

心臓病の基礎的・先駆的研究研究事業

**心筋細胞カルシウムシグナル異常の
統合的システムバイオロジー**

【研究の概要】

カルシウムは心臓の電氣的興奮と収縮に極めて重要な役割を果たしており、その動態の理解は、心臓の正常機能と不整脈ならびに心不全等の心臓病の病因を理解する上で必要不可欠である。心室筋細胞の特徴的な膜構築である細胞膜横行小管と筋小胞体 (SR) 膜が近接した接合膜構造において、電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル (LCC) とリアノジン受容体 (RyR) は Ca^{2+} を介して相互に開閉を調節している。これは、興奮収縮連関の駆動のみならず、活動電位波形や細胞内への Ca^{2+} 流入量、SR の Ca^{2+} 貯蔵量を監視・制御する分子機構として機能していることを、研究代表者らは示してきた。LCC および RyR と協働して Ca^{2+} シグナルの形成に関わる Ca^{2+} ポンプや Ca^{2+} 受容蛋白質を含めた『 Ca^{2+} シグナル関連蛋白質』は心筋の興奮収縮連関の調節の中心的役割を担っている。近年、代償性心肥大から不整脈や心不全に至る過程の基質として心筋細胞の接合膜構造の LCC および RyR における Ca^{2+} シグナル制御の異常が示唆されているが、十分な実証研究はなされていない。心筋細胞における Ca^{2+} シグナルの形成・調節機構は、細胞膜や細胞小器官の微細形態を基盤とした多彩な因子の複雑な協同作用によって成立しており、個々の分子機能の詳細な解析結果を積み重ねるだけではシステムを理解することは困難である。そこで本申請研究では、心疾患の病因解明を目指して、 Ca^{2+} シグナル関連蛋白質の正確な機能解析を行い、得られた分子機能データと細胞微細構造、分子局在を定量的に結び付けて4次元モデル化し、シミュレーションにより統合的に記述することを試みた。

本事業により、① 心筋細胞の Ca^{2+} シグナル制御における電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル (LCC) の役割と交感神経を介した Ca^{2+} シグナル制御のメカニズムを解析し、LCC と RyR 近傍の局所的 Ca^{2+} シグナルを介した LCC および β アドレナリン受容体/cAMP シグナル経路の制御機構を明らかにした。② RyR の心筋型アイソフォーム RyR2 の活性を解析し、カテコールアミン多形性心室頻拍 (CPVT) 変異を有する RyR2 では Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出 (CICR) 活性が増大していることを見出した。③ 不整脈突然死を示す拡張型心筋症 (DCM) モデルマウスを用いた解析から、収縮力の低下によって代償的に亢進したレニン・アンジオテンシン系が K チャネルの発現低下を招き、APD を延長し APD 間に心筋細胞内に流入する Ca^{2+} を増加させることにより筋小胞体の Ca^{2+} 過負荷と自発的 Ca^{2+} 遊離の増加から不整脈発生に至ることを見出した。④ 圧負荷モデル心筋を用いて心筋線維化に伴う興奮収縮連関の変化を解析し、線維化に伴う心筋細胞間情報伝達機構の破綻が張力発生低下を惹起することを明らかにした。⑤ Ca^{2+} シグナル制御システムとして統合的に理解するために、心筋細胞の微細構造を3次的に忠実に構成したモデルと心筋線維の興奮伝導モデルを作成し、活動電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度動態の計算や Brugada 症候群に特徴的な心電図の再現に成功した。⑥ 偏微分方程式で表される現象を取り扱えるようにするために、Physiological Hierarchy Markup Language (PHML) を用いたヒト心室筋の活動電位モデルの実装を行った。

上記の通り、心筋 Ca^{2+} シグナルの詳細な解析とモデル化により病態に伴う Ca^{2+} シグナル異常を定量的に示し、診断や治療法の開発にも繋がる新規知見を数多く得ることができた。

赤羽 悟美	東邦大学医学部薬理学講座・准教授	東京大学 ・博士(薬学)	研究の統括、電気生理学的手法による心筋電気活動の測定、カルシウムチャネルの機能解析
倉智 嘉久	大阪大学大学院医学系研究科・教授	東京大学 ・医学博士	心筋イオンチャネルの神経性制御機構の解析、微細形態を基盤とした細胞機能シミュレーション
呉林なごみ	順天堂大学医学部・准教授	お茶の水女子大学・医学博士	分子可視化法などを用いた細胞内カルシウム濃度変化の測定、リアノジン受容体の機能解析
草刈洋一郎	東京慈恵会医科大学医学部・講師	東京慈恵会医科大学・医学博士	収縮系蛋白質の機能解析、心不全筋の機能解析、電子顕微鏡を用いた心筋細胞微細構造の計測

研究報告

I 研究目的

心筋細胞において、電氣的興奮が細胞内Ca²⁺シグナルを介して心筋細胞の収縮を制御する連続的な反応がおこる。これは興奮収縮連関と呼ばれる。この過程では、膜電位変化をCa²⁺シグナルに変換する素子としてL型Ca²⁺チャネル(LCC)とリアノジン受容体(RYR)が、Ca²⁺シグナルを筋収縮に変換する素子としてトロポニン、トロポミオシンなどの収縮系蛋白質が重要である。本研究の目的は、このような生命現象を定量的に解析し、システムバイオロジーの視点から不整脈および心不全発生機転の基質となる病的な細胞機能変化を理解し、病態の新しい概念を開くことである。この目的のために、次の3つの課題を設定した。

