

組み換え心房性ナトリウム利尿ペプチドは不全心筋細胞において
イソプロテレノールによるミトコンドリア ROS 産生を抑制し、
リアノジン受容体を介した異常な Ca^{2+} leak を是正する

村上 和華子

山口大学大学院医学系研究科 応用医工学系専攻
器官制御医科学領域 器官病態内科学分野

平成28年10月

目次

第1章 要旨	3
第2章 諸言	3
第3章 研究方法	4
3.1 高頻拍右室ペーシングによるイヌ心不全モデルの作成	4
3.2 ペースメーカー植え込み後の管理, 血行動態評価	5
3.3 心筋細胞の単離	5
3.4 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) による抗酸化作用の評価	5
3.5 二重免疫組織化学染色によるミトコンドリア酸化ストレスの評価	5
3.6 Ca^{2+} spark の測定	6
3.7 筋小胞体内 Ca^{2+} 濃度の測定	6
3.8 心筋細胞生存率	6
3.9 統計解析	7
第4章 結果	7
4.1 イヌ心不全モデルの血行動態評価	7
4.2 単離心筋細胞に対する ANP の抗酸化作用	7
4.3 単離心筋細胞における Ca^{2+} 制御に対して ANP および ISO が与える影響	12
4.4 心筋細胞生存率に ANP および ISO が与える影響	15
第5章 考察	16
第6章 結語	21
第7章 謝辞	22
第8章 参考文献	22

第1章 要旨

目的：

心不全において、カテコラミンは細胞内活性酸素種（ROS）の産生を誘導し、リアノジン受容体からの異常な拡張期 Ca^{2+} leak を増加させる。ROS の産生や Ca^{2+} 制御に対する心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）の作用に関しては未だ不明な点が多い。我々は外因性 ANP を用いて、ANP の心筋保護効果や作用機序について検討した。

方法と結果：

イヌ頻拍誘発性心不全モデルの単離心筋細胞を用いて、酸化 DNA に対する抗 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 抗体とミトコンドリアに対する抗 VDAC 抗体による二重免疫組織化学染色を行い、ミトコンドリア DNA における酸化的障害を評価した。また共焦点顕微鏡を用いて、ROS に対する蛍光プローブである 2,7-dichlorofluorescein diacetate により、ANP が ROS に与える影響について検討した。更に Ca^{2+} spark のプローブである Fluo-4AM を用いて、 Ca^{2+} spark 頻度を測定した。最後に培養心筋細胞を経時的に観察し、生存率を求めた。不全心筋細胞における二重免疫組織化学染色では、イソプロテレノール（ISO）はミトコンドリア DNA の酸化的障害を促進させたが、ANP 存在下においては ISO により誘導された DNA の酸化的障害は抑制された。また、不全心筋細胞では、正常心筋細胞と比較して ROS の産生や Ca^{2+} spark の有意な増加を認め、ISO 存在下では ROS の産生や Ca^{2+} spark の増加がより顕著となったが、ANP 存在下では有意に抑制され、且つ、筋小胞体内の Ca^{2+} 含有量に変化は認められなかった。最後に不全心筋細胞の生存率は正常心筋細胞と比較して有意に低下し、ISO 存在下ではより顕著となったが、ANP 存在下において生存率の改善が認められた。

結語：

ANP は ISO によって誘導されたミトコンドリアにおける ROS の産生を抑制し、異常な Ca^{2+} leak を是正することで、心筋細胞の生存率を改善させた。このように、心不全における ANP の新たな心筋保護効果が示唆された。

第2章 諸言

β アドレナリン受容体刺激は正常心筋細胞に対して細胞障害性を有する¹⁾⁻³⁾。Mann らはカテコラミンが 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 依存性に細胞内 Ca^{2+} 過負荷を誘導し、収縮帯壊死やアポトーシスなどの心筋細胞の機能不全や障害を引き起こすことを報告した¹⁾。また Bovo らはウサギ正常心筋細胞において、過剰な β 受容体刺激がミトコンドリアにおける ROS の産生を増加させ、不整脈源性となる Ca^{2+} wave を引き起こすことを証明

した³⁾。一方でカテコラミンにより誘導された Ca^{2+} 過負荷は細胞内ミトコンドリアを障害し、更にミトコンドリア内での ROS の産生を増大させる³⁾⁻⁵⁾。また、不全心筋細胞において認められるリアノジン受容体からの持続的な拡張期 Ca^{2+} leak は、カテコラミンの作用を増強させ、細胞内の Ca^{2+} 過負荷を誘導し、筋小胞体内の Ca^{2+} を消費させることで、心筋の不整脈源性や、更には細胞機能を悪化させる原因となる⁶⁾⁻¹⁰⁾。そして、カテコラミンやホスホジエステラーゼ (PDE) III 阻害薬は少量であったとしても不全心筋細胞において正常心筋細胞と比較して Ca^{2+} leak を増加させることが報告されている⁶⁾⁻¹¹⁾。

心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) は機械的刺激により心房から放出され¹²⁾、血清中の ANP 濃度は心不全患者において上昇していることが知られている¹³⁾。林らは、外因性 ANP であるカルペリチドが心不全患者において抗レニン-アンギオテンシン-アルドステロン作用および抗カテコラミン作用を有することを報告した¹⁴⁾。ANP は細胞膜上のグアニル酸シクラーゼ共役型受容体 (GCA-R) に結合するペプチドであるが、GCA-R は血管平滑筋、血管内皮細胞、中枢神経、末梢神経、副腎、腎臓、脾臓、そして心臓と多臓器に発現するため、ANP は生理学的に多彩な機能を有する¹⁵⁾。中でも、血管拡張作用、利尿作用、抗酸化作用、抗カテコラミン作用、抗アポトーシス作用が知られているが¹⁵⁾⁻¹⁶⁾、分子的な作用機序に関しては未だ明らかでない点が多い。今回の研究において、我々は不全心筋細胞における外因性 ANP が有する心筋保護効果、および作用機序について検討した。

第3章 研究方法

3.1 高頻拍右室ペーシングによるイヌ心不全モデルの作成

本研究には雌ビーグル犬 (10-13 kg, 3-4 歳) を用いた。いずれも北山ラベス (長野県伊那市) から提供された後、山口大学動物実験施設において飼育および保管した。大型飼育ケージ (90 cm×85 cm×80 cm) を各頭に用意し、照明サイクルは 12 時間、照明時間帯は 7 時-19 時とした。室温は $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ に保ち、飼料 (オリエンタル酵母, 東京) は毎日提供し、自動給水装置により飲料を供給した。健康状態はペースメーカー植え込み術前後で同施設飼育職員により観察され、必要性があれば獣医による診察や治療を施した。

心不全モデルおよびシャムの作成は既報の通りに施行した^{6)-8), 17)}。簡略に述べると、イソフルランおよびペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) による深麻酔を行い、透視下で左頸静脈からペースメーカーリード (Medtronic, Minnesota, 米) を挿入し、右室心尖部へ固定した。リードをペースメーカー (大正医科器械, 大阪府) に接続した後、頸部皮下にペースメーカーを植え込んだ。250 bpm の高頻度右室ペーシングを 28 日間行い、10 頭の心不全モデルを作成した。正常心機能の対照群として 10 頭のシャムを用意した。

3.2 ペースメーカー植え込み後の管理, 血行動態評価

左室心筋細胞の単離術前に, 我々は意識下において心拍数 (HR) や血圧 (BP) 測定, 心エコー図による心機能評価を施行し, 28 日間の高頻度右室ペースキングが心機能に与える影響について評価した. モデル作成後, イソフルランおよびペントバルビタールナトリウムによる深麻酔を行い, 人工呼吸を行った. 既報の通り, 開胸後, 速やかに心臓を切除した^{6)-8), 17)}. 全ての手技は山口大学動物実験施設手術室で施行した. また本研究は国立衛生研究所による実験動物の保護と使用のガイドライン (NIH Publication No. 85-23, 1996 改訂) を順守して実施した. 動物の飼育と実験計画は山口大学医学部動物倫理委員会により許諾された.

3.3 心筋細胞の単離

既報を参考に, 左室自由壁から心筋細胞を単離した^{6)-8), 17)}. 簡略に述べると, 冠動脈対角枝により還流されている左室自由壁領域を楔形に切除し, 緩衝液を還流させた. 混合ガス (95%O₂, 5%CO₂) で通気された MEM (Sigma-Aldrich, Missouri, 米) にコラゲナーゼ B (0.5 mg/dl) とコラゲナーゼ D (0.5 mg/dl) を追加した緩衝液 (50 μM Ca²⁺) により順行性還流を行った. 37°C, 1 時間還流後, コラゲナーゼ付加緩衝液内で心筋を切断し, 桿状の成熟した細胞を単離した. 心筋細胞の培養液は, Ca²⁺濃度を 50 μM から緩徐に上昇させ, 最終的に 1 mM とした. ラミニンコートし, 5%ウシ血清を添加した培地へ移し, 混合ガス (95%O₂, 5%CO₂), 大気圧で, 37°C, 1 時間培養した. 単离心筋細胞を培養皿に生着させた後, 培養液を交換し, 既報の通り, 各実験開始まで, 37°C で培養した^{8,11,17)}.

3.4 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) による抗酸化作用の評価

単离心筋細胞における細胞内 ROS を評価するため, 既報の通り, 蛍光プローブである DCFH-DA (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, 米) を用いた^{7,11,18)}. 蛍光画像 (励起波長 490 nm, 蛍光波長 530 nm) の撮影は共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, 独) を使用した.

