

心筋梗塞によるリモデリング心の NCX 発現量増加と 二次的虚血によるアポトーシスとの関係

齊 藤 直*, 河 原 剛 一*

要 旨

本研究では、心筋梗塞によるリモデリング心が虚血・再灌流傷害を受けた際の脆弱性と NCX 発現動態との関連の解明を目的とした。雄の成体ラットにおける心筋梗塞由来リモデリング心を摘出して灌流心を作製し、虚血・再灌流傷害負荷を与えた結果、対照心と比較して有意な NCX1 発現量の増加および Caspase-3 活性と Calpain 活性の増加が確認された。このことは、心筋梗塞による心室リモデリング時に NCX 発現量が増加したため、その後の虚血・再灌流傷害時に NCX 機能逆転による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が促進され、その結果アポトーシスの誘導が促進された可能性を示唆している。

緒 言

心肥大・心不全の心筋細胞において、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がその病態に重要な役割を果たしていることが知られており¹⁾、心肥大・心不全心筋細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の分子メカニズムを解明することは大変有意義なことである。虚血傷害時には Na^+/Ca^{2+} 交換体 (NCX) 機能の逆転により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが示唆されている²⁾。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇はアポトーシスシグナルカスケードを惹起する因子の一つであることから、虚血・再灌流傷害時における NCX 機能逆転が心筋細胞死に影響を及ぼしている可能性がある。また、肥大心や不全心において NCX 発現の上昇が報告されている^{3,4)} ことから、もし肥大心筋細胞における NCX 発現上昇が生理的に過剰発現であり、そのこ

とにより NCX 機能逆転時の細胞内 Ca^{2+} 濃度が異常に上昇するとすれば、このことが肥大心やリモデリング心における二次的な虚血傷害に対する脆弱性に影響を及ぼしていることが考えられる。そこで本研究では、リモデリング心が虚血・再灌流傷害を受けた際の脆弱性と NCX 発現動態との関連の解明を目的とした。

方 法

A. リモデリング心の作製^{5,6)}

成体ウィスターラット (250~350g) に対して冠動脈結紮による心筋梗塞モデルを作製し本実験における一次的虚血とした。心筋梗塞モデルの作製手順は次の通りである。まず始めにジエチルエーテルで麻酔を掛け、その後気管にポリエチレンチューブを挿管してからレスピレータにチューブを繋いで人工呼吸を施す。それから胸部の皮膚を切開し、胸筋、前鋸筋を鉗子にて鈍的に剥離切開した後、第4~5肋間を鉗で切開し、胸骨下に開創器を入れて開創部を広げる。その後、心膜を鈍的に剥離した後切開部より心臓を圧出し、冠動脈左前下行枝を起始部より約2mmの部位で絹糸(5-0)にて結紮する。結紮後は心臓を元の位置に素早く戻し、ナイロン糸(4-0)にて胸部筋肉切開部位および胸部皮膚切開部位を縫合する。麻酔が解けたら挿管していたチューブを外し、ラットをケージに移して飼育する。

B. 灌流心の作製

二次的虚血は冠動脈結紮手術後1週間経過した灌流心において、灌流を止めることによって負荷した。灌流心の作製方法は次の通りである。まず対象のラットにジエチルエーテルで麻酔を行い、

*北海道大学大学院情報科学研究科細胞情報工学研究室

その後腹部を切開して下大静脈よりヘパリン溶液を投与する。数十秒後に胸部を開き弓状大動脈より自作カニューレを挿管した後、素早く心臓のみ摘出する。カニューレにチューブを繋ぎ、灌流ポンプにて Krebs-Henseleit buffer (KHB) 溶液 (mM: NaCl 120; KCl 4.7; CaCl₂ 1.2; NaHCO₃ 25; MgSO₄ 1.2; KH₂PO₄ 1.2; glucose 11) を 2ml/min の一定流量で灌流させる。KHB 溶液を 95% O₂ と 5% CO₂ の混合ガスにて飽和させ、温度は 37°C に保つ(図1)。

C. 虚血・再灌流傷害実験プロトコル

図2は虚血・再灌流傷害実験プロトコルの概略図である。虚血・再灌流傷害 (Ischemic heart) では 30 分間 KHB 溶液を灌流した後、灌流を止めて 37°C の生理食塩水の中で 30 分間放置する。その後再灌流として 60 分間 KHB 溶液を灌流する。対照心 (Control heart) では 120 分間 KHB 溶液を灌流し続ける。虚血・再灌流実験および対照実験ともリモデリング心 (Remodeled heart) と非手術心 (Non-remodeled heart) の両方を対象として行った。

