

心臓血管系のカルシウム動態に関する研究

1. 目的

心臓血管系の生理的な収縮・弛緩は細胞内 Ca により調節されている。細胞内 Ca 濃度の異常な増大は、心臓では不整脈の一因となり、血管系では高血圧の直接的成因となり、さらに冠血管や脳血管のスパズムスによって狭心症、心筋梗塞、脳卒中をもたらす。細胞内 Ca 濃度は、Ca チャンネルを通過する Ca 電流および筋小胞体など細胞内小器官による Ca の取り込みと放出によって動的に変化する。本研究の目的は、細胞内 Ca の生理的調節、病態での変化、人工制御のメカニズムの解明である。心臓血管系の構成要素である、心筋、血管平滑筋、血管内皮細胞を単離し、パッチクランプ法で Ca チャンネル電流を、光学的方法で細胞内 Ca イオン動態を測定法する。心臓血管系各細胞の Ca をはじめとするイオン動態の解明により、心臓病研究の基礎的知見を獲得したい。血管内皮細胞については動脈硬化との関連と循環調節の両面から注目されている。日本ではこの細胞のイオン動態の研究は遅れているのでこれも積極的に進めたい。

2. 組織

研究代表者

大地陸男 順天堂大学第二生理・教授
心筋 Ca チャンネルおよび血管内皮細胞チャンネルの電気生理学的研究。
研究の統括

分担研究者

入沢 宏 東京女子医大心研内科・顧問
心臓ペースメーカーの機序の電気生理学的研究
栗原 敏 慈恵医大第二生理・教授
心筋細胞内 Ca 動態の研究
八木 忍 自治医大薬理・講師
血管平滑筋細胞内 Ca 動態の研究
上田清悟 都老人医療センター循環器
血管内皮細胞の形態変化および Ca 動態の研究

3. 計画及び材料と方法

1. 心筋 Ca チャンネル (大地)

カテコルアミン、Ca アゴニスト、アセチルコリン、アデノシン、アセチルコリン等によるチャンネル修飾機序を解析する。特に、カテコルアミンの心筋 Ca 電流増大のチャンネル機序を研究する。まずモルモット心臓をコラゲナーゼ処理して心室筋、および心房筋を単離する。これらに細胞接着型のパッチクランプ法を適用して、単一 Ca チャンネル電流を長時間記録し、チャンネル開閉の統計的性質を正確に、定量的に記述する。

2. 心臓のペースメーカー機序 (入沢)

ペースメーカー電位の発生には T 型 Ca 電流、L 型 Ca 電流、If 電流、K 電流、Na-K ポンプ、Na-Ca 交換輸送の関与があることを明らかにしたが、Na⁺依存性の背景電流も予想される。兎の洞房結節から歩調取り細胞を酵素的に単離し、ホールセル型のパッチクランプ法で膜全体の電流を記録する。既知の各チャンネルの阻害剤存在下の背景電流の性質を解析する。

3. 心筋細胞内 Ca 動態 (栗原)

β 受容体刺激をはじめとする心筋収縮の調節における、細胞内 Ca の変化を解析する。細胞内の Ca²⁺濃度の動的変化を Ca²⁺感受性発光蛋白質であるエクオリンにより測定する。白イタチの心室筋線維束にエクオリンを注入し、Ca による発光を Ca トランジェントとして光電子増倍管で測定し、同時に張力を測定する。

4. 血管平滑筋細胞内 Ca 動態の測定 (八木)

単離血管平滑筋の Ca トランジェントと張力の関係を調べる。ラット大動脈を酵素処理し血管平滑筋を単離し、単一細胞の張力を測定する。また Ca 感受性蛍光色素 fura 2 により単離細胞の Ca トランジェントを測定する。ラット大動脈由来の株化培養平滑筋細胞 (A_{7r5}) で種々アゴニストによる細胞内 Ca 濃度変化を検索す。

5. 血管内皮細胞の形態変化 (上田)

血管内皮細胞が β 受容体刺激などでのサイクリック AMP 増加により、収縮することを発見した。このときの細胞内 Ca 動態を fura 2 法で調べる。培養肺動脈内皮細胞を用い形態変化 (収縮) を顕微鏡的に計測する。

6. 血管内皮細胞のイオンチャンネル (大地、上田)

