分極と遅延後脱分極の膜電位の図

心筋細胞の膜電位の模式図を表す。縦軸が電圧で、横軸が時間を表す。

正常膜電位（A）に変化がおき、活動電位の初期の段階におきる早期後脱分極

（B）、再分極終了直後の遅延後脱分極（C）がおきる。早期後脱分極、遅延後脱分極が閾値を上回るときに活動電位が発生する（D, E）。

遅延後脱分極は、細胞内カルシウム濃度の代償過程での、ナトリウム-カルシウム交換を介する脱分極である。このような細胞内カルシウム濃度の上昇の原因に、ライアノジンレセプター II（Ryanodine Receptor II: RyRII）の構造的、機能的変化によるカルシウムリークが知られている。

RyRII は小胞体上に存在し、心筋の収縮などを統制する細胞内カルシウムの調整に関与する。活動電位に伴い電位依存性カルシウムチャネルを介して細胞内へ流入したカルシウムが、RyRII に結合し小胞体から細胞質へのカルシウム放出を起こす（Calcium induced calcium release : CICR）。細胞質に放出されたカルシウムは、細胞外へ流出したり、再度、小胞体内への取り込まれ、拡張期における細胞質カルシウム濃度は下がる。この心筋細胞内のカルシウムの生理的制御をカルシウムハンドリ

ングと呼ぶ (Ciofalo and Thomas, 1965)。RyRII や関連タンパク質の構造的機能障害はカルシウム漏出 (カルシウムリーク) を起こす (Schweitzer et al., 2017)。その際、漏出したカルシウムは、他の RyRII に結合し CICR を起こす。それが次々に伝搬することで、細胞内カルシウム濃度が上昇する。一方、その代償過程で、ナトリウム—カルシウム交換機構を介する、一過性内向き電流による遅延後脱分極が誘起され、その遅延後脱分極に起因する活動電位である撃発活動が発生する。一時的で局所的な RyRII からカルシウムを放出する現象はカルシウムスパークと呼ばれ、CICR が次々と伝搬する現象はカルシウムウェーブと呼ばれる。このカルシウムウェーブは、遅延後脱分極の機序の一つとされる。

生活習慣の欧米化に伴う虚血性心疾患の増加や、高齢化に伴い高血圧や弁膜症患者が増加し、わが国の心不全患者は増加し (Okura et al., 2008)、突然死の原因となる不整脈の治療が重要となっている。しかしながら、これまでの抗不整脈薬は、心不全患者への使用において有害事象が多く (Echt et al., 1991)、効果的な抗不整脈薬の開発は依然として今後の課題である。心不全で起きる心室性不整脈の原因の一つに、遅延後脱分極が知られている。

RyRII は、ホモ 4 量体を形成し、カルシウム放出チャネルを形成している。健常心では、 β 受容体刺激によって活性化されるプロテインキナーゼ A が RyRII 4 受容体のうちの 1 つの受容体の Ser²⁸⁰⁹ をリン酸化する。これによりチャネルの開口確率が上昇し、カルシウム放出量が増加し、心筋収縮力が増加する。一方、不全心では、脱リン酸化酵素であるプロテインホスファターゼ 1 とプロテインホスファターゼ 2A の活性が低下することにより、RyRII 4 分子のうち 3 分子以上がリン酸化される (Marx et al., 2000; Yano et al., 2000)。これにより、FK506 結合タンパク質 12.6 が健常時より多く RyRII から解離し、チャネルの開口確率が増大し、カルシウムリークが起こる。このカルシウムリークによってカルシウムウェーブが起き、最終的に撃発活動による心室性不整脈を起こす。従って、カルシウムハンドリング異常を改善することは治療戦略の一つとなるが、これまでの抗不整脈薬の多くは、カルシウムハンドリング異常を改善しない。本研究は、カルシウムハンドリング異常に焦点を当てた心不全に関連する心室性不整脈への新規治療の開発を目的とする。

カルシウムハンドリングは、小胞体の RyRII、細胞膜のナトリウム—カルシウム交換体以外に、ミトコンドリアが関与している (Fonteriz et al., 2010)。Mitochondrial permeability transition pore からのカルシウムの放出を促進する carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone の投与により、カルシウムウェーブの頻度が上昇し、さらにミトコンドリアへのカルシウム取り込みを促進することでカルシウムウェーブが抑制された (Zhao et al., 2013)。また、RyRII 機能障害に起因したカルシウムウ

エーブによる心室性不整脈を主原因とする、カテコラミン誘発性多型性心室頻拍モデルマウスにおいて、イソプロテレノール投与によってカルシウムウェーブの頻度が上昇し、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みを促進することでカルシウムウェーブが抑制され、抗不整脈作用が示された (Schweitzer et al., 2017)。一方、心不全患者の心室性不整脈における遅延後脱分極に対する、このようなミトコンドリアへのカルシウム取り込み促進が効果的であるか否かはわかっていない。そこで、「心不全患者における RyRII からのカルシウムリークをミトコンドリアに代償させることにより、心室性不整脈を抑制する」と仮説をたてた。

ミトコンドリアにはカルシウムの取り込み、排出をおこなうタンパク質が多く報告されており、それらのうち主要なカルシウム流入経路であることが報告されている Mitochondrial calcium uniporter (MCU) に注目した (Rasmussen et al., 2015; Wei et al., 2012)。

以上より、本研究は、「心不全において、RyRII から漏れ出たカルシウムを MCU を介してミトコンドリアに取り込ませることによる心室性不整脈への影響について明らかにすること」を目的とする (図 1-2)。

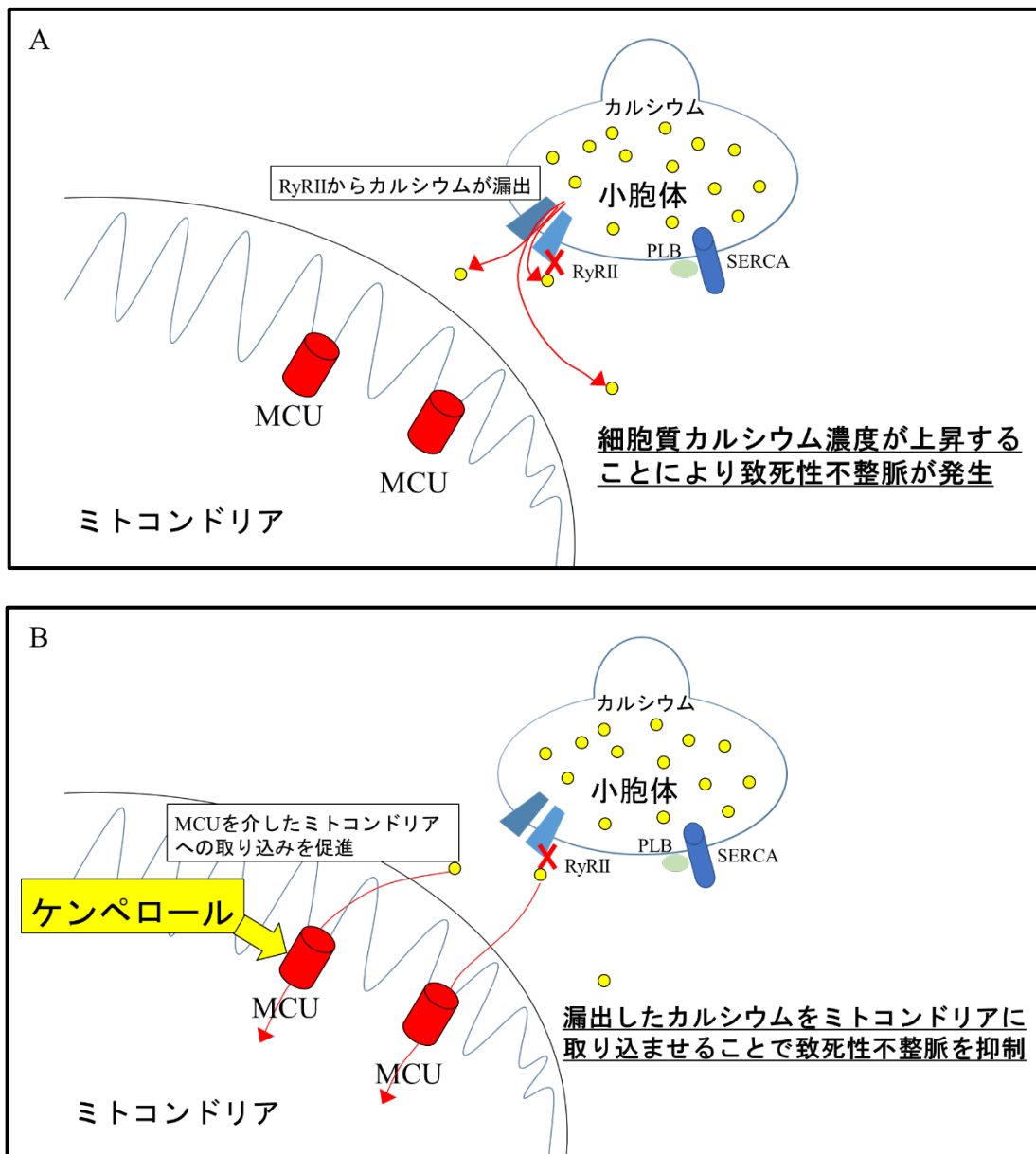


図 1-2.本研究の概要

不全心では、RyR II からカルシウムが漏出し、細胞質カルシウム濃度が上昇し、不整脈を誘発している (A)。ここに MCU 作動薬であるケンペロールを投与し、MCU を介したミトコンドリアへのカルシウム取り込みを促進することで、上昇した細胞質カルシウム濃度を代償し、致死性不整脈を抑制する考えた。●：カルシウムイオン、—：カルシウムの動き

4.実験方法

本研究の全実験は、国立大学法人北海道大学の動物実験に関する規定を遵守して行った。

4.1 心不全モデルマウスの作製

雄性 10~11 週齢の C57BL/6J マウス（体重 22~26 g）の心臓の左冠動脈前下行枝を結紮して心筋梗塞を作成した。術前にマウスの体重を測定し、塩酸メドメジン 0.3 mg / kg BW、ミダゾラム 4.0 mg / kg BW、酒石酸ブトルファノール 5.0 mg / kg BW の 3 種混合麻酔薬を腹腔内投与し (Kawai et al., 2011)、十分な麻酔深度になったことを確認した。70%アルコールで消毒を行い、実体顕微鏡下で手術を行った。手術台に臥位で四肢と尾をテープで固定し、気管挿管のために切歯を絹糸で牽引し頸部を進展位で固定した。頸部正中を皮膚切開の後に、顎下腺と気管前筋を展開した。気管の直線形状を保ち、23 ゲージのポリエチレンチューブを挿入した。半透明のチューブが気管軟骨を通過することを確認した。その後、従量式実験動物人工呼吸器 (SN-480-7x2T (Shinano, Tokyo, Japan)) に接続し、毎回 110 回、1 回換気量 0.4 ml で人工呼吸を開始し、送気時に前胸部が良好に挙上していることを確認した。

左前胸部を皮切し、大胸筋と小胸筋を牽引して温存し、肋間筋を露出した。第 4 肋間で肋間筋を切開した後に開胸器で視野を展開して心臓を確認した (図 3-2A)。心膜を切開した後に心臓を半時計方向に旋回させて左冠動脈の走行を確認し、左心耳下縁から 1 mm 程度遠位で 8-0 シルク縫合糸を使用して器械結びを行った (図 3-2B)。冠動脈結紮後に結紮部遠位の心筋が赤から白色へ色調変化を確認することで、心筋の虚血性変化を確認した。肋間を 8-0 シルク縫合糸 (ELP M6-80B2, Akiyama-seisakusyo, Tokyo, Japan) で肋間縫合、4-0 シルク縫合糸 (Sof silk™ VS-709, Covidien, Dublin, Ireland) で閉創し (図 3-2C)、手術を終了した。コントロール群のマウスには sham 手術を施した。これは上記一連の手技から左冠動脈結紮術を除いた処置を行った。

術後は麻酔からの回復が得られるまで 37°C の保温パッドで保温を継続しながら待機した。抜管までの時間は、十分に覚醒して自発呼吸が安定して再開する 2 時間とした。手術時間は 15 分程度、開胸時間は 7 分前後であった。

心筋梗塞を作製したマウスを心不全 (HF) 群、sham 手術を施行したマウスを sham 群とした。

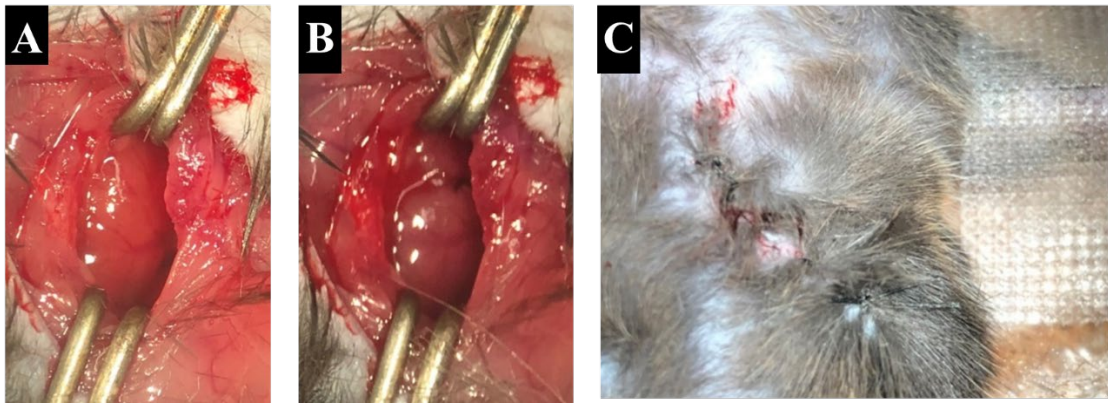


図 3-2 心筋梗塞手術の術中写真

気管挿管後、肋間を切開して心臓を露出し (A)、 8-0 シルク縫合糸イロンで左心耳下縁から 1 mm 程度遠位を結紮した (B)。その後肋間縫合し、 4-0 シルク縫合糸で皮膚縫合した (C)。

4.2 心エコー

心エコー法は非侵襲的な検査である。実験動物においては安静を保つことが極めて難しいため、麻酔薬を用いることがあるが、麻酔薬によって心抑制が生じて正しく心機能を評価できないことが報告されており、手技に習熟していれば非麻酔下での心エコー法が推奨されている (Pachon et al., 2015)。そのため、本研究では非麻酔下で心エコー法を行った。検査台に臥位で四肢と尾をテープで固定し、除毛クリームでマウスの前胸壁を除毛した。超音波診断装置および 12 MHz リニアプローブを用いて、 2D 胸骨傍短軸像乳頭筋レベルで最適な像を描出した。 M モード法に切り替え、記録紙スピード 40 mm/sec で記録の上、心拍数、左室拡張末期径、左室収縮末期径、左室前壁壁厚、左室後壁壁厚、左室内径短縮率を計測した (図 3-3)。



図 3-3. 心エコー検査の写真

奥に準備したマウスと検査台を設置し、心エコーを行っている。

4.3 免疫ブロット法

頸椎脱臼後に、心筋を迅速に摘出し液体窒素で凍結し -80°C で保存した。心筋からのタンパク質抽出、電気泳動、および免疫ブロットを以下の手順で行った。

タンパク質抽出

- 1) 凍結保存したサンプルを氷上で解凍した。氷冷した $10 \times$ Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology [CST], Danvers, Massachusetts, USA) を蒸留水で 10 倍希釈し、99.5%エタノール (Wako, Osaka, Japan) で希釈した 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (Sigma-Aldrich, MO, USA) およびセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼを阻害するプロテアーゼインヒビターカクテル錠である complete Mini (Roche, IN, USA) を 1 錠添加した。組織サンプルを入れ、ダウンス型ホモジナイザー (BioMasher II, nippi, Tokyo, Japan) でホモジナイズした。
- 2) ホモジナイズしたサンプルを遠心分離し ($15000g$, 10 分, 4°C)、ペレットを吸引しないように上清を新しいエッペンドルフチューブに移した。長期保存のため、 -80°C で冷凍保存した。

タンパク質濃度測定

抽出したサンプルタンパク質の濃度測定は、以下の手順の通り、ビシンコニン

酸法で測定を行った。

- 1) CELLSTAR 96 穴マイクロプレート (Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria) に BCATM Protein Assay Reagent A と BCATM Protein Assay Reagent B (Thermo Scientific, Meridian Rd, Rockford, USA) を 50 対 1 の割合で混合した working reagent を作成し、各ウェルに 200 μ l ずつ分注した。
- 2) ブランクとして 1 ウェル空白を置き、2 mg/ml のアルブミンスタンダードを 1、2、4、8、12、16 μ l ずつウェルに混合した。
- 3) 測定するサンプルは各 2 μ l ずつウェルに注入した。
- 4) 37°C で 30 分間インキュベートした。
- 5) タンパク濃度測定装置本体 (Immuno Mini Model NJ-2300, Biotec Tokyo, Japan) およびソフト (immuno mini, Biotec, Tokyo, Japan) で、540 nm 波長の吸光度を計測した。
- 6) スタンダードタンパク質の平均値の一次直線を算出し、スタンダードタンパク質濃度から得た検量線を基にサンプルタンパク質濃度を算出した。上記のタンパク質濃度測定は、スタンダード、サンプルとも同一サンプルを二重で各ウェルに置き、2 つの平均値で算出した。

サンプルの調製

- 1) 2-メルカプトノールを添加した Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 用サンプル緩衝液で、2.5 μ g/ μ l のサンプル溶液を作成した。ボルテックスミキサーで溶液を攪拌した。
- 2) MULTI HEATER TYPE MH-36 (WAKAMORI CO., LTD. Tokyo) にて 100°C で 5 分間加温した。
- 3) 短時間遠心してエッペンドルフチューブの蓋に付着した水滴を落とし、ボルテックスミキサーで攪拌した。

電気泳動

- 1) 電気泳動槽 (Criterion セル, Bio-Rad Laboratories, California, USA) に SDS-PAGE 泳動緩衝液*1 を注入し、電気泳動用のタンパク質ゲルをセットした。電気泳動用のタンパク質ゲルは Criterion TGX プレキャストゲル (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA) を使用した。使用するゲルは、AnyKD の濃度ゲルを使用した。

*1 SDS-PAGE 泳動緩衝液の組成: : 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS

- 2) 10 μ l のサンプルをピペットマンで各ウェルに注入し、サンプルレーンの端に分

子量マーカーである、カラーマーカー（Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range, Bio-Rad Laboratories）を注入した。

- 3) POWER PAC 300（Bio-Rad Laboratories）にて、60 V の定電圧で 30 分間、引き続いて 120 V の定電圧でおよそ 1 時間 30 分泳動し、サンプルがゲルの先端まで移動するのを確認して泳動を終了した。

ウェスタンブロッティング

セミドライ式ブロッティングで転写した。

- 1) タンパク質ゲルを PVDF 膜である Trans-Blot Turbo™（Bio-Rad Laboratories）の上に乘せた。
- 2) 1.0 A、25 V で 30 分間転写した。

Ponceau 染色

- 1) タンパク質を転写したメンブレンをタッパーに入れ、メンブレンが十分浸るようにポンソー S 染色液を（BCL-PSS-01, Beacle, Kyoto, Japan）注ぎ、軽く振蕩しながら 5 分間染色した。
- 2) タッパーの染色液を捨て、メンブレンが十分浸るように 1%酢酸溶液を注ぎ、バックグラウンドが十分低下し、タンパク質の染色が明瞭になるまで軽く振蕩した。
- 3) ウェスタンブロッティング撮影用イメージングシステム（ChemiDoc XRS+ System, 1708265J1NPC, Bio-Rad Laboratories）で撮影した。
- 4) メンブレンが十分浸るように 0.1 M NaOH 溶液を注ぎ、目視で確認しながらタンパク質が脱色されるまで軽く振蕩した。
- 5) タッパーの 0.1 M NaOH 溶液を捨て、蒸留水で 2 分間振蕩しブロッキング行程に進んだ。

ブロッキング～一次抗体反応～二次抗体反応

1 次抗体には、ウサギ抗 MCU モノクローナル抗体（1:1000, #14997, CST）を用い、2 次抗体には、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ 標識ヤギ抗ウサギ 標識免疫グロブリン G 二次抗体（1:5000, ab97051, Abcam）を用いた。

- 1) メンブレンをブロッキング溶液に移して、室温で 1 時間振蕩した。ブロッキング溶液には 3%スキムミルクを用いた。
- 2) 1×TBST*¹で振蕩しながら洗浄（10 分間×3 回）した。
- 3) 1 次抗体希釈液（ブロッキング溶液と同じ溶液で希釈）に浸し、4°Cで 1 晩