1. 心筋細胞の興奮収縮連関の細胞内微細構造を基盤とした統合的理解

LCCとRYRの近傍でおこる局所的なCa²⁺シグナルは、心筋細胞全体でおこるグローバルなCa²⁺シグナルの形成のみならず、活動電位波形の形成にも極めて重要な役割を果たしている。RyR2は、細胞質および小胞体内の二重のCa²⁺による制御を受けるがその全容は未だ明らかではない。局所的なCa²⁺シグナル制御においては、特にLCCとRYRの活性化および不活性化機構、そしてそれらの空間的な配置が重要な要素である。本研究では、LCCとRYRの活性化・不活性化機構を解析し、解析結果を基に数理モデルを用いた統合的シミュレーションを行い、心筋細胞のCa²⁺シグナルの形成・調節機構の究明を目指す。

心筋細胞はギャップジャンクションにより互いに結合し機能的合体を形成しており、心筋細胞どうしの協調性が心機能に大きく影響する。心筋細胞間の活動電位発生や興奮収縮連関の協調性が障害されると、異所性興奮の発生による不整脈や心収縮力の低下による心不全を誘発する。そこで、多細胞系の解析を行いシミュレーションモデルを活用して検証することにより、不整脈や心不全の発生機構の理解に繋げる。

2. 神経性制御の理解

不整脈の発生や心不全の進展過程において自律神経系、特に交感神経性制御の関与が研究されている。しかしながら、生理的な交感神経性調節機構には未だ多くの未解決な問題が残されている。シグナル伝達による Ca^{2+} シグナル関連分子の機能制御機構と、その生理学的意義を定量的に理解するために、項目 1. の成果である微細構造を基盤とする Ca^{2+} 動態のモデル化に、神経制御のシグナル機構をさらに導入する。

3. 病態の理解

病的状態の心筋細胞において、活動電位を形成するイオンチャネル・トランスポーターの発現・活性の変化、細胞間電気結合の低下、細胞内 Ca^{2+} ハンドリングの質的・量的異常、変化などがみとめられる。このような心筋細胞の変化は、構造的・電気的リモデリングと呼ばれ、致死的不整脈の発生基質となる。病態心筋において、心筋線維化は心臓の電氣的興奮や収縮に大きな影響を及ぼすことが知られている。しかしながら、一連の興奮収縮連関における心筋線維化の影響については未だ十分に明らかにされていない。そこで本研究では、病態モデル動物として拡張型心筋症 (DCM)モデルマウスを用いて、DCM 原因変異から心筋細胞のカルシウム動態異常および不整脈に至る過程を包括的に明らかにし、さらに心筋線維化に伴う興奮収縮連関機構の変化とメカニズムを明らかにし、心機能の液性調節因子 (アンジオテンシン、ノルアドレナリン等) や薬物の効果について、シミュレーションと実際のデータを比較して検証する。

II 研究計画および材料と方法

1. 心筋細胞の興奮収縮連関の細胞内微細構造を基盤とした統合的理解

1) 心筋 LCC の Ca^{2+} 透過性と開閉調節機構：心臓に発現する 2 種類の $\text{LCC}\alpha_1$ サブユニット ($\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$) を β_{2c} サブユニットおよび α_2/δ_1 サブユニットと共に BHK 細胞または ts-A201 細胞に発現させ、パッチクランプ法により活性化・不活性化機構及び Ca^{2+} 透過性を解析した。さらに、 $\text{Ca}_v1.2$ と $\text{Ca}_v1.3$ の間で Ca^{2+} 透過性の差異を担うアミノ酸を同定するため、 $\text{Ca}_v1.2$ と $\text{Ca}_v1.3$ の間でアミノ酸を入れ替えた変異体を作成し、解析を行った。

2) RyR2 の制御機構の解析：RyR2 変異体を心筋細胞に発現させることは困難なため、代わりに HEK293 細胞を用いた。マウス心筋からクローニングした RyR2 遺伝子に CPVT 変異を導入し、HEK 細胞に安定遺伝子導入し、doxycycline 投与により RyR2 の発現を誘導した。HEK 細胞の自発的な Ca^{2+} 遊離は、蛍光タンパク質型カルシウムセンサーを用いて、ニポウディスク型共焦点レーザー顕微鏡と二波長蛍光観察システム (W-View) を介して観察した。RyR2 活性は、HEK 細胞からミクロゾームを調製し ^3H リアノジン結合法により解析した。

3) 解剖学的・組織学的解析に基づいた心筋モデルの構築：下記のモデル化とコンピューターシミュレーションを実施した。① 細胞内の微細構造を考慮に入れた心筋細胞モデルの構築。② 心筋組織モデルの作成と興奮伝播のシミュレーション。③ 偏微分方程式で表される現象を取り扱えるようにするために、Markup Language (Physiological Hierarchy Markup Language : PHML)を用いたヒト心室筋のモデル化。

