

心臓病の基礎的研究

心臓における興奮伝播収縮連関に関する分子生理学的研究

《研究の概要》

心臓の機能は生体の条件、心臓の状態に適合して必要かつ十分な血液を拍出することである。これには、個々の細胞から構成されている心臓全体が同期的興奮、収縮することが絶対必要である。この機能的合胞体としての機能は、個々の細胞の正常な興奮、興奮の細胞間への速やかな伝播、個々の細胞の正常な収縮と同期的収縮によって果たされる。これらの要素の一つでも障害されると正常な心機能は期待できない。これは内因的、外因的要素で調節されており、この調節の異常、破綻が不整脈や心不全などの心臓病を誘発し生命維持を危うくする。調節機序、調節障害要素とその機序を知ることは、心臓病の治療、予防への意義は大きい。低酸素や虚血では、脂質代謝変化によるリゾフォスファチジルコリン (LPC) の遊離、細胞内 Ca イオン過負荷、Mg イオン増加、細胞内酸性化、PKC 活性化、ATP 減少による ATP 依存性 K チャネル (IK_{ATP}) の活性化などがみられることはよく知られている。本研究はこれらが心細胞機能に如何に影響を与えるかを細胞興奮、興奮伝播、収縮と云う一連の関係において、分子生理学的にそれぞれの観点から追求した。

①細胞膜は大電流や過分極電流で穿孔（電氣的膜穿孔）するが、LPC はこれを促進し正常の静止膜電位においてすら穿孔を促すことが判明した。これは Ca イオンの大量細胞内流入や細胞死を誘発し興奮異常を惹起させ不整脈発生や収縮異常の因子となる。エチレングリコールや IK_{ATP} チャネル阻害剤がこれに抑制的に作用することも判明した。②細胞間興奮伝播の場として働くギャップ結合チャネルの機能（電氣的細胞間結合）は、チャネル構成コネクシンの PKA 依存性リン酸化で促進、維持されること、細胞内 Ca イオン負荷、細胞内酸性化、Mg イオン負荷、PKC 活性化、PKG 活性化や LPC は PKA 依存性リン酸化を抑制することでチャネル機能を阻害することが判明し、虚血による不整脈発生の要因の一つとなる可能性が示唆された。③圧負荷による肥大心筋でもコネクシンの細胞接着部での発現減少、細胞表面での発現助長などの発現異常がみられ、筋細胞群の正常の縦方向優位の細胞間興奮伝播が変化し、横方向伝播も顕著になり伝播の Zig-Zag 即ち異方向伝播が促進され不整脈発生の下地を形成することも判明した。このような肥大心におけるコネクシンのリモデリングにアンギオテンシン II が関与していることも示唆された。④心筋の生体内における収縮力調節には、「Frank-Starling の法則」機構（筋伸展に対する収縮反応）（筋長効果）が重要であるが病態における調節機構は不明であった。細胞内酸性化、無機リン蓄積はトロポニン C の Ca 親和性を低下、クロスブリッジ数の減少、張力の低下をもたらすが、筋長効果は寧ろ促進させることが判明した。これは病的条件における心収縮の代償的維持機構を示唆する。細胞内 Ca イオン過負荷は、筋長効果を抑制し伸展により Ca 振動を惹起させたり、細胞内で不均一な収縮を誘発させたりなど収縮異常をもたらすことが示唆された。

かくして、本研究により、低酸素～虚血、肥大心において、どのような環境変化が、興奮、興奮伝播、収縮の調節機構にどのように影響を与え、心臓機能低下を惹起させている

か、その病態と機序に新しい知見が示された。

大地陸男	順天堂大学医学部生理学第二 教授	膜興奮とその病態
児玉逸雄	名古屋大学環境医学研究所 教授	心肥大における興奮伝播異常
栗原 敏	東京慈恵会医科大学生理学第二 教授	心筋収縮とその病態
今永一成	福岡大学医学部生理学 教授	ギャップ結合の機能と病態、総括

研究報告

本研究は、心臓機能の病態を「興奮－興奮伝播－収縮連関」と云う総合的観点から論ずることを目的としたもので、細胞膜興奮、興奮の伝導、収縮の異常と病態、それらの機序を検討した。報告も各々のテーマに分けて記載する。

①心筋細胞膜の電氣的・化学的穿孔に関する研究（大地陸男）

I. 研究目的

心筋細胞の興奮はイオンチャネルの開閉によって行われることは周知の通りである。一方、脂質二重層は大きなパルス通電によって穿孔することが、エレクトロポレーション (electroporation, EP) として知られている。重度不整脈に対しては電氣的除細動が重要な対処法である。最近、この電氣的除細動は副作用として EP を発生する、あるいは除細動のメカニズム自体に EP が関係するなどの報告があり、心筋における EP の基礎的研究の臨床に関連する意義が与えられた。また虚血などによる心筋代謝障害時には膜からリゾリン脂質が生成・放出され病態を修飾する。リゾホスファチジルコリン (LPC) は界面活性作用があり、これによる膜障害作用も報告されているが、多くのチャネル修飾作用に比較して十分研究されていない。この膜障害作用を解明し、障害を軽減できれば、病態の治療に資することができる。膜障害物質の存在下では EP が発生しやすいことは当然予想されるがその証明も必要である。そこで、我々の研究目的は、まずパッチクランプ法と蛍光測定法により、膜穿孔の経過を実時間で追跡する手段を確立し、これを LPC などによる膜穿孔の研究に通用することであった。

II. 研究計画および材料と方法

ウサギ心臓から単離した心室筋細胞を標本として用いた。パッチクランプ法による膜電流記録で LPC などの作用を検討した。また、ホールセルクランプ法と蛍光顕微鏡を併用して、膜電位制御により膜電流を記録し、電流固定により膜電位を記録して細胞内蛍光マーカーとの関係を検討した。蛍光法は時間的な分解能は低い、パッチクランプ法でのチャネル電流の混入を無視することができ、また長時間続く振幅の小さな現象の検出に有力である。膜穿孔のプロープとしては分子量 314 の ethidium カチオン (EB) を使用し、EB 蛍

光を蛍光顕微鏡で測定した。なお本研究では、大きな過分極や大量の膜障害性物質による不可逆的な穿孔ではなく、正常状態に近い刺激による微小な穿孔を研究対象とした。穿孔時には EB は電位依存性に静止電位で促進されて細胞内に流入し、流入量に対応した核蛍光の不可逆的増大をもたらす。細胞内では EB は主として DNA や RNA と結合することによって蛍光を増大する。静止電位 -80mV でも徐々に EB 蛍光は増大するので、最終的なパルスプロトコルでは、保持電位は -20mV とした。40 秒の試験パルスを適用し、パルス中に誘発される La^{3+} 感受性の内向き電流 (I_{hi}) と核および細胞質の EB 蛍光の増大を測定した。まず過分極パルスを 20mV ずつ -80 から -180mV まで増大した。別の実験では LPC 10mM を適用してから時間を追って -80mV パルスによって誘発される I_{hi} と EB 蛍光増大を調べた。膜電流固定による膜電位記録も行った。