抗体反応を行った。

- 4) 1×TBST で振蕩しながら洗浄（10 分間×3 回）した。
- 5) 2 次抗体希釈液（ブロッキング溶液と同じ溶液で希釈）に浸し、室温で 1 時間抗体反応を行った。
- 6) 1×TBST で振蕩しながら洗浄（10 分間×3 回）した。

*1 1×TBST の組成： 20×トリス緩衝生理食塩水（0.4 M Tris/HCl（pH 7.6）、3 M NaCl）を純水で 20 倍に希釈し、0.1% となるように polyoxyethylene sorbitan monolaurate（Tween20[®], Wako, Osaka, Japan）を加えた。

検出

- 1) PVDF 膜の全面を覆うように検出試薬をかけ、3 分間室温で静置した。検出試薬には ECL Prime（RPN2232, GE Healthcare, Little Chalfont, UK）を使用した。
- 2) ウェスタンブロッティング撮影用イメージングシステムで可視化されたバンドを検出した。

画像解析ソフト Image J（U.S. National Institutes of Health）を用いて集積光濃度を定量して解析した。なお、Ponceau 染色で評価した総タンパク質発現量をコントロールとして補正した。

4.4 ミトコンドリアのカルシウム取り込みの評価

4.4.1 ミトコンドリア単離

麻酔下に、心筋を迅速に摘出し、ミトコンドリアを以下の手順で単離した。

- 1) マウスを屠殺し、直ちに BIOPS^{*1}に漬け、両心房および右室組織を取り除いた。

*1 BIOPS（pH 7.1）の作製： 2.77 mM CaK₂EGTA, 7.23 mM K₂EGTA, 5.77 mM Na₂ATP, 6.56 mM MgCl₂/6H₂O, 20 mM Taurine, 15 mM Na₂Phosphocreatine, 20 mM Imidazole, 0.5mM Dithiothreitol, 50 mM MES hydrate

- 2) 1 ml isolation buffer^{*2}の入った 2 ml マイクロチューブへ検体を入れた。

*2 isolation buffer（pH 7.4）の作製： 100 mM Sucrose, 100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM KH₂PO₄, 0.1 mM EGTA, 0.2% bovine serum albumin

- 3) はさみをエッペン内に挿入し、4 分間 mince をした。
- 4) ピペットを用いて isolation buffer 1 ml を勢いよく入れ、2 分静置した。
- 5) 上清を 1 ml 捨て、あらたに isolation buffer 1 ml を加え、また 2 分静置した。これを 3 回繰り返した。

- 6) プロテアーゼ (Proteinase Type XXIV, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を 0.2 mg/ml isolation buffer で調整した。
- 7) プロテアーゼ溶液 1 ml を加え、30 秒ごとに転倒混和しながら、2 分間反応させた。
- 8) プロテアーゼ処理後の心筋組織を移し、電動ドリル付きテフロン棒を用いて、1 回 20 秒かけて計 6 回ホモジナイズした。
- 10) isolation buffer を、Douncer に 1.5 ml、15 ml コニカルチューブに 1.5 ml、計 3 ml 入れた。
- 11) ホモジナイズ溶液を 15 ml コニカルチューブへ移した。
- 12) 遠心 (4°C、750 g×10 分) した。
- 13) 上清を、2 本の 2 ml マイクロチューブへ移した。
- 14) 遠心 (4°C、10000 g×10 分) し、上清を破棄した。
- 15) 650 μ l の isolation buffer を加え、上清を破棄した。
- 16) 300 μ l の isolation buffer を加え、溶液化したペレットを一つにまとめた。
- 17) 遠心 (4°C、7000 g×3 分) し、上清を破棄した。
- 18) suspension buffer^{*3} 100 μ l を加え、十分に溶液化した。

^{*3} suspension buffer (pH 7.4) の作製 : 225 mM Mannitol, 75 mM Sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) , 0.1 mM EDTA

4.4.2 ミトコンドリアタンパク質濃度測定

以下の手順でミトコンドリアタンパク質濃度を測定した。

- 1) CELLSTAR 96 穴マイクロプレートに Pierce BCA タンパク質アッセイキットの Reagent A と Reagent B を 50:1 の割合で混合した working reagent を作成し、各ウェルに 200 μ l ずつ分注した。
- 2) ブランクとして 1 穴空白を置き、2 mg/ml のアルブミンスタンダードを 1, 2, 4, 8, 16 μ l ずつウェルに混合した。
- 3) 測定するサンプルは各 2 μ l ずつウェルに注入した。
- 4) 37°C で 30 分間インキュベートした。
- 5) マイクロプレートリーダーで 590 nm 波長の吸光度を計測した。
- 6) スタンダードの吸光度から得られる検量線を元にしてサンプルのタンパク質濃度を算出した。上記のタンパク質濃度測定は、スタンダード、サンプルとも同一サンプルを二重で各ウェルに置き、2 つの平均値を採用した。
- 7) 1 mg/100 μ L となるように suspension buffer を加えた。

4.4.3 蛍光吸光度計

蛍光光度計は、RF-6000 (SHIMADZU, Kyoto, Japan) を使用した (図 3-4 A, B, C)。ミトコンドリアに取り込まれないカルシウム蛍光色素である Fluo-5N (1 μ M ; Molecular Probes、OR、USA) を混和した potassium-based buffer^{*1} に、単離ミトコンドリア (1mg) を添加し、測定を開始した。測定開始 20 秒後に、50 μ M Ca^{2+} を滴下した。 Ca^{2+} 濃度は、WEBMAXC STANDARD で計算した。 CaCl_2 添加までの蛍光強度の平均値を F0 とし、F0 との比 (F_x/F_0) を求めた。滴下 5 秒後から 20 秒後までの F_x/F_0 を直線に近似し、傾きの絶対値を求めた。この傾きの絶対値は、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みが促進されていると増大する。同一の個体から単離した心筋のミトコンドリアで、ケンペロールを CaCl_2 と同時に投与したものとケンペロールを投与しなかったものを比較した。

*1 potassium-based buffer (pH 7.15) の作製 : 137 KCl 137 mM, KH_2PO_4 2 mM, Hepes 20 mM, EGTA 0.02 mM, Glutamate 5 mM, Malate 5 mM

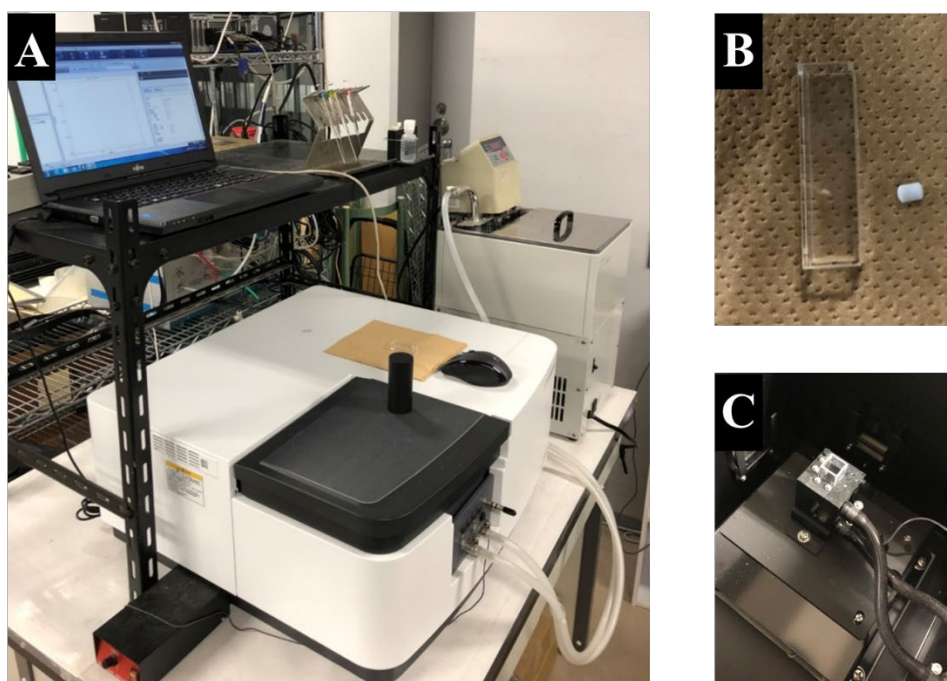


図 3-4. 蛍光吸光度計の写真

奥が恒温槽で、上はデータ取得用のパソコン (A)。黒い部分が開閉可能で、スターラーをいれたキュベット (B) を、(C) のように設置し測定を開始する。

4.5 カルシウムイメージング

4.5.1 心筋細胞単離

麻酔下で心筋を迅速に摘出し、以下の手順で心筋細胞を単離した。

- 1) 抗凝固目的に塩酸ヘパリン (400 IU ; AY Pharma, Tokyo, Japan) を腹腔内投与した。
- 2) 5 分後、マウスを屠殺して心臓を摘出し、氷冷した Perfusion buffer 液^{※1}に漬けた。
※1 Perfusion buffer 液 (pH 7.4) の組成 : 135 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.33 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 1 mM MgCl₂, 10 mM 2, 3-Butanedione-monoxime, 5 mM Taurine
- 3) Perfusion buffer 内で胸腺組織を除き、上行大動脈を露出した。
- 4) 上行大動脈に 23 ゲージ針を挿入し、4-0 絹糸で固定した。
- 5) ランゲンドルフ装置 (図 3-5) に接続した。37°C に保温し、酸素でバブリングした Perfusion buffer 液で逆行性灌流を 3ml/時間で開始した。
- 6) 1 分後に酵素液に変更した。酵素液は、Perfusion buffer 液にコラゲナーゼ (0.5 mg/ml, WAKO, Tokyo, Japan) とプロテアーゼ (0.1 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を溶解したものを使用した。
- 7) 10 分後、BufferA に漬けた。BufferA は Perfusion buffer 液に BSA (5mg/ml, NACALAI TESQUE, Kyoto, JAPAN) を溶解したものを使用した。
- 8) BufferA 内で両心房を取り除いて残った心室筋を小切片に切除し、100 µm セルストレーナー (Falcon, Tewksbury, MA, USA) で濾過した。
- 9) 10 分後、沈殿したペレットを 1.2mM カルシウム Tyrode 液^{※2}に移した。単离心筋細胞は単離後 4 時間以内に使用した。

※2 1.2mM カルシウム Tyrode 液 (pH = 7.4) の組成 : 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂·2H₂O, 10 mM HEPES, 5 mM glucose

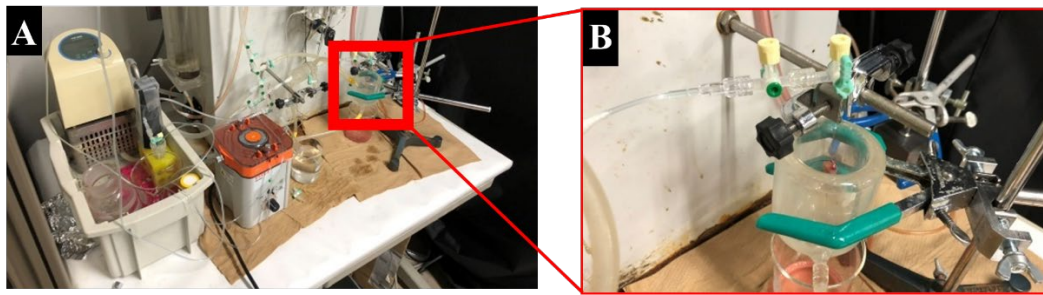


図 3-5. ランゲンドルフ装置の写真

左に恒温槽、真ん中にペリスタティックポンプがあり、右手に摘出した心臓を設置する (A)。摘出した心臓の周囲には、風を防ぎ、温度を一定に保つためのチャンバーを設置し、チャンバー内は温水が灌流している。B は、設置した心臓とその周りのチャンバーを示す。

4.5.2 心筋細胞のカルシウム色素染色

ガラスボトムディッシュ (Matsunami, Osaka, Japan) に、 $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ に希釈したラミニン (Wako, Osaka, Japan) を添加し、常温で 1 時間インキュベートした。残った器質を吸引し、穏やかにリンスした。ガラスボトムディッシュに $5\text{ }\mu\text{M}$ の Fluo-4 AM、 0.04% (w/v) pluronic F-127、 1.25 mM Probenecid (Dojindo, Kumamoto, Japan) を含む 1.2 mM カルシウム Tyrode を添加し、心筋細胞を滴下した。遮光下、室温で 30 分間インキュベートした。溶液を取り除き、 1.2 mM カルシウム Tyrode 液を添加した。

4.5.3 落射蛍光顕微鏡

心筋細胞におけるカルシウムウェーブの観察には、倒立顕微鏡 (IX-83 microscope, Olympus, Tokyo, Japan)、BioPoint MAC6000 filter and shutter control unit (Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA)、電動 XY ステージ (Chuo Precision Industrial, Tokyo, Japan)、Rolera EM-C2 electron multiplying cooled charge-coupled device camera (QImaging, Surrey, British Columbia, Canada) を用いた。Fluo-4 AM の励起には、SOLA Light Engine (Lumencor, Beaverton, OR, USA) および、励起フィルタとして $470\text{--}490\text{ nm}$ 、蛍光フィルタとして BP510-550 nm (Olympus, Tokyo, Japan) を使用した。対物レンズは UPlanSApo ($10\times$ 、開口数 0.40) を使用した。顕微鏡とその周辺機器は MetaMorph software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) で制御した。

ガラスボトムディッシュに装着した電極（図 3-6）による field stimulation により心筋細胞の電気刺激（矩形波、7-10 V、0.75 msec）を 0.5Hz で行った。安定してカルシウムトランジェントを認める細胞を解析対象とした。撮像開始後、5 回の field stimulation の後、ペーシングを停止し、30 秒間の拡張期のカルシウムウェーブの回数を定量解析した。sham 群と HF 群の両群で、1.2 mM カルシウムタイロード（対照）、1.2 mM カルシウムタイロードに 0.5 μ M イソプロテールを添加、イソプロテレノールに加え 10 μ M ケンペロールを添加の 3 種類の溶液での撮像を行い、HF 群においては、MCU 阻害薬である Ruthenium Red（ab120264、Abcam）を加えた溶液での撮像を行った。画像解析は、ImageJ で行った。心筋細胞の縦軸に平行に、拡張期の基線となっている蛍光強度（F0）に対する蛍光強度（Fx）の比率（Fx / F0）を測定した。

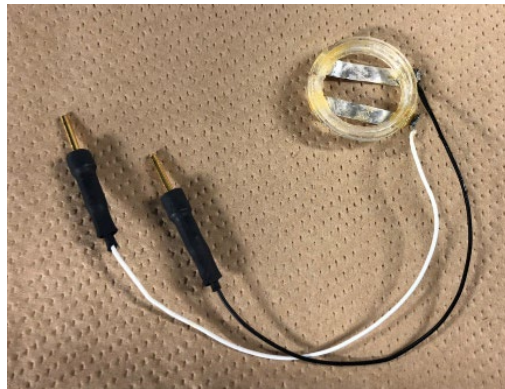


図 3-6 Field stimulation 用の電極の写真

ガラスボトムディッシュに設置し、刺激を行った。

4.5.4 共焦点レーザー顕微鏡

カルシウムスパークの測定は、アルゴンイオンレーザーと倒立顕微鏡（Axio Observer Z.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany）を組み合わせた共焦点レーザー顕微鏡（LSM-710, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany）を使用した。対物レンズは、油浸 Plan-Neofluor 対物レンズ（40 倍、開口数 1.3）を使用し、励起波長を 488 nm、蛍光波長を 493-630 nm とした。ガラスボトムディッシュに装着した電極による field stimulation により心筋細胞の電気刺激（矩形波、7-10 V、0.75 msec）を 0.5 Hz で行った。カルシウムトランジェントが定常状態に達した後、ラインスキャンモードで撮像した。ラインスキャンモードは設定した線上を繰り返しスキャンすることで、1 次元の空間情報と 2 次元の時間情報を含む

2次元画像を作成する。単離心筋細胞の縦軸に平行な線上を繰り返しスキャンした (327.9 Hz)。カルシウムスパークは、自動分析プログラムである SparkMaster を使用して計算した ($\text{sparks} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot 100 \mu\text{m}^{-1}$)。

カルシウムトランジェントは、スキャン開始後に field stimulation を開始し、最初のカルシウムトランジェントを対象とした。スキャン終了後に、 $10 \mu\text{M}$ のケンペロール滴下し、静かに混和したのちに、同一出力で field stimulation 下での同一ラインでのスキャンを行った。細胞のイメージングデータは、ImageJ で解析し、 F_x/F_0 を指数曲線に近似した。

4.6 不整脈誘発性の検討

4.6.1 ラングENDORF灌流心

- 1) 抗凝固を目的として塩酸ヘパリン (400 IU ; AY Pharma, Tokyo, Japan) を腹腔内投与した。
- 2) 5分後、マウスを頸椎脱臼により屠殺して心臓を摘出し、氷冷したカルシウム Tyrode 液^{*1}に漬けた。

^{*1} カルシウム Tyrode の組成 (pH 7.4) : 143 mM NaCl , 5.4 mM KCl , $0.33 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 5 mM HEPES , 5.5 mM glucose , 0.5 mM MgCl_2 , 1.8 mM CaCl_2

- 3) カルシウム Tyrode 液内で胸腺組織を除き、上行大動脈を露出させた。
- 4) 上行大動脈に 23 ゲージ針を挿入し、4-0 絹糸で固定した。
- 5) ラングENDORF装置に接続した。37°Cに保温し、酸素でバブリングしたカルシウム Tyrode 液で逆行性灌流を $3 \text{ ml} / \text{時間}$ で開始した。
- 6) 灌流心は 37°Cに保温されたチャンバー内で固定し、数分間拍動が安定していることを確認した後、実験に使用した。

4.6.2 電気刺激による不整脈誘発性

摘出灌流心の後壁に単極ペーシング電極、右室、左室にそれぞれ心電図記録用の単極電極を装着した。ラングENDORF装置に接続 8 分後から、左室後壁のペーシング電極から 150 msec のペーシングサイクル長で 10 発刺激を加え、15 秒の間欠期を置き 10 msec 毎にペーシングサイクル長を短縮した。出力は 2 mV に固定した。対照、イソプロテレノールを含むカルシウム Tyrode、イソプロテレノールとケンペフェロールを含むカルシウム Tyrode の 3 群で比較した。持続性心室性不整脈 (SVA: sustained ventricular arrhythmia) の発生もしくは 1:1 のペーシング補足が得られなくなるまでペーシングサイクル長を短縮した。心電図は右室および左室に装着した電極で PowerLab 4/26 (AD Instruments, Dunedin, New

Zeeland) を用いて測定した。SVA は 10 秒以上持続する頻脈性持続性心室性不整脈と定義した。

4.6.3 高濃度 β -アドレナリン受容体刺激による不整脈誘発性

摘出灌流心の右室、左室にそれぞれ心電図記録用の単極電極を装着した。1 μ M イソプロテレノールを含むカルシウム Tyrode、1 μ M イソプロテレノールと 10 μ M ケンペロールを含むカルシウム Tyrode の 2 群で比較した。心電図は右室および左室に装着した電極で PowerLab 4/26 (AD Instruments、Dunedin、New Zealand) を用いて測定した。3 秒以上持続する頻脈性持続性心室性不整脈 (short VA) の発生率を評価した。

4.7 電気生理学的記録

4.7.1 心筋細胞単離

4.5.1 の方法と同様に行った。

4.7.2 穿孔パッチクランプ法

穿孔パッチクランプ法による電流固定下での細胞内電位記録を行った。穿孔パッチクランプ法とは、ガラス電極直下の細胞膜に抗生物質であるアムホテリシン B を用いて微小な穴をあけて、細胞内電位を記録する方法である。パッチ電極はガラス管キャピラリーを牽引器 (Model P-97, Stutter Instrument Company, CA, USA) で引いて作成し、Pipette solution 液^{*1}で満たした。抵抗値が 2-5 $M\Omega$ のものを使用した。細胞内電位の測定は Axopatch200B パッチクランプ増幅器 (Axon Instruments, Union City, CA, USA) を用いて行い、Digidata 1440A (Axon Instruments, Union City, CA, USA) を介して A/D 変換してコンピューターに記録した。pClamp10 (Axon Instruments, Union City, CA, USA) に付属しているソフトウェア Clampex10 をパルスプロトコル制御に、Clampfit10 をデータ集計・解析に使用した。

ガラスボトムディッシュに、40 μ g/ml に希釈したラミニン (Wako, Osaka, Japan) を添加し、常温で 1 時間インキュベートした。残った器質を吸引し、穏やかにリンスした。

ガラスボトムディッシュに Bath solution^{*2}を添加し、単離心筋細胞を滴下した。顕微鏡及び電極の抵抗の変化を指標に単離細胞と電極を接触させ、シリンジで陰圧をかけギガオームシールを形成した。その状態で 5 分待ち、抵抗値の低下を確認した。静止膜電位が -60mV 以下の細胞を解析の対象とした。静止膜電位が -60mV 以下であることを確認した後に、ガラスボトムディッシュ内の溶液を、Vehicle 群は Bath Solution 液のみ、イソプロテレノール群は、Bath solution