D. TTC 染色

本実験における細胞壊死部位および形態学的変化を観察するために、本実験モデルから心臓を摘

出して Triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) 染色を行った。TTC 染色では生存細胞が赤く染色されるのに対し、壊死細胞は染色されない。染色方法は、まず灌流心作製方法と同様にして心臓を摘出し、カニューレを灌流ポンプに設置されたチューブに繋ぎ、灌流ポンプを用いてチューブより 2% TTC 溶液を 20 分間灌流する (2.5ml/min)。その後、4% フォルマリン溶液を 20 分間灌流する (2.5ml/min)。灌流終了後、心臓を 1~2mm の厚さで横断し、その切片をデジタルカメラにて撮影する。

E. ウェスタンブロット解析

活性化した Caspase-3 ならびに活性化した Calpain はアポトーシスシグナルカスケードにおいて重要な役割を果たしている。そこで本実験ではアポトーシスの誘導を評価する目的で Caspase-3 および Calpain の活性強度の解析を行った。また NCX の発現動態を評価するために NCX1 の発現量の解析も行った。NCX1 の発現量、Caspase-3 の活性強度および Calpain の活性強度を解析するために、Anti-NCX1 抗体、Anti-cleaved caspase-3 抗体および Anti- α -fodrin 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。 α -fodrin は活性化した Calpain により特異的に断片化されることによって 145 kDa の断片を生ずるため、本実験においては α -fodrin を Calpain 活性強度解析の対象として用いた。方法はまずラットから心臓を摘出して左心室壁の部位を切り取りホモジネイトしてサンプルを採取する。ここで、リモデリング心においては左心室壁の菲薄化した部位は取り除いた上でホモジネイトする。ウェスタンブロットには蛋白量が 30 μ g となるようにサンプルを用いる。抗体は各 1 次抗体、2 次抗体共に 2000 倍に希釈して使用した。

NCX1 の発現量、Caspase-3 活性および Calpain 活性の強度を相対的に数値化するために、ウェスタンブロット解析によって求められた X 線フィル

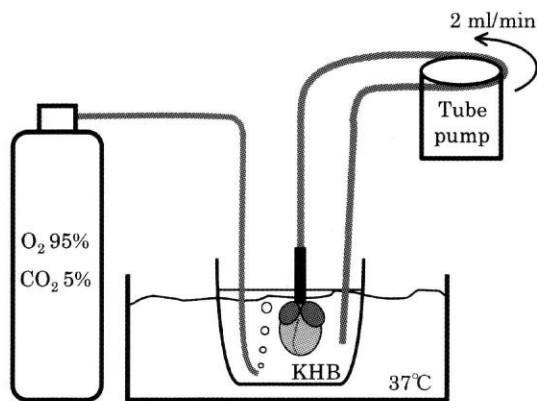


図1 摘出心灌流システムの概略図

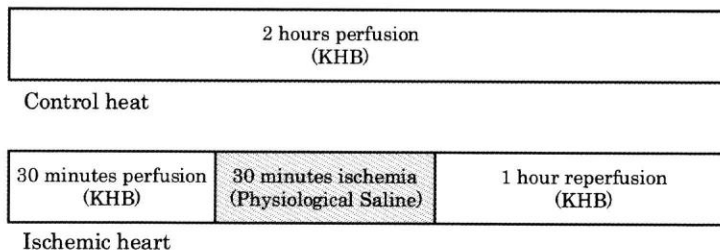


図2 虚血・再灌流傷害実験プロトコル

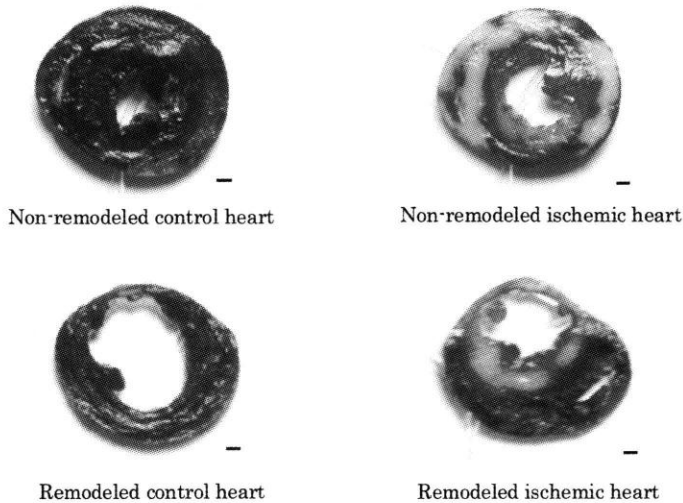


図3 TTC染色による心筋壊死部位の同定と心臓の形態変化(スケール・バー:1mm)