3.5 二重免疫組織化学染色によるミトコンドリア酸化ストレスの評価

ミトコンドリア DNA の酸化的障害に関しては, マウス脳細胞を用いた中別府らの手法を参照し¹⁹⁾, ミトコンドリアに対する抗 VDAC 抗体および酸化 DNA に対する抗 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 抗体による二重免疫組織化学染色を行った. 単离心筋細胞は, 2%パラホルムアルデヒドを用いて固定した後, 37°C で 60 分間, RNase 液 (10 mg/mL RNase A, 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7.5 mM NaCl) で処理後, 0.05% TritonX-100 で 30 分間培養した. 一次抗体としてウサギ抗 VDAC 抗体(1:100) (Abcam, Cambridge, 英) およびマウス抗 8-OHdG 抗体(1:100) (日本老化制御研究所, 東京) を, 核の検出には DAPI (1:800) (Thermo Fisher Scientific) を用いた. ブロッキング液を洗浄後, 各抗体と共に 24 時間, 4°C で培養した. 一次抗体を洗浄後, Alexa Fluor 488 抗マウス IgG (1:300) (Thermo Fisher Scientific) および

Alexa Fluor 633 抗ウサギ IgG (Thermo Fisher Scientific) により可視化し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss) を用いて撮影した。抗 8-OHdG 抗体の蛍光強度を抗 VDAC 抗体の蛍光強度で除した値をミトコンドリアにおける DNA 障害と定義した。

3.6 Ca²⁺ spark の測定

Ca²⁺ spark は既報の通り、共焦点レーザー顕微鏡 LSM5 (Carl Zeiss) を使用して測定した^{8,11,17}。共焦点レーザー顕微鏡は Argon を蛍光源に備えた倒立顕微鏡 Axiovert 100 (Carl Zeiss) から構成され、40 倍油浸対物レンズ Plan-Neofluor (開口数 1.3, 励起波長 488 nm, 蛍光波長>505 nm) を設定して計測した。単離心筋細胞は、20 μM Fluo-4 AM (Thermo Fisher Scientific) で 20 分間、室温、暗所でローディングした後に洗浄した。細胞内 Ca²⁺濃度がペーシング開始後に定常状態へ達するまで約 30 秒を要するため、単離心筋細胞を 0.5 Hz, 30-50 秒間ペーシング (ION Optix, Massachusetts, 米) した後に Ca²⁺ spark の計測を開始した。Ca²⁺ spark 画像はラインスキャンモードを用いて、細胞の核を避けて長軸方向に 1 スキャンあたり 1.92 msec の時間速度で 3,000 スキャン (5.76 秒) を行った。解析には Ca²⁺ spark の自動解析ソフトである SparkMaster を使用した。心筋細胞の機能は経時的に劣化するため、Ca²⁺ spark 解析は 3 時間以内に終了させた。

3.7 筋小胞体内 Ca²⁺濃度の測定

単離心筋細胞を 60 秒間、0.5 Hz でペーシング後、20 mM カフェインの急速還流を行った。カフェインにより誘導された一過性の Ca²⁺ 濃度変化 (Ca²⁺ transient) を求め、既報の通り、筋小胞体内の Ca²⁺含有量を評価した^{8,11,17}。

3.8 心筋細胞生存率

単離心筋細胞は 5%ウシ血清アルブミンおよび 0.1 mM Ca²⁺含有の培養液と非血清の培養液 (DMEM, 24 mM HEPES, 6 mM taurine, 5 mM creatine, 2 mM L-carnitine, 100 U/mL penicillin, and 100 μg/mL streptomycin) を同量配合した培養液に、試薬を添加し、各々 baseline 群, 10 nM ANP 群, 10 nM ISO 群, 10 nM ANP+10 nM ISO 群の 4 群間に分類した。各細胞は最初に培養皿上で 2 分間ペーシングを行い、ペーシングによる細胞収縮を確認した。培養 0 時間, 24 時間, 48 時間で心筋細胞生存率を計測した。底面に格子を印字した培養皿を使用し、200 細胞/4 平方ミリメートル以上の細胞圧着を確認した。心筋細胞は既報を参考に、形態学的に評価し、横紋を認め、桿状の形態を保持した心筋細胞を生存心筋細胞と評価した²⁰⁻²¹。

心筋細胞の形態学的評価の正当性に関して、トレパンプルー染色を用いて同様の条件で検討を行った。横紋を認める桿状心筋細胞において不染色となる割合は、培養 0 時間で 98.7% (2282/2312 細胞)、24 時間で 97.7% (2161/2211 細胞)、48 時間で 94.9% (2173/2290 細胞) と高率であり、形態学的評価の正確性が示唆された (Supplemental Fig2)。

3.9 統計解析

ISO 存在下/非存在下, ANP 存在下/非存在下, そして不全心筋細胞/正常心筋細胞の各群における比較には多変量分散分析を行い、有意差の評価には Kruskal Wallis ANOVA 検定をおこなった。血行動態に関しては、対応のない t 検定を用いた。解析には SPSS 18.0 ソフトウェア (SPSS, Chicago, 米) を使用した。P 値 0.05 以下を統計学的に優位と評し、数値は平均±標準誤差で表した。

第4章 結果

4.1 イヌ心不全モデルの血行動態評価

4 週間高頻度右室ペーシング後、左室内径短縮率 (FS)、左室拡張末期径 (LVDD)、左室収縮末期径 (LVDS) は、心不全群において正常心機能群と比して有意に低下した。(FS; 正常心機能群 34.9 ± 1.6 vs 心不全群 13.7 ± 1.1 %, $P < 0.0001$, LVDD; 正常心機能群 31.6 ± 0.4 mm vs 心不全群 40.0 ± 0.5 mm, $P < 0.0001$, LVDS; 正常心機能群 20.6 ± 0.6 mm vs 心不全群 34.6 ± 0.8 mm, $P < 0.0001$) (Table 1). 心拍数、収縮期血圧に有意差は認めなかった。これまでに報告された同様のモデルにおける血行動態と同等であった^{8,11,22}。

Table 1.

	HR(bpm)	SBP(mmHg)	LVDD(mm)	LVDS(mm)	LVFS(%)
Sham(n=10)	130±4	125±5	31.6±0.4	20.6±0.6	34.9±1.6
HF(n=10)	132±4	122±4	40.0±0.5*	34.6±0.8*	13.7±1.1*

Sham; 正常心機能対照群, HF; ペーシング誘発性心不全群, HR; 心拍数, SBP; 収縮期血圧, LVDD; 左室拡張末期径, LVDS; 左室収縮末期径, LVFS; 左室内径短縮率. 各 10 頭で得られた数値を平均±標準偏差で示した。統計解析には対応のない t 検定を用いた。*正常心機能対照群に対して $P < 0.0001$ 。

4.2 単離心筋細胞に対する ANP の抗酸化作用

我々は不全心筋細胞において、ISO によって誘導された細胞内 ROS に対する ANP の抗酸化作用を評価するために、ANP を異なる濃度 (1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM) で用いた実験を行った。結果、10 nM 以上の ANP で抗酸化作用が認められることが判明したが、10 nM 以上の高濃度を用いても抗酸化作用は増強するわけではなく、有意な差がないことが明らかになった。そのため、以降の実験では ANP は一律に 10 nM とした。In vivo における 10 nM ANP は臨床応用されているカルペリチドの一般的な使用濃度と同等である。

Fig 1A に正常心機能群と心不全群の代表的な心エコー図の一例を示す。左室駆出率 (EF) は正常心機能群において 79%と保たれていたが、心不全群では 22%と著明に低下していた。

Fig 1A

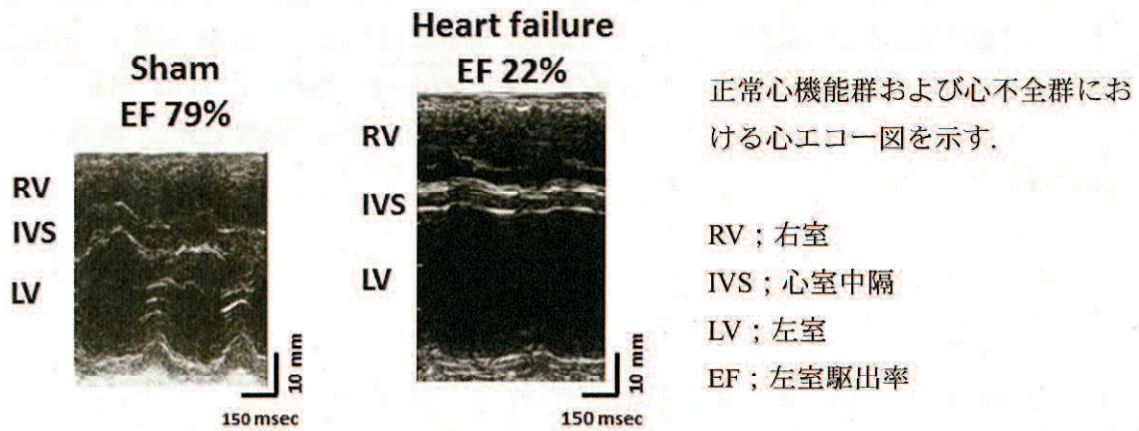
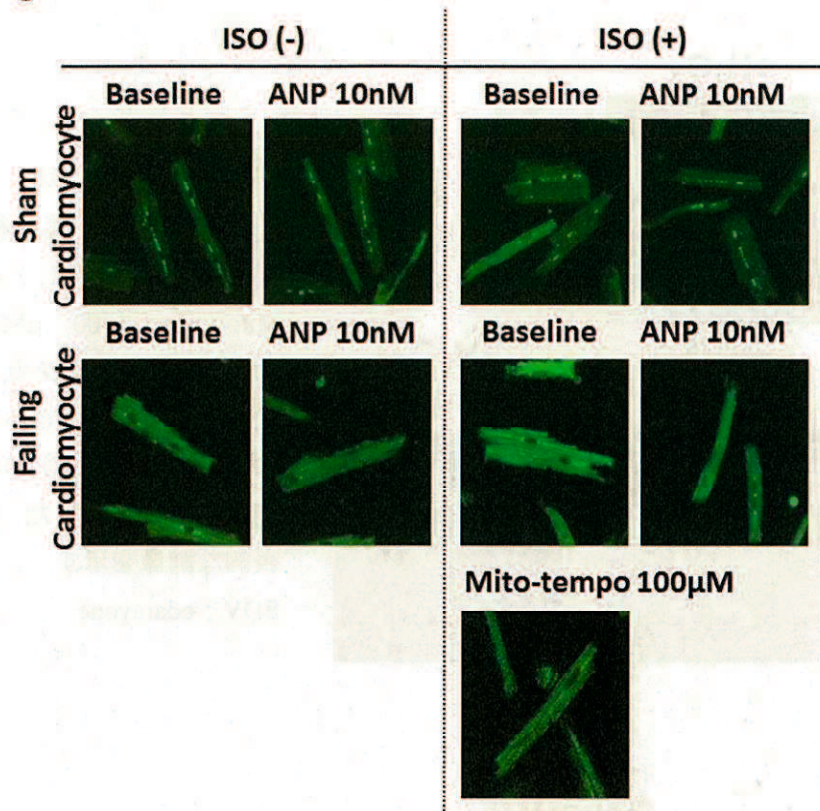