液にイソプロテレノール 0.5 nM を添加、イソプロテレノール+ケンペロール群は Bath solution にイソプロテレノール 0.5 nM、ケンペロール 10 μ M を添加して膜電位を測定した。1 nA、3 msec の電流を 5 回与えたのち、30 秒間で起きる活動電位を解析した。パッチクランプ法は室温で行った (23-25°C)。

※1 Pipette solution 液 (pH 7.25) の組成： 30 mM KCl, 110 mM K-aspartate, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 0.1mM EGTA

※2 Bath solution 液 (pH 7.4) の組成： 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 10mM HEPES, 10 mM glucose

4.8 血行動態測定

血行動態測定は、1.4-Fr マイクロマノメータチップカテーテル (Millar Instruments, Houston, Texas) を右頸動脈へ挿入し左室へカテーテルを進め、左室圧を測定した。その後、右内頸静脈に 24 ゲージのポリエチレンチューブを挿入し、薬剤を投与した。投与 30 分後の血行動態と比較した。

4.9 ミトコンドリア呼吸能測定

4.9.1 ミトコンドリア単離

4.4.1 の方法と同様に行った。

4.9.2 ミトコンドリアタンパク質濃度測定

4.4.2 の方法と同様に行った。

4.9.3 高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置

ミトコンドリア呼吸能は、単離ミトコンドリア (50~100 μ g) を用いて、Innsbruck 社製オロボロス装置、Oxygraph-2k (以下、O2k) を使用し、37 °C の環境下で測定した。

- 1) 2 ml のチャンバー内を、2 ml の Mir05 溶液*1 で満たし、蓋をして空気を追い出した。
- 2) 50~100 μ g の単離ミトコンドリアをハミルトンシリンジを用いて加えた。
- 3) ケンペロール存在下での呼吸能測定においては、10 μ M のケンペロールを加えた。
- 4) Complex I に関連する基質である、10 mM glutamate、2 mM malate、5 mM pyruvate を加えた。
- 5) 3 mM MgCl_2 と 1 mM Adenosine diphosphate を加えた。
- 6) Complex II に関連する基質である 10 mM succinate を加えた。

- 7) ATPase の阻害薬である 2.5 μ M oligomycin を加えた。
- 8) 最大の呼吸機能を見るため、脱共役剤である 1 μ M carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone を加えた。
- 9) 最大の呼吸機能を見るため、脱共役剤である 1 μ M carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone を加えた。
- 10) Complex I 以外による呼吸を観察するため、Complex I の阻害薬である 0.5 μ M rotenone を加えた。
- 11) Complex III の阻害薬である、2.5 μ M antimycin を加え、ミトコンドリアに関係する呼吸を停止させた。
- 12) Datlab software を用いて、酸素消費量を計算した。その際に、ミトコンドリア当たりの補正を行った。
*1 MiR05 溶液の組成： 0.5 mM EGTA, 3 mM $MgCl_2$, 20 mM Taurine, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 110 mM Sucrose, 60 mM Potassium lactobionate, 1 g/L BSA

4.10 ミトコンドリア活性酸素測定

4.10.1 ミトコンドリア単離

4.4.1 の方法と同様に行った。

4.10.2 ミトコンドリアタンパク質濃度測定

4.4.2 の方法と同様に行った。

4.10.3 活性酸素種測定

O2k に、チャンバー内の蛍光吸光度を測定する、O2k-Fluorescence LED2-Module をあわせて装着した。単離ミトコンドリアをチャンバー内に滴下する直前に、25 μ mol/l Amplex ultrared (Thermo Scientific, Meridian Rd, Rockford, USA)、1 U/ml horseradish peroxidase、5 U/ml Superoxide dismutase を加えた。ミトコンドリアの超酸化物は、Superoxide dismutase により H_2O_2 に変換される。 H_2O_2 は、horseradish peroxidase 存在下で、Amplex ultrared と反応し蛍光化合物であるレゾルフィンに変化する。560 nm の励起光により 590 nm の蛍光強度の測定を行った。チャンバー内に 50~100 μ g の単離ミトコンドリアを加えたのち、10 mM glutamate と 2 mM malate、5 mM pyruvate、10 mM succinate、3 mM $MgCl_2$ と 1 mM Adenosine diphosphate をくわえ、蛍光強度を測定したのち、ケンペロールを投与し蛍光強度を測定した。なお、あらかじめ 2 つの異なる既知の H_2O_2 を用いて標準曲線を作成し、放出される H_2O_2 値を算出し、またこれらはミトコンドリアタンパク質濃度で補正した。

4.11 統計学的検討

得られた数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。2 群間の平均値の差の検定は、Student's *t*-test を用いて行い、対応のある 2 群間の平均値の差の検定は Paired *t*-test を用いた。3 群間以上の平均値の差の検定に関しては、必要に応じて one-way analysis of variance (ANOVA) を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法を用いた。対応のない要因を 2 つ含む検定に関しては、必要に応じて two-way ANOVA を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Sidak 法を用いた。

2 群間の頻度検定に関しては Fisher の正確検定を用いて行った。解析ソフトは Prism 8 (GraphPad Software, CA, USA) を使用した。 $p < 0.05$ を有意と定義した。

5. 実験結果

5.1 動物特性、心エコーデータ

表 5-1 に術後 28 日の体重、臓器重量の結果を示す。体重は各群で差はなかった。体重で標準化した左室重量や肺重量は HF 群で sham 群と比較し、有意に増加した。図 5-1 に心エコーで評価した左室拡張末期径と左室内径短縮率の経時的な変化を、図 5-2 に HF 群の代表的な心エコー画像を示す。術後 1 日より左室内径は HF 群で sham 群と比較し、有意に増加し、左室短縮率は有意に低下した。表 5-2 に術後 28 日の心エコー指標の結果を示す。心エコーで評価した左室内径や左室後壁厚は HF 群で sham 群と比較し、有意に増加し、左室短縮率は有意に低下した。心拍数は各群に差はなかった。以上から、術後 28 日で HF 群は左室リモデリング及び心不全を呈するモデルであることが確認された。

表 5-1 術後28日の体重および臓器重量評価

	sham群 n = 6	HF群 n = 6
体重及び臓器重量		
体重、 g	25.8 ± 0.6	25.3 ± 0.6
左室重量/体重、 mg/g	3.01 ± 0.06	4.74 ± 0.26*
肺重量/体重、 mg/g	5.21 ± 0.08	6.59 ± 0.27*
データは平均値 ± 標準誤差。* $p < 0.05$ vs. sham群		

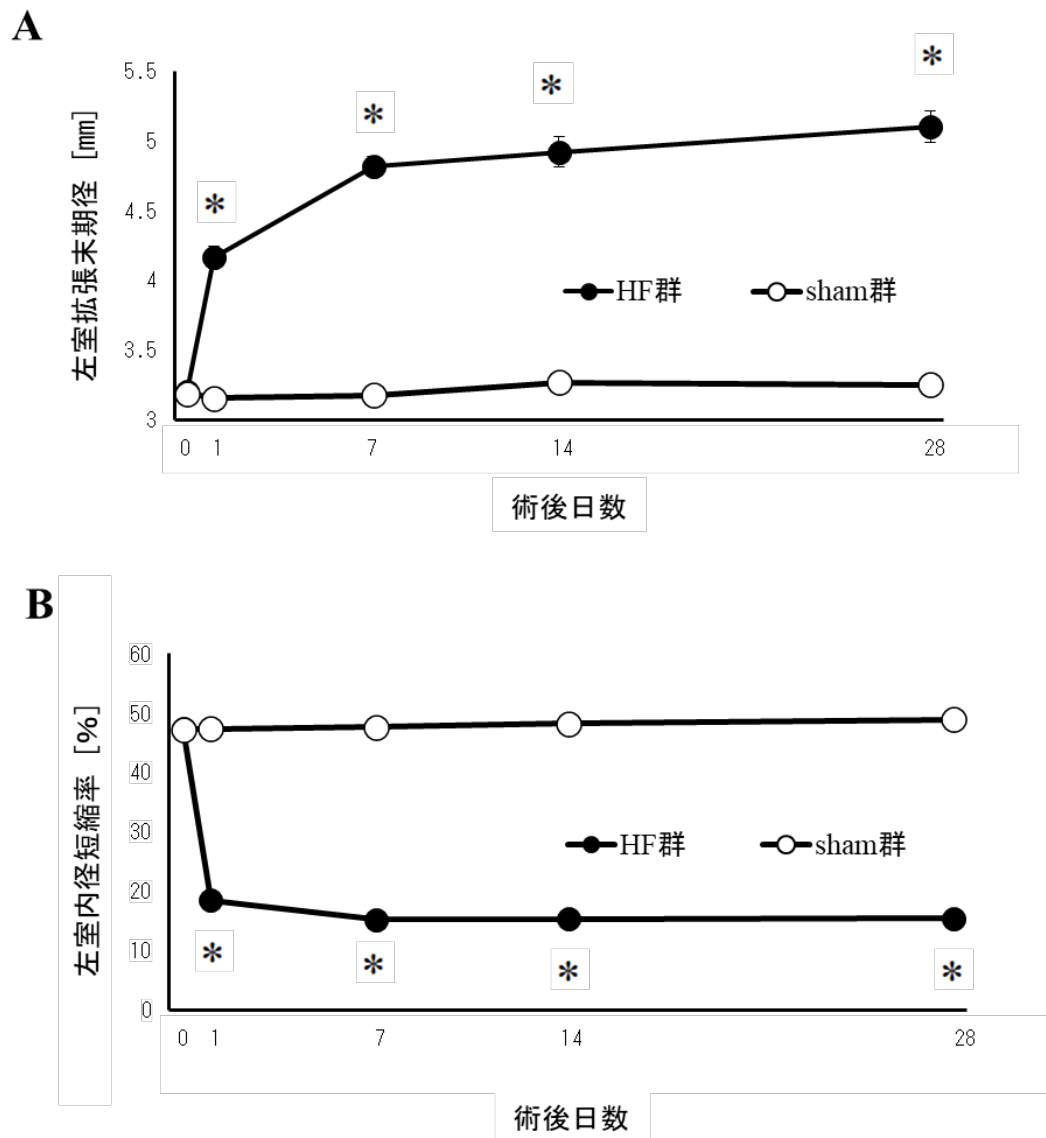


図 5-1 左室拡張末期径と左室内径短縮率の経時的な変化

マウスを臥位で固定した後、胸骨傍短軸像乳頭筋レベルで最適な像を抽出し、Mモード方で記録した。測定した左室拡張末期径（A）と、左室内径短縮率（B）の変化を示す。横軸が術後日数、縦軸は径（A）、短縮率（B）を表す。術翌日より、左室内径の拡大、左室内径短縮率の低下を認めた。データは平均値 ± 標準誤差。* $p < 0.05$ vs. 術後日数が一致した sham 群

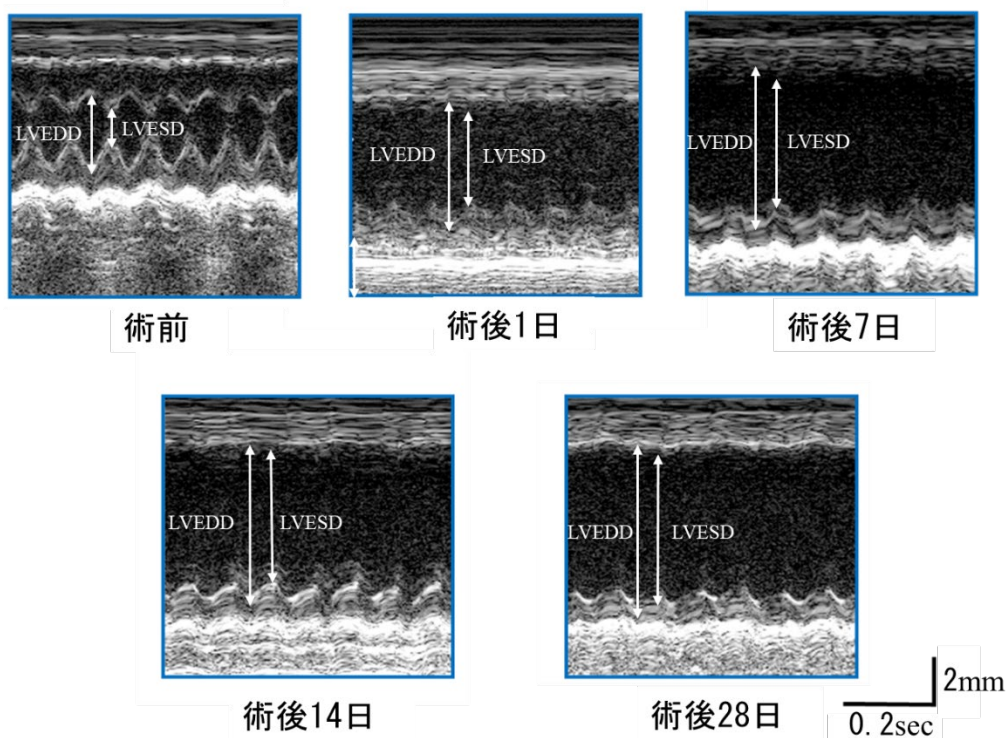


図 5-2 HF 群の代表的な心エコー画像

胸骨傍短軸像乳頭筋レベル、M モード方で記録した。横軸が時間、縦軸は長さを表す。術後 1 日目より左室内径の拡大、左室内径短縮率の低下を認めている。

LVESD : left ventricular end-diastolic diameter (左室拡張末期径)、LVEDD : left ventricular end-systolic diameter (左室収縮末期径)

表 5-2 術後28日の心エコー指標

	sham群 n = 58	HF群 n = 117
心拍数、回/分	722 ± 4	715 ± 3
左室拡張末期径、mm	3.2 ± 0.02	5.0 ± 0.03*
左室収縮末期径、mm	1.7 ± 0.01	4.3 ± 0.03*
左室内径短縮率、%	48.0 ± 0.8	15.1 ± 0.2*
左室前壁厚、mm	0.8 ± 0.01	0.4 ± 0.01*
左室後壁厚、mm	0.9 ± 0.02	0.6 ± 0.03*

データは平均値 ± 標準誤差。* $p < 0.05$ vs. sham群

5.2 Mitochondrial Calcium Uniporter のタンパク質発現

まず、本研究で標的としている MCU の発現について評価するために、術後 28 日の心筋における MCU タンパク質発現量についてウエスタンブロッティング法で評価した。術後 28 日目の心筋において、MCU タンパク質発現量は、HF 群と sham 群で有意差はなかった (図 5-2)。HF 群でも MCU を介するミトコンドリアへのカルシウム取り込みは可能と考えられる。

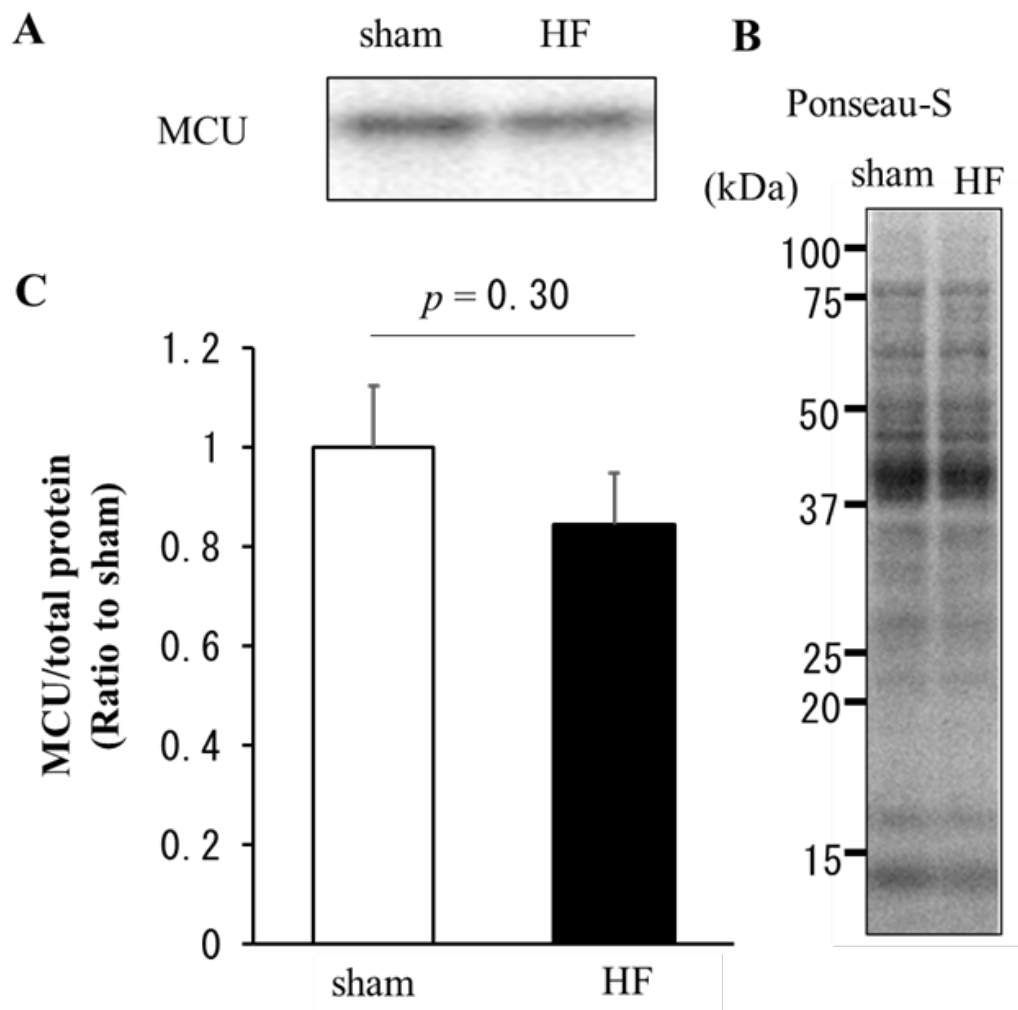


図 5-2 MCU タンパク質発現の評価

ウエスタンブロット解析で術後 28 日目の心筋組織ライセートの MCU タンパク質発現を定量評価した。代表的なブロットを示す (A)。Ponceau 染色で評価した総タンパク質量 (B) に対する MCU 発現量の比を計算した。sham 群の MCU タンパク質発現量を 1 として規格化したときのデータを示している (C)。各群 $n = 6$ 。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。

5.3 Mitochondrial Calcium Uniporter の活性化によるミトコンドリアへのカルシウム取り込みの比較

MCU タンパク質発現が sham 群と HF 群で差はなかったが、取り込み能については評価できていないため、蛋白発現量の評価だけでは、評価不十分と考えた。そこで、MCU の活性化によるミトコンドリアへのカルシウム取り込みの変化について蛍光吸光度計で検討した。MCU の活性化は MCU 作動薬であるケンペロールを用い (Han and Li, 2018; Sancak et al., 2013)、蛍光色素はミトコンドリアに取り込まれない Fluo-5N を用いた。単離ミトコンドリア外のカルシウムに Fluo-5N が結合することによる蛍光強度を測定する方法で評価した。つまり、ミトコンドリアへの取り込みが亢進していれば、ミトコンドリア外のカルシウムがより減少するため、蛍光強度低下の傾きの絶対値が増大する。図 5-3A に sham 群の、図 5-3C に HF 群の蛍光強度の変化の代表例を示す。Sham 群では、ケンペロールにより蛍光強度の傾きの絶対値が増加した [0.159 ± 0.027 /秒 (対照) vs. 0.212 ± 0.060 /秒 (ケンペロール)、 $n = 6$, $p = 0.029$] (図 5B)。HF 群でも同様に、ケンペロールにより蛍光強度の傾きの絶対値が増加した [0.181 ± 0.011 /秒 (対照) vs. 0.218 ± 0.017 /秒 (ケンペロール)、 $n = 7$, $p = 0.046$] (図 5D)。以上から、MCU 活性化によりミトコンドリアへのカルシウム取り込みが亢進することが示唆された。