III. 研究成果

ウサギ心室筋細胞の形態を顕微鏡カメラで観察しながら、LPC ($10\ \mu\text{M}$) を細胞外液に加えて、静止細胞、反復収縮する細胞、過収縮 (細胞死) する細胞の割合を時間的に追った。細胞外 K^+ 濃度の効果も検討した。 K^+ -free 液では LPC 投与前において長時間収縮する細胞が多く、LPC によってゆるやかに過収縮細胞が増した。正常 K^+ 濃度では LPC $10\ \mu\text{M}$ では形態の変化はなく、 $30\ \mu\text{M}$ で収縮開始後、短時間で過収縮に入った。この実験から、 K^+ は膜電位を正常な静止電位に維持して電氣的な穿孔を、 K^+ -free と比較して発生し難くするが、一度穿孔すると膜電位を深く保つために穿孔部からの Ca^{2+} 流入を促進すると示唆された。

LPC の膜穿孔への影響を、単離ウサギ心室筋にパッチクランプ法を適用して検討した。LPC は内向き整流性 K 電流 (I_{K1}) を抑制するとされる。しかし、ランプパルスを連発して I_{K1} を記録しつつ LPC ($30\ \mu\text{M}$) を投与したとき、 I_{K1} の抑制以前に電気穿孔による I_{hi} が生じた。LPC による穿孔の電位依存性を検討した。まず LPC (10 または $30\ \mu\text{M}$) による I_{hi} 発生の潜時の維持電位依存性を検討したが、細胞間のデータのばらつきが大きく有意な差はえられなかった。そこで、各細胞で膜電位を -40 、 -60 、 -80mV に 10s ずつ維持しつつ LPC を適用した。15 例において、最初の I_{hi} は -80mV で 10 例、 -60mV で 5 例において生じ、 -40mV では生じなかった。またこれらの I_{hi} は 0.1mM の La^{3+} で可逆的に抑制された。また LPC-誘発性 I_{hi} の上昇の経過は早く 10ms で 0.5nA にも達することもあり、十分に活動電位を誘発できる大きさであった。従って LPC は正常の膜電位近くで、電気膜穿孔を促進することが明らかになった。すなわち、LPC による不整脈の発生は電気穿孔に起因すると考えられた。

LPC のウサギ心室筋細胞膜への影響をさらに outside-out パッチクランプ法を用いて検討した。LPC ($3\ \mu\text{M}$) を与え、膜電位を持続時間 10s のパルスで過分極すると、不規則な内向き電流 (I_{hi}) が -140mV 近くで発生した。LPC $10\ \mu\text{M}$ では -60mV 、 -80mV でも I_{hi} が発生した。 I_{hi} は 0.1mM の La^{3+} で可逆的に抑制された。合成ポリマーのポリエチレングリコールは (PEG4000) は 25% または 10% の濃度で I_{hi} を軽度抑制した。一方、PEG (25%) は LPC 誘発性膜穿孔に伴う収縮と、それに伴う細胞のトリパンプルー取り込みを完全に抑制した。膜穿孔を Ca 流入による収縮および、膜不透過性核蛍光マーカである EB の蛍光増大で評価した場合、LPC は膜穿孔を促進し PEG はこれを抑制すると考えられた。

膜穿孔実験を膜電流固定による膜電位と EB 蛍光を同時に記録しながら行った。 K^+ -free 溶液は膜電位は最大 -180mV に過分極後、巨大な活動電位を発生させた。活動電位は持続時

間は3~5分におよぶプラトーを呈した。プラトー中はEB蛍光増大は軽度で、再分極後に大きく増大した。このEB蛍光増大は筋収縮の増大を伴った。このことから再分極は正の荷電をもつエチジウムおよびCa²⁺の流入を増大すると想定された。

EB存在下にI_{hi}を発生させるとATP感受性K電流(I_{KATP})が誘発された。グリベンクラミドは活動電位を10分以上まで持続させ、EB蛍光増大を抑制した。I_{KATP}は穿孔部からのCa²⁺流入を増大させて細胞障害性に働くことが判明した。

保持電位-20mVから、-80mVにはじまり-180mVまで20mVずつ増大する40secのパルスを2分毎に与え、内向き電流(I_{hi})電流を連続的に、またEB蛍光を20s毎に記録した。過分極を増大するにつれて、I_{hi}とEB蛍光が共に増大した。パルス中のEB蛍光変化分をI_{hi}の時間積分と比較すると、時間経過および振幅の電位依存性に関して、両者は平行的に増大した。EB蛍光は核の方が細胞質よりも2~5倍大であった。LPC(10μM)存在下では-80mVで正常溶液中-160mVパルスに相当するI_{hi}電流とEB蛍光増大が発生した。核EB蛍光強度と電流積分値の関係は、過分極単独およびLPCに共通していた。

IV. 考案

過分極あるいはLPCで誘発される不規則な内向き電流(I_{hi})が膜穿孔電流であることが、蛍光マーカーEBの流入で裏付けられた。今後は、膜穿孔の不整脈への寄与やCa²⁺イオン流入による障害性をI_{hi}から定量的に見積もることが可能と思われる。電流固定実験から、膜穿孔が発生した場合は、負の膜電位が膜損傷部からのethidium⁺やCa²⁺の流入を促進して細胞傷害的であり、これに対しグリベンクラミドが脱分極を持続させて細胞保護的に働くことが判明した。LPCは膜穿孔を強力に促進し、これによる穿孔は不整脈の発生や細胞へのCa²⁺過負荷によって細胞障害性となることが示された。穿孔を閉鎖または軽減する薬物の候補として、ポリエチレングリコールの作用をさらに検討する必要がある。