Fig 1A で示した正常心機能群, 心不全群の各々から単離した心筋細胞を Fig 1B に示す。いずれも細胞内 ROS に対する蛍光プローブである DCFH-DA ($1 \mu\text{M}$) と, 各試薬 (10 nM ANP , 10 nM ISO , 10 nM ANP+ISO) を添加した代表的な蛍光画像である。正常心筋細胞では, ANP 群, ISO 群, および ANP+ISO 群において, いずれの試薬も添加していない baseline 群と比較して, DCFH-DA の蛍光強度に差は認められなかった。対して, 不全心筋細胞の baseline 群は, 正常心筋細胞の baseline 群と比較して, 蛍光強度は増強しており, ISO 群においてはより顕著であった。しかし, ANP+ISO 群において, 蛍光強度は減弱し, 同様の変化は, ミトコンドリア ROS に対する特異的なスカベンジャーである Mito-tempo においても確認された (Fig 1B, C)。ここで, 正常心筋細胞に対して $25 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ を添加すると, 蛍光強度は著明に増加したが, ROS に対するスカベンジャーである $100 \mu\text{M edaravone}$ を投与すると蛍光強度が減弱することが確認された。対照的に edaravone の代わりに, 10 nM ANP および $100 \mu\text{M Mito-tempo}$ を投与しても, 蛍光強度は変化しなかった (Fig 1D, E)。

Fig 1B



正常心筋細胞および不全心筋細胞における細胞内 ROS の産生に関して、代表的な画像を示す。

単離心筋細胞に対して0.5Hzペーシング後、ROS に対する蛍光プローブであるDCFH-DA を用いて免疫蛍光染色を施行した。

上段；正常心筋細胞
下段；不全心筋細胞

Fig 1C

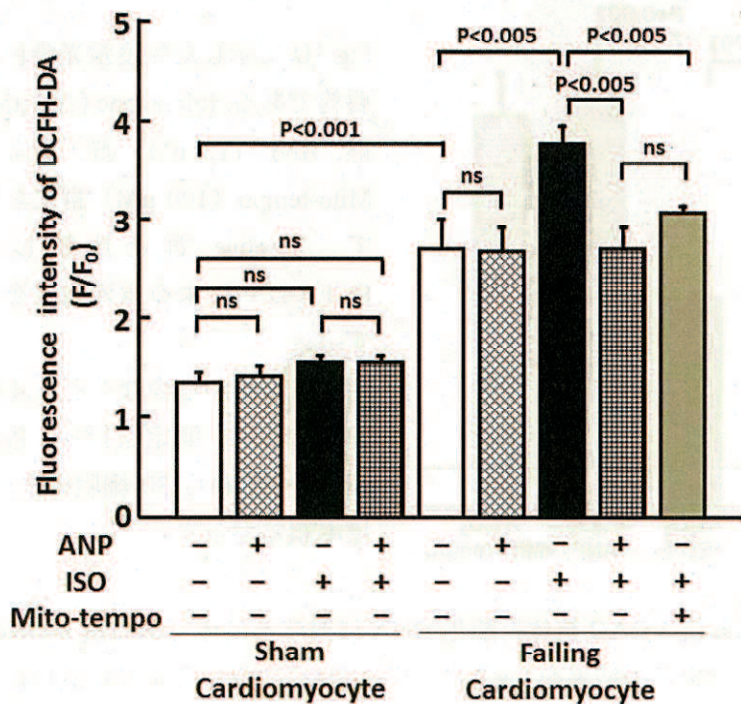
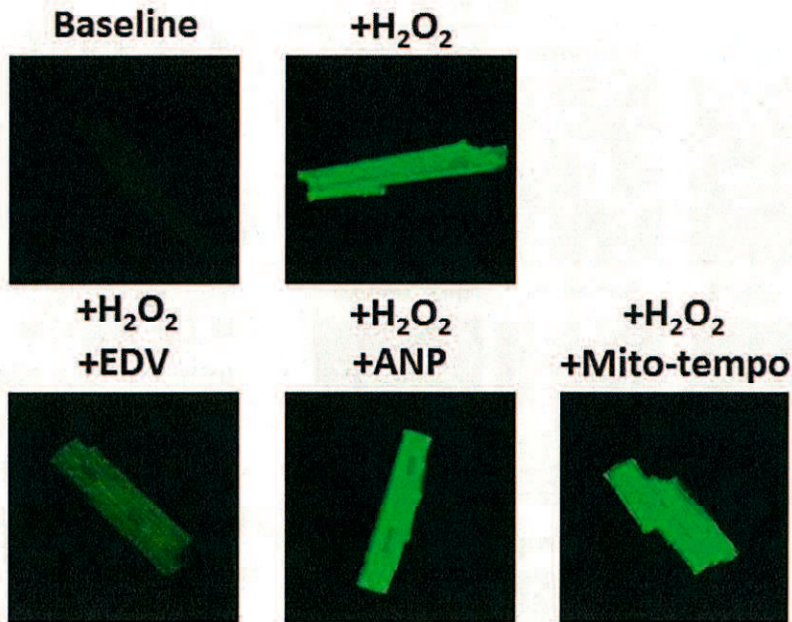


Fig 1B で示した免疫蛍光染色の要約である。

同じ培養皿から少なくとも4細胞を抽出し、測定を行い、各群は総計20から30細胞の平均±標準誤差で示す。

Fig 1D



正常心筋細胞に対して H_2O_2 (25 μM) 曝露後, ANP (10 nM), Mito-tempo (100 μM) およびフリーラジカルスカベンジャーである edaravone (100 μM) の抗酸化作用を評価した, 代表的な画像を示す. EDV; edaravone

Fig 1E

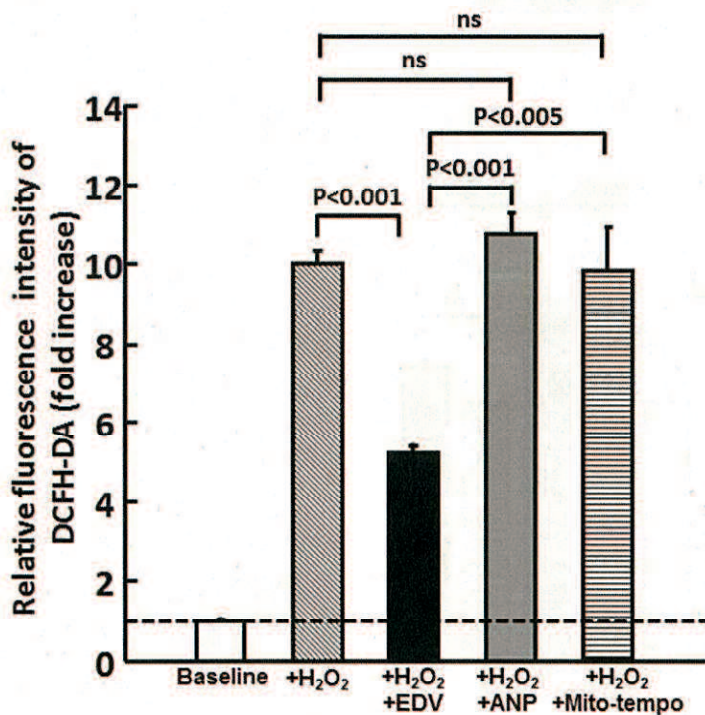
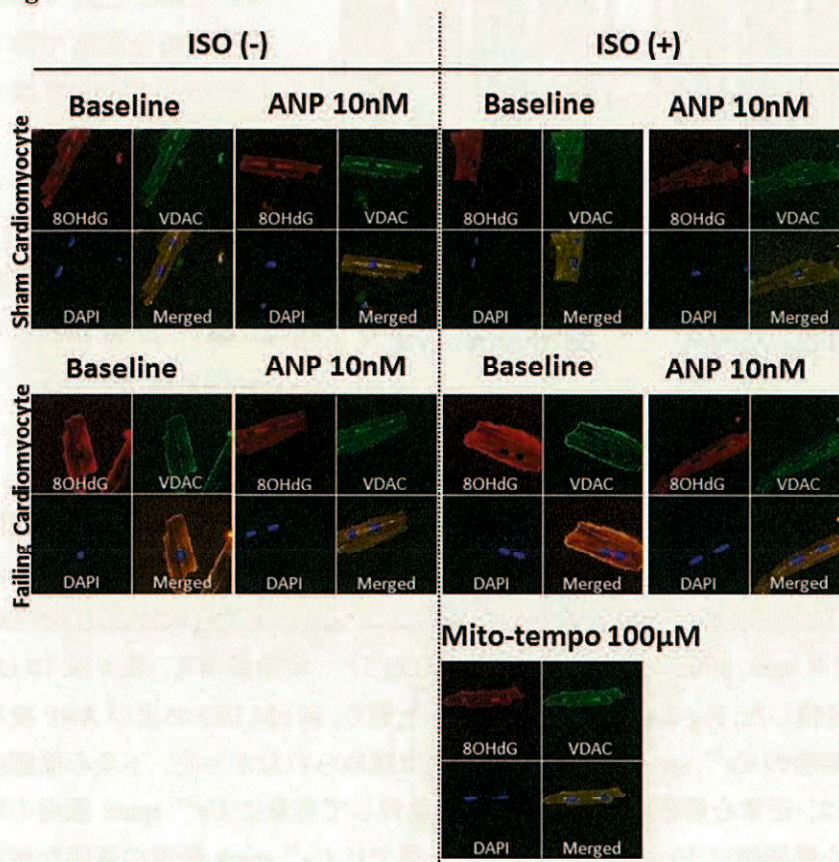