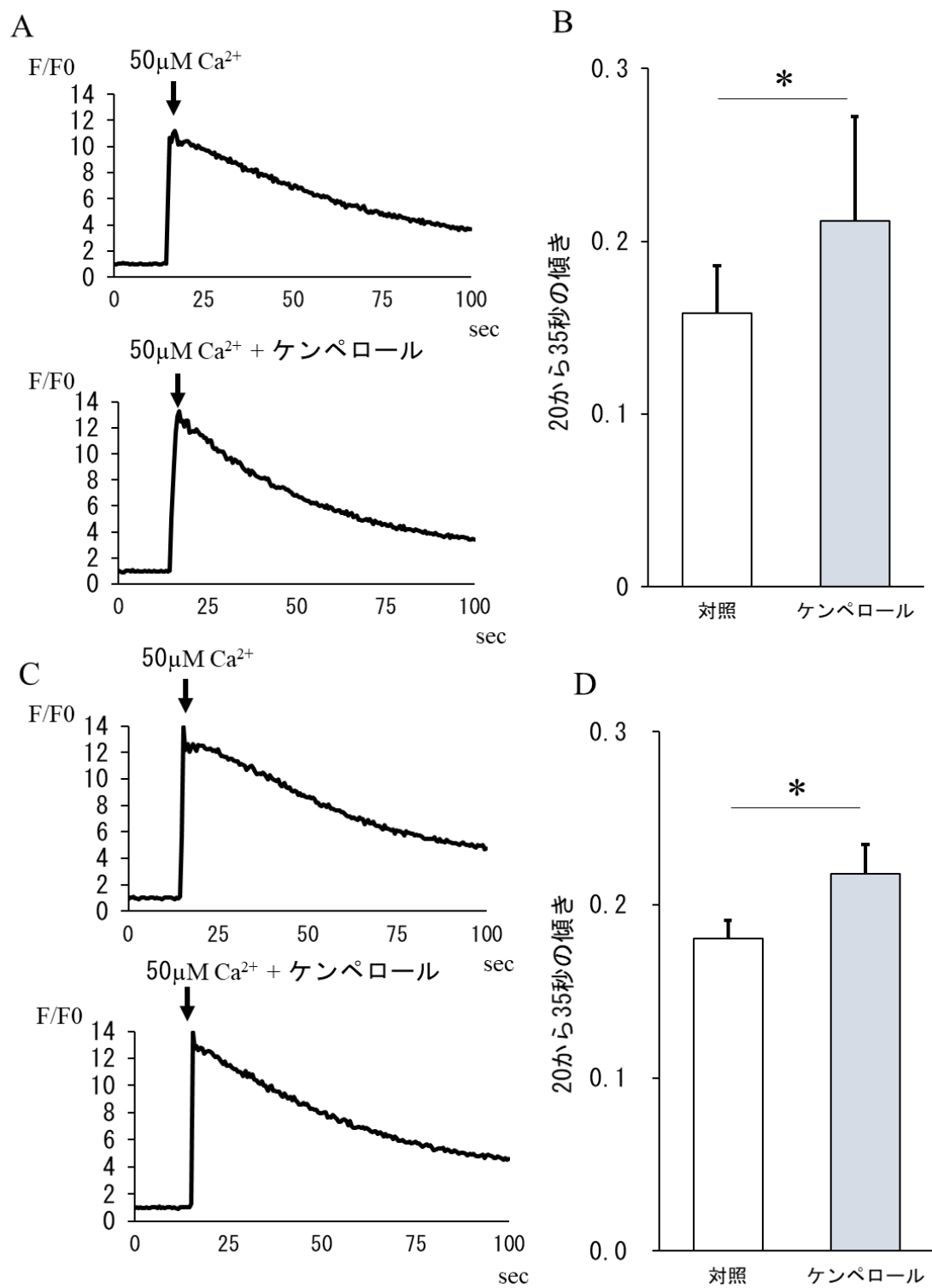


図 5-3 カルシウム蛍光色素を用いた単離ミトコンドリア外の蛍光強度

ミトコンドリアに取り込まれないカルシウム蛍光色素である Fluo-5N を用いて、蛍光吸光度計で単離ミトコンドリア外のカルシウム濃度の変化を評価した。498 nm の励起波長による蛍光波長 520 nm の蛍光強度を測定した。測定開始 20 秒後に、50 μM Ca^{2+} を滴下した。測定開始 20 秒までの蛍光強度の平均値を F0 とし、F0 との比 (F_x/F_0) を求めた。sham 群における 50 μM Ca^{2+} の添加による代表的な蛍光強度比の変化 (A)。sham 群の測定開始 20 から 35 秒の間の傾きの絶対値のグラフ (B)。HF 群における 50 μM Ca^{2+} の追加による代表的な蛍光強度比の変化 (C)。HF 群の測定開始 20 から 35 秒の間の傾きの絶対値のグラフ (D)。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。* $p < 0.05$ vs. 対照

5.4 カルシウムウェーブの比較

遅延後脱分極の原因となる拡張期の細胞内カルシウムウェーブについて評価するために、単離心筋細胞を Fluo-4AM で染色し、落射蛍光顕微鏡を用いて観察した。1.2mM カルシウム Tyrode 内の HF 群の心筋細胞に 0.5 Hz で電気刺激をしたが、カルシウムウェーブは観察されなかった。一方で、イソプロテレノール (0.5 μM) の添加により、カルシウムウェーブを認めた (図 5-4)。すなわち、イソプロテレノールによる β -アドレナリン受容体刺激を介して自発的な拡張期カルシウムウェーブが誘発された。

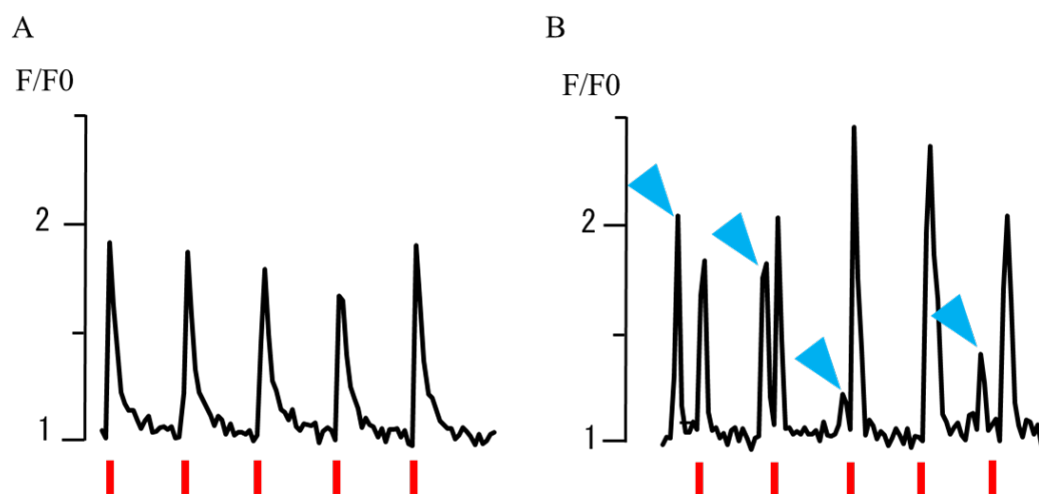


図 5-4 HF 群心筋細胞におけるカルシウム蛍光色素を用いた蛍光強度比

縦軸は、拡張期の基線となる蛍光強度 (F_0) に対する蛍光強度 (F) の比を、横軸は時間を表す。対照 (A) と、イソプロテレノール添加 (B) の蛍光強度比のグラフ。赤いバーは、field stimulation によるカルシウムトランジェントを、青矢印は、field stimulation に依存しないカルシウム強度の上昇で、カルシウムウェーブを表す。対照ではカルシウムウェーブを認めなかったが、イソプロテレノールの添加により、カルシウムウェーブを認めた。

このカルシウムウェーブに対する、ケンペロールの効果を検討しようとしたが、ペーシングの継続での細胞死が多く、困難であった。そこで、撮像開始後にペーシングを停止し、ペーシングをしていない間を拡張期と考え、その間の自発的なカルシウムウェーブを認める細胞数と平均カルシウムウェーブ数を調べることにした。

sham 群と HF 群の両方の群で、1.2 mM カルシウムタイロード (対照)、1.2 mM カルシウムタイロードに 0.5 μ M イソプロテールを添加、さらに 10 μ M ケンペロールを添加の 3 つの条件での、電気刺激後 30 秒間の自発的なカルシウムウェーブを評価した。蛍光顕微鏡による単離心筋細胞のカルシウムイメージングを図 5-5 に示す。細胞全体で同時に蛍光強度が上昇するカルシウムトランジェントと、細胞質内で蛍光強度上昇部位が伝搬するカルシウムウェーブを観察できる。

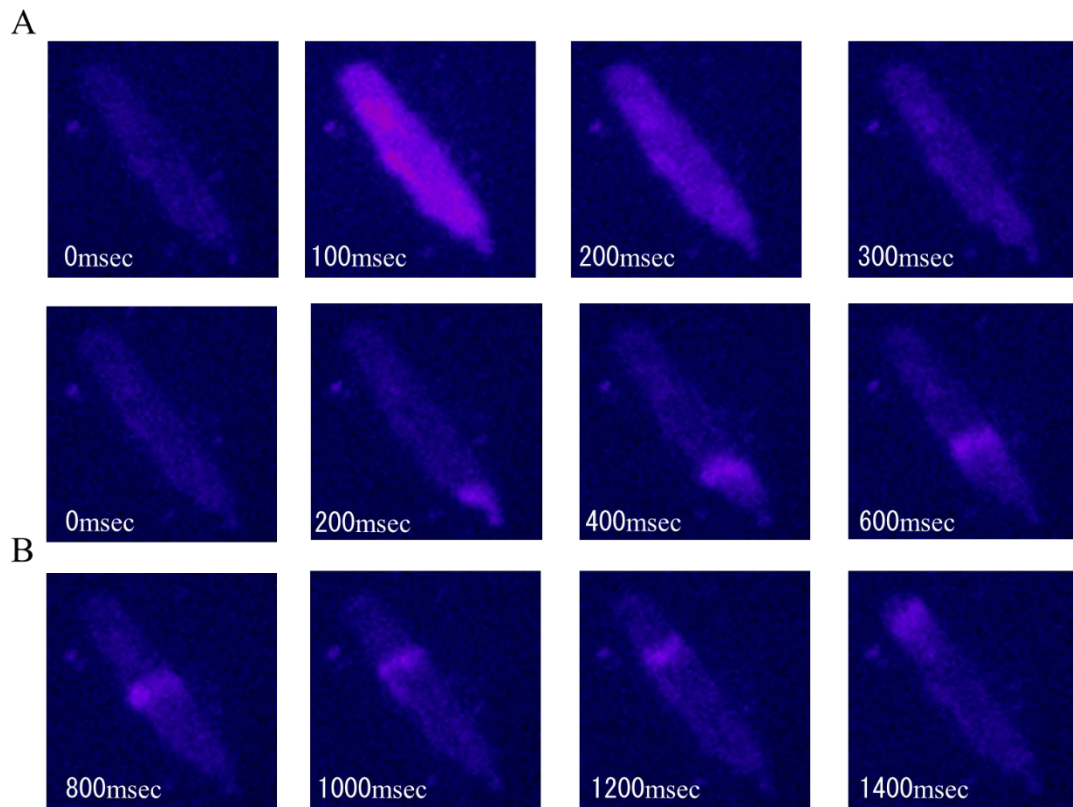


図 5-5 蛍光顕微鏡を用いた単離心筋細胞のカルシウムイメージング

Fluo-4 AM でカルシウム色素染色を行った単離心筋細胞のカルシウムイメージング。全ての画像は擬似カラー表示しており、青から赤くなるにつれて、蛍光強度の上昇、つまりカルシウム濃度の上昇をあらわす。電気刺激によって細胞質全体のカルシウム濃度が上昇するカルシウムトランジェント (A) と、右下から左上にむかってカルシウム濃度上昇部位が伝搬しているカルシウムウェーブ (B) を示す。

図 5-6A に sham 群心筋細胞におけるカルシウムウェーブの代表例を示す。カルシウムウェーブを認める細胞の割合は、対照に比べ、 $0.5 \mu\text{M}$ イソプロテレノールによる増加を認めず、 $0.5 \mu\text{M}$ イソプロテレノール存在下にケンペロールを加えても変化を認めなかった (図 5-6 B, C) [7.1% (対照、 $n=42$) vs. 10.8% (イソプロテレノール、 $n=37$)、 $p=0.70$; 8.3% (イソプロテレノール+ケンペロール、 $n=36$) vs. イソプロテレノール、 $p>0.99$ 、フィッシャーの正確検定]。また、30 秒間の平均カルシウムウェーブ数は、対照に比べ、イソプロテレノールによる増加を認めず、イソプロテレノール存在下にケンペロールを加えても増加しなかった [0.12 ± 0.08 (対照、 $n=42$)、 0.22 ± 0.10 (イソプロテレノール、 $n=36$)、 0.11 ± 0.07 (イソプロテレノール+ケンペロール、 $n=36$)、 $p=0.62$ 、one-way ANOVA]。

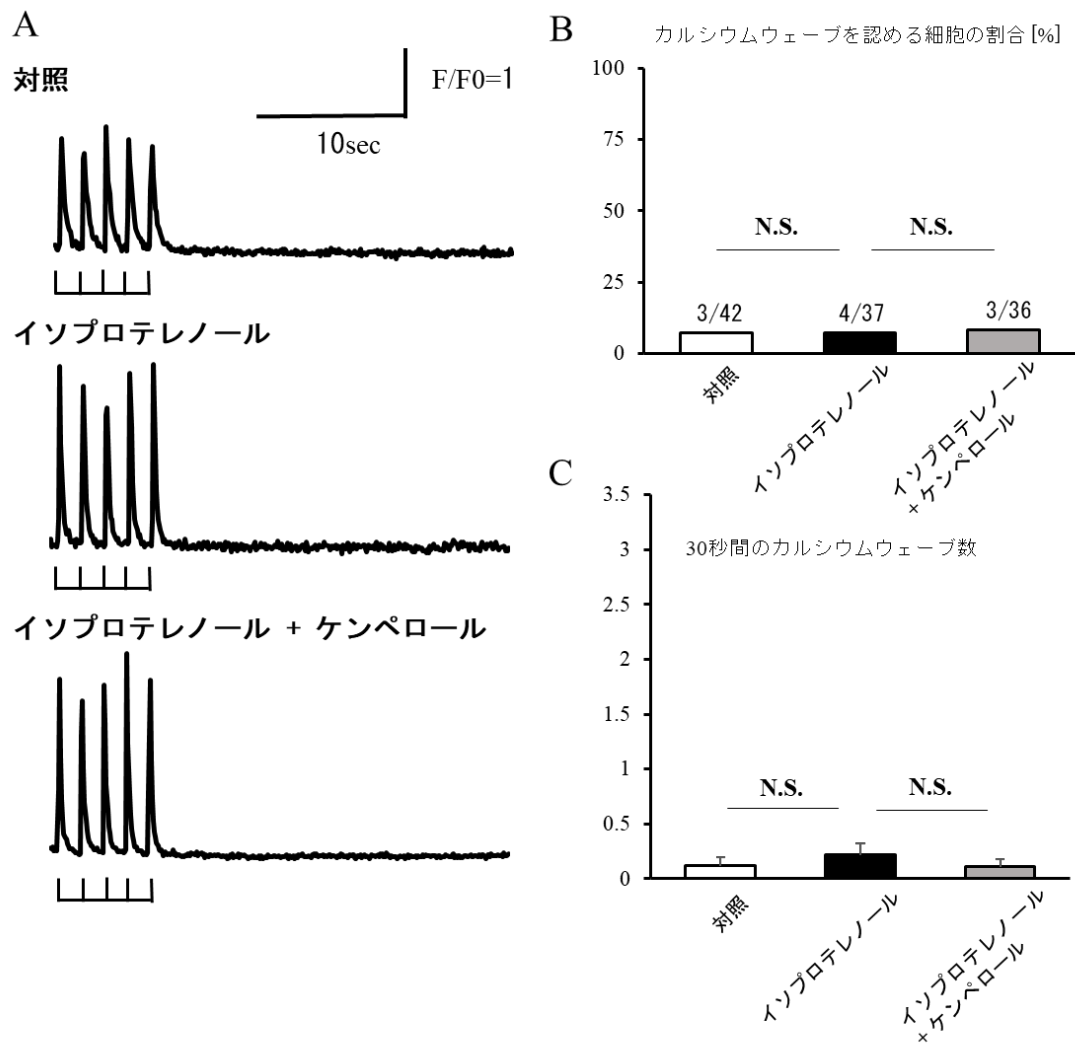


図 5-6 sham 群の心筋細胞におけるカルシウムウェーブ

安定してカルシウムトランジェントを認める細胞を解析対象とし、撮像開始後、5回の field stimulation を行い、ペーシングを停止し、30 秒間観察した。Fluo-4AM でカルシウム色素染色を行った sham 群の単離心筋細胞における蛍光強度比の変化 (A)。縦軸が蛍光強度比 (F/F_0)、 F/F_0 の上昇はカルシウム濃度の上昇を意味する。上から、対照、イソプロテレノール、イソプロテレノールとケンペロール処理後の代表的なプロットである。黒いバーはペーシングをあらわす (A)。カルシウムウェーブを認める細胞の割合 (B)、30 秒間に 1 細胞あたりで認められるカルシウムウェーブの回数 (C) のグラフ。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。N.S. : not significant。

一方、図 5-7A に HF 群心筋細胞におけるカルシウムウェーブの代表例を示す。カルシウムウェーブを認める細胞の割合は、対照に比べてイソプロテレノール処理で増加を認めたが、ケンペロールの追加で、有意な減少を認めなかった。しかし、イソプロテレノールにより増加した 30 秒間の平均カルシウムウェーブ数は、ケンペロールの追加により有意な減少を認めた。さらにイソプロテレノール、ケンペロール存在下に、MCU 阻害薬である Ruthenium Red を加えたところ、カルシウムウェーブを認める細胞の割合は軽度増加し、平均カルシウムウェーブ数は有意差をもって増加した (図 5-7 B, C)。[カルシウムウェーブを認める細胞の割合 : 28.1% (対照, n=32) vs. 66.0% (イソプロテレノール, n=50)、 $p < 0.001$; 56.0% (イソプロテレノール+ケンペロール, n=50) vs. イソプロテレノール、 $p = 0.31$; 70.0% (イソプロテレノール+ケンペロール+Ruthenium Red, n=50) vs. イソプロテレノール+ケンペロール、 $p = 0.21$ 、フィッシャーの正確検定]。[30 秒間の平均カルシウムウェーブ数 : 0.94 ± 0.36 (対照, n=32) vs. 2.74 ± 0.42 (イソプロテレノール, n=50)、 $p = 0.009$; 1.44 ± 0.27 (イソプロテレノール+ケンペロール, n=50) vs. イソプロテレノール、 $p = 0.049$; 2.94 ± 0.38 (イソプロテレノール+ケンペロール+Ruthenium Red, n=50) vs. イソプロテレノール+ケンペロール、 $p = 0.018$ 、one-way ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた]。HF 群では、遅延後脱分極の原因となりうるカルシウムウェーブがケンペロールによって抑制された。また、MCU 阻害薬の追加により増加していることから、ケンペロールの MCU を活性化する作用が主に起因すると示唆された。

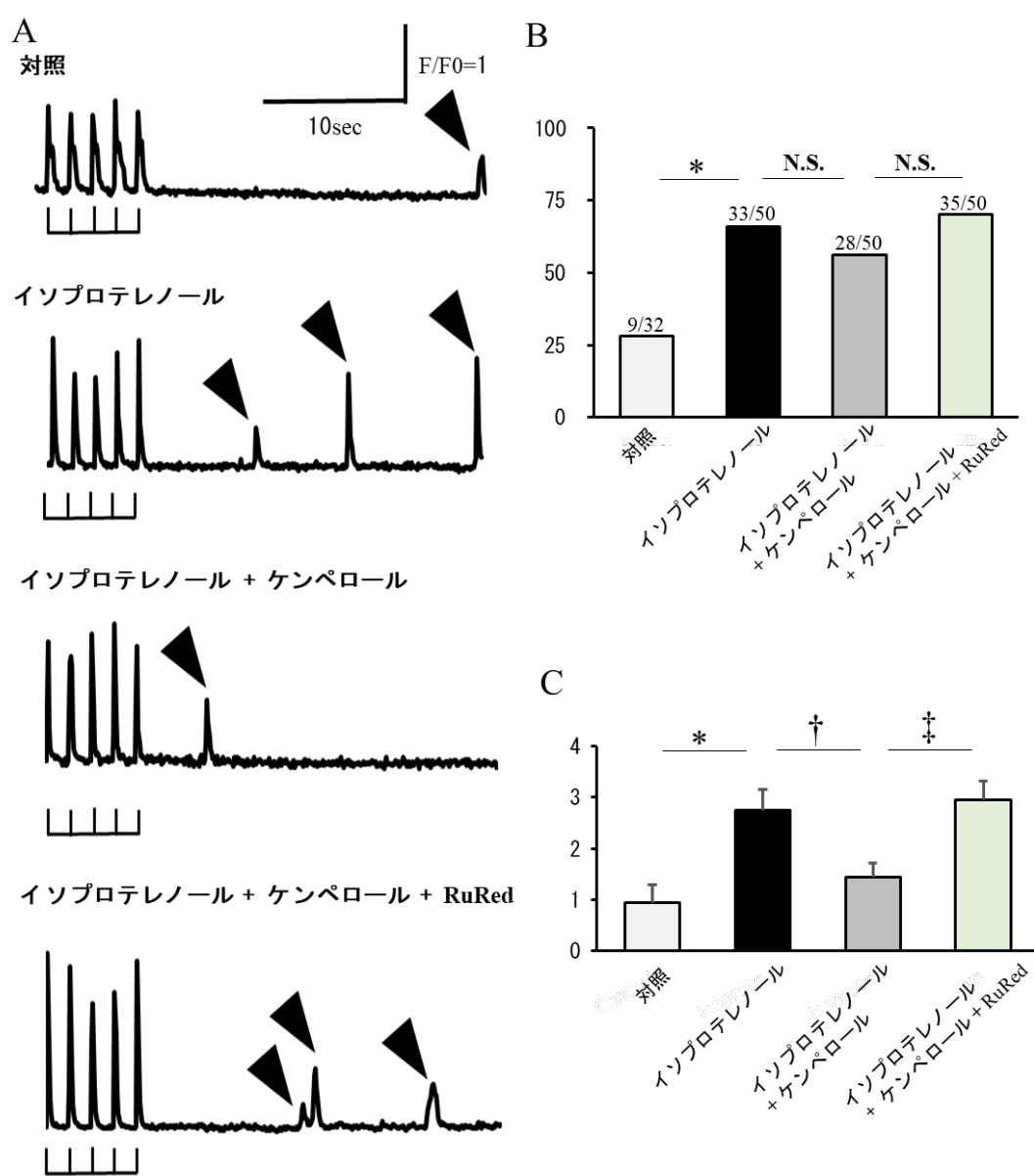


図 5-7 HF 群心筋細胞におけるカルシウムウェーブ

HF 群の単離心筋細胞における蛍光強度比のプロットを示す (A)。対照、イソプロテレノール、イソプロテレノールとケンペロール、イソプロテレノールとケンペロールと Ruthenium Red 処理後の代表的な蛍光強度比のプロットを示す。黒いバーはペーシングをあらわす。カルシウムウェーブを認める細胞の割合 (B)、30 秒間に 1 細胞あたりで認められるカルシウムウェーブの回数 (C) のグラフ。* $p < 0.05$ vs. 対照、† $p < 0.05$ vs. イソプロテレノール、‡ $p < 0.05$ vs. イソプロテレノール+ケンペロール。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。N.S. : not significant.