2. 神経性制御の理解

- 1) 心筋 LCC と Ca^{2+} シグナルの連関機構： マウスから急性単離した心室筋細胞および心房筋細胞を用いて、パッチクランプ法により心筋細胞内の Ca^{2+} シグナルの拡散距離をコントロールしながら、細胞内 Ca^{2+} の拡散距離と LCC の活性の関係を解析した。さらに、交感神経を介した Ca^{2+} シグナル制御のメカニズムについて、LCC 電流および Ca^{2+} シグナルと β 受容体/アデニル酸シクラーゼ/cAMP シグナル経路の相互調節機構を解析した。
- 2) 自律神経を介した心拍リズム制御機構： ムスカリン性アセチルコリン受容体 (M2R) 刺激により活性化されるムスカリン性カリウム (K_{ACh}) 電流の電位依存性と脱感作現象を理解するために、実験とシミュレーションを実施した。次に、新たに構築した心筋細胞 K_{ACh} 電流のモデルを洞房結節細胞のモデルに導入し、アセチルコリン適用時の心臓電気現象の応答をシミュレーションすることにより、 K_{ACh} 電流の特性の生理学的意義を検討した。

3. 病態の理解

- 1) 拡張型心筋症(DCM)マウス心筋細胞におけるカルシウム動態異常から不整脈に至る過程の解析： DCM モデルマウスとして筋原線維の Ca^{2+} 感受性低下を示す *TNNT2* ΔK210 ホモ接合体 (九州大学森本幸生博士より供与) を用いた。定期的に心電図を記録し、1~3 か月齢において心臓を摘出し、左心室筋に Di-4-ANEPPS を負荷し活動電位記録を、また Rhod 2 を負荷して Ca^{2+} シグナルを記録した。心筋サンプルを用いて蛋白発現量と遺伝子発現の解析を行った。さらに単離心筋細胞を調製し、電流解析と形態解析を行った。
- 2) 線維化を伴った心臓ならびに多細胞心筋組織標本における興奮収縮連関機構の破綻のメカニズム： ラット肺動脈狭窄モデルを作成し、術後 4~6 週で心臓を摘出した。右室乳頭筋を用いて Ca^{2+} 感受性発光蛋白エクオリンによる細胞内 Ca^{2+} 測定と等尺性収縮張力の同時測定を行った後、乳頭筋短軸切片標本をマッソン-トリクローム染色して線維化面積と細胞面積を測定した。同一標本を用いてコネキシン 43 (Cx43) の免疫組織染色を行い、イオン動態・活動電位・収縮における線維化の影響を定量化し、さらに線維化の進展度や各種イオン関連蛋白の増減と上記結果と比較検討した。また、右室自由壁を摘出し mRNA 解析および DNA マイクロアレイを施行した。
- 3) 心肥大および心房細動のモデル解析： TRPM4 チャネル機能を数理モデル化し、心房細動における TRPM4 チャネルの役割を解析した。さらに、第三群抗不整脈薬よってもたらされる hERG チャネル機能の変化を計測し、モデル化とシミュレーションを実施した。

III 研究成果

1. 心筋細胞の興奮収縮連関の細胞内微細構造を基盤とした統合的理解

- 1) 心筋 LCC の Ca^{2+} 透過性と開閉調節機構： 心臓の自動能と興奮伝播における心臓に発現する 2 種類の $\text{LCC}\alpha_1$ サブユニット ($\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$) の機能的役割を明らかにする目的で、両 Ca^{2+} チャネルの活性化・不活性化機構と Ca^{2+} 透過性を比較検討した。その結果、 $\text{Ca}_v1.3$ は $\text{Ca}_v1.2$ に比較して、活性化・不活性化の電位依存性が過分極側へシフトしていることを確認し、新たに電位依存性不活性化速度が遅く、不活性化からの回復速度が速いことを見出した。これらのデータを用いたコンピューターシミュレーションにより、ペースメーカー

一活動電位における $\text{Ca}_v1.2$ と $\text{Ca}_v1.3$ の役割を推測した。さらに、 $\text{Ca}_v1.3$ は Ca^{2+} に対する選択性が低いことを見出した。そこで Ca^{2+} 透過性の差異を担うアミノ酸を同定し、 $\text{Ca}_v1.3$ チャネル孔を形成する領域が開閉調節と Ca^{2+} 透過性に関わっていることを明らかにした。

2) RyR2 の制御機構の解析： 野生型 RyR2 を安定発現させた HEK 細胞は自発的な Ca^{2+} 振動を示し、細胞質の Ca^{2+} 上昇とともに小胞体内の Ca^{2+} の低下が観察された (図 1)。CPVT 変異を導入した RyR2 について同様な実験を行ったところ、多くの変異体で細胞質 Ca^{2+} シグナルの振幅の低下および Ca^{2+} 振動の頻度の上昇が観察された。一方、小胞体内 Ca^{2+} シグナルは変異体 RyR2 において静止時、 Ca^{2+} 遊離時ともに低下していた。 [^3H]リアノジン結合法により RyR 活性を調べたところ、野生型では二相性の Ca^{2+} 濃度依存性を示した。変異体では活性化 Ca^{2+} 感受性および最大値の上昇が観察された。以上より、CPVT 変異体では CICR 活性の著明な増大が病態の原因である可能性が示唆された。

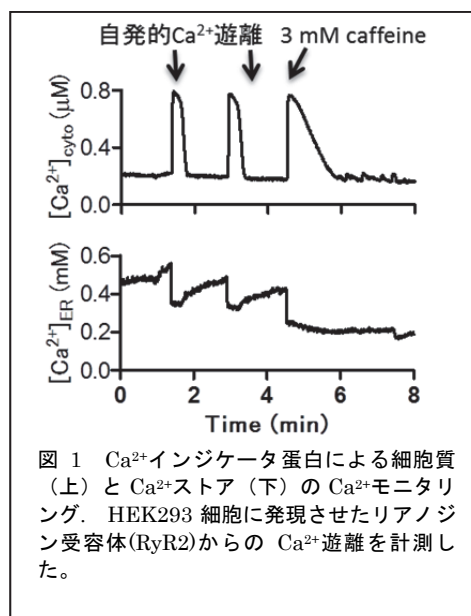


図 1 Ca^{2+} インジケータ蛋白による細胞質 (上) と Ca^{2+} ストア (下) の Ca^{2+} モニタリング。HEK293 細胞に発現させたリアノジン受容体(RyR2)からの Ca^{2+} 遊離を計測した。