Fig 1D で示した免疫蛍光染色の要約である. Edaravone (100 μM) 群, ANP (10 nM) 群, および Mito-tempo (100 μM) 群において, baseline 群と比較した DCFH-DA による蛍光強度を表す. 同じ培養皿から少なくとも 4 細胞を抽出し, 測定を行い, 各群は総計 20 から 30 細胞の平均 \pm 標準誤差で示す.

抗ミトコンドリア抗体である抗 VDAC 抗体と酸化 DNA に対する抗体である抗 8-OHdG 抗体を用いた二重免疫組織化学染色の結果を Fig 2 に示す. VDAC に対する蛍光標識 (緑色) は細胞質内に限局しているが, その局在は 8-OHdG に対する蛍光標識 (赤色) と相似して

いる。正常心筋細胞において、ANP 群、ISO 群および ANP+ISO 群において、抗 8-OHdG に対する蛍光強度に変化は認められなかったが、不全心筋細胞における ISO 群では抗 8-OHdG に対する蛍光強度の増強を認めた。この結果から、ISO によってミトコンドリア内における ROS の産生が亢進したと考えられたが、一方、ANP+ISO 群、また 100 μ M Mito-tempo 群では抗 8-OHdG 抗体の蛍光強度は抑制された (Fig 2A)。抗 8-OHdG 抗体における蛍光強度を抗 VDAC 抗体における蛍光強度により除した値を relative mitochondrial DNA damage として求めた結果を Fig 2 B に示す。以上の結果からは不全心筋細胞において ANP は ISO によって誘導されたミトコンドリアの ROS の産生を抑制することが示唆された。

Fig 2A



ミトコンドリアに対する抗 VDAC 抗体および酸化 DNA に対する抗 8-OHdG 抗体による二重免疫組織化学染色の代表的画像を示す。核の染色には DAPI を用いた。細胞質内における 8-OHdG の免疫活性はミトコンドリア蛋白である VDAC の活性と共局在している。

上段；正常心筋細胞

中段；不全心筋細胞

下段；不全心筋細胞 ISO 群に対してミト

コンドリアにおける ROS に対するスカベンジャーである Mito-tempo (100 μ M) を添加した。

Fig 2B

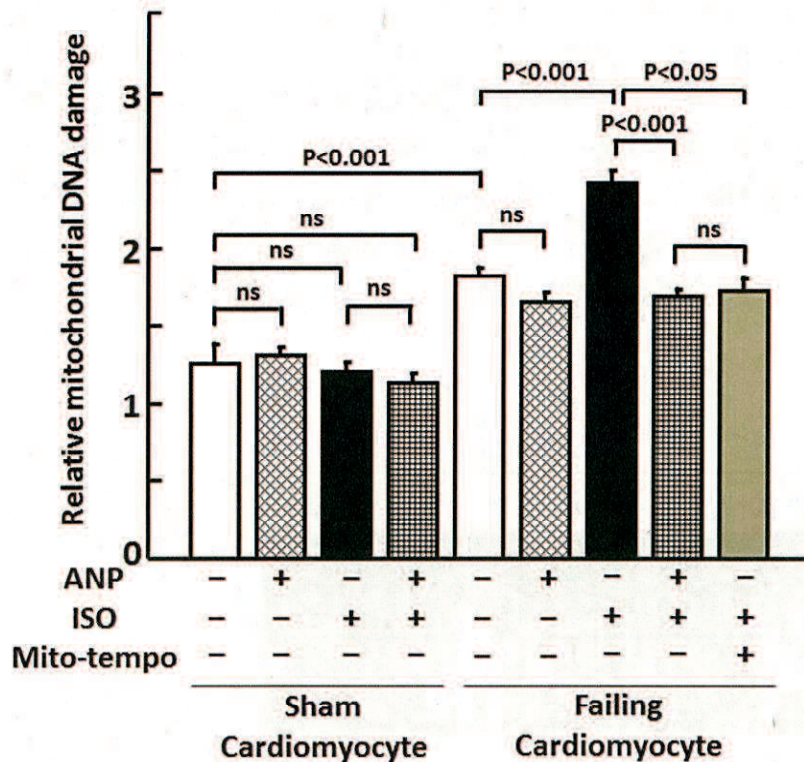
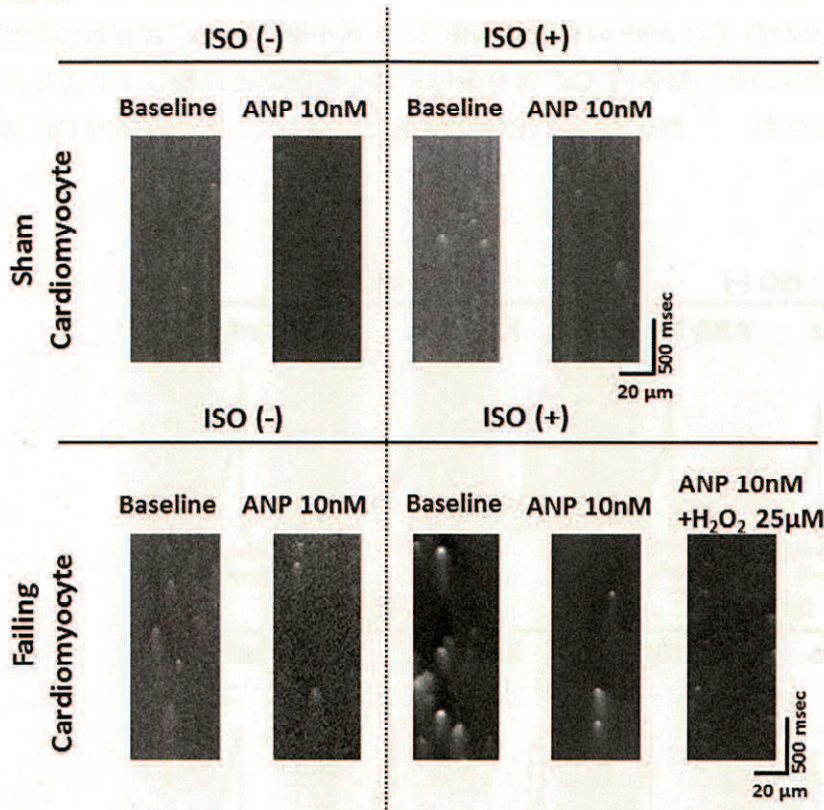


Fig 2A で示した免疫蛍光染色の要約である。各群間におけるミトコンドリアに対する相対的な障害を評価するために、抗 8-OHdG 抗体の蛍光強度を抗 VDAC 抗体の蛍光強度で除した値を平均±標準誤差で表す。同じ培養皿から少なくとも 4 細胞を抽出し、測定を行い、各群は総計 20 から 30 細胞の平均±標準誤差で示す。

4.3 単離心筋細胞における Ca^{2+} 制御に対して ANP および ISO が与える影響

正常心筋細胞に対して 10 nM あるいは 10 nM 以下の ISO を投与した場合、 Ca^{2+} spark 頻度 (events/100 μ m/sec) に変化を認めなかったが (0 nM; 0.90 ± 0.25 , 10 nM; 1.66 ± 0.30 , $p=0.07$), 30 nM あるいは 30 nM 以上の高濃度 ISO を投与した場合、 Ca^{2+} spark 頻度は増加した (0 nM; 0.90 ± 0.25 , 30 nM; 3.85 ± 0.66 , $p=0.0002$) (Supplemental Fig 1). 本結果から、我々は 10 nM ISO を“低濃度”ISO と定義した。Fig 3A および 3B に示した通り、10 nM ISO および ANP 投与群において、正常心筋細胞の Ca^{2+} spark 頻度に有意な差は認められなかった。不全心筋細胞の baseline 群においては、正常心筋細胞の baseline 群と比較して有意に Ca^{2+} spark 頻度の増加を認めた。更に不全心筋細胞に 10 nM ISO を投与した群では Ca^{2+} spark 頻度の著明な増加を認めた。しかし、ISO と共に ANP を投与した群では Ca^{2+} spark 頻度の増加は抑制された。ここで、ISO+ANP 群に 25 μ M H_2O_2 を投与した群においては Ca^{2+} spark 頻度は増加した。