5.5 カルシウムスパークの比較

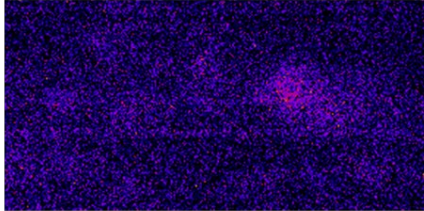
細胞質のカルシウム濃度が上昇は、拡張期の小胞体からの局所的なカルシウム放出であるカルシウムスパークをおこし、他のカルシウム放出ユニットを開きカルシウムウェーブを形成する(Zhao et al., 2013)。ミトコンドリアへのカルシウム取り込み亢進が細胞質カルシウムの拡散を防ぐとの報告があり(Subedi et al., 2011)、ケンペロールによるカルシウムウェーブの抑制の原因が、細胞質カルシウム濃度の低下と考えた。単離心筋細胞において、細胞質カルシウム濃度を直接測定することが難しかったため、細胞質カルシウム濃度に依存する、局所的な反応であるカルシウムスパークを共焦点レーザー顕微鏡で評価した。

図 5-8A に HF 群単離心筋細胞におけるカルシウムウェーブの代表例を示す。カルシウムスパーク頻度は、対照に比べ、イソプロテレノールにより増加し、イソプロテレノール存在下にケンペロールを加えることで減少した。[1.64 ± 0.18 (対照, $n=10$) vs. 8.58 ± 0.55 (イソプロテレノール, $n=11$)、 $p=0.006$; 5.97 ± 0.74 (イソプロテレノール+ケンペロール, $n=9$) vs. イソプロテレノール、 $p=0.047$ 、one-way ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた] (図 5-8B)。同時に算出される最大振幅、最大振幅の半分となる幅、最大振幅の半分となるまでの時間、カルシウムリーク^{*1}を図 5-7 に示す。最大振幅の半分となる幅、カルシウムリークは、イソプロテレノール存在下と比べて、イソプロテレノール存在下にケンペロールを加えることで減少した。[振幅 : 1.64 ± 0.18 (対照)、 1.47 ± 0.16 (イソプロテレノール)、 1.30 ± 0.09 (イソプロテレノール+ケンペロール)、 $p=0.24$ 、one-way ANOVA]。[最大振幅の半分の際の幅 : 2.78 ± 0.17 (対照, $n=67$) vs. 3.04 ± 0.16 (イソプロテレノール, $n=123$)、 $p=0.43$; vs. 2.12 ± 0.13 (イソプロテレノール+ケンペロール, $n=70$) vs. イソプロテレノール、 $p<0.0001$ 、one-way ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた]。[最大振幅の半分の際の時間 : 94.77 ± 7.90 (対照) vs. 76.52 ± 5.42 (イソプロテレノール)、 $p=0.07$; 60.82 ± 6.76 (イソプロテレノール+ケンペロール) vs. 対照、 $p=0.001$ 、one-way ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた]。[カルシウムリーク^{*1} : 624.13 ± 114.34 (対照) vs. 524.49 ± 79.74 (イソプロテレノール)、 $p=0.69$; 219.19 ± 48.16 (イソプロテレノール+ケンペロール) vs. 対照、 $p=0.0305$ 、one-way ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた] (図 5-8C)。

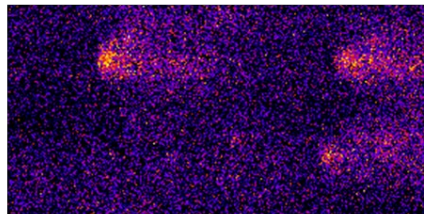
細胞質カルシウム濃度に依存するカルシウムスパークの頻度は、ケンペロールにより抑制されており、ケンペロールによる細胞質カルシウム濃度の低下が示唆された。

*1: カルシウムリーク = 頻度 × 振幅 × 最大振幅の半分の際の幅 × 最大振幅の半分の際の時間

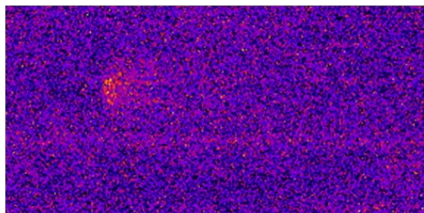
A
対照



イソプロテレノール



イソプロテレノール + ケンペロール

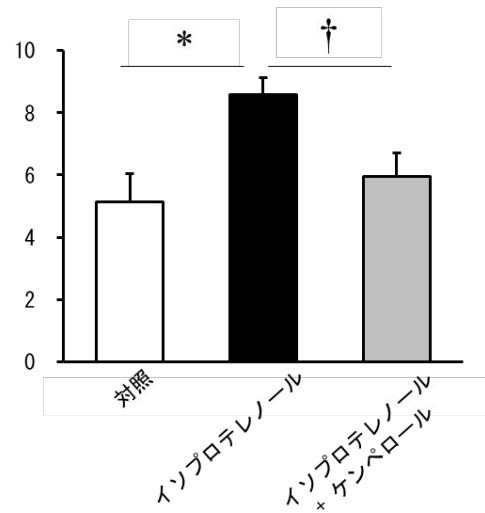


400msec

10μm

B

頻度 [sp./100 μm/sec]



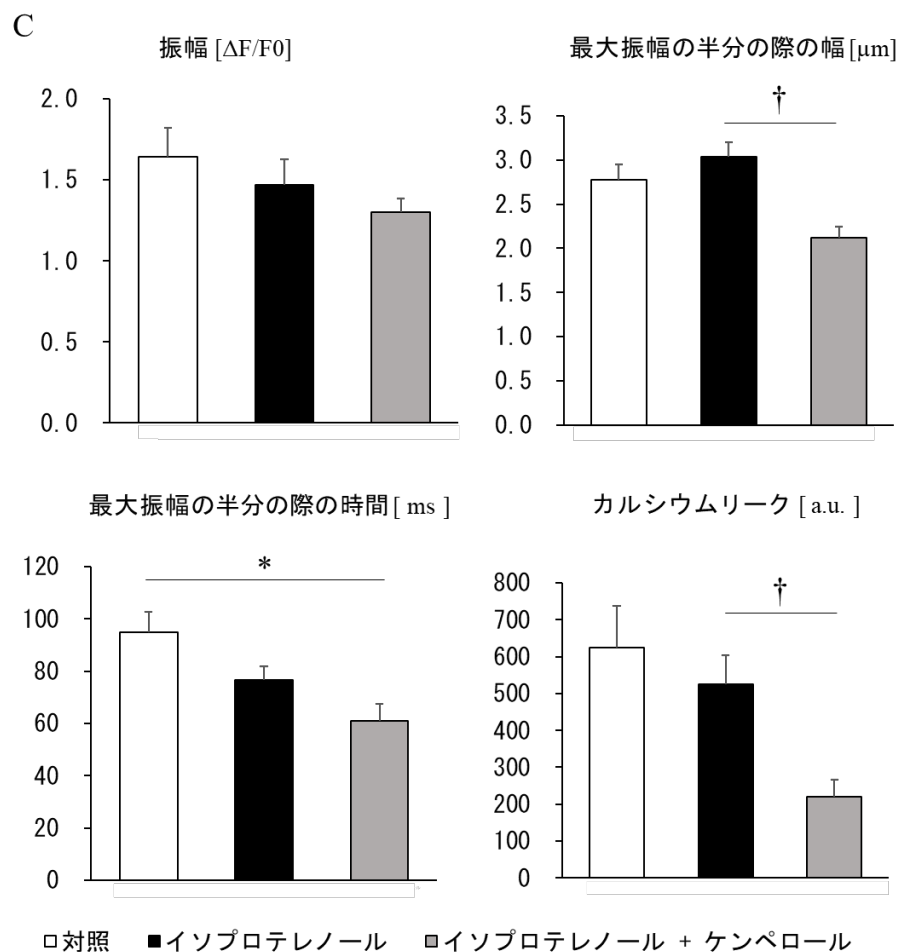


図 5-8 カルシウムスパークの評価を目的とした共焦点レーザー顕微鏡のラインスキャンモードによる HF 群心筋細胞のカルシウムイメージングと SparkMaster による自動解析結果

カルシウム蛍光色素染色をおこなった HF 群の心筋細胞を共焦点レーザー顕微鏡のラインスキャンモードで撮像した。細胞の長軸方向に設定した線上の蛍光強度を 327.9 Hz の頻度で記録することで、横軸に時間、縦軸に長さを表す画像を作成する。対照、イソプロテレノール、イソプロテレノールとケンペロール処理後の代表的なカルシウムイメージングを示す (A)。カルシウムウェーブと比して、より局所の蛍光強度の上昇を観察可能である。赤い部位が蛍光強度の上昇、つまりカルシウム濃度の上昇した部位をあらわす。自動分析プログラムである SparkMaster を使用して計算した、カルシウムスパークの頻度 (B)、カルシウムスパークの最大振幅、最大振幅の半分となる幅、カルシウムリーク (C) のグラフ。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。* $p < 0.05$ vs. 対照、† $p < 0.05$ vs. イソプロテレノール

5.6 小胞体内のカルシウム量の比較

ケンペロールの投与によるミトコンドリアへのカルシウム取り込みの促進が、上昇した細胞質カルシウム濃度を低下させたと考えたが、小胞体内のカルシウム貯蔵量の増加による細胞質カルシウム濃度の低下を否定できない。そのため、ケンペロールによる小胞体内のカルシウム貯蔵量の変化を評価するため、カフェインによるカルシウムカルシウムトランジェントを評価した。カフェインは、**RyRII** を介し、小胞体からのカルシウム放出を誘導する。放出されたカルシウムにより上昇する蛍光強度の最大値で小胞体内のカルシウム貯蔵量を評価した (Liu et al., 2015)。図 5-9A に sham 群心筋細胞における、C に HF 群心筋細胞における、カフェインによるカルシウムカルシウムトランジェントの代表例を示す。sham 群では、ケンペロールにより、最大蛍光強度が低下した [5.40 ± 0.21 (対照, $n = 17$) vs. 4.67 ± 0.25 (ケンペロール, $n = 16$)、 $p = 0.029$] (図 5-9 C)。HF 群でも同様に、ケンペロールにより蛍光強度の低下が増加した [4.70 ± 0.23 (対照, $n = 12$) vs. 3.38 ± 0.24 (ケンペロール, $n = 12$)、 $p = 0.0006$] (図 5-9 D)。

以上から、ケンペロールによる小胞体内カルシウム貯蔵量の低下が示唆された。しかし、ケンペロール有無でミトコンドリアへのカルシウム取り込み能が変化しているため、カフェイン投与により細胞質に放出されたカルシウムが、ミトコンドリアに取り込まれる量が多く、結果的に蛍光強度が低下していた可能性がある。現時点で小胞体カルシウムを直接計測する方法はなく、小胞体のカルシウム貯蔵量を正確に測定するのは不可能であった。

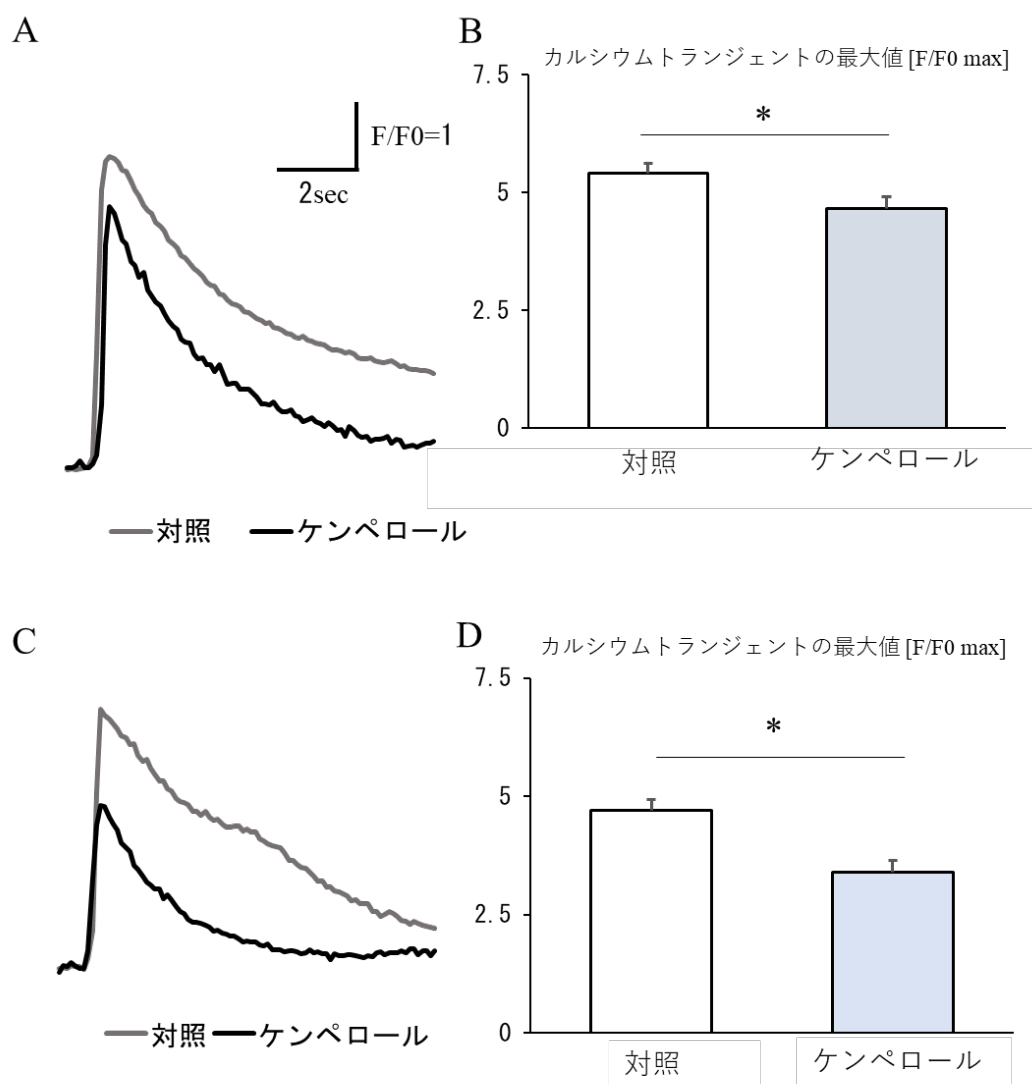


図 5-9 蛍光顕微鏡で測定した単離心筋細胞のカフェインによる蛍光強度比の変化
 カルシウム蛍光色素染色をおこなった HF 群の心筋細胞を蛍光顕微鏡で撮像した。撮像開始からカフェイン滴下までの蛍光強度の平均値を F_0 とし、 F_0 との比 (F_x/F_0) を求めた。sham 群における対照、ケンペロール処理後の代表的な蛍光強度比のプロット (A)。sham 群のカフェインによるカルシウムトランジェントの最大値のグラフ (B)。HF 群における対照、ケンペロール処理後の代表的な蛍光強度のプロット (C)。HF 群のカフェインによるカルシウムトランジェントの最大値のグラフ (D)。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。* $p < 0.05$ vs. 対照

5.7 電気刺激によるカルシウムトランジェント

次に、カルシウムハンドリングを変化させることによる副作用を調べることにした。まず、心筋細胞の収縮と関係のあるカルシウムトランジェントの振幅を測定することとした。心筋収縮に必要なカルシウムの多くは小胞体の CICR に依存しているためである (Eisner et al., 2017)。HF 群の心筋細胞において、電気刺激によるカルシウムトランジェントの振幅を測定した。同一細胞、同一出力での field stimulation、同一ラインでの最初のカルシウムトランジェントを解析対象とした。共焦点レーザー顕微鏡のラインスキャンモードでのカルシウムイメージングの代表例を図 5-10 A, B に示し、蛍光強度比のプロットを図 5-10 C, D に示す。ケンペロールによるカルシウムトランジェントの振幅に差はなかった [3.96 ± 0.26 (対照) vs. 3.86 ± 0.25 (ケンペロール)、 $n = 13$ 、 $p = 0.61$] (図 5-10 E)。半減期は延長し (図 5-10 F)、Tau に有意差はなかった (図 5-10 G)。[半減期 : 270.9 ± 17.48 (対照) vs. 292.85 ± 118.97 (ケンペロール)、 $p = 0.037$]、[Tau : 730.2 ± 67.6 (対照) vs. 792.7 ± 67.7 (ケンペロール)、 $p = 0.08$]。心筋細胞の収縮と関係のあるカルシウムトランジェントの振幅は変化しないことから、心筋細胞の収縮はケンペロールによって変化しないことが示唆された。

