

実験課題番号 : 2006A0137
実験課題名 : ラット不全心モデルの心筋クロスブリッジ動態解析に基づくナノ診断
実験責任者
所属機関 : 奈良県立医科大学
氏名 : 高木 都
使用ビームライン : BL40XU

利用報告 :

我々はSPring-8を用いて分子のナノオーダーのダイナミクスを観察することにより心不全を診断する方法の開発を目的として本研究を行った。心臓は生命活動を維持するために必要不可欠の器官として生体の末梢からの要求に答えてダイナミックにその機能特性を変えていくことが知られている (適応)。長期間にわたる適応として形態の変化 (リモデリング ; 心肥大など)

が知られ、細胞内の多岐にわたる機能タンパク分子発現の量的、質的变化を伴い、ポンプとしての心機能自体を障害する。このタンパクの発現異常は心筋細胞の興奮収縮連関に関わる機能タンパクでも観察され、 Ca^{2+} イオンハンドリングタンパクと収縮タンパクともに発現量の低下や形質の変化を来す。本研究では特に収縮タンパクに注目し、複雑な形態と多重の代償機構を保持した標本[生体位全心臓標本]ならびにその破綻を来した心不全モデル標本 (図1) を用いてアクチン・ミオシンの相互作用 (クロスブリッジ動態) とミオシン線維格子間隔の変化を心臓全体のマクロスコピックな心機能データと統合的に解析し、その機能情報から心臓の合目的性と心不全の病態のナノ診断を試み治療戦略を探究する。ナノ診断の検証をするために同時にマクロの心機能解析も行う。

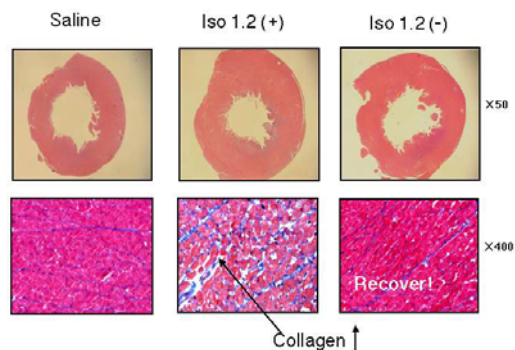


図1 : 本研究で使用した心不全標本と組織像

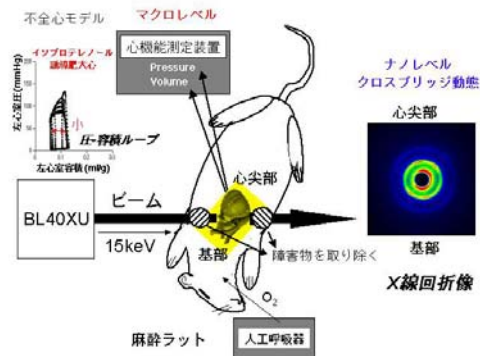
本研究ではイソプレナリンの慢性持続投与による心不全モデルを使用する。イソプレナリンは血行動態には影響を与えない用量だが、投与開始 3 日後にはコラーゲンの増生を伴う顕著な心肥大を引き起こす (Iso 1.2(+))。また、投与を中止後 2 日で有意な心肥大とコラーゲンの増生が消失する興味深いモデルである。

方 法

実験は各施設の動物取り扱い規約に基づき実施した。

モデル動物作成

実験の7日前に、Wistar Rat (雄、7週齢、n = 16)をペントバルビタールで麻酔し、薬剤投与用の浸透圧ポンプを背部皮下に埋め込む。浸透圧ポンプには、対照群には生理食塩液、不全心モデル群にはイソプレナリン・生理食塩溶液 (イソプレナリン 1.2 mg/kg/day) を注入し、7日間の慢性持続投与を行った。



標本作製

実験当日、まずラットをペントバルビタールで麻酔し、背部に埋め込んだ浸透圧ポンプを摘出した。気管切開による気道確保後に人工換気を行い、右頸静脈より輸液ラインを確保した。ついで肋間動脈、内胸動脈を結紮し、前部胸郭を除去し、心臓を露出した。心尖部より左心室容積測定用の2 Frコンダクタンスカテーテルおよび左心室圧測定用の1.4 Frカテーテル型圧トランスデューサを左室空内に挿入、留置し、実験ハッチにセットする。(図2)

図2：標本のセットアップ

方法に記したように標本を作製し、左心室壁にX線ビームが照射されるようにセットする。

X線回折像記録

照射するXビームはエネルギー15 keV、ビームサイズ $150\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ とした。X線の照射位置を調整した後、人工呼吸を停止しX線を照射、X線回折像を2秒間記録 (70 frames/sec) した。また、左心室の圧、容積データを同時に記録した。

データ解析

左心室にX線を照射すると二重の円弧状～環状のX線回折像が得られる。内側の回折像は1,0赤道反射と呼ばれミオシン線維を、外側の回折像は1,1赤道反射と呼ばれアクチン、ミオシン両方の線維の情報を反映する。心臓の収縮に伴い、ミオシン頭部がアクチンと結合 (クロスブリッジの形成) すると、ミオシン線維による回折像が減少するため、1,0赤道反射の輝度が低下する。また、収縮に伴い照射位置がずれると、X線が通過する部位のミオシン線維の量も変化するが、1,1赤道反射はアクチン、ミオシン両方の線維による回折像なので、その輝度は通過した部分のタンパク量を反映する。したがって、1,0赤道反射の輝度変化を、1,1赤道反射の輝度で補正すれば、クロスブリッジの形成・解離動態が観察できる。

また、X線と1,0赤道反射の為す角度は、X線の波長 (0.082nm) とミオシン線維の格子間隔により規定される。資料と撮像管の距離と1,0赤道反射の出現位置から、ミオシン線維の格子間隔 (約35～40nm) を解析できる。