Fig 3A



正常心筋細胞および不全心筋細胞における拡張期 Ca^{2+} spark の代表的な画像を示す。上段；正常心筋細胞 下段；不全心筋細胞

Fig 3B

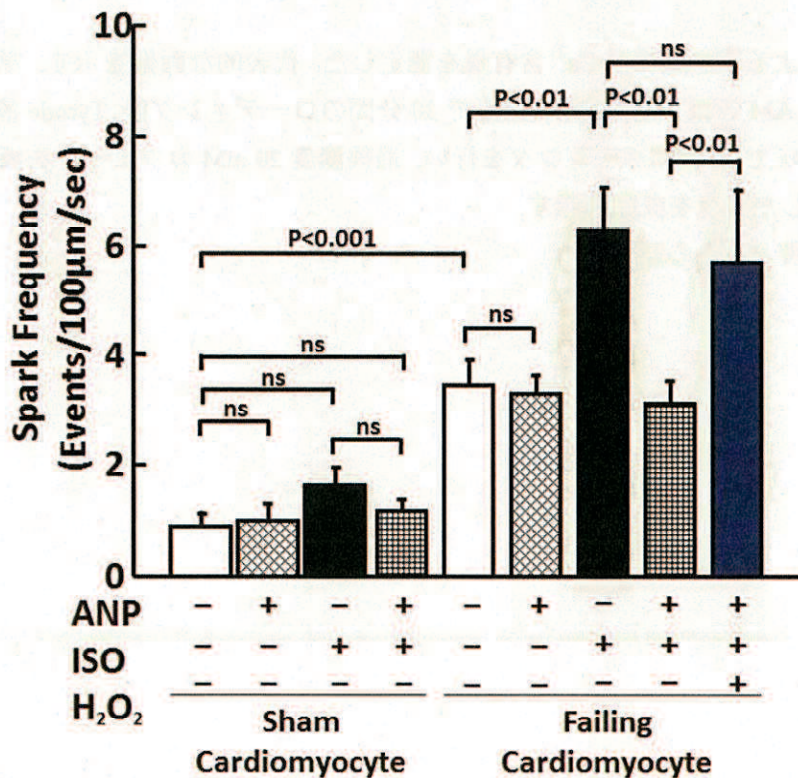
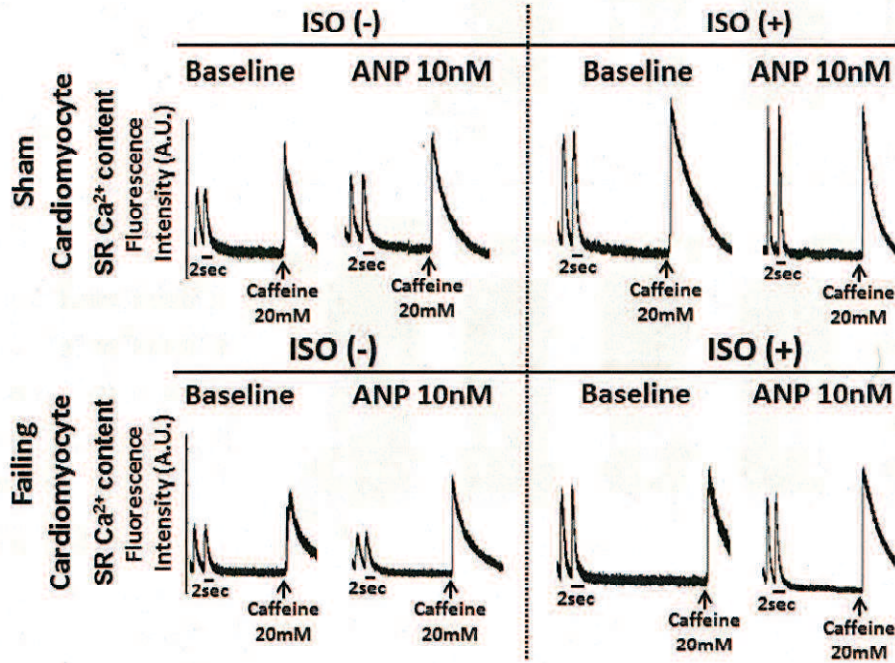


Fig 3B で示した免疫蛍光染色の要約である。不全心筋細胞において、ISO により拡張期 Ca^{2+} spark は増加するが、ANP を添加することで Ca^{2+} spark は抑制される。しかし、ISO に更に H_2O_2 を加えた群において、ANP を添加しても、 Ca^{2+} spark は抑制されない。同じ培養皿から少なくとも4細胞を抽出し、測定を行い、各群は総計20から30細胞の平均 \pm 標準誤差で示す。

ANP 群, ISO 群および ISO+ANP 群の各群における筋小胞体内 Ca^{2+} 含有量を Fig 4 に示す. 正常心筋細胞において, ISO 群では ANP の有無に関係なく, 筋小胞体内 Ca^{2+} 含有量の増加が認められた. 不全心筋細胞の筋小胞体内 Ca^{2+} 含有量は正常心筋細胞と比較して有意に低下していた. 不全心筋細胞において, ISO 群では ANP の有無に関係なく, 筋小胞体内 Ca^{2+} 含有量の増加が認められた.

Fig 4A



カフェインの急速還流による筋小胞体内 Ca^{2+} 含有量を測定した, 代表的な画像を示す. 単離心筋細胞に $20 \mu\text{M}$ Fluo-4 AM を添加し, 暗所, 室温で 30 分間のローディング後, Tyrode 液 (2 mM Ca^{2+}) で洗浄した. 2 Hz で 30 秒間ペーシングを行い, 最終濃度 20 mM カフェインを添加した. カフェインを添加した時点を矢印で示す.

上段; 正常心筋細胞, 下段; 不全心筋細胞

Fig 4B

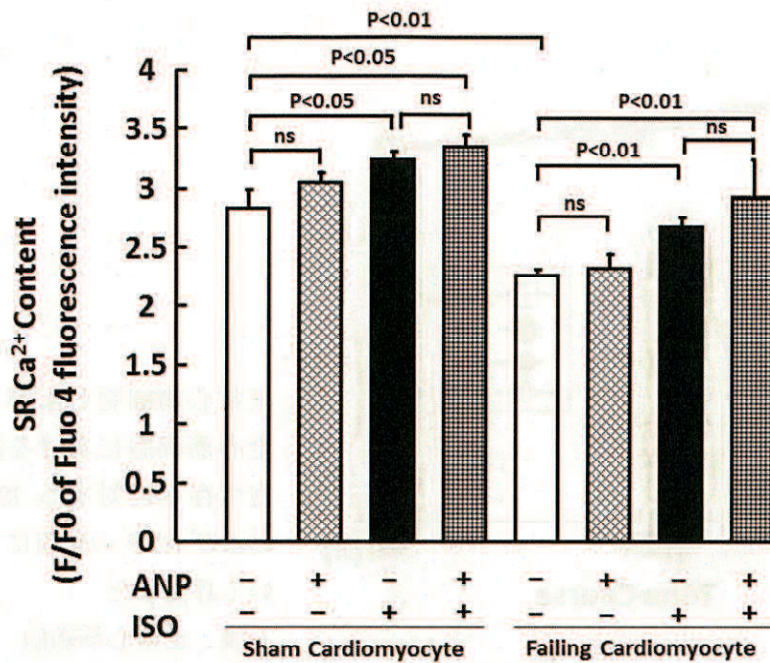


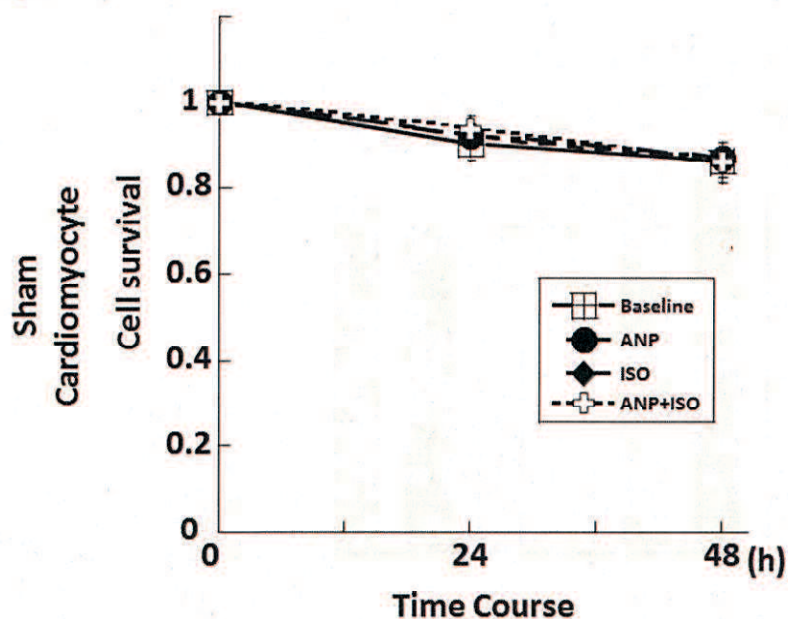
Fig 4B で示した免疫蛍光染色の要約である
 同じ培養皿から少なくとも 4 細胞を抽出し、測定を行い、各群は総計 20 から 30 細胞の平均±標準誤差で示す。