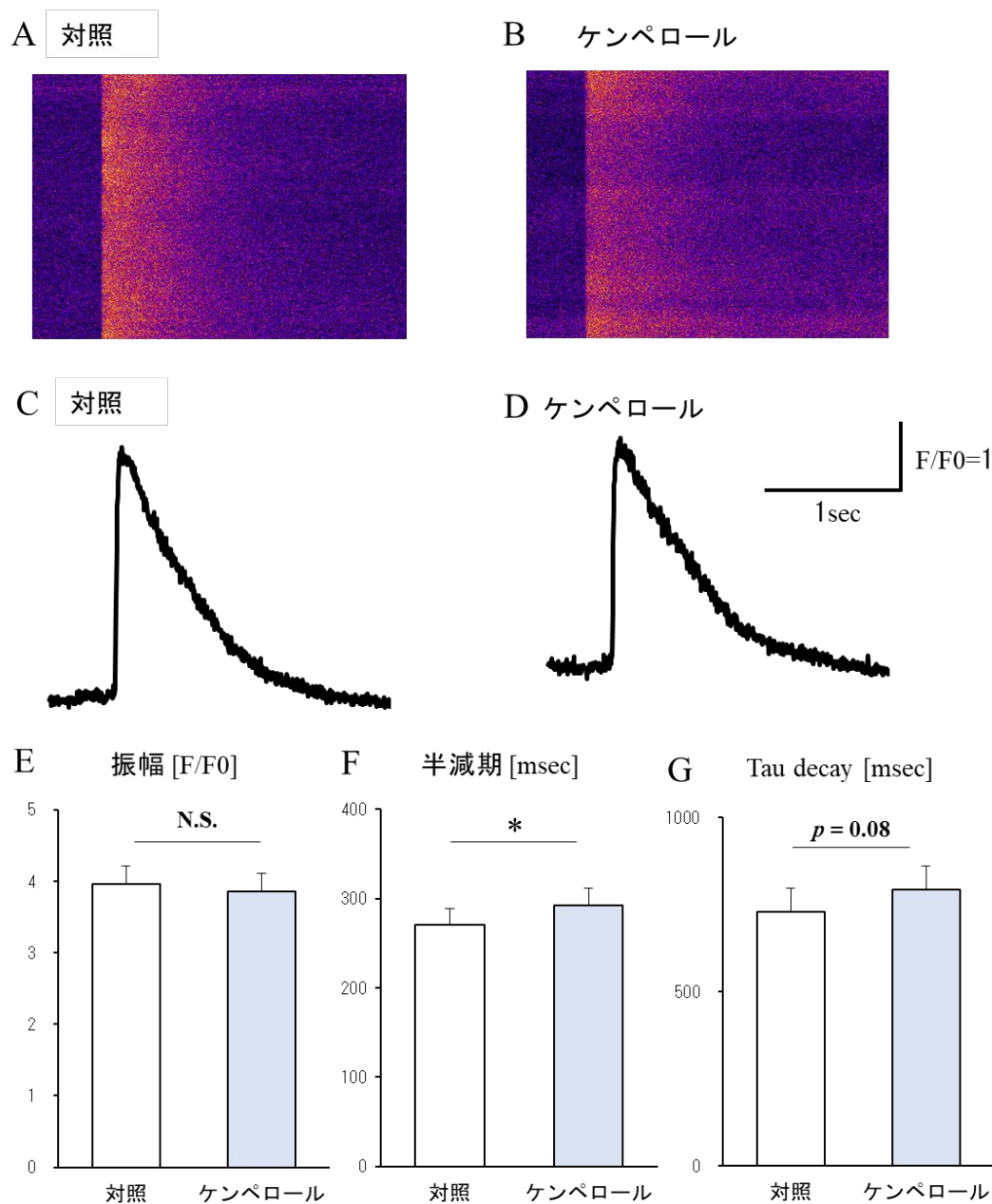


図 5-10 カルシウムトランジェントの評価を目的とした共焦点レーザー顕微鏡のラインスキャンモードでのカルシウムイメージング

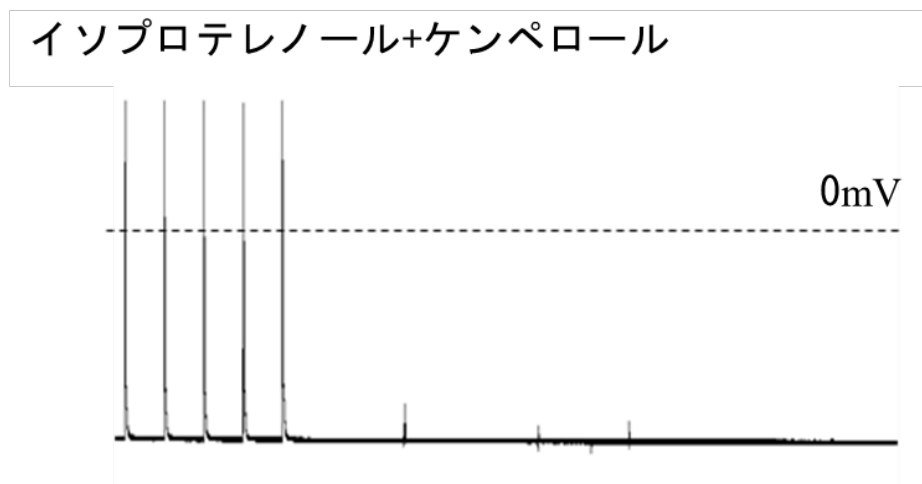
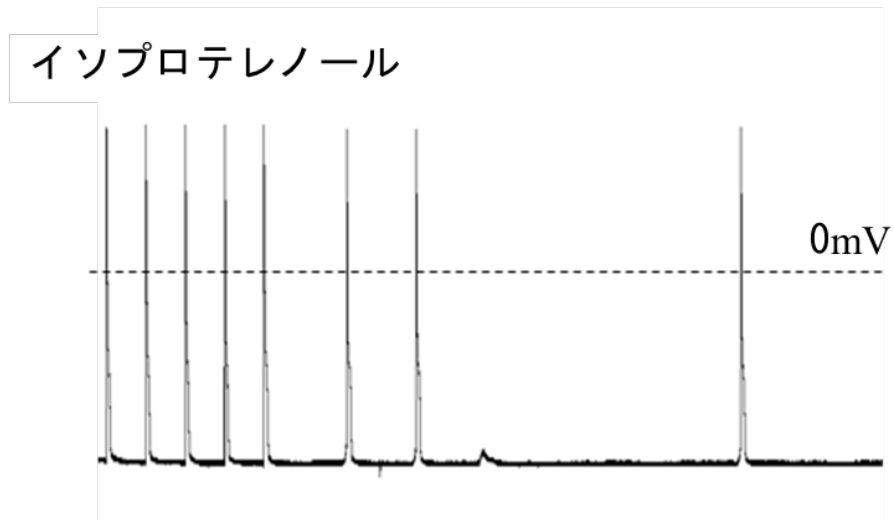
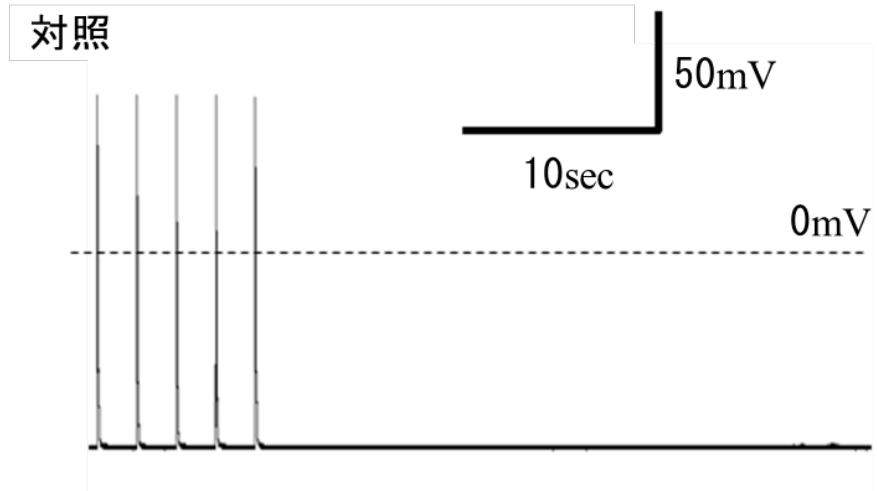
カルシウム蛍光色素染色をおこなった HF 群の心筋細胞を共焦点レーザー顕微鏡で撮像し、撮像開始後に field stimulation を行った。横軸は時間、縦軸は長さを表す。対照 (A)、ケンペロール処理後 (B) の代表的なカルシウムイメージングは、擬似カラー表示しており、青から赤くなるにつれて、蛍光強度の上昇、つまりカルシウム濃度の上昇をあらわす。電気刺激によって細胞質全体のカルシウム濃度が上昇するカルシウムトランジェントカルシウムを、同一細胞、同一出力での field stimulation、同一ラインでの最初のカルシウムトランジェントを対象とした。得ら

れた画像を Image J で解析した。対照 (C)、ケンペロール処理後 (D) の代表的な蛍光強度比の変化。縦軸が蛍光強度比、横軸が時間を表す。撮像開始から field stimulation までの蛍光強度の平均値を F_0 とし、 F_0 との比 (F_x/F_0) を求めた。電気刺激による最大 F_x/F_0 を振幅とした。また、 F_x/F_0 を指数関数に近似し、半減期と Tau decay を求めた。電気刺激によるカルシウムトランジェントの振幅 (E)、半減期 (F)、Tau decay (G) のグラフ。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。
* $p < 0.05$ vs. 対照、N.S. : not significant

5.8 穿孔パッチクランプ法による膜電位記録

カルシウムスパークの頻度、カルシウムウェーブの頻度を抑制し、カルシウムハンドリング異常の改善を認めた。このカルシウムハンドリング異常の改善が、膜電位に与える影響を評価するため、拡張期の自発的な活動電位の頻度を穿孔パッチクランプ法で評価した。図 5-11A に HF 群心筋細胞における穿孔パッチクランプ法による膜電位の代表例を示す。自発的な活動電位の回数は、対照に比べ、イソプロテレノールにより増加し、イソプロテレノール存在下にケンペロールを加えることで減少した。[0.20 ± 0.13 (対照、 $n=10$) vs. 1.63 ± 0.68 (イソプロテレノール、 $n=8$)、 $p=0.033$; 0.13 ± 0.13 (イソプロテレノール+ケンペロール、 $n=8$) vs. イソプロテレノール、 $p=0.033$ 、one-way ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた] (図 5-10B)。静止膜電位は、イソプロテレノールにより変化なかったが、イソプロテレノール存在下にケンペフェロールを加えて低下した。[-74.01 ± 2.57 mV (対照、 $n=10$) vs. -74.54 ± 1.70 mV (イソプロテレノール、 $n=8$)、 $p=0.923$; -83.11 ± 1.49 mV (イソプロテレノール+ケンペロール、 $n=8$) vs. イソプロテレノール、 $p=0.008$; イソプロテレノール+ケンペロール vs. 対照、 $p=0.016$ 、one-way ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた]。電気刺激の活動電位の振幅は差がなかった[121.68 ± 6.71 mV (対照、 $n=10$)、 117.84 ± 8.64 mV (イソプロテレノール)、 132.28 ± 5.36 mV (イソプロテレノール+ケンペロール)、 $p=0.493$ 、one-way ANOVA]。活動電位波形の立ち上がり最大速度時点を局所の脱分極点とし、局所の脱分極点から活動電位の最大振幅における 90%再分極点までの時間 (action potential duration at 90% repolarization ; APD90) は、差がなかった[102.73 ± 9.14 msec (対照) vs. 97.94 ± 17.46 msec (イソプロテレノール)、 101.34 ± 15.39 msec (イソプロテレノール+ケンペロール)、 $p=0.9686$ 、one-way ANOVA] (図 5-10C)。ケンペールによって、活動電位を伴う遅延後脱分極が減少したと考えられた。

A



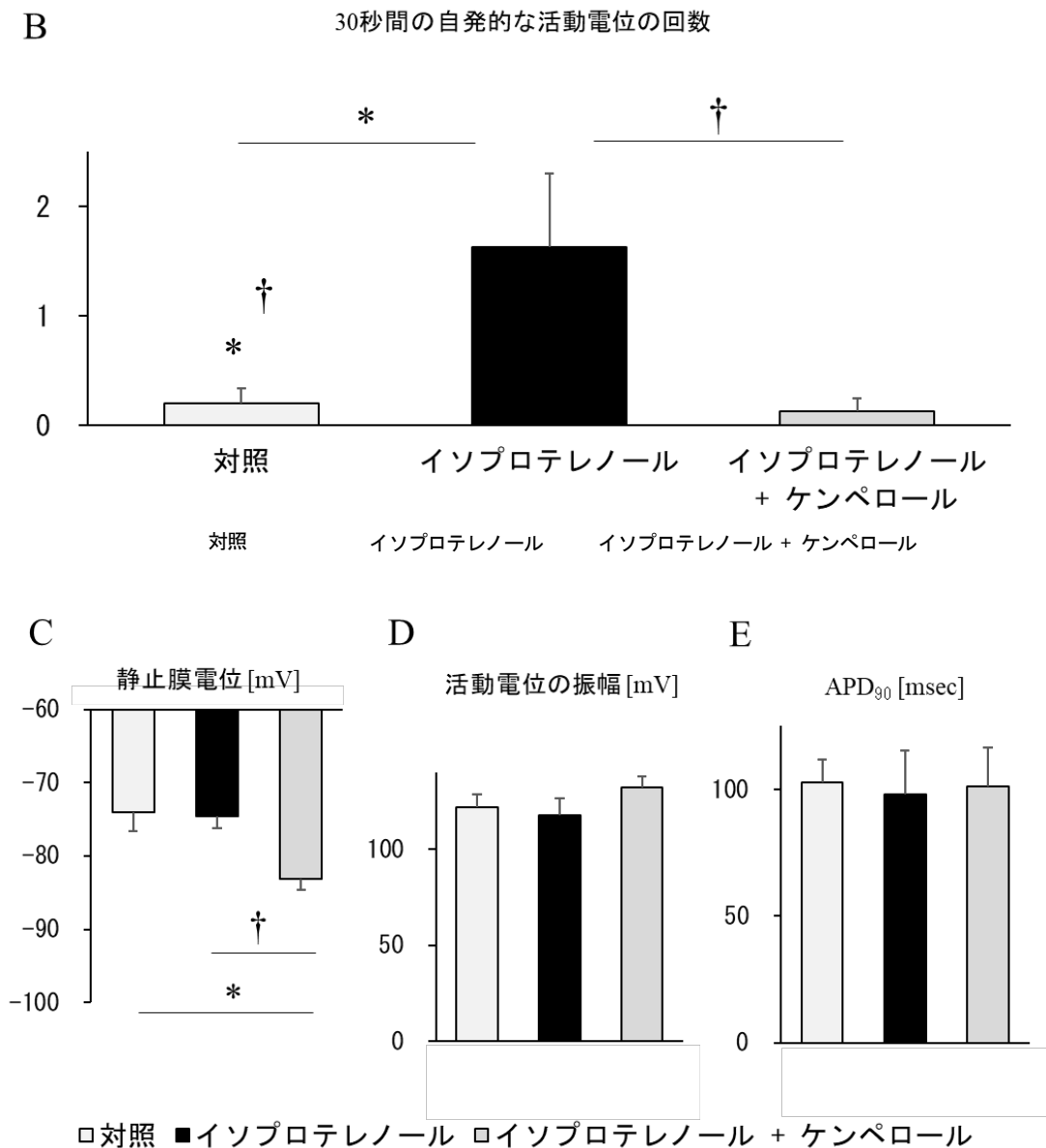


図 5-11 穿孔パッチクランプ法による HF 群心筋細胞の膜電位記録

HF 群単離心筋細胞に対し、穿孔パッチクランプ法で膜電位を記録した。静止膜電位が -60 mV 以下の細胞を解析の対象とし、静止膜電位を測定した後に、溶液を、対照は Bath Solution 液のみ、イソプロテレノール群は、Bath solution 液にイソプロテレノール 0.5 nM を添加、イソプロテレノール+ケンペロール群は Bath solution にイソプロテレノール 0.5 nM、ケンペロール 10 μ M を添加した。 1 nA、 3 ms の電流を 5 回与えたのち、 30 秒間で起きる活動電位を解析した。代表的な膜電位記録 (A) 。 30 秒間に 1 細胞あたりで認められる自発的な活動電位の回数 (B) 、静止膜電位の値 (C) 、与えた電流による活動電位の最大振幅 (D) 、

APD₉₀ (E) のグラフ。データは平均値 ± 標準誤差。* $p < 0.05$ vs. 対照、† $p < 0.05$ vs. イソプロテレノール

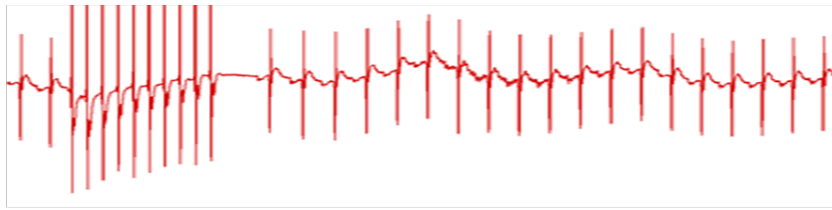
5.9 Mitochondrial Calcium Uniporter の活性化による持続性心室性不整脈への影響

カルシウムハンドリングの改善、撃発活動の抑制を認めたため、さらなる検討として、ランゲンドルフ灌流心での心室性不整脈の誘発性を評価した。

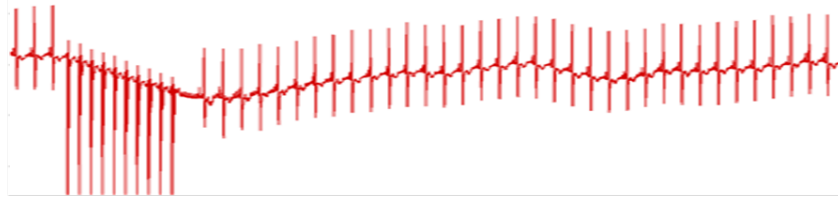
5.9.1 sham 群における連続ペーシング刺激下での持続性心室性不整脈の誘発性

図 5-12 A に sham 群における連続ペーシング刺激下での代表的な心電図を、図 5-11 B に SVA の発症率を示す。sham 群においては、100nM イソプロテレノールによ SVA の発症率は非刺激群に比し、有意な上昇を認めなかった。また、ケンペロール (10 μ M) を追加投与しても SVA の発症に有意な差は認めなかった (0% (対照: n=5)、0% (イソプロテレノール、n=5)、17% (イソプロテレノール + ケンペロール、n=6))。

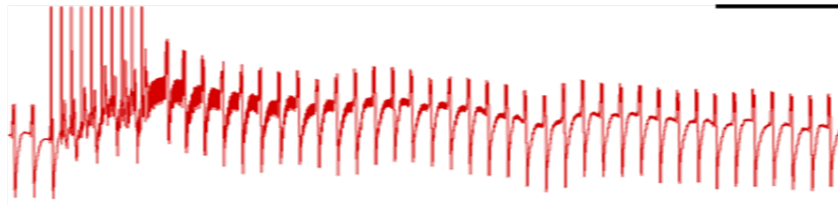
A 対照



イソプロテレノール



イソプロテレノール+ケンペロール



B

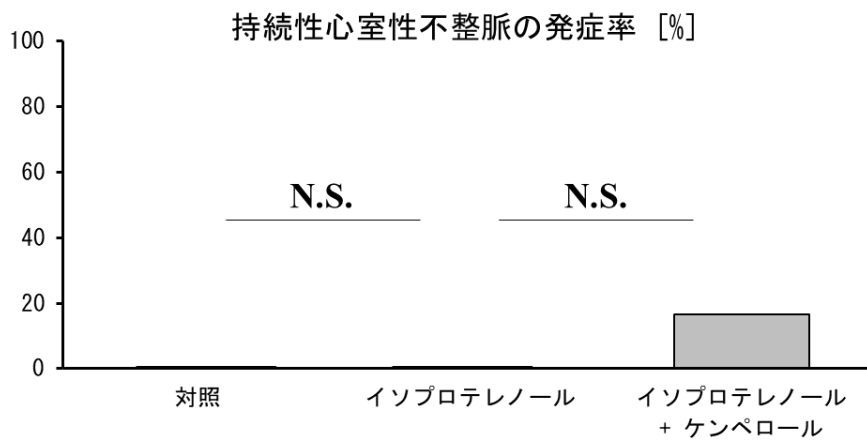


図 5-12 sham 群のランゲンドルフ灌流心での不整脈誘発

sham 群のランゲンドルフ灌流心で、連続ペースングによる不整脈の誘発性を評価した。対照、イソプロテレノールを含むカルシウム Tyrode、イソプロテレノールとケンペフェロールを含むカルシウム Tyrode の 3 群で比較した。代表的な心電図 (A) と、各群の不整脈の発症率のグラフ (B)。N.S. : not significance

5.9.2 HF 群における連続ペーシング刺激下での持続性心室性不整脈の誘発性

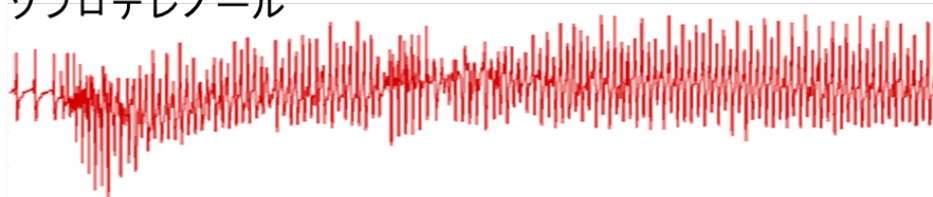
図 5-13 A に HF 群における連続ペーシング刺激下における代表的な心電図を、図 5-13 B に SVA の発症率を示す。HF 群において、イソプロテレノール (100 nM) による SVA の発症率は、対照に比し有意な上昇を認めた。また、イソプロテレノールにケンペロール (10 μ M) を追加することで、SVA の発症率を有意に低下させた [0% (対照、n=5) vs. 85.7% (イソプロテレノール、n=7) 、 $p=0.02$; 16.7% (イソプロテレノール + ケンペロール、n=6) vs. イソプロテレノール、 $p=0.03$ 、フィッシャーの正確検定]。

A

対照



イソプロテレノール



イソプロテレノール+ケンペロール



1sec

B

持続性心室性不整脈の発症率 [%]