結果と考察

図3に正常心で観察された代表的なラット左心室圧容積データ (LVPおよびLVV) と同時に記録したX線回折像解析から得られた1,0/1,1赤道反射輝度比 (Ratio) とミオシン線維格子間隔 (Lattice) のデータを示す。まずラット左心室圧容積データ (図3 A-C) をみると、左心室圧 (図3 B) が3拍目より増加していることが解る。これは、胸部大動脈 (横隔膜直上部) にオクルーダを置き、3拍目開始時点で大動脈を閉塞し、左心室に対する後負荷を増大させたためである。左室容積 (図3 A) は拡張期末容積はほとんど変化せず、収縮期末容積がわずかに増加している。これは、後負荷の増大、すなわち左心室駆出抵抗の増加により、一回心拍出量が減少したことを示す (図3 C)。

一方、X線回折像解析から得られたミオシン線維格子間隔、1,0/1,1赤道反射輝度比を (図3 D-F) にしめす。ミオシン線維格子間隔 (図3 D) については次のように考えることができる。心臓の収縮に伴い心筋細胞が短縮する、細胞の容積をほぼ一定と考えると心筋細胞の短縮は細胞幅の増加を引き起こす。収縮タンパクヘスケールダウンすると、筋節の短縮と心筋線維間隔の増加として捉えることができる。また、赤道反射輝度比 (Ratio) (図3 E)

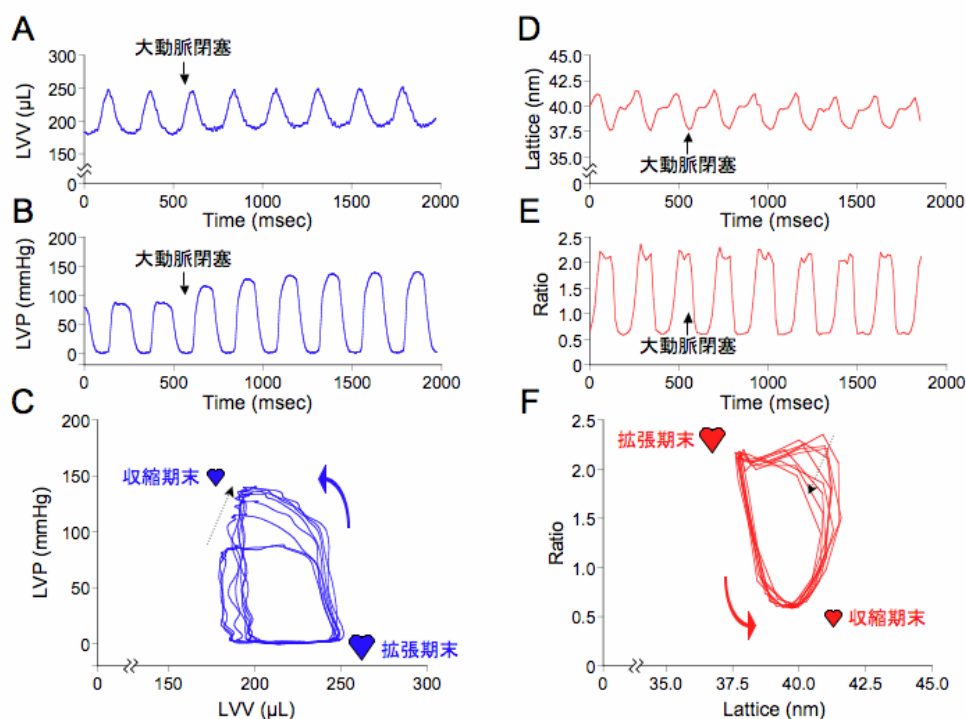


図3：ラット左心室の圧容積データと左心室自由壁のX線回折像解析データ

A：ラット左心室容積の時系列データ、B：ラット左心室圧の時系列データ、C：ラット左心室圧容積ループ。青の大ハートは拡張期末、小ハートは収縮期末を示し、圧容積ループは反時計方向 (青矢印) に観察される。胸部大動脈の閉塞により、収縮期末の圧容積関係は点線矢印のように右上方へ移動する。D：同時に記録したX線回折像を解析し、得られたミオシン線維の格子間隔の時系列データ、E：同じく1,0赤道反射、1,1赤道反射の輝度比の時系列データ、F：ミオシン線維格子間隔をX軸に、1,0/1,1輝度比をY軸にプロットして得られた、ナノループ。赤の大ハートは拡張期末、小ハートは収縮期末を示し、ナノループは反時計方向 (赤矢印) に観察される。胸部大動脈の閉塞により、ナノループは点線矢印で示したようにループの形状を変える。

は、アクチンとミオシンの相互作用を示しており、相互作用の増加すなわちクロスブリッジの形成が進むと輝度比は低下する。大動脈の閉塞に伴い左心室圧は顕著に増大したが、赤道反射輝度比では収縮期の有意な輝度比の低下は認められなかった。

ミオシン線維格子間隔-赤道反射輝度比のナノループで見ると、大動脈の閉塞に伴う後負荷の増大により、ナノループの形状は点線矢印のように収縮期末から弛緩・拡張期において格子間隔の変化を縮小させる方向にシフトさせた。上記の結果より、後負荷の増大は、クロスブリッジ形成を増やすのではなく、筋節短縮の抑制と格子間隔の維持が左心室圧上昇の鍵となることが示唆された。しかし、これらの解析結果については個体差も大きく、今後さらなる検討が必要であると思われる。

また、正常心と肥大心の比較については、現在データ解析が進行中であり、その結果は別の機会に改めて報告させていただきたい。