肺動脈内皮細胞の収縮に伴い Cl⁻のフラックスの変化が生じる。培養内皮細胞の膜電流をホールセルクランプ法で記録し、Cl⁻チャンネルの存在を確認し、またこれに対する β 受容体刺激の影響を調べる。

4. 成果

心室筋においても、心房筋においても、 β 作用は Ca チャンネルの遅いゲート過程を修飾して利用率を増し、Ca 電流を増強した。アデノシンは β 作用下に cAMP を減少して利用率を減少して β 刺激効果を打ち消した。洞房結節細胞の背景電流はガドリニウムによって最も鋭敏に抑制された。P_{Na}/P_K が約 0.5 で血漿のイオン濃度では逆転電位は -21mV と計算された。イオン選択性では Li < Na < Cs < K < Rb の順にコンダクタンスの増加をみた。 β 作用は Ca トランゼントと張力を増強し、ムスカリン受容体刺激は GTP 結合蛋白質 (Gi) を介してこれに拮抗した。拮抗関係は弛緩時間にはみられなかった。心筋の収縮蛋白系が張力依存性に Ca を結合した。株化培養平滑筋細胞 (A_{7r5}) の種々アゴニストに対する細胞内 Ca 濃度の反応性は一様ではなく、また同一細胞でも Ca 濃度は一定にならず振動が観察された。血管内皮細胞の形態変化は細胞内 Ca の上昇を全く伴わなかった。cAMP・A-kinase 系と共に C-kinase 系も同様の調節機能を示した。内皮細胞の Cl⁻電流が発見された。この Cl⁻電流は遅い電位依存性開閉を行った。イソプレナリンは Cl⁻電流を抑制して内皮細胞を過分極させることが判明した。

5. 考察

本研究の主な成果の意義を Ca 動態と関連させて考察する。心臓は循環系のポンプであり、その機能は収縮性と収縮頻度に大きく依存する。交感神経は β 受容体刺激により収縮性を速やかに増大させる。我々はこの機序を Ca チャンネルレベルと Ca トランジェントのレベルで解明した。単一チャンネル電流の解析では、 β 刺激はチャンネルの開確率よりも利用率を増大した。またチャンネルには電位依存性および電位非依存性の二つの遅いゲート過程が存在した。 β 刺激はこれらの遅い過程の調節によって利用率を増大すると結論された。 β 刺激は可逆的に Ca トランジェントを増大し時間経過も促進した。この Ca トランジェントの変化は、張力変化の多くを説明するが、可逆性の点で不一致があった。以上のように、 β 受容体の収縮性調節の機序の解明が大きく進展した。心拍数の調節に関してはペースメーカー機序の基礎的電流となる背景電流が発見された。

血管内皮細胞は EDRF やエンドセリンの放出により、末梢循環の調節で中心的な役割を演ずる。Ca 流入は EDRF の放出を促進する。発見された Cl^- 電流は静止電位に大きく寄与するであろう。 β 受容体刺激による Cl^- 電流の抑制による過分極は Ca 流入の促進により、EDRF の放出を促進しうる。

6. 発表

大地陸男

1. Ochi, R. & Kawashima, Y.: Prolongation of unavailable state as mechanism of calcium channel blockade. Current Topics in Antiarrhythmic agents. ed. by Toyama J. & Hondeghem, L. M. 87-91, Excerpta Medica, 1989
2. Kawashima, Y., Kato, M. & Ochi, R.: Depression of calcium current by acetylcholine and adenosine in cardiac muscle. Biosignalling in Cardiac and Vascular Systems. ed. by Fujiwara, M., Narumiya, S., & Miwa, S. 252-256, Pergamon Press, 1989
3. Miura, A., Kawashima, Y. & Ochi, R.: Voltage-dependent blockade of calcium channel by a new dihydropyridine calcium channel blocker DHP-218 in cardiac muscle. Biosignalling in Cardiac and Vascular Systems. ed. by Fujiwara, M., Narumiya, S., & Miwa, S. 414-418, Pergamon press. 1989
4. 大地陸男, 川島優子, : 心筋 Ca 電流の神経性調節. 自律神経 26: 266-269, 1989
5. Ochi, R. & Kawashima, Y.: Modulation of slow gating process of calcium channels by isoprenaline in guinea-pig ventricular cells. J. Physiol. (Lond.), 424: 187-204, 1990
6. Kato, M., Yamaguchi, H. & Ochi, R.: Mechanism of adenosine-induced inhibition of calcium current in guinea-pig ventricular cells. Circulat. Res. 67: 1134-1141, 1990
7. Ochi, R. & Kawashima, Y.: Modulation of slow gating process of calcium channels by isoproterenol and nitrendipine in cardiac muscle. Recent Advances in Calcium Channels and Calcium Antagonists. ed. by Yamada, K. & Shibata, S. 11-17, Pergamon Press, 1990

