

原著

培養心筋細胞肥大におよぼす拍動と β 受容体刺激の影響

内貴 猛*, 林 あさこ*, 河原 剛一*

要 旨

慢性的な力学的過負荷による心筋細胞肥大の発生メカニズムには未だ不明な点が多い。本研究では力学的過負荷が加わった状態において、心拍出量を正常に保つために活性化される交感神経の作用が、心筋細胞肥大形成におよぼす影響を検討した。成熟ラット単離心筋細胞を電気刺激しながら培養し、交感神経伝達物質の添加や細胞収縮力、収縮頻度の変化が細胞の大きさにおよぼす影響を、細胞内タンパク量を測定して調べた。その結果、交感神経作用の一つである β 受容体刺激によって細胞肥大が誘発され、細胞収縮（電気刺激）と相乗的な効果を示すことがわかった。さらに、その変化は収縮関連タンパクにも認められ、力学的負荷に対する適応的な変化である可能性が示唆された。一方、電気刺激のみでは収縮関連タンパクのみが有意に増加し、 β 受容体刺激とは異なるメカニズムの変化が起こることが示唆された。これらの結果より、交感神経活動亢進により β 受容体を介した細胞肥大と機械的負荷感受性受容体を介した収縮関連タンパク産生増加による収縮機能変化が同時に起こる可能性が示唆された。

キーワード： 心筋細胞肥大, 交感神経, 力学的負荷, β 受容体, 心筋細胞収縮性, 電気刺激

緒 言

高血圧症, 弁膜症, 心筋梗塞等の疾病により慢性的な力学的過負荷が心臓に加わると心肥大あるいは心拡大が形成される。これらの心臓リモデリングは心筋細胞の肥大をとまなう。リモデリング

心は虚血耐性が低く、軽度の虚血でも心不全になりやすいため、リモデリングを防ぐために多くの研究が世界中で行われている。しかし、心筋細胞肥大の発生メカニズムには未だ不明な点が多い。特に力学的負荷と心筋細胞肥大との関係についてはよくわかっていない。力学的過負荷が加わるような病態では、通常的心拍出量を保つために心臓交感神経活動が活発になり、心臓の収縮性（心拍数と収縮力）を増大させている。本研究ではこのような交感神経活性化、特にそれによる心臓収縮性の亢進が、心筋細胞肥大形成におよぼす影響を明らかにする。

そのために本研究では、成熟ラットから単離した心筋細胞を電気刺激しながら培養し、交感神経伝達物質を添加したり、細胞外カルシウム濃度、電気刺激頻度あるいは電界強度を変化させたりして、交感神経活動が活性化した状態を模擬し、それらの要因が細胞の大きさにおよぼす影響を検討した。細胞の大きさの指標として細胞1個あたりに含まれる総タンパク量を測定した。また、誘発された細胞肥大が収縮性を増大させる変化であるのかを検討するために、 α アクチンと β ミオシン量を測定し、比較検討した。

試料および方法

心筋細胞単離

実験には生後10週齢以降の Wistar 系雄ラット心臓から、Krebs-Henseleit 緩衝液 (K-3753, Sigma) と collagenase Type II (Worthington Biochem. Co.) を用いる酵素法により採取した心筋細胞を用いた^{1,2)}。矩形に形の整った正常な細胞をラミニン (BT-276, Biomedical Tech. inc.) でコートした直径60 mmの培養ディッシュ (Primaria 3802, Falcon) に播種し、3時間の間に接着しなかった細

*北海道大学電子科学研究所

胞を洗い流した後、血清を含まず、5 mM の creatine と 5 mM の taurine, 0.1 μ M の insulin, 50 U/ml の penicillin, 50 μ g/ml の streptomycin を含む D-MEM 培養液 (D-6429, Sigma) を用い、5 % CO₂, 37°C の環境下で培養実験に用いた。1 頭のラット心臓から得た心筋細胞を、細胞同士が接着しない程度の密度になるように、4 あるいは 6 枚のディッシュに播種した。

