

[課題番号]

2007B1660

[実験課題名 / Title of Experiment]

X線回折を用いた生体内での心筋クロスブリッジ動態の評価

In vivo Evaluation of Cardiac Cross-Bridge Dynamics Using X-ray Diffraction

[実験責任者 / Project Leader]

政野 智也 / Masano Tomoya (0015676)

所属機関：神戸大学大学院 医学系研究科 内科学講座 循環器内科学分野

大学院 4 年生

[ビームライン / Beamline]

BL40XU

背景：従来 Ca^{2+} ハンドリング異常が心不全発症・進展の機序に密接に関与することが推測されているにもかかわらず、方法論の限界のため、実際に心不全病態下で生体内でのクロスブリッジ動態がどのように変化しているかはまったく不明である。心筋からの X 線回折により生じる 2 つの赤道反射、1,0 および 1,1 反射、は太いフィラメントと細いフィラメント間の架橋形成の程度を反映し、その格子間隔はフィラメント間の距離を表す。近年、我々は第三世代放射光施設 SPring-8 において高輝度で指向性の良い放射光を用いることで、生体内での動的な心臓からの X 線回折撮像法を確立した (Biophys J 2006 Mar 1;90(5):1723-8.)。本法は従来不可能であった、生体内でリアルタイムにミオシンとアクチンの相互作用を、またナノメーター・オーダーであるミオフィラメント間の距離を正確に測定しうる画期的な手法である。

心筋長-張力関係として知られるフランク・スターリングの法則が拡張末期のフィラメント間の距離に依存するののかについてはいまだ明らかにされていない。今回我々は細胞容積を増加させることでフィラメント間の距離を開大した場合、クロスブリッジ動態にどのような影響を与えるのかについて検討した。

目的：細胞容積の制御には細胞内 Na^+ 濃度が重要な役割を果たすことが知られており、 Na^+-K^+ ATPase 阻害剤であるウアバインを投与した際の心筋クロスブリッジ動態への影響について検討する。

実験の方法：8 週齢オスの C59BL6 マウスの頸動脈にカニューレを施行した後、生体内の心臓より X 線回折像を撮影した。X 線回折像の実際の撮影法について述べる。イソフルレン吸入麻酔下で動物の大胸筋を左側のみ剥離。続いてビームが前胸壁より垂直に入射されるように動物を固定。呼吸に伴う胸郭の変動を排除するため、あらかじめ人工呼吸下に過換気とし、撮像直前に停止させることで無呼吸を得た。入光は左第 3 肋間より開始し、順次ビームに対し垂直面でマウスの位置を変えて撮像した。ビームサイズは $0.25 \times 0.10 \text{ mm}^2$ で、15msec のフレームを一回につき計 70 コマ撮像した。薬物を投与前にベースラインとして X 線回折像を撮影後、ウアバインをカニューレより投与し、10 分後に再度撮像を行った。

結果：10 例中 2 例でウアバインの投与により拡張末期のフィラメント間の距離が開大するとともにクロスブリッジ動態の悪化が認められた。残りのものは拡張末期のフィラメント間の距離にほとんど変化が見られなかった。そのような例ではほとんどがクロスブリッジ動態にも変化が認められなかったが、1 例のみクロスブリッジ動態の増強を認めた。

考察：心筋細胞では Na^+-K^+ ATPase が阻害された場合、代償的に $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchanger の reverse mode が活性化されることが知られている。つまり、ウアバインの投与により

細胞内 Na^+ 濃度が上昇せず、一方で $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchanger を介して Na^+ のくみ出しとともに Ca^{2+} の流入がおり、クロスブリッジ動態に影響を与えた可能性がある。今後さらに、 Na^+-K^+ ATPase を阻害するとともに $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchanger の reverse mode を KB-R7943 にて阻害した場合のクロスブリッジ動態について検討する予定である。

結語：病態により局所的なクロスブリッジ動態の障害が生体内で生じうることを本手法により初めて証明できたことは大変意義深い。生体内で撮像するメリットとしては(1)ランゲンドルフ灌流による摘出心での評価に比べ、血液の存在下かつ非開胸のため組織浸透圧が生理的範囲内である、(2)血圧や心電図など他の生体情報を同時にモニターできる、(3)変力・変時作用を有する薬物への反応性、虚血や心毒性物質による病態モデル、さらには遺伝子改変動物など多様なモデルを扱えることがあげられる。今後、この方法を用いて心臓病の分子レベルでの病態把握を目指すとともに、最終的には臨床でも応用可能な方法論の確立を目標としている。