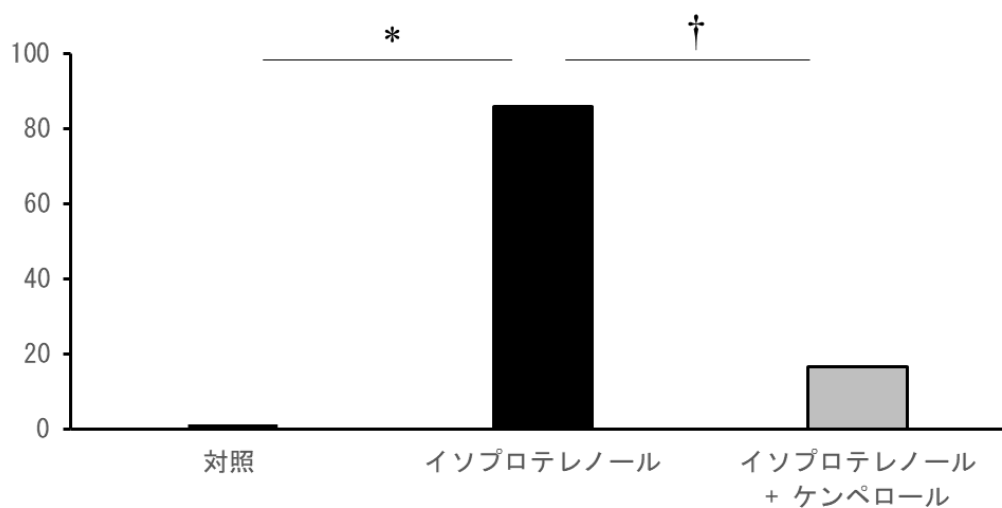


図 5-13 HF 群のランゲンドルフ灌流心での不整脈誘発

HF 群のランゲンドルフ灌流心で、連続ペーシングによる不整脈の誘発性を評価した。対照、イソプロテレノールを含むカルシウム Tyrode、イソプロテレノールと

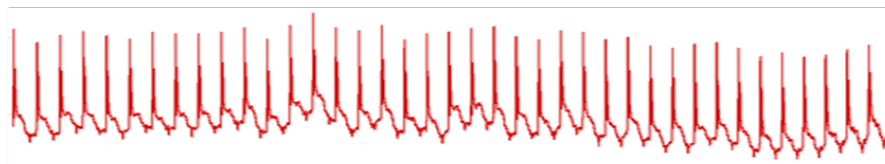
ケンペフェロールを含むカルシウム Tyrode の 3 群で比較した。代表的な心電図 (A) と、各群の不整脈の発症率のグラフ (B)。* $p < 0.05$ vs. 対照、† $p < 0.05$ vs. イソプロテレノール

5.9.3 HF 群における高濃度 β -アドレナリン受容体刺激による不整脈誘発性

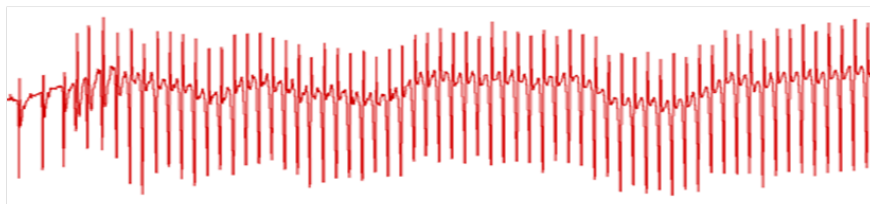
電気刺激によって誘発される心室性不整脈の評価では、リエントリー型を含んでいる可能性を否定できないため、高濃度イソプロテレノール（1 μ M）によって誘発される心室性不整脈の発症率を評価した。図 5-14 A に高濃度イソプロテレノール存在下での代表的な心電図を、図 5-14 B に short VA の発症率を示す。HF 群は、イソプロテレノール（1 μ M）による short VA の発症率は sham 群に比し HF 群で、有意な上昇を認めた。また、イソプロテレノールにケンペロール（10 μ M）を追加すると、short VA の発症率が有意に低下した [0% (sham 群—イソプロテレノール、n=10) vs. 46.7% (HF 群—イソプロテレノール、n=15)、 $p=0.02$; 11.8% (HF 群—イソプロテレノール + ケンペロール、n=17) vs. イソプロテレノール、 $p=0.049$ 、フィッシャーの正確検定]。以上から、ケンペロールによる心室性不整脈の抑制効果を認めた。

A

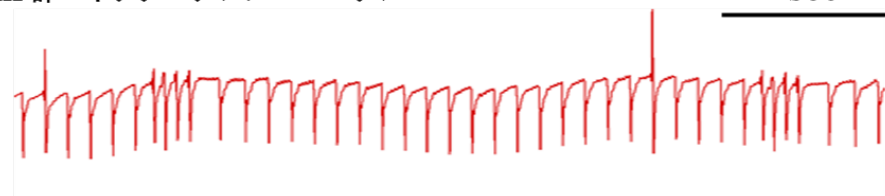
sham群 – イソプロテレノール



HF群 – イソプロテレノール



HF群 – イソプロテレノール + ケンペロール



B

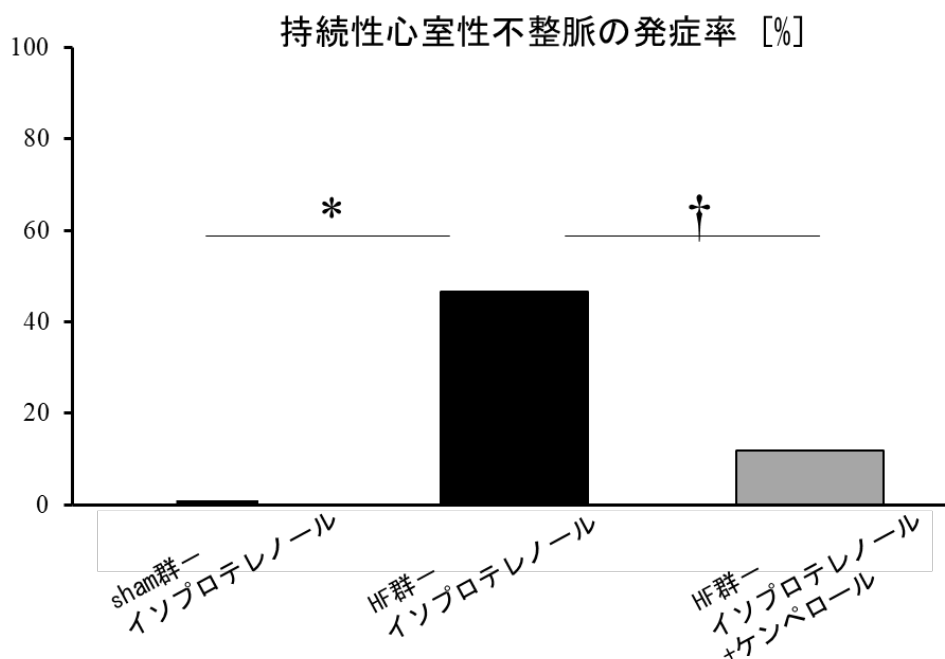


図 5-13 ランゲンドルフ灌流心での高濃度イソプロテレノールによる不整脈誘発

ランゲンドルフ灌流心で、高濃度イソプロテレノールによる不整脈の誘発性を評価した。 sham 群のランゲンドルフ灌流心で、イソプロテレノールのみを含むカルシ

ウム Tyrode を灌流した群、 HF 群のランゲンドルフ灌流心でイソプロテレノールのみを含むカルシウム Tyrode を灌流した群、 HF 群のランゲンドルフ灌流心でイソプロテレノールに加えてケンペロールを含むカルシウム Tyrode を灌流した群の 3 群を比較した。代表的な心電図 (A) と、各群の不整脈の発症率のグラフ (B)。

* $p < 0.05$ vs. 対照、† $p < 0.05$ vs. イソプロテレノール

5.10 Mitochondrial Calcium Uniporter の活性化による血行動態の評価

カルシウムハンドリングを変化させることによる血行動態への急性効果をみるために、左室内に進めたマイクロマノメータチップカテーテルで、ケンペロールによる血行動態の変化を評価した。ケンペロールは右内頸静脈から 5 mg/kg を投与した。表 5-3 に sham 群、 HF 群の、左室収縮期圧、左室拡張末期圧、最大左室内圧時間微分値、最小左室内圧時間微分値を示す。いずれの値も有意な差はなかった。ケンペロールは血行動態に影響しない可能性が示唆された。

表 5-3 ケンペロール投与による血行動態指標

HF 群	ケンペロール投与前	ケンペロール投与30分後
心拍数、bpm	442±13	452±14
左室収縮末期圧、mmHg	93±1.3	92±2.1
左室拡張末期圧、mmHg	10.3±1.1	10.7±1.3
最大左室内圧時間微分値、mmHg/s	6117±334	6163±436
最小左室内圧時間微分値、mmHg/s	-4714±89	-4622±88
sham 群	ケンペロール投与前	ケンペロール投与30分後
心拍数、bpm	481±7	480±11
左室収縮末期圧、mmHg	104±1.9	105±2.8
左室拡張末期圧、mmHg	2.9±0.5	3.1±1.4
最大左室内圧時間微分値、mmHg/s	9768±603	9769±590
最小左室内圧時間微分値、mmHg/s	-6332±99	-6270±285

データは平均値±標準誤差。

5.11 ミトコンドリア呼吸能に対する効果

ケンペロールがミトコンドリアのカルシウムハンドリング以外に与える影響について評価するために、ATP 産生への影響を評価した。ミトコンドリアは、酸化的リン酸化による ATP 産生を担っている。ケンペロールの ATP 産生への影響をしらべるため、Complex I と II に関連する基質をすべて添加した際の、心筋単離ミトコンドリアの呼吸能に与える影響について評価した。ミトコンドリアの ATP 産生能はミトコンドリア呼吸能と強く正の相関関係を示すことが報告されているためである (Lark et al., 2016)。sham 群、HF 群から単離したミトコンドリアの呼吸能は、ケンペロールによって抑制された [sham 群 ; 1.00 ± 0.01 (対照) vs. 0.78 ± 0.03 (ケンペロール)、 $n=5$, $p=0.0008$], [HF 群 ; 0.85 ± 0.02 (対照) vs. 0.69 ± 0.02 (ケンペロール)、 $n=5$, $p=0.0021$] (図 5-15)

ケンペロールは、両群で、ATP 産生を抑制することが示唆された。

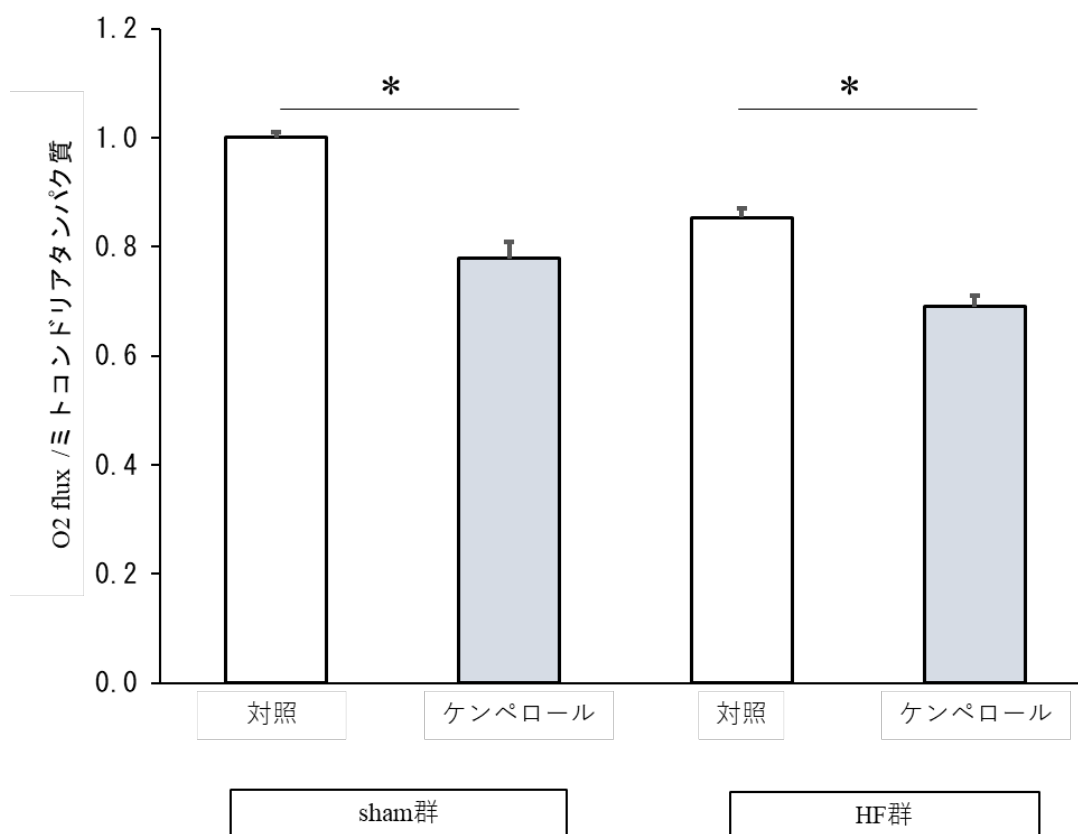


図 5-15 sham 群、HF 群の単離ミトコンドリアの呼吸能へのケンペロールの効果

HF 群、 sham 群の両群の左室心筋から単離したミトコンドリアの呼吸能に対するケンペロールの効果について評価した。単離したミトコンドリアのうち、 50~100 μg を、 10 μM のケンペロールを含むチャンバーと含まないチャンバーに滴下し、呼吸能を測定した。 sham 群の単離ミトコンドリアをケンペロールを含まないチャンバーに滴下したときの酸素消費量を 1 として規格化したときのデータを示している。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。* $p < 0.05$ vs. 対照

5.12 ミトコンドリア活性酸素種に対する効果

ケンペロールによるその他の影響を評価するため、単離ミトコンドリアの活性酸素種産生に与える影響について評価した。sham 群、HF 群いずれも、単離したミトコンドリアの活性酸素種の産生は、ケンペロールによって抑制された [sham 群：100 ± 0.58 (対照) vs. 18.69 ± 0.94 (ケンペロール)、n = 3、p = 0.0001]、[HF 群：100 ± 4.08 (対照) vs. 16.35 ± 1.51 (ケンペロール)、n = 4、p = 0.0003] (図 5-16)。ケンペロールは、ミトコンドリア由来の活性酸素種を抑制した。

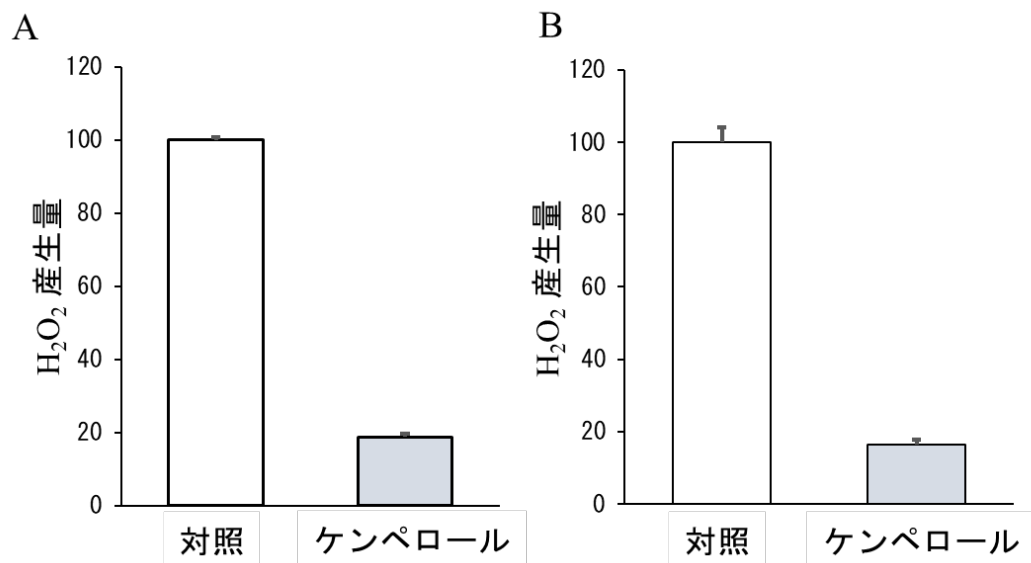


図 5-16 sham 群、HF 群におけるミトコンドリア活性酸素種の比較

HF 群、sham 群の両群の左室心筋から単離したミトコンドリアの活性酸素種の産生に対するケンペロールの効果について評価した。単離したミトコンドリアのうち、50~100 µg を、チャンバーに滴下し、Complex I と Complex II に関連する基質を滴下した後、活性酸素種の生産量を測定した。その後、ケンペロールを滴下し、再度活性酸素種の生産量を測定した。ケンペロール滴下前の活性酸素種生産量を 100 として規格化したときのデータを示す。データは平均値 ± 標準誤差。*p < 0.05 vs. 対照

6. 考察

私は本研究を通じて以下の知見を明らかにした。

- 1) HF 群と sham 群の左室心筋において、MCU のタンパク質発現量に差はなかった。
- 2) 不全心においてミトコンドリアへのカルシウム取り込みを亢進するケンペロールが拡張期のカルシウムウェーブ、カルシウムスパークの形成を抑制し、拡張期の活動電位の形成を抑制した。
- 3) ケンペロールは、 β -アドレナリン受容体刺激下の持続性心室頻拍の発生を抑制した。
- 4) ケンペロールによるカルシウムハンドリングの変化は、血行動態指標に影響しなかった。
- 5) ケンペロールによってミトコンドリアの酸素消費量は低下し、活性酸素種の産生が低下した。

6.1 虚血性心不全における MCU タンパク質発現

心筋梗塞 4 週後の左室心筋において、MCU タンパク質発現量は、sham 群と比べて変化がなかった (図 5-2)。圧負荷誘発心不全における MCU タンパク質発現は、左室収縮障害をきたしていない術後 2 週間で増加を認め、左室収縮力の低下を認める術後 8 週でも増加していた (Yu et al., 2018)。本研究の結果から、虚血性心不全と、圧負荷誘発心不全では、MCU タンパク質発現への影響が異なることが示唆される。心肥大患者の心筋生検において、miR-1 の減少が MCU タンパク質の増加と関連していると報告されたが (Zaglia et al., 2017)、MCU タンパク質発現を特異的に制御するシグナル伝達経路はほとんどわかっておらず、今後の検討課題である。

6.2 細胞内カルシウムハンドリングにおけるミトコンドリアの役割

ミトコンドリアは、心筋細胞の体積のうち約 3 割を占める (Barth et al., 1992; Kim et al., 1994)。酸化リン酸化による ATP 産生や、アポトーシスにおける役割の研究は進んでいるが、心拍によりカルシウムは急速に変化し続けるため、心筋のカルシウムハンドリングにおけるミトコンドリアの役割はまだ明らかになっていない。

不全心の単離心筋細胞において、MCU 作動薬であるケンペロールには、 β 受容体刺激によって形成されたカルシウムウェーブ（図 5-6）、カルシウムスパークの発生頻度を抑制した（図 5-7）。不全心と同様に、RyRII の機能障害によるカルシウムリークに起因する心室性不整脈が主原因であるカテコラミン誘発多形性心室頻拍モデルマウスにおいて、ミトコンドリアへのカルシウム取り込み能亢進により、カルシウムウェーブの減少が報告された (Schweitzer et al., 2017)。RyRII からのカルシウムリークに対して、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みが代償的に働くという点で、本研究と矛盾しない。しかし、胸部大動脈結紮モデルラットで、ケンペロール投与によるカルシウムウェーブの頻度の増加が報告された (Hamilton et al., 2018)。この報告では、心筋細胞単離 36 から 48 時間後に細胞内カルシウム動態を観察しており、心筋細胞単離 4 時間以内の観察とは、心筋細胞のカルシウムハンドリングが異なる可能性がある。

ケンペロールは、MCU 選択的活性化薬ではないが、MCU 阻害薬をケンペロールの存在下に追加投与すると、カルシウムウェーブが抑制できなかったことから（図 5-6）、ケンペロールによるカルシウムウェーブの抑制は、MCU の活性化が主な機序と考えられた。

6.3 MCU 活性化による不整脈発生の抑制

不全心の単離心筋細胞において、 β アドレナリン受容体刺激によって形成される拡張期の自発的な活動電位はケンペロールにより抑制された（図 5-10）。カルシウムウェーブと膜電位を同時記録した過去の報告では、カルシウムウェーブと一致して膜電位が上昇し、閾値以上となると活動電位に変化している (Zhao et al., 2013)。カルシウムウェーブと同様に、 β アドレナリン受容体刺激によって形成された自発的な活動電位の回数が抑制されており、矛盾しない結果だった。