電気刺激と交感神経作用模擬

拍動下での交感神経作用の影響を検討するため、Electronic Stimulator (SEN-7203, 日本光電) で自動能をもたない成熟心筋細胞を電気刺激して収縮させた。電気刺激には、刺激頻度 0.5, 1, 2 回/sec, 電界強度 0.83, 1.66, 5 V/cm, パルス幅 5 msec の矩形パルス電流を用い、3 cm の間隔で培養液中に平行に配置した直径 0.375 mm の銀線電極により細胞を刺激した。上記の電界強度は、それぞれの周波数において細胞の約 70% が収縮し始める値であった。

実験毎に必ず、比較対照のコントロールとして電気刺激をせずにインキュベータ中に静置したディッシュを 1 あるいは 2 個用意した。残りの 2 ~ 5 個のディッシュを交感神経作用の模擬実験に用いた。培養実験において交感神経作用によるカテコラミン受容体刺激と心拍数の変化、収縮力の変化を個別に模擬するために、電気刺激を一定にした状態で β 受容体を刺激する isoproterenol (I-5627, Sigma) を添加したり、刺激周波数を変化させたり、培養液中 (細胞外) の Ca²⁺ 濃度を変化させた。Isoproterenol と細胞外 Ca²⁺ 濃度の影響については、電気刺激頻度を 0.5 回/sec, 電界強度を 5 V/cm に設定して検討した。全ての培養実験は通常の培養環境において 24 時間行った。なお、norepinephrine は β 受容体の他に α 受容体も刺激するが、本研究では収縮性増大効果の大きいとされる β 受容体刺激の影響のみを検討した。

細胞数と細胞内総タンパク、収縮関連タンパクの評価

培養実験終了後、培養ディッシュの任意の中心線上を等間隔に 13 箇所、顕微鏡下でデジタルカメラ (Coolpix990, Nikon) に撮影した。撮影時には 4 倍の顕微鏡対物レンズを用い、1 個の画像に

2.4 × 1.8 mm の範囲を撮影した。後日撮影した画像中の細胞数を測定し、測定した総面積に対するディッシュの有効面積の割合を掛け合わせて総細胞数を推定した。細胞が一様に分布した場合にのみ、この推定はほぼ正確 (誤差 6 % 以内) であった。そのため、分布に偏りがあったディッシュは以降の解析対象から除外した。

撮影後、細胞を cell scraper で剥がして採取し、タンパク分解酵素阻害因子や界面活性剤等を含む抽出バッファーにより、氷上にて細胞質内のタンパクを抽出した。抽出バッファーの組成は、10 mM Tris-HCl, 25 % glycerol, 0.82 M NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 2 mM sodium pyrophosphate, 0.5 mM phenylmethyl-sulphonyl fluoride (PMSF), 0.5 mM DTT, 1.25 μ g/ml pepstatin A, 10 μ g/ml aprotinin, 0.1% Triton X である。抽出した溶液中の総タンパク量を、分光光度計 (Ultraspec 3300pro, Amersham pharmacia biotech.) とビウレット反応を用いる BCA タンパク定量キット (BCA Protein Assay Kit, Pierce) により測定した。その際の標準タンパクにはウシ胎児血清アルブミン (Albumin Standard fraction V 23209, Pierce) を用いた。そして、最終的に細胞 1 個あたりの総タンパク量を算出し、細胞の大きさの指標として用いた。全ての細胞あたりの総タンパク量のデータを、同一実験条件にて電気刺激を与えずに静置培養した細胞 (control) の値で基準化して、電気刺激条件や薬品添加による細胞の大きさの差異を比較検討した。

筋線維量の変化を検討するために、収縮に関わるタンパクのうち α アクチンと β ミオシンの細胞あたりの含有量を、免疫染色を用いたウェスタンブロットにより測定した。電気泳動とウェスタンブロットには一般的な SDS-PAGE と PVDF 膜を用いた。電気泳動時の分子マーカには Prestained SDS-PAGE (161-0318, Bio-Rad) を用いた。各タンパクの検出には Mouse anti-Actin monoclonal antibody (MAB1501, Chemicon) と Mouse anti-slow muscle Myosin monoclonal antibody (MAB1628, Chemicon) を一次抗体に用い、Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) を二次抗体に用いた。発光剤には LumiGLO (7003, Cell Signaling Tech.) を用い、二次抗体と