4.4 心筋細胞生存率に ANP および ISO が与える影響

単離心筋細胞において、培養開始時に、横紋を認め、桿状の形態を保持した心筋細胞を計数した(正常心筋細胞; n=1804, 不全心筋細胞; n=1540). 培養開始から 48 時間に渡り、10 nM ANP 群, 10 nM ISO 群, 10 nM ANP+10 nM ISO 群において、単離心筋細胞の形態学的変化を観察し、細胞表面が平滑で、且つ桿状の形態が保持されているか評価した。細胞の中には長軸方向に短縮したり、円球状に縮小し、非常に粗で突起状の細胞表面に変化したり、様々な形態異常が認められた。我々は、培養開始時の形態が維持された細胞を“viability”を保持した細胞と評価した。

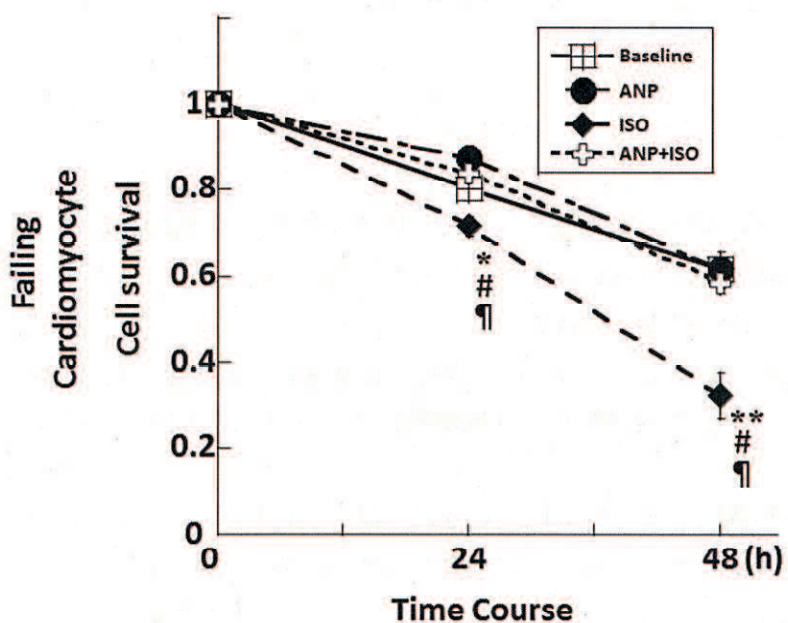
正常心筋細胞において、培養開始後 48 時間で、いずれの試薬も添加していない baseline 群での生存率は 90%であり、この結果は 10 nM ANP 群, 10 nM ISO 群, 10 nM ANP+10 nM ISO 群において有意差は認められず、培養開始時および 24 時間においても同様に差は認められなかった。一方、不全心筋細胞において、培養開始後 48 時間で、baseline 群での生存率および 10 nM ANP 群の生存率は 59%と低下していた。更に、10 nM ISO 群では 33%まで低下したが、10 nM ANP+10nM ISO 群では 56%まで改善した (10 nM ISO 群; 33 ± 5%, 10 nM ANP+10nM ISO 群; 56 ± 2%, p<0.01) (Fig 5) .

Fig 5



正常心筋細胞および不全心筋細胞における細胞生存率に対する ISO および ANP の作用について評価した。

上段；正常心筋細胞
下段；不全心筋細胞



* 不全心筋細胞 baseline に対して $p < 0.05$

**不全心筋細胞 baseline に対して $p < 0.01$

#不全心筋細胞 ANP 群 に対して $p < 0.05$

¶ 不全心筋細胞 ANP+ISO 群 に対して $P < 0.05$

平均±標準誤差で示す。

第5章 考察

我々は、本研究において、合成カテコラミンである ISO は低濃度であれば正常心筋細胞に対して細胞障害は与えないが、不全心筋細胞に対しては低濃度であっても、細胞内 ROS を増加させ、リアノジン受容体を介した拡張期 Ca^{2+} leak を誘導し、心筋細胞生存率を低下させることを示した。更に、不全心筋細胞において ISO により誘導された細胞障害は ANP により抑制され、その分子的な作用機序として、ISO により誘導されたミトコンドリアにおける

酸化ストレスの亢進が、GCA 受容体を介したシグナル伝達によって抑制されることを示した。この知見は本研究で行ったいくつかの実験結果により裏付けられ、以下に概括する。

DCFH-DA を用いた細胞内 ROS の測定においては、不全心筋細胞の baseline 群において、正常心筋細胞の baseline 群での蛍光強度と比較して有意に上昇していた。更に、不全心筋細胞において低容量 ISO を添加した群においては、不全心筋細胞の baseline 群と比較して蛍光強度は有意に上昇していた。しかし、ここで ISO に ANP を添加した群においては、ISO によって増強された蛍光強度は減衰していた。二重免疫組織化学染色においても同様な結果が認められた。不全心筋細胞において、ミトコンドリアの酸化 DNA は ISO 群で増加したが、ANP+ISO 群において、ISO により誘導された DNA 障害は抑制された。更に、不全心筋細胞の baseline 群において、 Ca^{2+} spark 頻度は上昇し、ISO 群ではより顕著となったが、ANP+ISO 群において、 Ca^{2+} spark 頻度は減少した。以上の結果を反映して、細胞生存率は心不全において、ISO 群では悪化したが、ANP+ISO 群では生存率の改善が認められた。

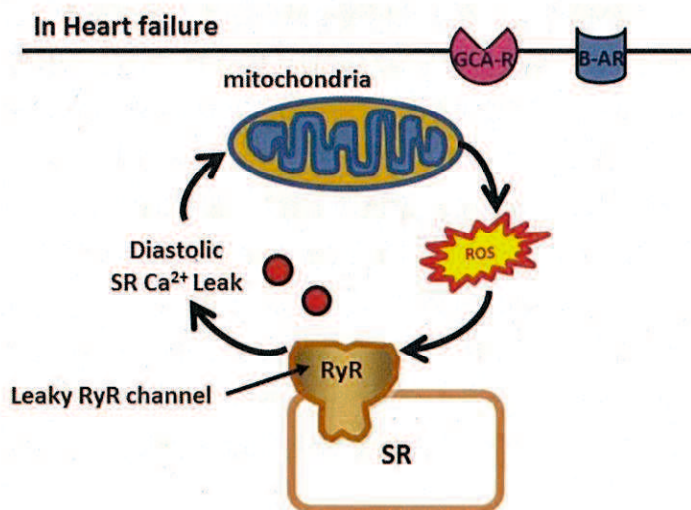
ANP における抗酸化作用の機序に関しては未だ明らかでないものの、免疫応答や²³⁻²⁵⁾、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系や交感神経系の抑制が関与していると報告されている^{14, 16, 26-28)}。本研究では、心不全において、外因性の ANP により、ISO によって誘導されたミトコンドリアの酸化的障害が抑制されることが示された。この結果から、ANP が抗酸化作用を為す際、最初にミトコンドリアに対して働きかけることが示唆される。不全心筋細胞において、心筋の酸化的障害は増加していることが報告されているが^{7, 18, 29, 30)}、その障害の源はミトコンドリアであると考えられている^{31, 32)}。この度の研究では、不全心筋細胞において、低容量の ISO においてもミトコンドリアにおける ROS の産生を促し、更に外因性の ANP により ROS の産生を抑制されたことを報告した。

本研究では、ANP がどのようにして ISO により誘導されたミトコンドリアの ROS の産生を抑えるのかを明らかにすることはできなかったが、文献的には、心不全や心肥大などの病的状態では、ANP はミトコンドリア生合成を保つ働きがあること³³⁾、またフェニレフリン処理された肥大心筋細胞において、ミトコンドリアで産生された ROS により誘導された分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) シグナル伝達を減少させる働きを持つことが報告されている³⁴⁾。アドレナリン受容体刺激はこのような病的な状態で、 Na^+/H^+ 交換輸送体 (NHE-1) 活性を高め、細胞内 Na^+ 濃度を上昇させるが、その一方で、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体を介して細胞質内 Ca^{2+} 濃度も上昇する結果となる。増加した Ca^{2+} は Ca^{2+} 単輸送体により、ミトコンドリア内に取り込まれ、ミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度が上昇し、最終的にミトコンドリア内での Ca^{2+} 過負荷が生じることで、ROS の産生が亢進し、MAPK シグナル伝達を介した心肥大が生じると報告されている^{33, 34)}。ANP-GCA-R シグナル伝達系を介した cyclic guanosine monophosphate (cGMP) の上昇により、NHE-1 活性は抑制され、その結果、心筋細胞の肥大抑制されることが報告されている³⁵⁾。これらの文献から、ANP は心不全においても、NHE-1 を阻害することによって、ミトコンドリアでの ROS の産生を抑制させる可能性が考えられる。

不全心筋細胞において、ANP が細胞生存率を改善させたもう一つの機序として、ANP が cGMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKG-I) によるシグナル伝達を介して、心筋細胞肥大抑制効果や収縮機能改善効果があることが報告されている³⁶⁻³⁸⁾。すなわち、ANP が GCA 受容体に結合すると、cGMP の生合成が促進され、PKG が活性化される。PKG によるシグナル伝達は G タンパクシグナル調節因子 2 や TRPC チャンネル (筋小胞体の特異的な標的タンパク質) をリン酸化させ、圧負荷やアンギオテンシン II などのストレスに対する心筋細胞肥大を抑制し心保護効果があるとされている³⁶⁻³⁸⁾。