V. 研究成果の発表

1. Wang, W., Watanabe, M., Nakamura, T., Kudo, Y., Ochi, R.: Properties and expression of Ca²⁺-activated K⁺ channels in H9c2 cells derived from rat ventricle. *Am J Physiol* 276:H1559-H1566, 1999
2. Okada, T., Asanuma, K., Nakamura, T., Ochi, R.: Hydrogen peroxide-induced enhancement of prostanoid release and myocardial damage by its washout in isolated rat heart. *Pathophysiology* 6:27-33, 1999
3. Oide, H., Tateyama, M., Wang, X.E., Hirose, M., Itatsu, T., Watanabe, S., Ochi, R., Sato, N.: Activated stellate (Ito) cells possess voltage-activated calcium current. *Biochim Biophys Acta.* 1418:158-64, 1999
4. Seitz, S., Wegener, J.W., Rupp, J., Watanabe, M., Jost, A., Gerhard, R., Shainber, A., Ochi, R., Nawrath, H.: Involvement of K⁺ channels in the relaxant effects of YX-1 in vascular muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 382:11-18, 1999
5. Gupte, S.A., Okada, T., Tateyama, M., Ochi, R.: Activation of TxA₂/PGH₂ receptors and protein kinase C contribute to coronary dysfunction in superoxide treated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 32:937-946, 2000

6. Tateyama, M., Zong, S., Tanabe, T., Ochi, R.: Functional properties of voltage-gated Ca^{2+} channels in cultured adult rabbit ventricular myocytes expressing $\alpha_{1E}\text{Ca}^{2+}$ channel genes. *Am J Physiol* 280:C175-C182, 2001
7. Ochi, R., Song, Y.M., Akuzawa, T.M., Tateyama, M.: Electroporation of cardiac muscle: modulation by lysolipids, surfactants and polyethylene glycol. *Jpn J. Physiol.* 20(supple3):20-23, 2000
8. Sonoda, S., Ochi, R.: Independent modulation of L-type Ca^{2+} channel in guinea pig ventricular cells by nitrendipine and isoproterenol. *Jpn Heart J.* 42:771-780, 2001
9. Gupte, S.A., Tateyama, M., Okada, T., Oka, M., Ochi, R.: Epiandrosteron, a metabolite of testosterone precursor, blocks L-type calcium channels of ventricular myocytes and inhibits myocardial contractility. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34:679-688, 2002
10. 大地陸男：心血管系における細胞膜傷害。 脈管学 41:13-21, 2001
11. 渡邊マキノ、大地陸男：血管内皮細胞における Cl^- 電流および細胞内 Ca^{2+} 濃度の浸透圧による修飾。 脈管学 40:205-209, 2000
12. Song, Y.-M., Ochi, R.. Hyperpolarization and lysophosphatidylcholine increase inward current and ethidium fluorescence in rabbit ventricular myocytes (in the course of revision)
13. Wang, W., Hino, N., Yamasaki, H., Aoki, T., Ochi, R.: The $\text{K}_v2.1 \text{K}^+$ channel as a major outward current-related channels in the H9c2 myoblasts derived from rat heart (submitted)
14. Song, Y.-M., Ochi, R.: K^+ -deprivation-induced voltage-dependent increase of nuclear ethidium fluorescence in rabbit ventricular myocytes (in preparation)

②興奮伝播におけるギャップ結合の役割とその病態（今永一成）

I. 研究目的

心筋において、gap junction は電氣的細胞間連結として機能し、細胞間興奮伝播の場として重要な役を果たしている。Gap junction のこの生理的機能の障害は、興奮伝播遅延、興奮の re-entry などを誘発し、重篤な不整脈発生の要因となる。この Gap junction の生理的機能は、gap junction 構成の channel の数、開閉などの静的、動的要素に依存している。これらは channel 構成の蛋白、connexin の分子構造変化に依存している可能性が示唆されてはいるものの、これに関する研究は少なく、不明な点が多い。分子構造変化はリン酸化に依存している可能性を鑑み、本研究では、gap junction の生理的機能を障害する要素としての低酸素、細胞内 Ca 負荷、細胞内酸性化、PKC 活性化、PKG 活性化の connexin リン酸化、connexin の発現への影響を機能との相関において検討した。また、糖尿病心筋においても検討した。

II. 研究計画および材料と方法

成獣モルモット、ラット心臓を用いた。心臓を摘出後、Langendorff 法で、正常 Krebs Hensuleit 液 (97%O₂、3%CO₂ 飽和、pH=7.4) を 37°C、定圧 (60mmHg)、定流 (16~18ml/min) で灌流。定常状態後、試験液を 30~60 分、必要な時 90 分灌流した。右心室筋を分離し、免疫組織標本、免疫ブロット (Western Blot) の資料とした。Connexin (Cx) には、心室筋に優位に発現する Cx43 を対象とし、Mouse monoclonal anti-Cx43 antibody を用いた。生理学的細胞間連絡 (GJC) は、longitudinal internal resistance (ri)、gap junction の電氣的抵抗 (impedance 法) (Rj) 或いは dye-coupling で評価した。

低酸素条件は、97%N₂、3%CO₂ 飽和液で行った (pO₂=10mmHg)。細胞内 Ca 負荷は灌流液 Na 濃度減少で、細胞内酸性化は灌流液飽和ガスの CO₂ 分圧上昇で施行した。PKA、PKC、PKG 活性化には、夫々、8Bromo cyclic AMP, PKA activator, TPA, 8Bromo cyclic GMP を用いた。PKA 抑制として PKA inhibitor を、PKC inhibitor として Calphostin C を用いた。糖尿病心筋には STZ 誘発糖尿病ラット心室筋を用いた。

Western Blot において、43KDa~45KDa の間に 2 つの isoform が認められた。高分子の isoform の発現は phosphatase により激減し、PKA activator, 8Bromo cyclic AMP で促進された。低分子 isoform を非リン酸化 (P0)、高分子 isoform をリン酸化 isoform (P1) とし、P1, P0 isoform の mean density を測定 (NIH Image) し、P1/P0 比をリン酸化の指標とし、P1/P0 増加をリン酸化促進と評価した。(表-1) Immunohistochemistry では、intercalated disk での Cx43 spot の immunoreactivity(mean density), mean area を測定し Cx43 発現の指標とした。

III. 研究成果

1) PKA 活性化 (表-1)

8Bromo cyclic AMP (1 μ M) は、Rj, ri を減少させ、Cx43 のリン酸化を促進した。Intercalated disk における Cx43 の immunoreactivity を促進し、Cx43 の発現面積を増加させた。これは、cyclic AMP, 0.1~10 μ M まで濃度依存性を示し、この効果は、PKA inhibitor で抑制された。8Bromo cyclic AMP の作用は PKA 活性化を介することが強く示唆された。また、PKA 活性化による Cx43 の発現促進、リン酸化促進と GJC の促進は並行することが示唆された。

2) 低酸素 (表-2)