反応して得られる化学発光をX線フィルムに記録した。記録した発光像をスキャナでコンピュータに読みとり、NIH-imageにより各レーン毎のバンドの輝度の合計値を定量化した。

全てのデータを平均値+標準偏差で示し、統計的検定には二元配置分散分析(ANOVA)とScheffe法による多重比較を行い、有意水準を5%とした。

結 果

β受容体刺激の影響

交感神経伝達物質によるβ受容体刺激の影響と細胞収縮の影響を同時に検討するために電気刺激を加えた細胞と加えない細胞に1と10μMのisoproterenolを作用させ、細胞あたりの総タンパク量を測定した。その結果、図1に示すようにisoproterenolを添加した群の細胞あたりの総タンパク量は添加しなかった群より有意に多かった。しかし、isoproterenol濃度による違いはなかった。また、各isoproterenol濃度における細胞あたりの総タンパク量は電気刺激した群で多く、統計的検定の結果からも電気刺激(収縮)の影響が有意に現れた。これらの結果から、一般的に言われているようにβ受容体刺激により細胞肥大が起こることが確認できた。さらにその肥大を細胞収縮が促

Results by ANOVA and Scheffe's test (p<0.05)

Isoproterenol 0 μM vs. 1 μM	p = 0.0016 S.
Isoproterenol 0 μM vs. 10 μM	p = 0.0371 S.
Isoproterenol 1 μM vs. 10 μM	p = 0.5784 N.S.
Quiescent vs. Stimulation	p = 0.0112 S.

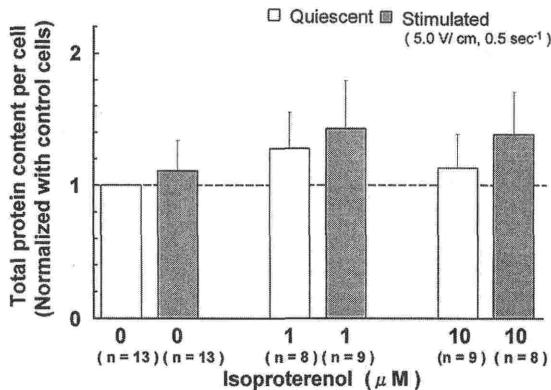


図1 細胞の大きさにおよぼすβ受容体刺激(isoproterenol)の影響
Control細胞の総タンパク量: 9.31±4.87 μg/cell

進し、細胞収縮性の亢進が細胞肥大の程度を増大させている可能性が示唆された。

収縮頻度と収縮力の影響

β受容体刺激により亢進される収縮頻度(心拍数)と細胞収縮力が細胞あたりの総タンパク量におよぼす影響を検討した。

まず、Ca²⁺濃度の異なる3種類の培養液を用いたときの影響を検討した。その結果、図2に示すように、細胞あたりの総タンパク量には全く差異は見られなかった。細胞外カルシウム濃度の増加により心筋収縮力が増加することはよく知られたことであり、今回の測定条件においては細胞あたりの総タンパク量、すなわち細胞肥大におよぼす細胞収縮力の影響はほとんどないことを示唆し