以上の結果を基に、我々は ISO により誘導された心筋細胞障害に対する ANP の心筋保護作用の分子的機序として、以下の理論を推察した (Fig 6)。不全心筋細胞において、細胞内の ROS は正常心筋細胞と比較して増加しているが (Fig 6A)、ここで不全心筋細胞に ISO を投与すると、細胞内 ROS の産生は更に亢進し、リアノジン受容体を介した拡張期 Ca^{2+} leak の増加が認められる。拡張期 Ca^{2+} leak が増加する機序として、以下の二つのカスケードが考えられる (Fig 6B)。一つ目は β アドレナリン刺激により活性化された cAMP 依存性 PKA によって生じた Ca^{2+} 過負荷によるミトコンドリア内における ROS の産生亢進である。PKA はホスホランパンの Ser 16 やリアノジン受容体の Ser 2808 をリン酸化させ、リアノジン受容体からの拡張期 Ca^{2+} leak を増加させる^{7, 11, 18)}。 Ca^{2+} leak により、細胞内は Ca^{2+} 過負荷に至り、結果的にミトコンドリアは障害を受けて ROS の産生が亢進される⁴⁾。もう一方の機序として、 β アドレナリン刺激による、 Ca^{2+} 非依存性のミトコンドリア内における ROS の産生亢進が考えられる^{3, 4, 39)}。ISO によって修飾された Ca^{2+} カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素 (CaMK II) が活性化されると⁵⁾、リアノジン受容体からの異常な Ca^{2+} leak が増加し^{7, 18, 40)}、結果的にはミトコンドリア内の ROS 産生が促されることで、ミトコンドリア内における ROS とリアノジン受容体からの拡張期 Ca^{2+} leak による悪循環が形成されることとなる。しかしながら、ISO によって誘導されたミトコンドリア内における ROS の産生とリアノジン受容体を介した拡張期 Ca^{2+} leak は ISO に ANP を加えることで抑制された (Fig 6C)。

Fig 6A



不全心筋細胞においてリアノジン受容体はチャンネルが不安定化しており、 Ca^{2+} leak が生じやすい状況にある。

Fig 6B

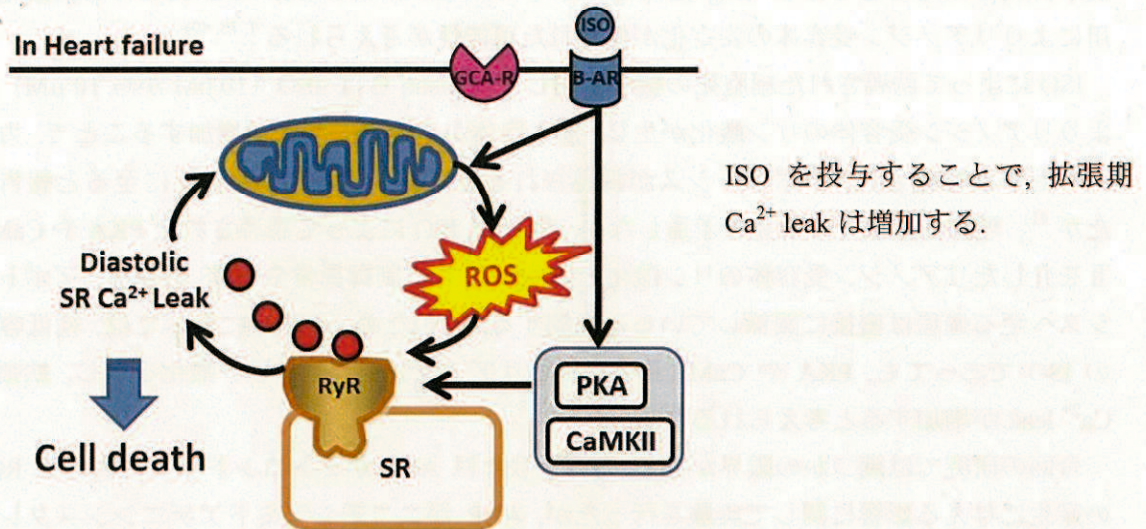
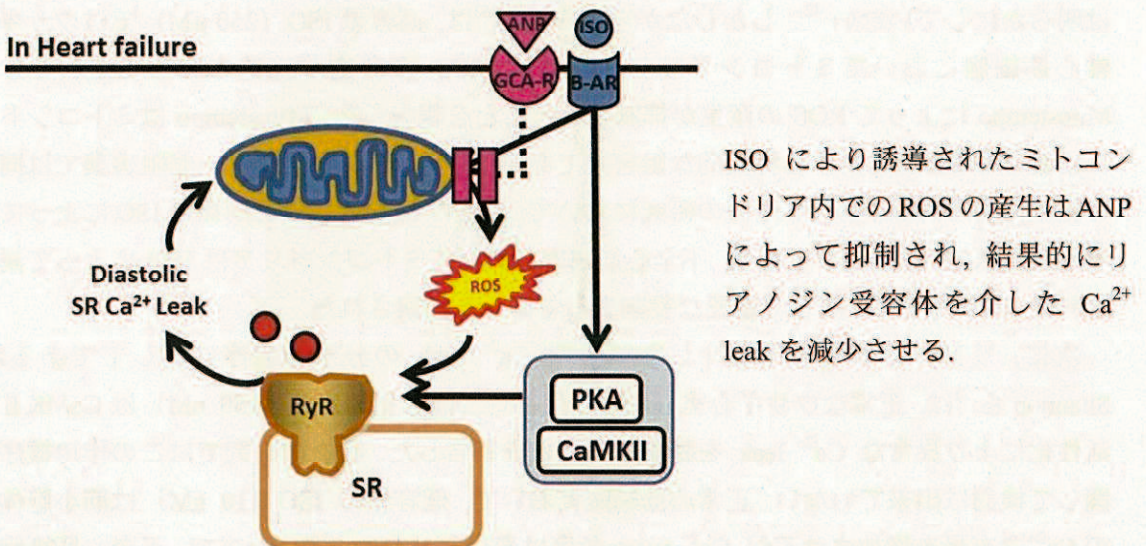


Fig 6C



(ANP; 心房性ナトリウムペプチド, GCA-R; グアニル酸シクラーゼ A 受容体, ISO; イソプロテレノール, β-AR; β 受容体, PKA; プロテインキナーゼ A, ROS; 活性酸素種, SR; 筋小胞体)

このような不全心筋細胞に対する ANP の抗酸化作用は、NHE-1 阻害作用に認められるような、他の有益な作用によって付随的に得られた二次的な効能であると考えられる。前述した実験において、H₂O₂ により増加した細胞内 ROS は ANP 投与により抑制されず (Fig 1D, E), ISO および ANP が共存したところに H₂O₂ を投与すると、Ca²⁺ spark 頻度は上昇した。これらの結果は外因性の ROS はリアノジン受容体を介して直接的に拡張期 Ca²⁺ leak を増強させるという、これまでの報告と矛盾しない結果である³⁾。重要なことは、ISO により筋小胞体

内の Ca^{2+} 含有量が増加したにも関わらず, ANP によって ISO により誘導された Ca^{2+} spark 頻度が抑制されたことであり (Fig 3B, Fig 4B), これらの結果からは ANP における抗酸化作用によりリアノジン受容体の安定化が促された可能性が考えられる^{7, 18, 40)}.

ISO によって誘導された細胞死の機序に関して, Ellison らは ISO (10 nM から 10 μM) によりリアノジン受容体のリン酸化が生じ, 筋小胞体からの Ca^{2+} leak が増加することで, カスパーゼが活性化され, アポトーシスが誘導されることで, 最終的に細胞死に至ると報告したが⁴¹⁾, 理論的に我々の所見と矛盾しない. 我々は, ISO によって誘導された PKA や CaMK II を介したリアノジン受容体のリン酸化と細胞内の Ca^{2+} 制御異常や ROS の産生, アポトーシスへ至る過程は密接に関係していると推測する. そのため, 心不全においては, 極低容量の ISO であっても, PKA や CaMK II を介したリアノジン受容体のリン酸化を生じ, 拡張期 Ca^{2+} leak が増加すると考えられる⁹⁻¹¹⁾.

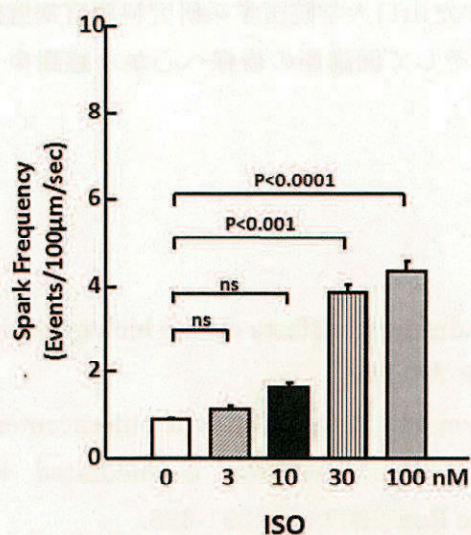
今回の研究では幾つかの限界がある. まず, 我々は ANP がミトコンドリアにおける ROS の産生に与える影響に関して実験を行ったが, ANP がニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) オキシダーゼおよびキサンチンオキシダーゼに与える影響に関しては明らかにしていない⁴²⁾. しかしながら, Bovo ら³⁾は, 高容量 ISO (250 μM) ではウサギ正常心筋細胞においてミトコンドリアにおける ROS の産生が亢進されること, そして Mito-tempo によって ROS の産生が抑制されることを報告した. Mito-tempo はミトコンドリアにおける ROS に対する特異的な阻害薬であり, キサンチンオキシダーゼ阻害薬では同様の結果は得られなかった. 今回の研究において, ANP は Mito-tempo と同様に ISO によって誘導された ROS を抑制しており, 不全心筋細胞においてミトコンドリアは ISO によって誘導された ROS の産生に関して重要な役割をしていると推察された.