ム画像をもとに、画像解析ソフト(Scion Image)を用いて蛋白量の解析を行った。ウェスタンブロットを行う際に、特定の1頭の非手術対照ラットより採取したサンプルを必ず1レーン流し、その解析値を1.0としてその他のレーンの蛋白量を数値化した。その後、全ての非手術対照ラット(n=6)の値の平均値を求め、その値で解析を行った全ての値を正規化してグラフ化した。

グラフ上の測定値は平均±標準偏差で示した。分散分析にて全群間の有意差検定を行い、有意差があった場合の各群間の有意差検定はFisherの最小有意差法により行った。危険率が5%未満を統計的に有意と判定した。

結 果

A. 形態学的変化および細胞壊死発現部位

TTC染色を行った結果を図3に示した。有色の部位は生存細胞を、白く抜けている部位は壊死細胞を示している。図3において形態学的変化を見ると、リモデリング心では心室リモデリングの特徴である心室壁の菲薄化や心室拡大が現われていることが確認できる。一方、非手術心では形態学的変化は認められなかった。また、二次的虚血の有無による特徴的な相違は認められなかった。

細胞壊死に関しては、二次的虚血を行っていない対照心(Control heart)では壊死細胞が確認されないが、二次的虚血を行った心臓(Ischemic heart)では広範囲に渡って壊死細胞が確認された。

B. ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析の結果を図4に示した。リモデリング心におけるNCX1の発現量は二次的虚血負荷の有無に拘らず非手術心に対して有意に増加していた(図4A)。NCX1の発現量に関しては二次的虚血負荷による有意差は現われなかった。

Calpain活性はリモデリング心において非手術心よりも有意に高く、また、リモデリング心においては二次的虚血を行った心臓の方が対照心よりも有意にCalpain活性が高かった(図4B)。Caspase-3ではCalpain活性と同様の結果に加え、非手術心においても二次的虚血を行った心臓の方が対照心よりも有意に活性が高かった(図4C)。

リモデリング心と非手術心それぞれにおいて、二次的虚血心と対照心との活性強度の差を見てみると、Calpain活性ではリモデリング心において増加量が大きい傾向を示し(リモデリング心0.84 vs 非手術心0.29)、Caspase-3に関してはCalpain程ではないもののリモデリング心において増加量が高い傾向を示した(リモデリング心1.26 vs 非手術心1.05)。

考 察

心肥大・心不全の心筋細胞において、 Ca^{2+} -カルモジュリン複合体によって活性化される脱リン酸化酵素・カルシニューリンが肥大応答の媒介役となること、細胞内 Ca^{2+} の上昇が心筋細胞アポトーシスを誘導することなど、 Ca^{2+} がその病態におい