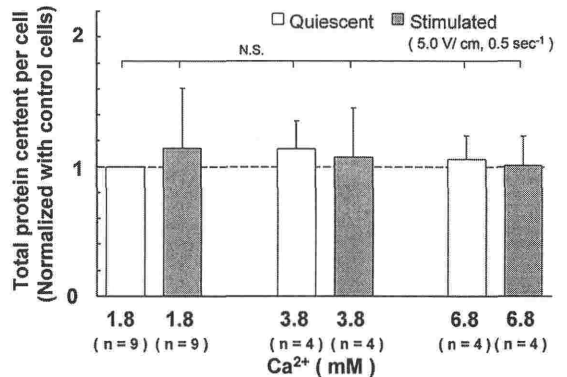


図2 細胞の大きさにおよぼす細胞外カルシウム濃度(収縮力)の影響
Control細胞の総タンパク量: 6.82±2.19 μg/cell

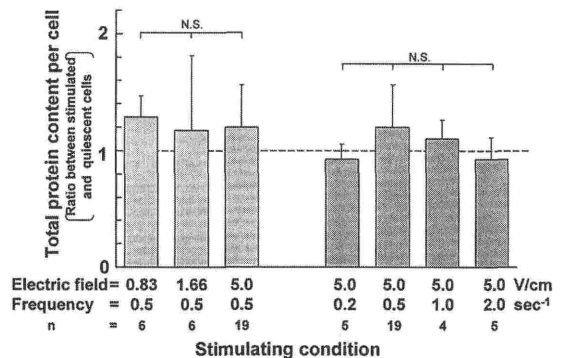


図3 細胞の大きさにおよぼす刺激頻度と電界強度の影響
Control細胞の総タンパク量: 7.64±3.86 μg/cell

ている。

次に電気刺激頻度を変化させて収縮頻度変化の影響を検討した。その結果、図3に示すように、0.5回/secで電気刺激したときに細胞あたりの総タンパク量が多くなる傾向にあったが、統計的検定の結果、刺激頻度による有意な差はなかった。このことから収縮力と同様に今回の測定条件においては細胞肥大におよぼす細胞収縮頻度の影響はほとんどないことがわかった。また、刺激電界強度の影響も調べたが、有意な差異はなかった(図3)。

アクチンとミオシンの変化

β受容体刺激により誘発された細胞肥大が心筋細胞の収縮性を増大させる変化であるのかを検討するために、心筋細胞の収縮を担う主要なタンパクであるαアクチンとβミオシンの、β受容体刺激による細胞1個あたりの量の変化を検討した。その結果、それぞれ図4と5に示すように、

各条件においてαアクチンとβミオシンにはほぼ総タンパクと同様の増加傾向があることがわかった。これらの結果からβ受容体刺激による細胞肥大は収縮関連タンパクの増加をともなう現象であり、過剰な力学的負荷が心臓に加わっている状態においては、その負荷に対抗するための適応的变化である可能性が示唆された。

一方、総タンパク量に比べ、αアクチンとβミオシンにはisoproterenolによる影響よりも電気刺激の影響が強く現れ、isoproterenolを添加しない場合にも電気刺激の有無による差異が大きいことがわかった。このことは3種類の細胞外カルシウム濃度において電気刺激の有無がαアクチンとβミオシンにおよぼす影響にも現れ、図6と7に示すとおり、統計的に有意ではなかったものの、同じカルシウム濃度において電気刺激を加えた方がαアクチンとβミオシンの量が多くなる傾向があった。これらの結果より、電気刺激による細胞収縮は主にαアクチンとβミオシン等の収縮

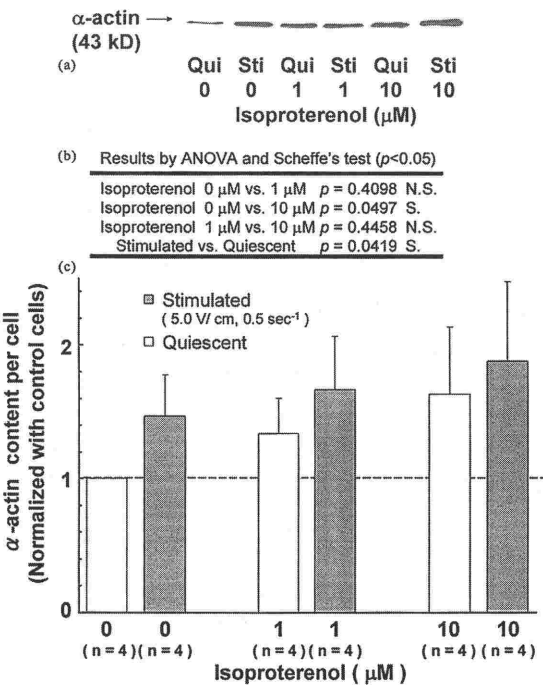


図4 アクチン量におよぼすβ受容体刺激の影響 (a)ウエスタブロットの免疫染色画像の1例, (b)統計的検定, (c)免疫染色画像から定量化したアクチン量の平均値の比較