3) 解剖学的・組織学的解析に基づいた心筋モデル

の構築： 心筋細胞の微細構造を 3 次元的に忠実に構成したモデルを用いて、活動電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度動態が計算できるようになった。心筋線維の興奮伝導モデルを作成し、この心筋線維モデルを用いて、介在板への Na^+ チャネルの偏在化が phase-2 reentry の発生に寄与する可能性を示し、Brugada 症候群に特徴的な心電図 (ST 上昇) を再現した。さらに、偏微分方程式で表される現象を取り扱えるようにするために、我々のグループで開発を進めているモデルシミュレーションプラットフォームに準拠した Physiological Hierarchy Markup Language (PHML) によってヒト心室筋細胞の活動電位モデルの実装を行った。このモデルを用いて、不全心での Na^+ - Ca^{2+} 交換器 (NCX) の増強と K^+ 電流の減弱が早期後脱分極 (EAD) や遅延後脱分極 (DAD) の発生に寄与することを再現した。

2. 神経性制御の理解

1) 心筋細胞におけるカルシウムシグナルと β 受容体/アデニル酸シクラーゼ/cAMP シグナルの相互調節機構： アデニル酸シクラーゼのサブタイプの中で、心室筋細胞には主として Ca^{2+} 抑制性アデニル酸シクラーゼ (AC5 および AC6) が発現している。しかしながら、 β 受容体/アデニル酸シクラーゼ/cAMP シグナル経路と LCC や Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出機構に由来する Ca^{2+} シグナルが相互にどのように調節しているかについては明らかではない。そこで我々は、パッチクランプ法により心筋細胞内の Ca^{2+} シグナルの拡散距離をコントロールしながら、LCC 電流および Ca^{2+} シグナルと β 受容体/アデニル酸シクラーゼ/cAMP シグナル経路の相互調節機構を解析した。その結果、心室筋細胞において、 β 受容体/アデニル酸シクラーゼ/cAMP シグナル経路は、 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出機構に由来する Ca^{2+} シグナルを介して抑制的に制御されていることが明らかになった。

2) 自律神経を介した心拍リズム制御機構： M2R の活性化薬の効果を系統的に評価するこ

とにより、薬物毎に各膜電位における K_{ACh} チャネル電流の増加の程度が大きく異なり、脱分極時に強くチャネルを活性化させる薬物と静止膜電位付近で強くチャネルを活性化させる薬物の2群に大別されることを明らかにした。さらに ACh と M2R 間の相互作用モデルと G 蛋白質と K_{ACh} チャネルの相互作用モデルに異なる2つの解離定数を導入することで短期脱感作を再現できた。活動電位シミュレーションから、心筋細胞 K_{ACh} 電流の短期脱感作は迷走神経緊張時における心停止に対する安全機構として働いていることが示唆された。

3. 病態の理解

1) 拡張型心筋症(DCM)マウス心筋細胞におけるカルシウム動態異常から不整脈に至る過程の解析: DCM マウスは半減期 70~90 日の半減期で死亡するが、1 か月齢では低死亡率で運動性も WT と差がなく、2 か月齢ではうっ血性心不全の徴候はないまま不整脈突然死する個体が多かった。3 か月齢では、心不全の徴候を示して死亡する個体が増えた。病態の伸展に伴い、心室筋細胞において Ca^{2+} transient peak の増大、 Ca^{2+} wave, Ca^{2+} spark の頻度増加がみられると共に、活動電位持続時間 (APD)の延長、自発的活動電位の頻度増加もみられた。さらに、2 か月齢から複数の K^+ チャネルおよび調節サブユニット ($K_{v4.2}$, $K_{v1.5}$, $KChIP2$) の減少が進んでいることが分かった。また K^+ チャネルの減少は、巨大化した細胞で顕著であることが示唆された。これらの変化の多くは、アンジオテンシン受容体拮抗薬の投与により抑制された。

2) 線維化を伴った心臓ならびに多細胞心筋組織標本における興奮収縮連関機構の破綻のメカニズム: ラット肺動脈狭窄モデル (Banding Model) 心筋の乳頭筋を摘出し、細胞内 Ca^{2+} 濃度と張力の同時測定を行った。マッソン染色結果から Banding Model を線維化のない肥大心筋 (Hypertrophy) 群と線維化のある肥大心筋群 (Fibrosis) に分類した。右室圧負荷心肥大によって発症する線維化には中間状態がなく、明確に線維化の有無で二相性に分類できるモデルであることが確認された (図2)。一方、乳頭筋径と細胞短軸面積は両群で同等であり、心肥大は同等であると考えられた。