8. Ochi, R., Nakamura, T. & Li, Hong-yu.: Does phosphorylation increase the open probability of calcium channel of cardiac muscle? *The Physiologist*. 34:102, 1991
9. Jahnel, U., Nawrath, H. & Ochi, R.: Adrenergic effects on calcium channel currents are antagonized by 5' (N-ethyl)-carboxamido-adenosine in guinea pig atrial cells. (submitted to *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*)
10. Ochi, R., Ueda, S. & Nunokawa, T.: Inhibition of voltage-dependent Cl⁻ current by B-adrenergic stimulant in endothelial cells. (submitted to *Nature*)
11. Ochi, R. & Kawashima, Y.: Single-channel analysis of acetylcholine-induced inhibition of calcium current in guinea pig ventricular cells. (in preparation).
12. Li, Hong-yu & Ochi, R.: Enhancement of Bay K 8644-induced prolongation of the open time by isoprenaline in cardiac L-type calcium channel (in preparation)
13. Nakamura, T., Ono, A., Takahashi, M., Hamao, K., Tanzawa, K., Yamazaki, M. & Ochi, R.: Leualacin, a peptide isolated from *Hapsidospora Irregularis*, blocks L-type calcium current in guinea pig ventricular cell. (in preparation)
14. Kawashima, Y. & Ochi, R.: Effects of dihydropyridine calcium agonist and antagonist on the L-type calcium channel in vascular smooth muscle isolated from vena cave inferior of guinea pig. (in preparation)
15. Kawashima, Y., Ueda, S., & Ochi, R.: Voltage-gated large conductance chloride channels in endothelial cells from bovine pulmonary artery. (in preparation)
16. 大地陸男, 布川朝雄,: 心筋の Ca チャネル. *治療学 Biomedicine & Therapeutics* 24: 23-26, 1990
17. 大地陸男, 中村 健: Ca チャネルと興奮・収縮. *病理生理* 10: 423-429, 1991
18. 大地陸男: 心筋 Ca チャネルの生理的・薬理的修飾. *心臓* (印刷中)
19. 大地陸男: Ca²⁺チャネル. *Clinical Neuroscience* (印刷中)
20. 大地陸男: イオンチャンネルとは. *Clinical Neuroscience* (準備中)
21. 大地陸男: Single Channel Analysis. 「膜学実験シリーズ」第一部生体膜編, 共立出版 (準備中)
22. 大地陸男: 新しいカルシウム透過性チャンネル, *Mebio* (準備中)
23. 岡田隆夫, 大地陸男: 抗不整脈薬によるイオンチャンネル変調: Ca²⁺チャンネル, *治療学* (準備中)

入沢 宏

24. Kaibara, M., Nakajima, T., & Giles, W.: Regulation of spontaneous opening of the muscarinic K⁺ channel in rabbit atrium. *J. gen. Physiology* 94, 3a: 43rd Ann Meeting Soc. general Physiologists, Woods Hole 1989
25. Hagiwara, N., Irisawa, H. & Kasanuki, H. Sodium-potassium pump current in sinoatrial node cells of rabbit. 62nd Scientific Sessions. American Heart Association Nov. 1212 1989
26. Nakajima, T., Wu, S., Irisawa, H. & Giles, W.: Mechanism of acetylcholine induced