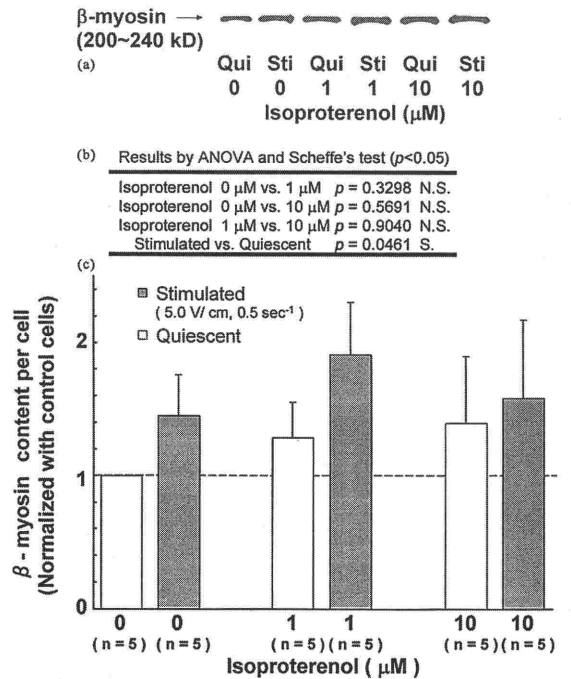


図5 ミオシン量におよぼすβ受容体刺激の影響 (a)ウエスタブロットの免疫染色画像の1例, (b)統計的検定, (c)免疫染色画像から定量化したミオシン量の平均値の比較

Results by ANOVA and Scheffe's test ($p < 0.05$)	
[Ca ²⁺] 1.8 mM vs. 3.8 mM	$p = 0.2792$ N.S.
[Ca ²⁺] 1.8 mM vs. 6.8 mM	$p = 0.3591$ N.S.
[Ca ²⁺] 3.8 mM vs. 6.8 mM	$p = 0.9835$ N.S.
Stimulated vs. Quiescent	$p = 0.0534$ N.S.

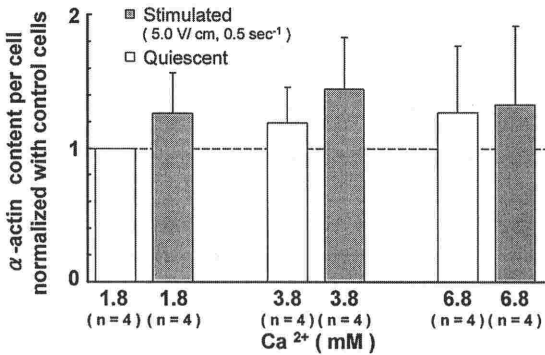


図6 アクチン量におよぼす細胞外カルシウム濃度（収縮力）の影響

関連タンパクの産生増加を引き起こすのに対し、 β 受容体刺激はそれら以外のタンパクの産生増加も引き起こし、その増加量が収縮関連タンパクの産生増加量よりもかなり多いことが示唆された。

考 察

本研究では心臓交感神経活動の活発化が心筋細胞肥大形成におよぼす影響を単離成熟ラット心筋細胞の培養実験により検討した。特に本研究では交感神経による細胞収縮性亢進の細胞肥大発生における役割を検討するため、細胞収縮性の調節を主に司る β 受容体の影響を調べた。 β 受容体刺激による細胞肥大誘発については未だ定説はなく、肥大には関与しないという報告³⁾や、 α 受容体による肥大誘発を抑制するという報告⁴⁻⁷⁾、 α 受容体と同様に肥大を誘発するという報告⁸⁻¹⁰⁾があり、混沌としている。本研究の結果は β 受容体刺激も α 受容体刺激と同様に細胞肥大を誘発するという報告を支持するものであった。