低酸素下では、ri は時間依存性に増加し、40~60 分後 ri が正常の約 4 倍になると伝導遮断がみられた。Cx43 のリン酸化も低酸素で時間依存性に抑制された。8Bromo cyclic AMP (1 μ M) は低酸素による ri 上昇、Cx43 リン酸化抑制を改善かつ予防したが、これらの改善効果は、低酸素 100 分では弱く、120 分では見られなかった。gap junction の電子顕微鏡所見では、低酸素 30~40 分に変性像を示すが、8Bromo cyclic AMP 存在下ではほぼ正常像が保たれた。しかし、120 分低酸素では cyclic AMP の改善効果は見られなかった。低酸素持続によって細胞内 Ca 増加、細胞内酸性化が誘発されることを考えると、Cx43 のリン酸化 PKA 依存性リン酸化は Ca 濃度、酸性度によって影響を受ける可能性が示唆された。

3) 細胞内 Ca 負荷 (表-3)

灌流液 (細胞外) Na 濃度減少による細胞内 Ca レベルを collagenase 処理、単離心室筋

細胞を用い Fura-2 で測定した。正常の 141.1mM から 78.1mM、13.1mM 減少させると、正常の約 1.2 倍、1.8 倍に上昇した。Na 濃度減少が大きくなるにつれて ri は上昇し、Cx43 リン酸化は減少した。8Bromo cyclic AMP (1 μ M) は ri 上昇、リン酸化抑制を改善させたが、Na=13.1mM ではこの改善効果は見られなかった (PKA 依存性リン酸化の抑制)。8Bromo cyclic AMP の改善効果は PKA inhibitor で消失した。

4) 細胞内酸性化 (表-3)

pH の低下に従い ri は上昇、Cx43 リン酸化は減少した。8Bromo cyclic AMP (1 μ M) は ri 上昇、リン酸化抑制を改善させたが、pH6.4 以下ではこの改善効果は見られなかった (PKA 依存性リン酸化の抑制)。8Bromo cyclic AMP の改善効果は PKA inhibitor で消失した。

5) PKC 活性化 (表-4)

TPA により ri は上昇し、これは Calphostin C で抑制された。8Bromo cyclic AMP の改善効果は見られなかった。Cx43 のリン酸化は軽度ながらも促進されたが、PKA 依存性リン酸化は抑制された。細胞接合部における Cx43 の発現は抑制され、細胞側面への発現が促進された。糖尿病心筋では conductivity が低下していること、Cx43 の PKC 依存性リン酸化が促進されていることを認めた。

6) PKG 活性化 (表-4)

8Bromo cyclic GMP はリン酸化を軽度促進した。Cyclic AMP 1 μ M と cyclic GMP 1 μ M との混在では、cyclic AMP のリン酸化促進効果が優位であり、cyclic GMP 10 μ M では PKA 依存性リン酸化は抑制された。

7) LPC (表-4)

LPC (1 μ M) はリン酸化を抑制し、PKA 依存性リン酸化をも抑制した。

表-1 (平均値)

	control		+cAMP	cAMP + phosphatase	PKA inhibitor + cAMP	PKA activator	PKA activator + phosphatase
	-cAMP	+phosphatase					
ri	1	/	0.7	/	1.0	0.6	/
P1/P0	1	0.2	1.7	0.2	1.0	1.8	0.2

表-2 (平均値)

	before		Hypoxia 30 min		Hypoxia 60 min		Hypoxia 120 min	
	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP
ri	1	0.7	2.4	1.5	3	1.7	4.5	4.2
P1/P0	1	1.7	0.8	1.5	0.6	1.2	0.52	0.45

表-3 (平均値)

	control		Low Na				Low pH			
	Na141.1, pH7.4		78.1		13.1		7.1-6.9		6.1-5.9	
	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP
ri	1	0.7	1.5	1.0	3.0	2.9	1.3	1.0	2.6	2.6
P1/P0	1	1.7	0.9	1.3	0.7	0.7	1.0	1.3	0.7	0.6

表-4 (平均値)

	control		TPA, 0.1 μ M		cGMP				LPC	
	-cAMP	+cAMP 1 μ M	-cAMP	+cAMP 1 μ M	cGMP, 1 μ M		cGMP, 10 μ M		-cAMP	+cAMP 1 μ M
					-cAMP	+cAMP 1 μ M	-cAMP	+cAMP 1 μ M		
ri	1	0.7	1.7	1.6	/	/	/	/	2.0	2.2
P1/P0	1	1.7	1.2	0.84	1.3	1.8	1.4	1.3	0.5	0.5

IV. 考案

従来から知られていた低酸素、細胞内 Ca 負荷、細胞内酸性などの gap junction 生理機能抑制要素が connexin のリン酸化抑制と深く関係していることを証明した。また、Cx43 の PKA 依存性活性化は Cx43 の発現促進、維持 (消退抑制) により GJC を促進、維持に寄与していることが示唆された。PKC 依存性リン酸化は Cx43 を degradation を受け易くさせる、即ち proteolysis へ導くものと考えられる。かくして、PKA 活性化は connexin に対して "up-regulation" として、PKC 活性化は "down-regulation" として働いているものと考え

られる。PKG 活性化も PKA の作用に影響を与える要素と思われる。

本研究は、gap junction の生理機能が connexin のリン酸化に依存しており、PKA 依存性リン酸化と PKC 依存性リン酸化で制御されていることを示唆したことに大きな意義がある。さらに、Ischemic preconditioning の要因の一つとして PKC 活性化が関与しているものと考えられているが、この機序として、PKC 活性化で GJC は抑制されると云う本研究成果を考えると PKC 活性化で toxic substances の細胞間拡散の抑制に起因するかも知れないと云う興味ある示唆も得られた。PKC に関しては、これらにいずれの isoform が関与しているかを検討しなければならないであろう。