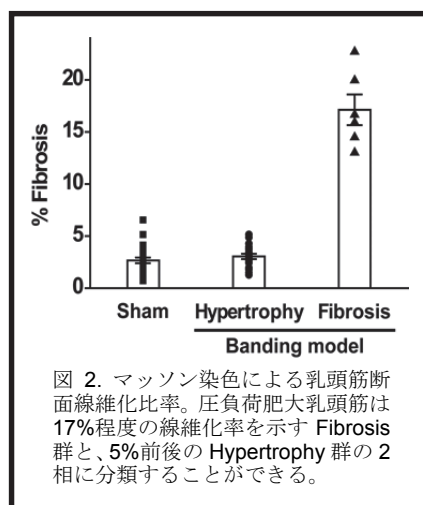


図2. マッソン染色による乳頭筋断面線維化比率。圧負荷肥大乳頭筋は17%程度の線維化率を示す Fibrosis 群と、5%前後の Hypertrophy 群の2相に分類することができる。

機能評価を分類したところ、Hypertrophy 群では張力が保たれていたのに対し、Fibrosis 群では張力が著しく減弱していた。細胞内 Ca^{2+} 濃度がピークに至るまでの時間は、Fibrosis 群でほぼ2倍に延長していた。このことは、線維化によりイオンの情報伝達機構が破綻した結果として張力減弱が起こっていることを示唆した (図3)。線

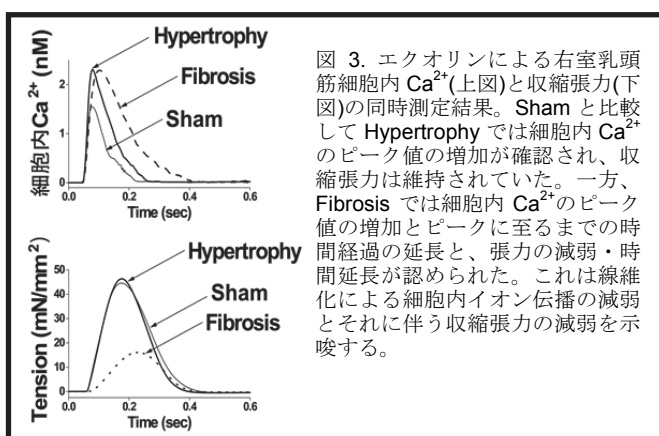


図3. エクオリンによる右室乳頭筋細胞内 Ca^{2+} (上図)と収縮張力(下図)の同時測定結果。Sham と比較して Hypertrophy では細胞内 Ca^{2+} のピーク値の増加が確認され、収縮張力は維持されていた。一方、Fibrosis では細胞内 Ca^{2+} のピーク値の増加とピークに至るまでの時間経過の延長と、張力の減弱・時間延長が認められた。これは線維化による細胞内イオン伝播の減弱とそれに伴う収縮張力の減弱を示唆する。

維化心筋標本では活動電位持続時間が著しく延長していた。生化学的検索から、Nav1.5 の mRNA は Fibrosis 群で有意に増加していた。一方で、Ca²⁺関連蛋白 (Cav1.2、RyR、SERCA、PLB、NCX) の mRNA は Fibrosis 群で有意に減少していた。線維化心筋では介在板の消失に伴いCx43発現が消失しており、細胞間情報伝達機構の破綻が確認

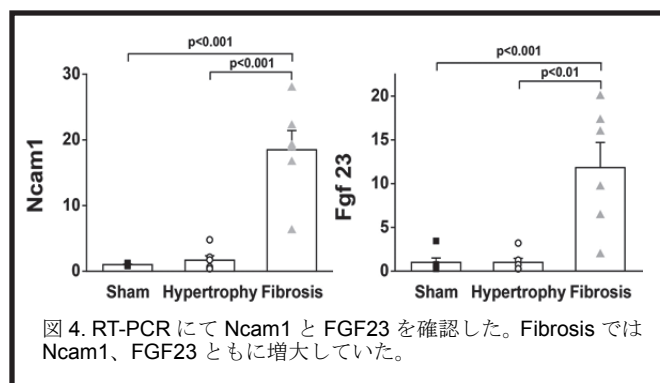


図4. RT-PCRにてNcam1とFGF23を確認した。FibrosisではNcam1、FGF23ともに増大していた。

された。線維化の有無で機能変化と形態変化が二相性に分類できることが確認されたので、これを線維化発症モデルとしてDNAマイクロアレイを施行したところ、Ncam1とFGF23の発現量に両群間で有意差があり、線維化特異的因子であることが示唆された(図4)。

3) 心肥大および心房細動のモデル解析： ヒト心房筋モデルへTRPM4チャンネルモデルを導入し、活動電位シミュレーションを実施した。細胞内Ca²⁺濃度依存的な脱分極が認められた。本結果は、細胞内Ca²⁺濃度依存的な期外収縮の発生の可能性を示唆する。さらに、アミオダロンやニフェカランなどの第三群抗不整脈薬はhERGチャンネル阻害作用とファシリテーション作用を併せ持つことを明らかにした。ファーマコフォア解析を行い、ファシリテーション作用に関わる薬物構造を決定した。実験的に得られたデータを用い、抗不整脈薬のI_{Kr}ファシリテーション作用は過剰な活動電位長延長作用によるEAD形成に起因した催不整脈リスクを下げる可能性を示した。

IV 考察

心筋細胞においてCa²⁺シグナルは、細胞膜や細胞内小器官の微細形態を基盤としたCa²⁺シグナル制御分子の局在と分子間協同作用により精緻に制御されており、その制御の破綻は興奮伝導の異常や収縮不全をもたらす。心筋細胞のCa²⁺シグナル制御の異常は、不整脈や心不全の成因として重要であるが、数多くの分子と制御経路が緊密に連携しており、原因と結果が複雑に絡み合っているため、個々の実験結果からメカニズムを理解することは困難である。Ca²⁺シグナルの形成・調節機構とそれらの破綻のメカニズムを理解するためには、個々の分子の機能と局在を統合したシステムの理解が必要である。