そこで、 β 受容体刺激によって起こる細胞収縮力増大が細胞肥大発生に寄与しているかを細胞外Ca²⁺濃度を変化させて検討したが、総タンパク量には細胞収縮力増大の影響はなかった。また、交感神経活動の活発化による心拍数の増加が細胞肥大におよぼす影響についても検討した結果、Ivester et al.¹¹⁾と同様に0.5回/secの頻度で収縮させたときに細胞あたりの総タンパク量が多くなる

Results by ANOVA and Scheffe's test ($p < 0.05$)	
[Ca ²⁺] 1.8 mM vs. 3.8 mM	$p = 0.4262$ N.S.
[Ca ²⁺] 1.8 mM vs. 6.8 mM	$p = 0.8970$ N.S.
[Ca ²⁺] 3.8 mM vs. 6.8 mM	$p = 0.6903$ N.S.
Stimulated vs. Quiescent	$p = 0.0537$ N.S.

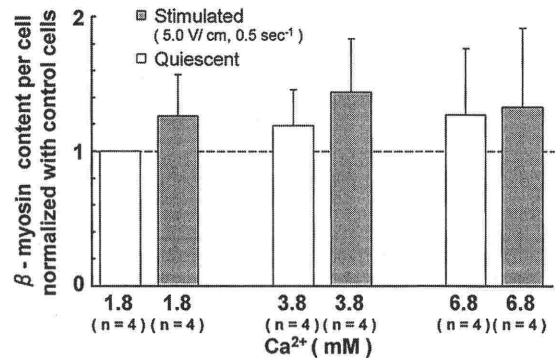


図7 ミオシン量におよぼす細胞外カルシウム濃度（収縮力）の影響

傾向が得られたものの、統計的には有意ではなかった。さらに、細胞収縮の有無による総タンパク量の差異もほとんどなかった。ところが、 β 受容体を刺激した場合には電気刺激による細胞収縮の効果が有意に現れ、両者の刺激の間に何らかの相乗的な効果が存在することが明らかになった。それはおそらく β 受容体刺激によるAキナーゼ (protein kinase A) を介したタンパクの転写・合成の亢進と筋小胞体のカルシウム放出・回収能の亢進によるカルシニューリンを介したタンパクの転写・合成の亢進が加算的に起こるためではないかと考えられる (図8)。また、細胞外Ca²⁺濃度を増加させても総タンパク量には影響がなかったことから、AキナーゼがL型CaチャンネルからのCa²⁺の流入量を増加させ、筋小胞体から放出されるCa²⁺を増加させる経路よりも、Aキナーゼが筋小胞体Ca²⁺-ATPaseのCa²⁺回収を抑制しているフォスホランバンの抑制解除を行う経路が主に細胞肥大に関与していることが考えられる。

本研究における α アクチンと β ミオシンの解析から、 β 受容体刺激による細胞肥大は収縮関連タンパクの増加をともなう現象であることがわかった。しかし、本研究から得られた最も重要な知見は、細胞を収縮させることによりアクチンとミオシンが増加する傾向にあることがわかったことである。このことは総タンパク量の解析では検出できなかった。この結果より、細胞収縮は全く