V. 研究成果の発表（平成 11 年～14 年予定を含む）本研究助成に関するもののみ

1. Manoach, M., Varon, D., Tribulova, N., Shainberg, A., Zimmer, T., Imanaga, I.: Are the antiarrhythmic-difibrillating effects of sotalol due to or despite the prolongation of the action potential duration? Life Science 65: PL273-279, 1999
2. Manoach, M., Shainberg, A., Tribulova, N., Imanaga, I.: Are the class III defibrillating effect due to or despite of the prolongation of action potential duration? New Strategies for Antiarrhythmic Treatment, Tokyo, Program & Abstract p29, 1999
3. Imanaga, I., Inai, T., Hirosawa, N., Shibata, Y., Uehara, A.: Abnormalities of intercellular impulse propagation in the diabetic cardiac muscle. International Conference on Diabetes and Cardiovascular Disease, Winnipeg, Canada, (Invited symposiast), Program p41, 1999
4. Imanaga, I., Inai, T., Hirosawa, N., Shibata, Y., Uehara, A.: Disturbances of intercellular impulse propagation in the diabetic myocardium -with reference to gap junction. 1999
International Gap Junction Conference, Gwatt, Switzerland, Program p63, 1999
5. 今永一成, 稲井哲一朗, 廣澤伸枝, 上原 明: PKC は心筋 gap junction channel protein (connexin) にどのような影響をあたえるか? 日本臨床生理学会雑誌 29(Suppl.): 136, 1999
6. 今永一成, 松村 健, 真山 崇, 廣澤伸枝: 糖尿病心筋における興奮伝播の c-AMP～PKA に対する反応の異常—gap junction からの検討. 日本病態生理学会雑誌 7(2): 31, 1998
7. 今永一成: 心筋における興奮伝導への PKC の影響—gap junction からの検討—. 日本心電学会誌「心電図」19(5): 597, 1999
8. Imanaga, I., Inai, T., Hirosawa, N., Shibata, Y., Uehara, A.: A cause of conduction disturbances in the diabetic heart -with special reference to gap junction. J. Mol. Cell. Cardiol. 31(11): A186, 1999
9. 今永一成, 廣澤伸枝, 松村 健, 真山 崇, 上原 明, 稲井哲一朗, 柴田洋三郎: 心筋ギャップ結合の調節と興奮伝播における役割. 心臓 32(3); 233-241, 2000
10. Imanaga, I., Hirosawa, N., Inai, T.: How is PKA-mediated phosphorylation of

- Cx43 modified by Ca and H ions? The 4th International symposium on the mechanisms involved in the cardioprotective effect of antiarrhythmic drugs and self ventricular defibrillation. Tel-Aviv, Israel, Abstract 11, 2000
11. Manoach, M., Tribulova, N., Varon, D., Zinman, T., Isaack, A., Shainberg, A., Imanaga, I.: Are the antiarrhythmic-defibrillating effects of d-sotalol due to or despite of the prolongation of the action potential duration? The 4th international symposium on the mechanisms involved in the cardio-protective effect of antiarrhythmic drugs and self ventricular defibrillation. Tel-Aviv, Israel, Abstract 14, 2000
 12. Imanaga, I., Hirosawa, N., Matsumura, K., Mayama, T.: Intracellular ionic strength of calcium and hydrogen affect PKA-mediated phosphorylation of connexin43 of cardiac gap junction. The 2nd Korea-Japan Join symposium, Seoul, Korea, Program & Abstract 29, 2000
 13. 今永一成, 廣澤伸枝, 松村 健, 真山 崇: 心筋 gap junction connexin 燐酸化への Ca^{2+} , H^+ の影響. 日本臨床生理学会雑誌 30(Suppl.): 114, 2000
 14. Imanaga, I., Hirosawa, N.: Effects of cyclic AMP on electrical intercellular decoupling and PKA mediated phosphorylation of gap junction connexin43 during the intercellular Ca overload and acidosis in the adult guinea-pig ventricular myocardium. Jpn. J. Physiol. 50(Suppl.): S70, 2000
 15. 今永一成: 心筋ギャップ結合コネキシン(Cx)43 の燐酸化への Ca イオン強度・酸性度の影響. 日本心電学会誌「心電図」20(5): 532, 2000
 16. Imanaga, I., Hirosawa, N., Matsumura, K., Mayama, T.: Effects of Ca ions and acidosis on phosphorylation of cardiac gap junction connexin 43 (Cx43) in adult guinea-pig heart. The 17th ISHR, Japanese Section, J. Mol. Cell. Cardiol. 32(11): A119, 2000
 17. 今永一成, 廣澤伸枝: 糖尿病心筋におけるギャップ結合コネキシンの異常. 日本病態生理学会雑誌 9(2): 39, 2000
 18. Imanaga, I., Hirosawa, N., Sakamoto, Y.: Factors influencing PKA-dependent phosphorylation of connexin43 of the cardiac gap junction. Jpn. J. Physiol, 51(Suppl.): S73-74, 2001
 19. Imanaga, I., Hirosawa, N., Hailin, Matsumura, K., Mayama, T., Sakamoto, Y.: Factors influencing phosphorylation of connexin of the cardiac gap junction -with reference of intercellular impulse conductivity. Symposium on Cardiac Electrophysiology and ionic Currents, The 17th World Congress of International Society for Heart Research (ISHR) Cardiovascular (Award:17th World Congress of ISHR, "Medal of Merit"), Winnipeg, Canada, J. Mol. Cell. Cardiol. 33(6): A50, 2001
 20. Imanaga, I., Hirosawa, N., Hailin, Matsumura, K., Mayama, T., Sakamoto, Y.: Factors influencing PKA-dependent phosphorylation of connexin43 of the cardiac gap junction. 2001

- International Gap Junction Conference, Hawaii, U.S.A., 2001, p88, 2001
21. 今永一成, 海琳, 廣澤伸枝, 小川皓一: 心筋ギャップ結合構成コネキシン 43 の磷酸化と生理的機能. 2001年コネキシン研究会, 三田市, プログラム 101, 2001
 22. Imanaga, I., Uehara, A., Hailin: Effects of activation of PKC and PKG on PKA-mediated phosphorylation of connexin43 extracted from ventricular muscle cells of adult guinea-pig heart. The 18th ISHR, Japanese Section, J. Mol. Cell. Cardiol. 33(Suppl.), 2001
 23. 今永一成, 上原 明, 海琳: 心筋ギャップ結合コネキシン、Cx43 の PKA 依存性磷酸化に与える因子: 日本心電学会誌「心電図」21(5), 669, 2001
 24. Imanaga, I., Hirose, N., Hailin, Sakamoto, Y., Matsumura, K., Mayama, T.: Phosphorylation of connexin43 and regulation of gap communication. Heart Cell Coupling and Impulse Propagation in Heart and Disease. Ed by DeMello, W.C., Janse, M., Kluwer Pub., Chapt. 8, 2002
 25. * Matsumura, K., Imanaga, I.: Effects of cyclic AMP on hypoxia-induced disturbances of conductivity on guinea-pig ventricular myocardium -with special reference to gap junction. Biochemica et Biophysica Acta, submitted, 2002
 26. * Imanaga, I., Matsumura K., Mayama, T: Significance of PKA and PKC dependent phosphorylation of connexin in the cardiac gap junction. Exp. Clin. Cardiol., submitted, 2002
 27. * Mayama, T., Imanaga, I.: Effects of d-Sotalol and Tedisamil, ClassIII-antiarrhythmic drugs, on physiological function of the cardiac gap junction. Exp. Clin. Cardiol., submitted, 2002
 28. * Kamegawa, Y., Hirose, N., Hailin, Imanaga I.: Abnormalities of intercellular impulse conductivity in the diabetic rat heart induced by Streptozotocine -with reference to the gap junction. Biochemica et Biophysica Acta, submitted, 2002
 29. Imanaga, I., Hailin, Matsumura, K., Mayama, T.: Effect of activation of PKC and PKG on the PKA-dependent phosphorylation of connexin43 of the cardiac gap junction. The 3rd Japan-Korea Joint Symposium on Brain Science, and Cardiac and Smooth Muscles Kurume, Abstract 42, 2002
 30. Imanaga, I., Hailin, Ogawa, K.: Significance of PKA and PKC in connexin43(Cx43) of the cardiac gap junction. Jpn. J. Physiol. 52(Suppl), 2002
 31. 今永一成, 海琳, 小川皓一: 心筋ギャップ結合コネキシンの発現、維持、消退の制御機序: 日本心電学会誌「心電図」22, 2002
 32. 今永一成, 海琳, 小川皓一: 心筋ギャップ結合コネキシン 43 の機能制御機構: 日本臨床生理学雑誌 32(Suppl):2002