また、不全心において、 β 受容体刺激下での電気刺激による心室性不整脈と高濃度 β 受容体刺激薬による心室性不整脈は、ケンペロールによって抑制された（図 5-12, 13）。カテコラミン誘発多形性心室頻拍モデルマウスにおいて、3 日間の浸透圧ポンプによるケンペロール投与が、エピネフリンとカフェインの急速投与による心室性不整脈を抑制したと報告されており (Schweitzer et al., 2017)、本研究結果と矛盾しない。本研究では、慢性的なケンペロール投与を行わなかったが、単

離心筋細胞において、カルシウムスパーク、カルシウムウェーブの減少が速やかに出現していたため、ランゲンドルフ灌流心での実験を行い、予想通り急性効果を認めた。

6.4 小胞体-ミトコンドリア間のカルシウムクロストーク

ミトコンドリア内の緩徐なカルシウム上昇がエネルギー産生を促進することから (Brandes and Bers, 1997)、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みは必要であると考えられている。実際、小胞体とミトコンドリアは Mitofusins 1 と 2 で小胞体と結合し (Dorn and Maack, 2013)、小胞体-ミトコンドリア接触部位で高カルシウム濃度部位を形成している (Giacomello et al., 2010; Csordas et al., 2010)。また、ラットの新生児心筋細胞において、MCU の過剰発現により、自発的な収縮時、つまり小胞体からのカルシウムの放出時に、ミトコンドリア内にカルシウム濃度が上昇するポイントを認めたことが報告されている (Drago et al., 2012)。このカルシウムハンドリングにおける小胞体とミトコンドリアの関係を、小胞体-ミトコンドリア間のカルシウムクロストークといい、密接な関係があると考えられている。しかし、一方で、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みの抑制により、細胞質のカルシウムスパークが増加したが、小胞体内カルシウム貯蓄量に変化がなかったことが報告され (Subedi et al., 2011)、また、MCU の過剰発現による小胞体内カルシウム貯蔵量に変化はなかった報告がある (Drago et al., 2012)。本研究では、小胞体内カルシウム貯蓄量を評価するために、カフェインによるカルシウムトランジェントと (図 5-9)、カルシウムトランジェントの振幅を測定した (図 5-10)。カルシウムトランジェントの振幅の測定は、小胞体カルシウム貯蔵量の減少とカルシウムトランジェントの振幅の減少の関連性が報告されていたためである (Bassani et al., 1995; Trafford et al., 1997)。しかし、いずれの評価も、小胞体から細胞質に排出されたカルシウムによって、小胞体内カルシウム貯蔵量を評価している。ケンペロールの有無により、MCU を介した細胞質からミトコンドリアへの取り込み能が異なる条件での比較となり、小胞体内カルシウム貯蔵量の評価が困難であった。

一方で、カルシウムトランジェントは、sham 群、HF 群いずれもケンペロールで変化なく (図 5-9)、また血行動態の変化を認めなかった (表 5-3)。心筋収縮に必要なカルシウムは、小胞体からの CICR に依存しており (Eisner et al., 2017)、小胞

体から放出されたカルシウムのうち、心筋収縮に関わる細胞質カルシウムは、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みの促進によって変化しないことが示唆される。拡張期には、細胞内におけるカルシウムのほとんどが小胞体内に貯蔵されている。ケンペロールによりミトコンドリアへ取り込まれるカルシウム量が、小胞体内に貯蔵されたカルシウム量と比較して小さいため、心筋収縮に必要なカルシウムに変化がなく、最終的に収縮が変わらなかったと考えられる。

6.5 ケンペロールによる MCU 以外への作用

ケンペロールはフラボノイドの一種で、抗酸化作用が知られ (Havsteen, 2002)、細胞保護効果を示す。本研究でも活性酸素種の抑制を認めた (図 5-14)。しかし一方で、ケンペロールによる ATP 産生の抑制が報告されている (Chinnam et al., 2010; Li et al., 2012; Poor et al., 2014)。ミトコンドリアの ATP 産生能はミトコンドリア呼吸能と強く正の相関関係を示すことが報告されており (Lark et al., 2016)、本研究では、単離ミトコンドリアの呼吸能について評価した。過去の報告と同様に、ケンペロールにより呼吸能の低下を認めた (図 5-13)。

また、ケンペロールによるカルシウムトランジェントの半減期の延長を認めた (図 5-10)。小胞体から細胞質に放出されたカルシウムは、筋小胞体カルシウム ATP アーゼにより小胞体内に再度取り込まれるか、あるいは、ナトリウム-カルシウム交換体によって細胞外へ排出され細胞質カルシウムは低下する (Voigt and Dobrev, 2012)。この細胞質カルシウム低下の過程において、前半は筋小胞体カルシウム ATP アーゼによる小胞体への再取り込みが主な役割だとされており (Perez-Trevino et al., 2015)、本研究結果からケンペロールによる筋小胞体カルシウム ATP アーゼの活性低下が示唆される (図 5-9)。ケンペロールによる ATP 産生の低下が筋小胞体カルシウム ATP アーゼの活性を低下させた可能性がある。

一方、ミトコンドリア内カルシウム上昇はミトコンドリア ATP 合成能を促進するとされており、上述の結果と一致しない。本研究ではこの不一致を説明する結果を示しえないが、ケンペロールによるミトコンドリアへのカルシウム取り込み亢進とは別に、ATP 産生能を抑制する作用があると考えられる。

6.6 細胞内カルシウム異常への介入における臨床的意義

心筋細胞の収縮性は、細胞内カルシウム濃度の変化に影響される (Wehrens et al., 2004; Eisner et al., 2017)。カルシウムハンドリング異常は、興奮収縮連関の障害をおこし、ひいては心機能障害につながるため (Choudhury et al., 2014)、心不全による異常なカルシウムハンドリングを正常化することを目的とした研究が進んでいる。悪性高熱症に投与されるダントロレンは、N末端ドメインとセントラルドメイン間の脆弱化した接触を安定化させることにより (Kobayashi et al., 2005)、RyRIIからのカルシウム漏出を止め、不全心の心筋細胞の収縮を改善した (Kobayashi et al., 2009)。また、筋小胞体カルシウム ATPアーゼ 2a 遺伝子治療は、筋小胞体カルシウム ATPアーゼ 2a タンパク質発現を増加させて、小胞体へのカルシウム再取り込みを促すことを目標とする治療戦略である (Lyon et al., 2020)。

カルシウムハンドリング異常は、遅延後脱分極による撃発活動の原因になりうるため、抗不整脈を目的とした治療の対象になる。これまでの薬剤は、ナトリウムチャンネル、カリウムチャンネル、カルシウムチャンネルや、 $\beta 1$ アドレナリン受容体などの、細胞膜上のチャンネルやレセプターをターゲットとしており、細胞内カルシウムハンドリングを改善しない。これらの抗不整脈薬は、心不全患者への使用における有害事象のため (Echt et al., 1991)、効果的な抗不整脈薬の開発は以前として今後の課題である。本研究のようにミトコンドリアへのカルシウム取り込みに注目した研究が進んでおり、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みの促進が心不全患者の心室性不整脈に対する新たな治療法になることが期待される。

6.7 ケンペロールの臨床応用

欧米において、フラボノイド摂取量と心血管疾患の発生率、死亡率についての報告は多くされている (Peterson et al., 2012)。一部でケンペロールについて評価されており、冠動脈疾患による死亡、脳梗塞が報告されているが (Knekt et al., 2002; Lin et al., 2007)、致死性不整脈の発生率については評価されていない。今後の検討課題である。

6.8 本研究の限界

本研究では、心不全心モデルとして虚血性心不全を使用しているが、本研究で得られた知見を不全心として一般化して論じる際には、ほかの不全心モデルでの検討も

要すると考えられる。また、ケンペロールはフラボノイドの一種であり、MCU 活性化以外にも抗酸化作用を含めた多様な効果が想定される。さらに、単離細胞の電気刺激は、0.5Hz であり、生理的な心拍数とは異なる。本研究で、小胞体からのカルシウムの漏出が、ミトコンドリアへのカルシウム取り込み亢進により代償されたことが示唆されたが、時間解像度、空間解像度の問題から、小胞体ーミトコンドリアカルシウムクロストークについては直接観察できていない。

7. 総括及び結論

本研究の結果から明らかになった事項の要約を以下に述べる。

1. 虚血性心不全において、 sham 群と比して MCU のタンパク質発現に差はなく、いずれの群も、ケンペロールによる MCU 活性化は、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みを促進した。
2. 虚血性心不全において、 MCU 活性化により、不整脈の成因となる遅延後脱分極を起こしうるカルシウムハンドリング異常を代償した。さらに、 MCU 活性化により拡張期の活動電位の形成を抑制し、持続性心室頻拍の発症を抑制した。
3. ケンペロールによるカルシウムハンドリングの代償は、血行動態の悪化を認めなかったものの、ミトコンドリアの酸素消費量は低下した。

上記の結果から、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みの亢進によって、カルシウムウェーブおよびカルシウムスパークが抑制され、遅延後脱分極による心室性不整脈を抑制することが示唆された。心不全患者における突然死の抑制に、ミトコンドリアへのカルシウムを取り込みは治療標的となりうると考えられ、本発見は有意義な点と考える。慢性投与による効果は未知であるが、すでに冠動脈疾患、脳梗塞の抑制効果が臨床研究で明らかにされており、今後、致死性不整脈の発生率への影響について研究が発展することが期待される。

8. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた北海道大学大学院医学研究院内科学講座循環病態内科学教室 安斉俊久教授に感謝申し上げます。

北海道大学大学院医学研究院内科学講座循環病態内科学教室 渡邊昌也助教には博士課程での研究全般・学位論文作成に、御多忙の中、多くの御指導をして頂き大変感謝申し上げます。重ねて、親身なご助言を頂きました北海道大学大学院医学研究院内科学講座循環病態内科学教室 天満太郎先生、並びに北海道大学大学院医学研究院心不全遠隔医療開発学分野 鎌田壘特任助教に深く感謝の意を表します。

本研究において、御協力をいただきました北海道大学大学院医学研究院内科学分野循環病態内科学教室 甲谷太郎医員、中尾元基医員、門坂崇秀医員、小泉拓也医員並びに循環病態内科学教室員の先生方に深く感謝申し上げます。

本研究において、共同研究者として蛍光顕微鏡を用いた実験に御助力頂きました北海道大学大学院医学研究院細胞生理学教室 大場雄介教授、藤岡容一郎講師に深く感謝申し上げます。

本研究において、貴重な御指導・御助言を頂き、データ解析に御助力を頂きました北海道大学医学研究院分子生物学教室 佐邊壽孝教授に深く感謝申し上げます。

本研究において、穿孔パッチクランプ法による膜電位記録に御助力頂きました北海道大学大学院医学研究院生理系部門薬理学分野 吉岡充弘教授に深く感謝申し上げます。

また本研究の実験遂行にあたり多大なご助力をいただきました実験助手の山根美和子様、木村友紀様、また医局秘書室の皆様に厚く御礼を申し上げます。

本研究は多くの実験動物の尊い生命の犠牲の賜物であることをここに銘記いたします。

最後に、私をここまで育てていただいた両親と、この研究生活をあらゆる面で支えてくれた妻の美保子と息子の裕大に心から感謝いたします。

2021 年 3 月

萩原 光

9. 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

10. 引用文献

Barth, E., Stammeler, G., Speiser, B. and Schaper, J. (1992). Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J. Mol. Cell Cardiol.*, *24*, 669-681.

Bassani, J. W., Yuan, W. and Bers, D. M. (1995). Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.*, *268*, C1313-1319.

Brandes, R. and Bers, D. M. (1997). Intracellular Ca^{2+} increases the mitochondrial NADH concentration during elevated work in intact cardiac muscle. *Circ. Res.*, *80*, 82-87.

Chinnam, N., Dadi, P. K., Sabri, S. A., Ahmad, M., Kabir, M. A. and Ahmad, Z. (2010). Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner. *Int. J. Biol. Macromol.*, *46*, 478-486.

Choudhury, S., Bae, S., Ke, Q., Lee, J. Y., Singh, S. S., St-Arnaud, R., Monte, F. D. and Kang, P. M. (2014). Abnormal calcium handling and exaggerated cardiac dysfunction in mice with defective vitamin d signaling. *PLoS One*, *9*, e108382.

Ciofalo, F. R. and Thomas, L. J., Jr. (1965). The Effects of Zinc on Contractility, Membrane Potentials, and Cation Content of Rat Atria. *J. Gen. Physiol.*, *48*, 825-839.

Csordas, G., Varnai, P., Golenar, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T. G., Balla, T. and Hajnoczky, G. (2010). Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol. Cell*, *39*, 121-132.

Dorn, G. W., 2nd and Maack, C. (2013). SR and mitochondria: calcium cross-talk between kissing cousins. *J. Mol. Cell Cardiol.*, *55*, 42-49.

Drago, I., De Stefani, D., Rizzuto, R. and Pozzan, T. (2012). Mitochondrial Ca^{2+} uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca^{2+} peaks in cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *109*, 12986-12991.

Echt, D. S., Liebson, P. R., Mitchell, L. B., Peters, R. W., Obias-Manno, D., Barker, A. H.,

Arensberg, D., Baker, A., Friedman, L., Greene, H. L., et al. (1991). Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *N. Engl. J. Med.*, 324, 781-788.

Eisner, D. A., Caldwell, J. L., Kistamas, K. and Trafford, A. W. (2017). Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ. Res.*, 121, 181-195.

Fonteriz, R. I., De La Fuente, S., Moreno, A., Lobaton, C. D., Montero, M. and Alvarez, J. (2010). Monitoring mitochondrial Ca^{2+} dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin. *Cell Calcium*, 48, 61-69.

Giacomello, M., Drago, I., Bortolozzi, M., Scorzeto, M., Gianelle, A., Pizzo, P. and Pozzan, T. (2010). Ca^{2+} hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca^{2+} mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Mol. Cell*, 38, 280-290.

Hamilton, S., Terentyeva, R., Kim, T. Y., Bronk, P., Clements, R. T., J, O. U., Csordas, G., Choi, B. R. and Terentyev, D. (2018). Pharmacological Modulation of Mitochondrial Ca^{2+} Content Regulates Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Release via Oxidation of the Ryanodine Receptor by Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species. *Front. Physiol.*, 9, 1831.

Han, L. and Li, J. (2018). Canonical transient receptor potential 3 channels in atrial fibrillation. *Eur. J. Pharmacol.*, 837, 1-7.

Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.*, 96, 67-202.

Kawai, S., Takagi, Y., Kaneko, S. and Kurosawa, T. (2011). Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp. Anim.*, 60, 481-487.

Kim, H. D., Kim, C. H., Rah, B. J., Chung, H. I. and Shim, T. S. (1994). Quantitative study on the relation between structural and functional properties of the hearts from three different mammals. *Anat. Rec.*, 238, 199-206.

Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T. and Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J.*

Clin. Nutr., 76, 560-568.

Kobayashi, S., Bannister, M. L., Gangopadhyay, J. P., Hamada, T., Parness, J. and Ikemoto, N. (2005). Dantrolene stabilizes domain interactions within the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.*, 280, 6580-6587.

Kobayashi, S., Yano, M., Suetomi, T., Ono, M., Tateishi, H., Mochizuki, M., Xu, X., Uchinoumi, H., Okuda, S., Yamamoto, T., et al. (2009). Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 53, 1993-2005.

Lark, D. S., Torres, M. J., Lin, C. T., Ryan, T. E., Anderson, E. J. and Neuffer, P. D. (2016). Direct real-time quantification of mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in permeabilized skeletal muscle myofibers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 311, C239-245.

Li, B., Vik, S. B. and Tu, Y. (2012). Theaflavins inhibit the ATP synthase and the respiratory chain without increasing superoxide production. *J. Nutr. Biochem.*, 23, 953-960.

Lin, J., Rexrode, K. M., Hu, F., Albert, C. M., Chae, C. U., Rimm, E. B., Stampfer, M. J. and Manson, J. E. (2007). Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. *Am. J. Epidemiol.*, 165, 1305-1313.

Liu, J., Xin, L., Benson, V. L., Allen, D. G. and Ju, Y. K. (2015). Store-operated calcium entry and the localization of STIM1 and Orai1 proteins in isolated mouse sinoatrial node cells. *Front. Physiol.*, 6, 69.

Lyon, A. R., Babalis, D., Morley-Smith, A. C., Hedger, M., Suarez Barrientos, A., Foldes, G., Couch, L. S., Chowdhury, R. A., Tzortzis, K. N., Peters, N. S., et al. (2020). Investigation of the safety and feasibility of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with chronic heart failure supported with a left ventricular assist device - the SERCA-LVAD TRIAL. *Gene Ther.*

Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N. and Marks, A. R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 101, 365-376.

Okura, Y., Ramadan, M. M., Ohno, Y., Mitsuma, W., Tanaka, K., Ito, M., Suzuki, K., Tanabe, N., Kodama, M. and Aizawa, Y. (2008). Impending epidemic: future projection of heart failure in Japan to the year 2055. *Circ. J.*, *72*, 489-491.

Pachon, R. E., Scharf, B. A., Vatner, D. E. and Vatner, S. F. (2015). Best anesthetics for assessing left ventricular systolic function by echocardiography in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, *308*, H1525-1529.

Perez-Trevino, P., Perez-Trevino, J., Borja-Villa, C., Garcia, N. and Altamirano, J. (2015). Changes in T-Tubules and Sarcoplasmic Reticulum in Ventricular Myocytes in Early Cardiac Hypertrophy in a Pressure Overload Rat Model. *Cell Physiol. Biochem.*, *37*, 1329-1344.

Peterson, J. J., Dwyer, J. T., Jacques, P. F. and McCullough, M. L. (2012). Associations between flavonoids and cardiovascular disease incidence or mortality in European and US populations. *Nutr. Rev.*, *70*, 491-508.

Poor, M., Veres, B., Jakus, P. B., Antus, C., Montsko, G., Zrinyi, Z., Vladimir-Knezevic, S., Petrik, J. and Koszegi, T. (2014). Flavonoid diosmetin increases ATP levels in kidney cells and relieves ATP depleting effect of ochratoxin A. *J. Photochem. Photobiol. B*, *132*, 1-9.

Sancak, Y., Markhard, A. L., Kitami, T., Kovacs-Bogdan, E., Kamer, K. J., Udeshi, N. D., Carr, S. A., Chaudhuri, D., Clapham, D. E., Li, A. A., et al. (2013). EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science*, *342*, 1379-1382.

Schweitzer, M. K., Wilting, F., Sedej, S., Dreizehnter, L., Dupper, N. J., Tian, Q., Moretti, A., My, I., Kwon, O., Priori, S. G., et al. (2017). Suppression of Arrhythmia by Enhancing Mitochondrial Ca(2+) Uptake in Catecholaminergic Ventricular Tachycardia Models. *JACC Basic. Transl. Sci.*, *2*, 737-747.

Subedi, K. P., Kim, J. C., Kang, M., Son, M. J., Kim, Y. S. and Woo, S. H. (2011). Voltage-dependent anion channel 2 modulates resting Ca²⁺ sparks, but not action potential-induced Ca²⁺ signaling in cardiac myocytes. *Cell Calcium*, *49*, 136-143.

Trafford, A. W., Diaz, M. E., Negretti, N. and Eisner, D. A. (1997). Enhanced Ca^{2+} current and decreased Ca^{2+} efflux restore sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content after depletion. *Circ. Res.*, *81*, 477-484.

Voigt, N. and Dobrev, D. (2012). Cellular and molecular correlates of ectopic activity in patients with atrial fibrillation. *Europace*, *14 Suppl 5*, v97-v105.

Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., Reiken, S. R. and Marks, A. R. (2004). Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ. Res.*, *94*, e61-70.

Yano, M., Ono, K., Ohkusa, T., Suetsugu, M., Kohno, M., Hisaoka, T., Kobayashi, S., Hisamatsu, Y., Yamamoto, T., Kohno, M., et al. (2000). Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca^{2+} leak through ryanodine receptor in heart failure. *Circulation*, *102*, 2131-2136.

Yu, Z., Chen, R., Li, M., Yu, Y., Liang, Y., Han, F., Qin, S., Chen, X., Su, Y. and Ge, J. (2018). Mitochondrial calcium uniporter inhibition provides cardioprotection in pressure overload-induced heart failure through autophagy enhancement. *Int. J. Cardiol.*, *271*, 161-168.

Zaglia, T., Ceriotti, P., Campo, A., Borile, G., Armani, A., Carullo, P., Prando, V., Coppini, R., Vida, V., Stolen, T. O., et al. (2017). Content of mitochondrial calcium uniporter (MCU) in cardiomyocytes is regulated by microRNA-1 in physiologic and pathologic hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *114*, E9006-E9015.

Zhao, Z., Gordan, R., Wen, H., Fefelova, N., Zang, W. J. and Xie, L. H. (2013). Modulation of intracellular calcium waves and triggered activities by mitochondrial Ca^{2+} flux in mouse cardiomyocytes. *PLoS One*, *8*, e80574.