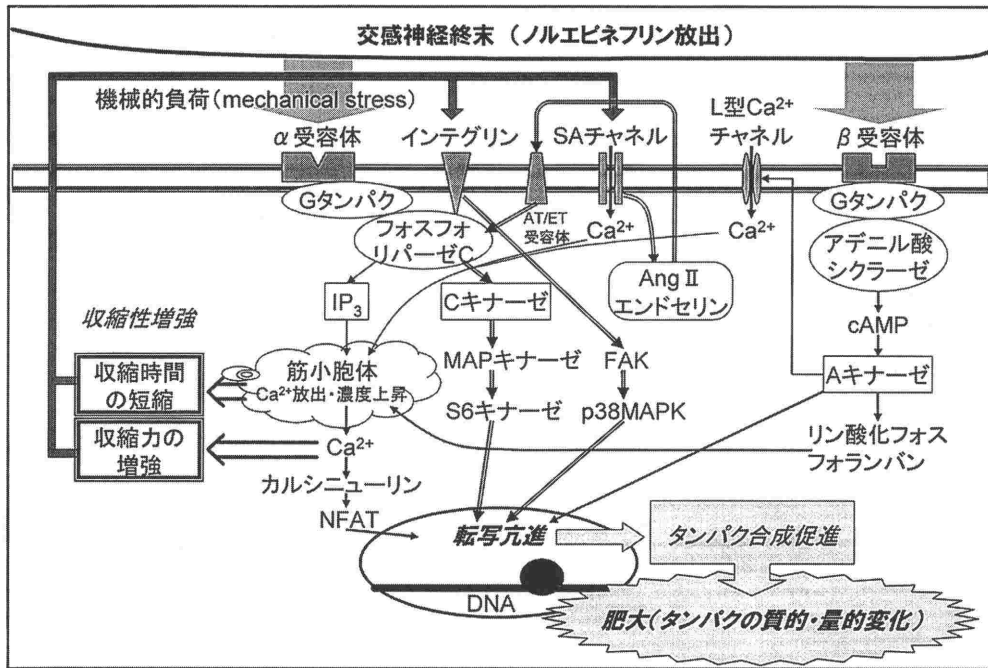


図8 細胞肥大に関連する細胞内信号伝達系路

細胞肥大に関与しないのではなく、総タンパク量にはほとんど現れないがアクチンとミオシン等の収縮関連タンパクの合成増加を引き起こし、収縮機能を変化させている可能性があることがわかった。これに対し、β受容体刺激は総タンパク量に現れるほど多量の収縮関連タンパク以外のタンパクの合成増加をも引き起こし、細胞肥大に発展していく可能性があると考えられる。この推察は、β受容体刺激により静置した心筋細胞の非収縮関連タンパクのみが増加するというDubusらの報告⁸⁾と一致している。そしてこのことは、細胞収縮がβ受容体刺激とは異なるメカニズム(経路)でタンパク合成促進を誘発している可能性を示している。小室らは機能的負荷により細胞肥大が誘発される経路を明らかにし¹²⁾、その経路によりβミオシンやαアクチンといった収縮関連タンパクを産生する胎児型遺伝子が特異的に発現することを明らかにした^{13,14)}。これらのことから、本研究において心筋細胞は細胞収縮により自分自身の機能的負荷感受性受容体を刺激し、図8に示すように小室らが示した力学的ストレスに関する信号伝達経路を介して収縮関連タンパクの合成を特異的に亢進していた可能性が示唆される。

細胞収縮により収縮関連タンパクの合成は亢進したが、その収縮力の亢進による収縮関連タンパクの有意な増加は本研究では認められなかった。培養日数との関係や発現遺伝子の検索、増加収縮力の測定、α受容体刺激との関係、虚血環境下での変化等の今後の研究が期待される。

結 論

交感神経活動亢進と心筋細胞肥大発生の関係を明らかにするために、本研究では成熟ラット単離心筋細胞を24時間電気刺激しながら培養し、交感神経伝達物質の添加や細胞収縮力、収縮頻度の変化が細胞の大きさにおよぼす影響を検討した。その結果、交感神経作用の一つであるβ受容体刺激によって細胞肥大が誘発され、細胞収縮(電気刺激)と相乗的な効果を示すことがわかった。さらに、その変化は収縮関連タンパクにも見られ、力学的負荷に対する適応的な変化である可能性が示唆された。一方、電気刺激のみでは収縮関連タンパクのみが有意に増加し、β受容体刺激とは異なるメカニズムの変化が起こることが示唆された。これらの結果より、交感神経活動亢進によりβ受容体を介した細胞肥大と機能的負荷感受性受容体