心筋細胞のCa²⁺シグナル制御におけるLCCの役割と交感神経を介したCa²⁺シグナル制御のメカニズムを明らかにする目的で、マウスの心筋細胞におけるアデニル酸シクラーゼとLCCの連関機構を解析し、心室筋細胞においてはCICRの拡散を介してLCCの活性およびCa²⁺抑制性アデニル酸シクラーゼの活性が抑制的に制御されていること、さらにLCCとRyR間のCICRを介したナノスペースのCa²⁺シグナルを介してLCCが促進的調節を受けていることを見出した。これに対し、心房筋ではそれらの抑制的制御が観察されず、心室筋とは異なる制御機構の存在が示唆された。

心筋型RyR2の機能解析から、CPVT変異を有するRyR2におけるCICR活性の増大が不整脈発症の原因となることが示唆された。CICR活性の増大パターンは変異体によって異

なっており、このことが病態の多様性や重症度と関連すると考えられる。RyR2 の CICR 活性の変化は先天異常のみならず、DCM などの原因疾患により二次的にも生じることから、リン酸化や酸化ストレスなどによる修飾機構も考慮することが必要であると考えられた。

不整脈突然死を示す本 DCM モデルマウスでは、収縮力の低下がレニン・アンジオテンシン系などの関与により複数の K^+ チャネルの発現低下を招き、APD 延長と Ca^{2+} 流入量の増大による筋小胞体の Ca^{2+} 過負荷をもたらし、自発的 Ca^{2+} 遊離の増加から不整脈発生に至ると考えられた。さらに交感神経系の活性化、心拡張、心筋細胞サイズの不均一化、線維化はこの不整脈発生を促進することが予測された。

細胞内 Ca^{2+} 濃度と張力の同時測定を行うことで、発生張力は線維化心筋で著明に低下することが明らかになった。多細胞標本を用いて一連の興奮収縮連関における線維化病態解明を行うことで、細胞間情報伝達機構の破綻が最終的な張力発生低下を惹起することが明らかになった。多細胞標本での張力発生とその病態発症機構を明らかにすることは、単一細胞から多細胞のへ至るシミュレーションモデル構築への重要なデータを供与することに繋がると考えられる。Ncam1 と FGF23 は、これまで心肥大に関連して発現が上昇することが報告されているが、我々は肥大でなく線維化特異的に発現が上昇することを見出した。今後は、候補因子の心筋細胞レベルでの興奮収縮連関への影響、特に Ca^{2+} 関連蛋白発現への影響を明らかにすることで、組織レベルと細胞レベルでの階層を跨いだ心筋興奮収縮連関における線維化の病態解明を行っていく必要がある。

本研究では、心筋細胞の電気生理学的理解をさらに推し進め、新たに明らかになった分子・細胞機能の理論研究も並行して進めることで、LCC や RyR をはじめとする Ca^{2+} シグナル関連蛋白の役割を、従来以上の明確さで理解することができた。さらに心不全や不整脈の発症と進展に伴う Ca^{2+} シグナルの異常を定量的に示すことができ、診断や治療法の開発にも繋がる新規知見を数多く得た。特に本研究においては構造に着目した研究を行い、イオンチャネルの細胞内局在と細胞間の構造や、組織を構築している解剖学的・機能的組織構造が、心臓の電気現象の頑健性と密接に関連していることを示す事ができた。これらは従来の生命科学の還元的アプローチの限界を乗り越えた成果と言える。よく研究された心筋細胞の Ca^{2+} シグナルにおいてそのような成果をあげることが出来た意義は大きく、今後、 Ca^{2+} シグナルが制御する様々な細胞機能制御の解明においてもこのアプローチの有効性を期待させるものであると言える。

最後に、本研究事業の遂行にあたり多大なるご支援を賜りました公益財団法人車両競技公益資金記念財団に心より感謝申し上げます。

V 研究成果の発表

【雑誌】

1. Teng J, Iida K, Ito M, Izumi-Nakaseko H, Kojima I, **Adachi-Akahane S**, Iida H: Role of glycine residues highly conserved in the S2-S3 linkers of domains I and II of voltage-gated calcium channel α_1 subunits. **Biochim Biophys Acta**. 1798: 966-974, 2010.
2. Tanaka H, Namekata I, Ogawa T, Tsuneoka Y, Komikado C, Takahara A, Iida-Tanaka N,

Izumi-Nakaseko H, Tsuru H, **Adachi-Akahane S**: Effects of S(+)-efonidipine on the rabbit sinus node action potential and calcium channel subunits $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ and $Ca_v3.1$. **Eur J Pharmacol.** 649: 263-267, 2010.

3. Mitsumori Y, Nakamura Y, Hoshiai K, Nagayama Y, **Adachi-Akahane S**, Koizumi S, Matsumoto M, Sugiyama A: In vivo canine model comparison of cardiovascular effects of antidepressants milnacipran and imipramine. **Cardiovasc Toxicol.** 10: 275-282, 2010.

4. Murayama T, **Kurebayashi N**: Two ryanodine receptor isoforms in nonmammalian vertebrate skeletal muscle: possible roles in excitation-contraction coupling and other processes. **Prog Biophys Mol Biol.** 105, 134-144, 2010.