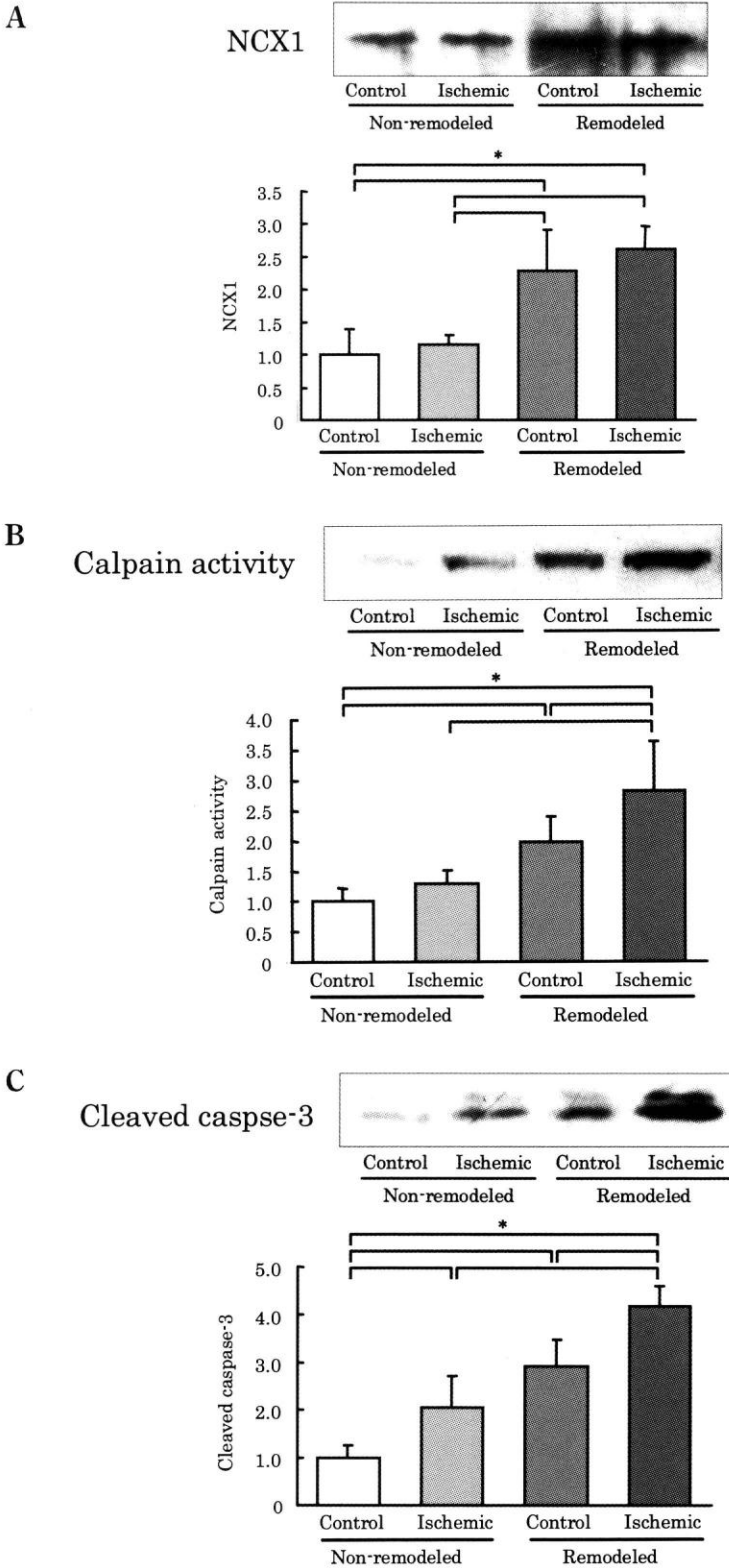


図4 ウェスタンブロットによる NCX 発現量(A), Calpain 活性(B)および Caspase-3 活性(C)の解析 (グラフ中 n=6, *: p<0.05)

て重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた^{8,9)}.

心筋細胞において Ca^{2+} 輸送に関わっている分子としては、細胞膜上の L 型 Ca^{2+} チャンネル、NCX、 Ca^{2+} -ATPase、筋小胞体上のリアノジン受容体、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase などが挙げられる。その中で、肥大心や不全心において NCX の発現量が上昇することが確認されている。

心筋梗塞が生じて虚血状態に陥ると細胞内は酸性に傾く。そこで細胞内 H^+ を細胞外へ排出して酸性を解消するために Na^+/H^+ 交換体が稼働し、細胞内 H^+ は細胞外へと排出され、同時に細胞内へ Na^+ が取り込まれる。次に上昇した細胞内 Na^+ 濃度を下げる必要があるが、虚血による細胞内 ATP 枯渇などにより Na^+/K^+ ATPase の機能は低下しているため、NCX の機能逆転が生じて細胞内 Na^+ を細胞外へ排出し、細胞内へ Ca^{2+} を取り込んでいる可能性がある。この時、虚血傷害によって Ca^{2+} ATPase の機能が低下しているため細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが考えられる。肥大心筋細胞において NCX 発現量が増加すること、および細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇はアポトーシスを誘導することを考慮すると、肥大した心筋細胞は虚血傷害に対して非常に脆弱になっていることが予測される。そこで本研究では、心筋梗塞によって心室リモデリングを生じた心臓を対象として、虚血・再灌流傷害を受けた際の脆弱性と NCX 発現動態との連関を解析した。

TTC 染色によって心筋壊死部位を確認した結果、二次的虚血を行った心臓では心室リモデリングの有無に拘らず壊死細胞が確認できた。目視的には一次的虚血を行っていない心臓の方が、心筋壊死領域が大きい傾向が認められた。これには、一次的虚血によるプレコンディショニング効果の関与の可能性が考えられる。今後この現象に関する詳細な解析が必要である。