を介した収縮関連タンパク産生増加による収縮機能変化が同時に起こる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 内貴 猛, 林あさこ, 河原剛一: 心筋細胞の単離とその力学的特性の測定, 第14回バイオエンジニアリング講演会 講演論文集, No.02-04, pp.241-242, 2002
- 2) Mitcheson JS, Hancox JC, and Levi AJ : Cultured adult cardiac myocytes: Future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovascular Res* 39 : 280-300, 1998
- 3) Simpson P : Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an α 1-adrenergic receptor and induction of beating through an α 1- and β 1-adrenergic receptor interaction. *Circ Res* 56 : 884-889, 1985
- 4) Wu J, Dent P, Jelinek T, et al : Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate. *Science* 262 : 1065-1069, 1993
- 5) Cook SJ, McCormick F : Inhibition by cAMP of ras-dependent activation of raf. *Science* 262 : 1069-1072, 1993
- 6) Haefner S, Adler HS, Mischak H, et al : Mechanism of inhibition of raf-1 by protein kinase A. *Mol Cell Biol* 14 : 6696-6703, 1994
- 7) Schäfer M, Pönicke K, Heinroth-Hoffmann I, et al : Beta-adrenoceptor stimulation attenuates the hypertrophic effect of alpha-adrenoceptor stimulation in adult rat ventricular cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol* 37 : 300-307, 2001
- 8) Dubus I, Samuel JL, Marotte F, et al : β -Adrenergic agonists stimulate the synthesis of noncontractile but not contractile proteins in cultured myocytes isolated from adult rat heart. *Circ Res* 66 : 867-874, 1990
- 9) Pinson A, Schluter KD, Zhou XJ, et al : α - and β -adrenergic stimulation of protein synthesis in cultured adult ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 25 : 477-490, 1993
- 10) Yamazaki T, Komuro I, Zou Y, et al : Norepinephrine induces the raf-1 kinase/mitogen-activated protein kinase cascade through both α 1- and β -adrenoceptors. *Circulation* 95 : 1260-1268, 1997
- 11) Ivester CT, Kent RL, Tagawa H, et al : Electrically stimulated contraction accelerates protein synthesis rates in adult feline cardiocytes. *Am J Physiol* 265 : H666-H 674, 1993
- 12) 田中真理子, 小室一成: “機械的刺激による心筋細胞肥大”, *医学のあゆみ* 187 : 842-846, 1998
- 13) Komuro I, Katho Y, Kaida T, et al : Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 266 : 1265-1268, 1991
- 14) Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, et al : Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 96 : 438-446, 1995

Effects of Contraction and Stimulation of β -adrenergic Receptors on the Hypertrophy of Cultured Myocardial Cells

Takeru Naiki*, Asako Hayashi*, and Koichi Kawahara*

*Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, Hokkaido, Japan

Detailed mechanisms underlying the genesis of myocardial cell hypertrophy caused by long-term mechanical overload have not yet been fully understood. In the present study, we investigated effects of the increased sympathetic nervous tone, which is considered to occur in order to maintain the normal cardiac output when the heart is mechanically overloaded, on cell hypertrophy. To do this, myocardial cells isolated from adult rats were cultured under electrical field stimulation, and the effects of an agonist of sympathetic receptors, and the frequency and intensity of cell contraction on the mass of the cells were investigated by measuring the total protein content and the contents of α -actin and β -myosin.

The cell hypertrophy was induced by stimulating β -adrenoceptors, and was enhanced by concurrent cell contraction (electrical stimulation). These changes were associated with the increase in the contents of actin and myosin, indicating that the cell hypertrophy induced in the present study may be an adaptive response against the mechanical overload if it would occur in vivo. On the other hand, the cell contraction itself significantly increased the contents of actin and myosin. The present study suggested that the increased sympathetic nervous tone induced hypertrophy by stimulating β -adrenoceptors together with the increase in contractile proteins through mechanoreceptor activation.

Key words : Cell hypertrophy, Sympathetic nerve, Mechanical overload, β -receptor, Contractility of myocardial cell, Electrical stimulation

(Circ Cont 24 : 378~385, 2003)