③肥大心筋における興奮伝播異常とその病態、機序（児玉逸雄）

I. 研究目的

心臓では gap junction を介する心筋細胞間の電氣的・代謝的結合によって臓器全体としての興奮・収縮の協調が生まれ、血液ポンプとしての働きが可能となる。近年の分子生物学的研究により、gap junction チャネルを構成する蛋白（connexin）の構造とチャネル機能との関係が次第に明らかにされてきた。心筋細胞には主に 3 種類の connexin アイソフォーム（Cx43、Cx45、Cx40）が存在するが、それらの発現が心臓内の部位により異なることや、発生・分化あるいは病態に伴ってその発現様式が著しく変化することが知られるようになってきた。本研究では、1) 心肥大・心不全に伴う心室筋 gap junction の発現様式の変化（リモデリング）について、圧負荷心肥大モデル動物を用いて、免疫組織・細胞化学および電顕による形態的变化の観察と機能解析を組み合わせて検討するとともに、2) 心臓のペースメーカー組織である洞房結節における connexin アイソフォームの発現を単離細胞の免疫細胞化学により検討した。

II. 研究計画および材料と方法

1) 心肥大・心不全に伴う心筋 gap junction のリモデリング

モノクロタリン（MCT）皮下投与（60mg/kg）により誘発した肺高血圧に起因する右室肥大（RVH）ラットと、腹部大動脈縮窄術後の左室肥大（LVH）ラットを作成した。心室筋凍結組織切片と単離心室筋細胞を Cx43 に対する抗体を用いて免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて gap junction の発現分布を観察した。また、透過型電顕を用いて gap junction の微細形態を観察し、金コロイドを用いた免疫電顕も行った。一部の実験では、大動脈縮窄ラットに angiotensin type 1 受容体拮抗薬 losartan（10mg/kg/day）を経口投与し gap junction リモデリングにおける angiotensin の役割を検討した。また、MCT 投与ラットでは、細胞外電位マッピングにより右室自由壁における興奮伝導速度を計測した。

2) 洞房結節における connexin アイソフォームの発現

ウサギ洞房結節からペースメーカー細胞を単離し、Cx43、Cx45 および Cx40 に対する抗体を用いて免疫蛍光染色した。共焦点顕微鏡を用いて再構成した細胞の投影画像から、各アイソフォームの発現を定量的に解析した。

III. 研究成果

1) 心肥大・心不全に伴う心筋 gap junction のリモデリング

正常心室筋では Cx43 gap junction は細胞長軸端の介在板部分に局在していたが、MCT 投与ラットの肥大した右心室筋や大動脈縮窄ラットの肥大した左心室筋では介在板部分における Cx43 の発現に加えて正常では殆ど認められない細胞側面にも Cx43 の発現が多く認められた。一方、介在板部分における Cx43 の発現は、両心肥大モデルともに、肥大の進展に伴って介在板中央部分に存在する小型のギャップ結合が選択的に減少し、介在板単位面積当たりのギャップ結合密度が低下した。透過電顕を用いた微細形態観察では、肥大大心筋で観察される介在板から離れた部位に出現する gap junction は、一部は心室筋細胞の側

面どうしの接合構造を形成するが、他の一部は細胞内で輪状構造 (annular gap junction) をとることが認められ、これらの構造は介在板部分における正常な gap junction とともに Cx43 に対する抗体で標識されることが免疫電顕により確認された。Angiotensin 1 型受容体拮抗薬は、大動脈縮窄による左室肥大のみならず、心室筋 gap junction 配列のリモデリングも抑制した。

MCT 投与ラットの電気生理学実験では、肥大心室筋では心筋線維に沿った方向の伝導速度が有意に減少したが、それを横切る方向の伝導速度には変化を認めず、両者の比である anisotropic ratio が低下した。

2) 洞房結節における connexin アイソフォームの発現

洞房結節中心部に由来する小型の細胞では Cx45 と少量の Cx40 が細胞膜全体に散在していたが Cx43 の発現は認めなかった。Cx45 発現密度 (細胞投影面積で基準化) は洞房結節細胞の大きさとの間に逆相関を認め、洞房結節辺縁部に由来する大型の細胞では Cx45 の発現は少なかった。また一部の大型の洞房結節細胞では Cx45 と Cx43 の共発現を認めた。心房筋細胞では介在板部分に Cx43 の発現を認めたが Cx45 の発現は認められなかった。これらの結果から、Cx45 が洞房結節ペースメーカー細胞の同期化に中心的役割を果たし、洞房結節辺縁部の細胞に Cx45 と Cx43 が発現することは、これら connexin アイソフォームの共発現が心房筋への興奮伝播経路形成に関与している可能性が示唆された。

IV. 考案

1) 心肥大・心不全に伴う心筋 gap junction のリモデリング

RVH と LVH の 2 種類の圧負荷心肥大モデルの形態学的観察では、肥大心筋ではいずれのモデルにおいても共通する心室筋 gap junction の特徴的発現分布の変化が観察された。このうち、介在板から離れた部位に発現した gap junction の一部は細胞側面の結合構造を形成するが、他の一部は細胞間の結合機能を発揮しない細胞内構造 (annular gap junction) をとることが電顕観察により明らかになった。Annular gap junction の増加はリモデリング過程における gap junction の分解・再構成の亢進に関与している可能性が示唆される。Angiotensin 1 型受容体拮抗薬はこれらの変化を抑制したことから、gap junction リモデリングには angiotensin II が重要な役割を果たすと考えられた。更に、肥大心筋の介在板中央部分の小型 gap junction が減少して、介在板における gap junction 分布密度が低下したことは、電気生理学実験において心筋線維に沿った方向の興奮伝導速度が低下したこととよく一致している。このように心肥大・心不全の病態における gap junction 配列のリモデリングは、興奮伝導 anisotropy を変化させて不整脈発生の基質形成に関与することが示唆される。