左心室筋における残存心筋細胞を用いたウェスタンブロットの結果、リモデリング心において NCX1 発現量の有意な増加が認められた。二次的虚血の有無による有意差は無かったことより、NCX1 発現量の増加は二次的虚血による直接的なものではなく、心室リモデリングによって心筋肥大が惹き起こされ、NCX1 の発現量が増加したた

めであると考えられる。

Calpain 活性および Caspase-3 活性は心室リモデリングの有無で比較した場合、リモデリング心において活性が高く、二次的虚血の有無で比較した場合、二次的虚血を行った心臓において活性が高かった。また、リモデリング心と非手術心それぞれにおいて、二次的虚血心と対照心との活性強度の増加率では、リモデリング心において増加率が大きい傾向を示した。このことは細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によってアポトーシスが促進されたことを示唆している。リモデリング心では NCX1 の発現量が増加していることより、二次的虚血によって惹き起こされる NCX の機能逆転と NCX1 発現量の増加が、リモデリング心における二次的虚血による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を促進し、アポトーシスの誘導を促進している可能性がある。

結 論

NCX1 の発現量はリモデリング心において対照心に比べて有意に増加していることが確認された。また、虚血・再灌流傷害による Calpain 活性および Caspase-3 活性がリモデリング心において対照心よりも有意に増加しており、その増加率もリモデリング心の方が大きい傾向を示した。このことは、NCX1 発現量の増加によって、虚血・再灌流傷害時の NCX 機能逆転による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が促進され、アポトーシスの誘導が促進された可能性を示唆している。

以上、本論文の要旨は第 27 回循環制御医学会総会 (2006 年 東京) で発表した。

文 献

- 1) 福富 匡, 黒瀬 等: 心筋におけるシグナル伝達. 生体の科学 2004; 55: 296-303.
- 2) Ladilov Y, Haffner S, Balsler-Schafer C, et al: Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. Am J Physiol 1999; 276: H1868-76.
- 3) Sipido KR, Volders PGA, Vos MA, et al: Altered $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? Cardiovasc Res 2002; 53: 782-805.
- 4) Schillinger W, Fiolet JW, Schlotthauer K, et al: Relevance of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in heart failure. Cardiovasc Res 2003; 57: 921-33.

- 5) Saitoh T, Nakajima T, Kawahara K: Possible involvement of apoptotic death of myocytes in left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Jpn J Physiol* 2003; 53: 247-52.
- 6) Saitoh T, Nakajima T, Takahashi T, et al: Changes in cardiovascular function on treatment of inhibitors of apoptotic signal transduction pathways in left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 2006; 15: 130-8.
- 7) Wang KKW: Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 2000; 23: 20-6.
- 8) Wilkins BJ, Molkentin JD: Calcineurin and cardiac hypertrophy: Where have we been? Where are we going? *J Physiol* 2002; 541: 1-8.
- 9) Wilkins BJ, De Windt LJ, Bueno OF, et al: Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 7603-13.

Pathophysiological Role of the Increase in the Expression of NCX Responsible for the Increased Vulnerability to Ischemia/Reperfusion in the Remodeled Hearts

Tadashi Saitoh*, Koichi Kawahara*

*Laboratory of Cellular Cybernetics, Graduate School of Information Science and Technology, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

The aim of this study is to evaluate the relationship between the increase in the expression of Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) and the increased vulnerability to ischemia/reperfusion in the remodeled hearts. The coronary artery of male adult rats was ligated. One week later, the hearts were removed and perfused with Krebs-Henseleit buffer (KHB) solution. Control hearts were perfused with KHB solution for 2 hours. Ischemic hearts were first perfused with KHB solution for 30 minutes, and then the perfusion was perfectly terminated and the hearts were immersed in saline for 30 min. The hearts were perfused again with KHB solution for 1 hour. Western blotting revealed that the expression of

cardiac NCX in the remodeled hearts was significantly increased as compared with that in the non-remodeled hearts. Both the secondary ischemia-induced increases in the caspase-3 cleavage and the calpain activity were more intensively detected in the remodeled hearts than those in the non-remodeled hearts. These results suggest that the expression of cardiac NCX is increased in association with cardiac remodeling, and that the secondary ischemia might result in the marked increase in the concentration of intracellular Ca²⁺ via reversed NCX, leading to the increase in apoptotic cardiomyocytes in the remodeled hearts.

Key word : Na⁺/Ca²⁺ exchanger, remodeled heart, ischemia/reperfusion, apoptosis

(*Circ Cont* 2006; 27: 352-357.)