- inhibition of Ca current in bullfrog atrial myocytes. *J. gen. Physiology*, 96: 865-885, 1990
27. Nakajima, T., Irisawa, H. & Giles, W.: N-ethymaleimide uncouples muscarinic receptors from acetylcholine sensitive potassium channels in bullfrog atrium. *J. gen. Physiology*, 96: 887-903, 1990
 28. Zeipes, D. P., Jalife, J.: Sinus and atrioventricular node cells: Cellular electrophysiology, 95-102, *Cardiac Electrophysiology from Cell to Bedside 1990*
 29. Hagiwara, N., Irisawa, H., Kasanuki, H., & Hosoda, S.: Presence of an inwardbackground current sensitive to sodium in the isolated rabbit sinoatrial node cells. Abstract sent to 44th Meeting Soc. General Physiologists, Woods Hole, Sept. 1990
 30. Kaibara, M., Nakajima, T., Irisawa, H. & Giles, W.: Regulation of spontaneous opening of muscarinic K⁺ channels in rabbit atrium. *J. Physiol. (Lond.)* 433: 589-613, 1991
 31. Irisawa, H., Hagiwara, N.: Pacemaker mechanism in the isolated rabbit sinoatrial node cells --Presence and role of a background current--. 18th International symposium on cardiovascular electrophysiology, Feb 19, 1991
 32. Hagiwara, N., Masuda, H., Shouda, M, & Irisawa, H.: Anion channels activated by the swelling of cardiac myocytes. Physiological Society Meeting, Chambrige, July, 1991
 33. Hagiwara, N., Irisawa, H., Kasanuki, H. & Hosoda, S.: Background inward current sensitive to sodium ion in the sinoatrial node cell of rabbit heart. Manuscript in submitted. 1990
 34. Irisawa, H., Brown, H. F., Giles, W.: Cardiac pacemaker mechanisms. *Physiological Review*. (in press) 1990

栗原 敏

35. Kurihara, S., Konishi, M., Ozaki, O., Suda, N. & Suzuki, S.: Regulation of tension development by intracellular calcium ion concentration and modification by neurotransmitters in mammalian cardiac muscles. *Physiology and Pharmacology of Transmembrane Signalling*, ed. by Segawa, T., Endo, M., Ui, M. & Kurihara, K., Elsevire, 275-280, 1989
36. Watanabe, M., Kurihara, S., Inoue, S. & Ohno, T.: Binding of murine monoclonal antibodies to the active and inactive configuration of aequorin. *FEBS Letters*, 246: 73-77, 1989
37. Matsubara, I., Yagi, N., Saeki, Y., Suda, N. & Kurihara, S.: A dynamic X-ray diffraction study on slow skeletal muscle of the chick at the beginning of contraction. *Photon Factory Activity Report*, 7: 129, 1989
38. 栗原敏, 岡崎修, 須田憲男, 小西真人, 本郷賢一: 心筋細胞内 Ca 動態と収縮に対するベーターおよびムスカリン受容体刺激の効果. *自律神経*, 26: 270-273, 1989

39. Ozaki, O., Suda, N., Hongo, K., Konishi, M. & Kurihara, S.: Modulation of Ca^{2+} transients and contractile properties by beta-adrenoceptor stimulation in ferret ventricular muscles.
J. Physiol. (Lond.), 423: 221-240, 1990
40. Kurihara, S., Saeki, Y., Hongo, K., Tanaka, E. & Sudo, N.: Effect of length change on intracellular Ca^{2+} transients in ferret ventricular muscle treated with 2,3-Butanedione Monoxime (BDM).
Jpn. J. Physiol., 40: 915-920, 1990
41. Kokubun, S., Tamura, T. & Saigusa, A.: Mechanisms underlying the slow onset of the action of a smooth muscle cells. Recent Advances in Calcium Channels and Calcium Antagonists, ed. by Yamada, K. & Shibata, S. Pergamon Press, 120-126, 1990
42. Kurihara, S., Tanaka, E., Hongo, K., Suda, N., Okazaki, o. & Saeki, Y.: Effects of intracellular Acidification on Ca^{2+} transients and contraction in mammalian cardiac muscles. The diabetic heart. ed. by Nagano, M., Dhalla, N. S., Raven Press, Ltd., New York, 1991
43. Kokubun, S., Saigusa, A. & Tamura, T.: Blockade of Cl channels by organic and inorganic blockers in vascular smooth muscle cells. Pfluegers Archv., 418: 204-213, 1991
44. Tamura, T., Saigusa, A., Kokubun, S.: Mechanisms underlying the slow onset of action of a new dihydropyridine, NZ-105, on a cultured smooth muscle cell line. Eur. J. Pharmacol. in the press.
45. Hongo, K., Tanaka, E., Kurihara, S.: Effects of muscarnic receptor stimulation on intracellular calcium transients and tension in isoprenaline-treated mammalian ventricular muscle. (in preparation)
46. Hongo, K., Tanaka, E., Tanaka, T. & Kurihara, S.: Effects of a newly-synthethized dihydropyridine Ca antagonist in ferret ventricular muscle. (in preparation)
47. Suda, N., Kokubun, S.: The mechanism underlying the netative staircase of contraction in rat ventricular muscle. (in preparation)
48. 栗原敏 : 運動と心臓. 体力科学, 39: 360-364, 1990
49. 栗原敏, 小西真人, 本郷賢一, 須田憲男, 田中悦子, : 温血動物心筋における細胞内 Ca イオン動態と弛緩. 薬理と治療, 18: 193-199, 1990
50. 栗原敏, 須田憲男, 本郷賢一, : 心筋細胞内カルシウムイオンの動態. 蛋白質核酸酵素, 35: 1688-1694, 1990