2) 洞房結節における connexin アイソフォームの発現

洞房結節中心部に由来する小型の細胞に、心室筋や心房筋の主要な gap junction 蛋白である Cx43 が発現しないことは、他の動物種においても報告されている。大型の洞房結節細胞の一部に Cx45 と Cx43 の発現を認めたことは、組織標本の分界稜上に位置する洞房結節から心房筋への移行部において Cx45 と Cx43 が発現していることとよく一致しており、心房筋への興奮伝播経路を形成していると考えられる。Cx45 と Cx43 の共発現は 2 種類の connexin アイソフォームから構成される gap junction チャネル (heteromeric connexon

や heterotypic channel) 形成の可能性を示唆する。しかしながら、それらのチャネルが洞房結節のペースメーカー機能や心房筋への興奮伝導にどのような役割を果たしているかについては更に検討する必要である。

V. 研究成果の発表

1. Uzzaman, M., Honjo, H., Takagishi, Y., Emdad, L., Magee, A.M., Severs, N.J., Kodama, I.: Remodeling of gap-junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ. Res.* 86, 871-878, 2000.
2. Kodama, I., Uzzaman, M., Emdad, L., Takagishi, Y., Honjo, H., Toyama, J.: Gap junction remodeling in hypertrophied cardiac muscle. *Jpn. J. Electrocardiol.* 20(Suppl. 3), 93-98, 2000.
3. Emdad, L., Uzzaman, M., Takagishi, Y., Honjo, H., Kodama, I., Murata, Y.: Remodeling of cytoskeleton and mechanical junctions in the left ventricular hypertrophy of the rat. *Environ. Med.* 44, 110-112, 2000.
4. 児玉逸雄, Uzzaman, M., Emdad, L., 本荘晴朗, 高岸芳子: 心肥大に伴う gap junction 配列のリモデリング. *心臓* 32, 242-248, 2000.
5. Uzzaman, M., 児玉逸雄, 本荘晴朗, Emdad, L., 高岸芳子: 心肥大に伴う gap junction のリモデリング. *Therap. Res.* 21, 1257-1259, 2000.
6. Emdad, L., Uzzaman, M., Takagishi, Y., Honjo, H., Uchida, T., Severs, N.J., Kodama, I., Murata, Y.: Gap junction remodeling in hypertrophied left ventricles of aortic-banded rats; Prevention by angiotensin II type 1 receptor blockade. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 219-231, 2001.
7. Sasano, C., Takeuchi, S., Uzzaman, M., Emdad, L., Takagishi, Y., Honjo, H., Kodama, I.: Internalization of connexin43 gap junction in hypertrophied rat ventricular myocytes. *Environ. Med.* 45, 97-99, 2001.
8. 本荘晴朗, 児玉逸雄: Gap junction と興奮伝導. *Medical Topics Series 不整脈* 2001. 杉本恒明, 井上博 (編), メディカルレビュー社, pp. 12-21, 2001.
9. Honjo, H., Boyett, M.R., Copen, S.R., Takagishi, Y., Opthof, T.; Severs, N.J., Kodama, I.: Heterogeneous expression of connexins in rabbit sinoatrial node cells: correlation between connexin isotype and cell size. *Cardiovasc. Res.* 53, 89-96, 2002.
10. 本荘晴朗, 児玉逸雄: ギャップジャンクションチャネルの構造と心筋興奮伝導. *医学のあゆみ*. (in press) 2002.

④収縮の異常とその病態 (栗原 敏)

I. 研究目的

心臓のポンプ機能が破綻すると、全身の酸素需要量に見合った酸素の供給が行われなく

なり生体の運動機能が著しく損なわれる。心臓のポンプ機能の低下は、興奮発生の異常、興奮伝導の障害、収縮制御機構の障害の何れによってももたらされる。我々の研究は、収縮制御の分子機構を明らかにするとともに、病態時における細胞内イオン環境の変化が収縮制御機構にどのように影響するのかについてスキンド標本を用いて調べた。

II. 研究計画および材料と方法

1) 生筋を用いた実験

フェレットやラットの右心室から摘出した乳頭筋の表層細胞内にエクオリンを注入して、細胞内 Ca^{2+} 濃度 (Ca^{2+} transient, CaT) と収縮張力を同時測定し、以下の実験を行った。単収縮の経過中に筋長を急速に短縮させると、張力低下に一致して細胞内 Ca^{2+} 濃度は一過性に増加した (extra-Ca)。この Ca^{2+} は張力低下によってトロポニン C (TnC) から解離した遊離 Ca^{2+} を反映していることが報告されている。この extra-Ca は活動クロスブリッジの解離によって TnC の Ca^{2+} 親和性が低下することを表しているので、これを指標として、筋長による収縮調節機構 (Frank-Starling の法則) の分子メカニズムを調べた。

2) スキンド標本を用いた実験

ラットの右室肉柱を Triton X-100 で処理してスキンド標本を作成し、pCa-張力関係を測定して、それに対する筋長変化、溶液中の MgATP 濃度、ADP 濃度、pH、リン酸 (Pi) 濃度、TnC の Ca^{2+} 結合を増すピモベンダンの効果などを調べ、発生張力や Ca^{2+} 応答性が筋長によって変化するメカニズムを収縮蛋白系レベルで検討した。また、生理的条件下あるいは病態時における、 Ca^{2+} 応答性の筋長依存性を考察した。