5. Sakamoto Y, Ishijima M, Kaneko H, **Kurebayashi N**, Ichikawa N, Futami I, Kurosawa H, Arikawa-Hirasawa E: Distinct mechanosensitive Ca^{2+} influx mechanisms in human primary synovial fibroblasts. **J Orthop Res.** 28, 859-864, 2010.

6. Song X, **Kusakari Y**, Xiao CY, Kinsella SD, Rosenberg MA, Scherrer-Crosbie M, Hara K, Rosenzweig A, Matsui T: mTOR attenuates the inflammatory response in cardiomyocytes and prevents cardiac dysfunction in pathological hypertrophy. **Am J Physiol Cell Physiol.** 299: C1256-1266, 2010.

7. 呉林なごみ, 村山尚: リアノジン受容体. **生体の科学**, 61: 444-445, 2010

8. Inanobe A, Nakagawa A, Matsuura T, **Kurachi Y**: A structural determinant for the control of PIP₂ sensitivity in G protein-gated inward rectifier K^+ channels. **J Biol Chem.** 285: 38517-38523, 2010.

9. Ikushima M, Ishii M, Ohishi M, Yamamoto K, Ogihara T, Rakugi H, **Kurachi Y**: ANG II inhibits insulin-mediated production of PI 3,4,5-trisphosphates via a Ca^{2+} -dependent but PKC-independent pathway in the cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 299: H680-689, 2010.

10. Murakami S, Suzuki S, Ishii M, Inanobe A, **Kurachi Y**: Cellular modelling: experiments and simulation to develop a physiological model of G-protein control of muscarinic K^+ channels in mammalian atrial cells. **Philos Trans A Math Phys Eng Sci.** 368: 2983-3000, 2010.

11. Ait-Haddou R, **Kurachi Y**, Nomura T: On calcium-buffer dynamics within the excess buffer regime. **J Theor Biol.** 264: 55-65, 2010.

12. Aita Y, **Kurebayashi N**, Hirose S, Maturana AD: Protein kinase D regulates the human cardiac L-type voltage-gated calcium channel through serine 1884. **FEBS Lett.** 585: 3903-3906, 2011.
13. Horiuchi-Hirose M, Kashihara T, Nakada T, **Kurebayashi N**, Shimojo H, Shibazaki T, Sheng X, Yano S, Hirose M, Hongo M, Sakurai T, Moriizumi T, Ueda H, Yamada M: Decrease in the density of t-tubular L-type Ca²⁺ channel currents in failing ventricular myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 300: H978-988, 2011.
14. Kakizawa S, Yamazawa T, Chen Y, Ito A, Murayama T, Oyamada H, **Kurebayashi N**, Sato O, Watanabe M, Mori N, Oguchi K, Sakurai T, Takeshima H, Saito N, Iino M: Nitric oxide-induced calcium release via ryanodine receptors regulates neuronal function. **EMBO J.** 31: 417-428, 2011.
15. Murayama T, **Kurebayashi N**, Oba T, Oyamada H, Oguchi K, Sakurai T, Ogawa Y: Role of Amino-terminal Half of the S4-S5 Linker in Type 1 Ryanodine Receptor (RyR1) Channel Gating. **J Biol Chem.** 286, 35571-35577, 2011.
16. Haraguchi R, Ashihara T, Namba T, Tsumoto K, Murakami S, **Kurachi Y**, Ikeda T, Nakazawa K: Transmural dispersion of repolarization determines scroll wave behavior during ventricular tachyarrhythmias: A simulation study. **Circ J.** 75: 80-88, 2011.
17. Furutani K, Yamakawa Y, Inanobe A, Iwata M, Ohno Y, **Kurachi Y**: A mechanism underlying compound-induced voltage shift in the current activation of hERG by antiarrhythmic agents. **Biochem Biophys Res Commun.** 415: 141-146, 2011.
18. Inanobe A, Nakagawa A, **Kurachi Y**: Interactions of cations with the cytoplasmic pores of inward rectifier K⁺ channels in the closed state. **J Biol Chem.** 286: 41801-41811, 2011.
19. Inanobe A, Matsuura T, Nakagawa A, **Kurachi Y**: Inverse agonist-like action of cadmium on G-protein-gated inward-rectifier K⁺ channels. **Biochem Biophys Res Commun.** 407: 366-371, 2011.
20. Tsumoto K, Ashihara T, Haraguchi R, Nakazawa K, **Kurachi Y**: Roles of subcellular Na⁺ channel distributions in the mechanism of cardiac conduction. **Biophys J.** 100: 554-563, 2011. PubMed PMID: 21281569
21. Yamashita T, Inoue H, Okumura K, Kodama I, Aizawa Y, Atarashi H, Ohe T, Ohtsu H, Kato T, Kamakura S, Kumagai K, **Kurachi Y**, Koretsune Y, Saikawa T, Sakurai M, Sato T, Sugi K, Nakaya H, Hirai M, Hirayama A, Fukatani M, Mitamura H, Yamazaki T, Watanabe E, Ogawa S: J-RHYTHM II Investigators. Randomized trial of angiotensin II-receptor blocker vs. dihydropyridine calcium channel blocker in the treatment of paroxysmal atrial fibrillation with

hypertension (J-RHYTHM II study). **Europace**. 13: 473-479, 2011.