八木忍

51. Yagi, S., Becker, P.L. & Fay. F. S.: Relationship between forces and Ca^{2+} concentration in smooth muscle as revealed by measurements on single cells. Proc. N. A. S. USA, B5: 4109-4113, 1988
52. 八木忍 : 単一平滑筋細胞の張力測定法. 生体の科学, 39: 520-522 1989

53. 八木忍：単一平滑筋細胞の張力と細胞内 Ca^{2+} の同時測定. 実験医学, 7: 682-686, 1989
54. Maeyama, K., Yagi, S., Sasaki, M., Sakurai, E. & Watanabe, T.: Oscillatory Ca^{2+} single in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. Japan. J. Pharmacol, 52: 83, 1990
55. Maeyama, K., Yagi, S., Sasaki, M., Sakurai, E. & Watanabe, T.: Calcium signal and histamine secretion induced by aggregation of immunoglobulin E receptors in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. in "New Perspectives in Histamine Research." pp417-422, Agents and Actions Supplements, vol. 33, Birkhaeuser Verlag, Basel, 1991

上田清悟

56. 上田清悟, 蔵本築, B. L. Fanburg : Cyclic AMP による血管内皮細胞の形態変化. 心臓 21: 53-55, 1989
57. Ueda, S., Lee, S.-L. & Fanburg, B. L.: Ca^{2+} transport in cyclic AMP induced contraction of vascular endothelial cells. Biosignaling in Cardiac and Vascular Systems. ed. by Fujiwara, M., Narumiya, S. & Miwa, S. 109-111, Pergamon Press, 1989
58. Ueda, S., Lee, S.-L. & Fanburg, B. L.: Chloride efflux in cyclic-AMP induced configurational change of bovine pulmonary artery endothelial cells. Circulat. Res. 66: 957-967, 1990
59. 上田清悟, 蔵本築 : 冠動脈硬化の進展とその制御老年者の剖検所見よりみた冠動脈硬化の評価とその進展機序に関する考察 シンポジウム II 日本老年医学会雑誌 27: 14-19, 1990
60. 上田清悟 蔵本築 : 自然発症高血圧ラットの内皮細胞の機能異常の存在 第 4 回 Ca 拮抗薬シンポジウム Therapeutic Research. 11: 2868-2872, 1990
61. 上田清悟 松下哲 蔵本築 : 内皮細胞の形態変化と Ca^{2+} イオン輸送. 薬理と治療 18: 3455-3458, 1990
62. 上田清悟 蔵本築 : 動脈硬化の部位特異性. 現代医療 22:1207-1212, 1990
63. 上田清悟 : 血管平滑筋代謝と改善薬に関する最近の進歩. 「クリニカ」 17: 93-98, 1990
64. 上田清悟 : 老年者における心臓病薬の使い方. 「クリニカ」 18: 82-87, 1991
65. 上田清悟 他 : Neuropeptide CGRP の血管内皮細胞作用. 心臓 (印刷中) 1991
66. Ueda, S., Ochi, R., Matsushita, S. & Kuramoto, K.: Isoproterenol-and staurosporin-induced chloride channel depression with configurational changes of cultured endothelial cells from bovine pulmonary artery. (in preparation)