III. 研究成果

1) 無傷筋の筋長を短縮させると細胞内 Ca^{2+} 濃度が一過性に上昇し (extra-Ca)、この extra-Ca は張力低下分が大きくなるに従い大きくなり、両者に正の相関が見られた。これは筋長の短縮ではなく張力低下が TnC の Ca^{2+} 親和性に影響することを示唆している。また、extra-Ca は筋長変化直前の細胞内 Ca^{2+} 濃度にも影響され、 Ca^{2+} 濃度が高いほど extra-Ca の振幅も大きかった。筋長変化直前の Ca^{2+} 濃度は TnC と結合している結合 Ca^{2+} 量に近似できるので、extra-Ca を筋長変化直前の細胞内 Ca^{2+} 濃度で除した正規化 extra-Ca を指標として用いた。正規化 extra-Ca と張力変化分との関係は、細胞外 Ca^{2+} 濃度の影響を受けた。細胞外 Ca^{2+} 濃度が高くなると正規化 extra-Ca は減少した。逆に、細胞外 Ca^{2+} 濃度を低下させると、正規化 extra-Ca は増加した。これは、細胞外 Ca^{2+} 濃度を増加させると、CaT が大きくなり筋長変化直前の細胞内 Ca^{2+} 濃度が高くなる。従って、形成される活動クロスブリッジも多くなる。このためクロスブリッジの結合によって TnC の Ca^{2+} 親和性がより高くなり、Tn と結合する Ca^{2+} が増えることが考えられる。このため、張力低下に伴う Ca^{2+} 親和性低下がおこりにくくなり extra-Ca が減少するものと考えられる。他方、細胞外 Ca^{2+} 濃度を減少させると、これとは逆のことが生じるので extra-Ca が大きくなるものと考えられた。

2) スキンド標本の実験結果：pCa-張力関係は筋の伸張によって左方移動し Ca^{2+} 感受性が増加した。溶液中の MgADP 濃度を 0.1 から 10mM まで増加させ、予め pCa-張力関係を左方移動させておくと、筋の伸張に伴う左方移動度が減少した。これは、MgADP 濃度を増して結合クロスブリッジを増加させ、クロスブリッジによる TnC の Ca^{2+} 親和性機構が十分に働い

ていると、筋長による Ca^{2+} 親和性調節機構が機能しにくくなることを示唆している。ピモベンダンは Ca^{2+} 感受性を増加させたが、筋の伸張による pCa-張力関係の左方移動度には影響しなかったので、TnC そのものは筋長効果には本質的に関与していないことが示唆された。溶液中の Pi を増したり、pH を低下させたりすると、pCa-張力関係は右方移動した。それぞれで筋を伸張すると伸張による pCa-張力関係の左方移動度が増加した。また、高 Pi、低 pH では最大張力が減少した。これらの結果は、Pi や H^+ の増加によって結合クロスブリッジ数が減少すると、収縮蛋白系の Ca^{2+} 感受性が低下し、pCa-張力関係に対する筋の伸張効果が顕著になることを示唆している。

IV. 考案

心筋の収縮は筋長依存性が骨格筋に比べて高く、僅かな還流血液量の変化によって拍出量が調節されている。心筋の発生張力の筋長依存性は、細胞膜を除去したスキンド標本でも観察されたので収縮蛋白系そのものに由来する性質であることがわかった。また、無傷筋を用いた実験から、結合クロスブリッジの数が増えると、TnC の Ca^{2+} 親和性が増加して TnC と Ca^{2+} の結合が増し、そのため遊離 Ca^{2+} は減少するので、CaT の減衰相は短縮する。また、スキンド標本の MgADP、Pi、pH の実験で観察されたように、 Ca^{2+} 感受性が低下すると筋長効果（筋の伸張による pCa-張力関係の左方移動）は増強される。細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下すると TnC と結合する Ca^{2+} は減少し、活動クロスブリッジ数が減少し筋長効果が大きくなる。

V. 研究成果の発表：

1. Fukuda, N., Ishiwata, S.: Effects of pH on spontaneous tension oscillation in skinned bovine cardiac muscle. *Pflugers Arch-Eur. J. Physiol.* 438: 125-132, 1999.
2. Ishikawa, T., Kajiwara, H., Kurihara, S.: Modulation of Ca^{2+} transient decay by tension and Ca^{2+} removal in hyperthyroid myocardium. *Am. J. Physiol.* 276: H289-H299, 1999.
3. Ishikawa, T., Kajiwara, H., Kurihara, S.: Alterations in contractile properties and Ca^{2+} handling in streptozotocin-induced diabetic rat myocardium. *Am. J. Physiol.* 277: H2185-H2194, 1999.
4. Fukuda, N., Kajiwara, H., Ishiwata, S., Kurihara, S.: Effects of MgADP on length dependence of tension generation in skinned rat cardiac muscle. *Circ. Res.* 86: e1-e6, 2000.
5. Kajiwara, H., Morimoto, S., Fukuda, N., Ohtsuki, I., Kurihara, S.: Effect of troponin I phosphorylation by protein kinase A on length dependence of tension activation in skinned cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272: 104-110, 2000.
6. Yagi, N., Saeki, Y., Ishikawa, T., Kurihara, S.: Cross-bridge and calcium behavior in ferret papillary muscle different thyroid states. *Jpn. J. Physiol.* 51: 319-326, 2001.

7. Fukuda, N., Sasaki, D., Ishiwata, S., Kurihara, S.: Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle. - Role of titin in the Frank-Starling mechanism of the heart -. *Circulation* 104: 1639-1645, 2001.
8. Fukuda, N., O-Uchi, J., Sasaki, D., Kajiwara, H., Ishiwata, S., Kurihara, S.: Acidosis or inorganic phosphate enhances the length dependence of tension in rat skinned cardiac muscle. *J. Physiol.* 536: 153-160, 2001.
9. 栗原 敏, 草刈洋一郎, 石川哲也, 本郷賢一: エクオリンを用いた心筋細胞内 Ca^{2+} 信号の測定. *Jpn. J. Electrocardiol.* 21: S-2-3~S-2-14, 2001.
10. 石川哲也, 望月正武, 栗原 敏: トロポニン C の Ca^{2+} 親和性変化を介した Ca^{2+} 拮抗剤によるフェレット心室筋の収縮制御. *心筋の構造と代謝-2000-* 23: 201-204, 2001.
11. Hongo, K., Kusakari, Y., Kawai, M., Konishi, M., Kurihara, S., Mochizuki S: Use of tetanus to investigate myofibrillar responsiveness to Ca^{2+} in isolated mouse ventricular myocytes. *Jpn. J. Physiol.* 52: 121-127, 2002.
12. Yagi, N., Saeki, Y., Kiyota, H., Kurihara, S.: Radial mass transfer of cross-bridges in a tetanized ferret heart muscle. *Pflugers Arch-Eur. J. Physiol.* 444: 38-42, 2002.
13. Hongo, K., Kusakari, Y., Kawai, M., Konishi, M., Mochizuki, S., Kurihara, S.: Relation between intracellular Ca^{2+} concentration in tetanized myocytes of rat and mouse. *Signal Transduction and Cardiac Hypertrophy*. In: Dhalla NS, Rupp H, Angel A, Pierce GN, Kluwer Academic Publishers, Boston. (in press)