22. Morimoto S, Ito M, Oda S, Sugiyama A, Kuroda M, **Adachi-Akahane S**: Spinal mechanism underlying the antiallodynamic effect of gabapentin studied in the mouse spinal nerve ligation model. **J Pharmacol Sci**. 118: 455-466, 2012.

23. Sugiyama A, Nakamura Y, Nishimura S, **Adachi-Akahane S**, Kumagai Y, Gayed J, Naseem A, Ferber G, Taubel J, Camm J: Comparison of the effects of levofloxacin on QT/QTc interval assessed in both healthy Japanese and Caucasian subjects **Br J Clin Pharmacol**. 73: 455-459, 2012.

24. Suzuki T, Shioya T, Murayama T, Sugihara M, Odagiri F, Nakazato Y, Nishizawa H, Chugun A, Sakurai T, Daida H, Morimoto S, **Kurebayashi N**: Multistep ion channel remodeling and lethal arrhythmia precede heart failure in a mouse model of inherited dilated cardiomyopathy. **PLoS One** 7: e35353, 2012.

25. 呉林なごみ, 村山尚: 筋小胞体の Ca^{2+} 放出機構の最近の進歩. **生体の科学**, 63: 374-375, 2012

26. Aoyagi T, **Kusakari Y**, Xiao CY, Inouye BT, Takahashi M, Scherrer-Crosbie M, Rosenzweig A, Hara K, Matsui T: Cardiac mTOR protects the heart against ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 303: H75-85, 2012.

27. Yamakawa Y, Furutani K, Inanobe A, Ohno Y, **Kurachi Y**: Pharmacophore modeling for hERG channel facilitation. **Biochem Biophys Res Commun**. 418: 161-166, 2012.

28. Noble D, **Kurachi Y**, Hunter P, Wang X, Gordon M, Boron W: Physiology without borders 2. **Physiology (Bethesda)**. 1: 2, 2012.

29. Nin F, Hibino H, Murakami S, Suzuki T, Hisa Y, **Kurachi Y**: Computational model of a circulation current that controls electrochemical properties in the mammalian cochlea. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 109: 9191-9196, 2012.

30. Ito M, Yamanashi Y, Toyoda Y, Izumi-Nakaseko H, Oda S, Sugiyama A, Kuroda M, Suzuki H, Takada T, **Adachi-Akahane S**: Disruption of Stard10 gene alters the PPAR α -mediated bile acid homeostasis. **Biochim Biophys Acta**. 1831: 459-468, 2013.

31. Hashimoto M, Enomoto M, Morales J, **Kurebayashi N**, Sakurai T, Hashimoto T, Nara T, Mikoshiba K: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates replication, differentiation, infectivity

and virulence of the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. **Mol Microbiol**, 87, 1133-1150, 2013.

32. Sugihara M, Odagiri F, Suzuki T, Murayama T, Nakazato Y, Unuma K, Yoshida K, Daida H, Sakurai T, Morimoto S, **Kurebayashi N**: Usefulness of running wheel for detection of congestive heart failure in dilated cardiomyopathy mouse model. *PLoS One*, 8, e55514, 2013.

33. O-Uchi J, Komukai K, **Kusakari Y**, Morimoto S, Kawai M, Jhun BS, Hurst S, Hongo K, Sheu SS, Kurihara S: Alpha1-adrenoceptor stimulation inhibits cardiac excitation-contraction coupling through tyrosine phosphorylation of beta1-adrenoceptor. **Biochem Biophys Res Commun**. 433: 188-193, 2013.

34. Odagiri F, Inoue H, Sugihara M, Suzuki T, Murayama T, Shioya T, Konishi M, Nakazato Y, Daida H, Sakurai T, Morimoto S, **Kurebayashi N**: Effects of candesartan on electrical remodeling in the hearts of inherited dilated cardiomyopathy model mice. (投稿中)

35. Murayama T, Uehara A, Yasukochi M, Suzuki J, Kanemaru K, Iino M, Sakurai T, **Kurebayashi N**: Divergent effects of disease-associated mutations on type 2 ryanodine receptor channel. (投稿中)

36. Okumura S, Jin M, Namekata I, Tsuneoka Y, Kurotani R, Suita K, Kawakami Y, Hamaguchi S, Fujita T, Jin H-L, Ishikawa F, Cai W, Bai Y, Suzuki S, Tsunematsu T, Hidaka Y, Ichikawa Y, Izumi-Nakaseko H, **Adachi-Akahane S**, Yokoyama U, Sato M, Tanaka H, Ishikawa Y: Disruption of Epac1 decreases phosphorylation of phospholamban and protects the heart against stresses. (投稿中)

37. Inoue T, Kobirumaki-Shimozawa F, Kagemoto T, Fujii T, Terui T, **Kusakari Y**, Hongo K, Morimoto S, Ohtsuki I, Hashimoto K, Kurihara S, Fukuda N: Depressed Frank-Starling relation in left ventricular muscle of the knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy with troponin T deletion mutation Δ K210. (投稿中)

38. Murakami S, Inanobe A, **Kurachi Y**: Short-term desensitization of muscarinic K^+ current in the heart. (投稿中)

【書籍】

1. 古川哲史, 赤羽悟美: 電位依存性 Ca^{2+} チャンネル. トランスポートソームの世界 —膜輸送研究の源流から未来へ— (金井好克ほか編) p. 110-121, 廣川書店, 京都, 2011.

2. 呉林なごみ, 心筋 Ca^{2+} transient と不整脈発生.、不整脈学、井川博・村川裕二編、南江堂; 2012.