次に, リアノジン受容体を介した拡張期 Ca^{2+} leak の分子的機序に関してであるが, Shannon ら²⁾は, 正常なウサギ心室心筋細胞において高容量の ISO (250 nM) は CaMK II の活性化により異常な Ca^{2+} leak を誘導することを報告した. 我々の研究ではこの作用機序に関して検討は出来ていない. 正常心筋細胞において, 低容量の ISO (10 nM) は筋小胞体内の Ca^{2+} 含有量を増加させるが, Ca^{2+} spark 頻度は変化させなかった. 一方で, 不全心筋細胞において, 筋小胞体内の Ca^{2+} 含有量と共に Ca^{2+} spark 頻度も増加させた. これらの結果は, 低容量 ISO によって誘導された不安定化したリアノジン受容体からの Ca^{2+} leak は, 筋小胞体内の Ca^{2+} 含有量の増加によって引き起こされることが示唆された.

最後に, ミトコンドリア酸化ストレスに対する ANP の直接的な作用に関しても課題である. VDAC および 8-OHdG による二重免疫組織染色法では, ミトコンドリアにおける特異的な酸化障害を示せてはならず, それ故, 我々は本研究において, ミトコンドリアに特異的な抗酸化薬である Mito-tempo を比較に用い, ANP が ISO によって誘導されたミトコンドリアにおける ROS の産生を著しく抑制することを証明した. しかしながら, ANP がミトコンドリアの ROS 産生に対して直接的に抑制するかどうかを検討するためには, 我々は, ミトコンドリア内のスーパーオキシドに対する特異的な蛍光色素である MitoSOX などを用い

た、別の手法においても同様の現象が認められることを検証しなければならない。

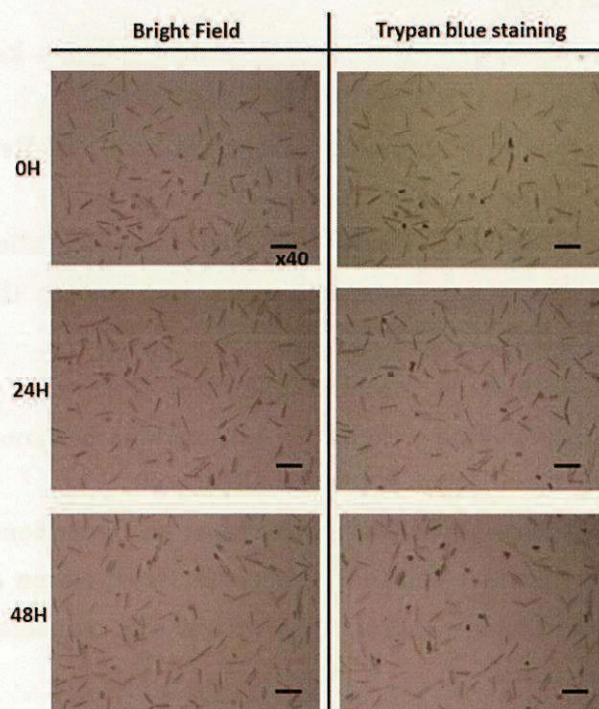
Supplemental Fig 1.



正常心筋細胞において、ISO (3 nM~100 nM) が Ca^{2+} spark 頻度に与える影響を評価した。3 nM および 10 nM ISO 群における Ca^{2+} spark 頻度は、ISO を投与していない群と比較して差を認めなかった。一方で、30 nM および 100 nM ISO 群では Ca^{2+} spark 頻度の増加を認めた。

同じ培養皿から少なくとも 4 細胞を抽出し、測定を行い、各群は総計 20 から 30 細胞の平均±標準誤差で示す。

Supplemental Fig 2.



正常心筋細胞に対して、トレパンプルー染色を用いて、心筋細胞の形態学的評価を行った。0.1%トレパンプルー染色に 5 分間、曝露した後、培養液で洗浄し、染色細胞、非染色細胞を計測した。

横紋を認める桿状心筋細胞において不染色となる割合は、培養 0 時間で 98.7% (2282/2312 細胞)、24 時間で 97.7% (2161/2211 細胞)、48 時間で 94.9% (2173/2290 細胞) と高率であった。各群で 2100 以上の細胞を評価し、各々の実験で 1 回あたり 600 以上の細胞を計測した。スケールバーは 200 µm を表す。

第 6 章 結語

ANP は ISO により誘導されたミトコンドリアにおける ROS の産生を抑制し、異常な拡張期 Ca^{2+} spark を是正し、最終的に心不全における心筋細胞の生存率の改善させる。

第7章 謝辞

本研究を行うために、多大なご指導・ご支援を戴いた山口大学院医学系研究科器官病態内科学教授 矢野雅文先生, 准教授 小林茂樹先生, そして同講座の皆様へ心から感謝申し上げます。

第8章 参考文献

1. Mann DL, Kent RL, Parsons B, Cooper G 4th. Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation*. 1992;85: 790-804.
2. Curran J, Hinton MJ, Ríos E, Bers DM, Shannon TR. Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res*. 2007;100 :391-398.
3. Bovo E, Lipsius SL, Zima AV. Reactive oxygen species contribute to the development of arrhythmogenic Ca^{2+} waves during β -adrenergic receptor stimulation in rabbit cardiomyocytes. *J Physiol*. 2012;590: 3291-3304.
4. Santulli G, Xie W, Reiken SR, Marks AR. Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112: 11389-11394.
5. Luo M, Anderson ME. Mechanisms of altered Ca^{2+} handling in heart failure. *Circ Res*. 2013;113: 690-708.
6. Oda T, Yano M, Yamamoto T, Tokuhisa T, Okuda S, Doi M, et al. Defective regulation of interdomain interactions within the ryanodine receptor plays a key role in the pathogenesis of heart failure. *Circulation*. 2005;111: 3400-3410.
7. Yano M, Okuda S, Oda T, Tokuhisa T, Tateishi H, Mochizuki M, et al. Correction of defective interdomain interaction within ryanodine receptor by antioxidant is a new therapeutic strategy against heart failure. *Circulation*. 2005;112: 3633-3643.
8. Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Mochizuki M, et al. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing inter-domain interactions within the ryanodine receptor. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53: 1993-2005.
9. Marks AR. Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *J Clin Invest*. 2013;123: 46-52.
10. Dobrev D, Wehrens XH. Role of RyR2 phosphorylation in heart failure and arrhythmias: controversies around ryanodine receptor phosphorylation in cardiac disease. *Circ Res*. 2014;114: 1311-1319.
11. Kobayashi S, Susa T, Ishiguchi H, Myoren T, Murakami W, Kato T, et al. A low-dose

β 1-blocker in combination with milrinone improves intracellular Ca^{2+} handling in failing cardiomyocytes by inhibition of milrinone-induced diastolic Ca^{2+} leakage from the sarcoplasmic reticulum. *PLoS One*. 2015;10: e0114314.

12. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, et al. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation*. 1994;90: 195-203.

13. Tsutamoto T, Bito K, Kinoshita M. Plasma atrial natriuretic polypeptide as an index of left ventricular end-diastolic pressure in patients with chronic left-sided heart failure. *Am Heart J*. 1989;117: 599-606.

14. Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Tsutsui T, et al. Intravenous atrial natriuretic peptide prevents left ventricular remodeling in patients with first anterior acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37: 1820-1826.

15. Kuhn M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res*. 2003;93: 700-709.

16. Kitakaze M, Asakura M, Kim J, Shintani Y, Asanuma H, Hamasaki T, et al. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet*. 2007;370: 1483-1493.

17. Yamamoto T, Yano M, Xu X, Uchinoumi H, Tateishi H, Mochizuki M, et al. Identification of target domains of the cardiac ryanodine receptor to correct channel disorder in failing hearts. *Circulation*. 2008;117: 762-772.

18. Mochizuki M, Yano M, Oda T, Tateishi H, Kobayashi S, Yamamoto T, et al. Scavenging free radicals by low-dose carvedilol prevents redox-dependent Ca^{2+} leak via stabilization of ryanodine receptor in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49: 1722-1732.

19. Ohno M, Oka S, Nakabeppu Y. Quantitative analysis of oxidized guanine, 8-oxoguanine, in mitochondrial DNA by immunofluorescence method. *Methods Mol Biol*. 2009;554: 199-212.

20. Maruyama R, Takemura G, Aoyama T, Hayakawa K, Koda M, Kawase Y, et al. Dynamic process of apoptosis in adult rat cardiomyocytes analyzed using 48-hour videomicroscopy and electron microscopy: beating and rate are associated with the apoptotic process. *Am J Pathol*. 2001;159: 683-691.

21. Goto K, Takemura G, Maruyama R, Nakagawa M, Tsujimoto A, Kanamori H, et al. Unique mode of cell death in freshly isolated adult rat ventricular cardiomyocytes exposed to hydrogen peroxide. *Med Mol Morphol*. 2009;42: 92-101.

22. Yano M, Kobayashi S, Kohno M, Doi M, Tokuhisa T, Okuda S, et al.

- FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation*. 2003;107: 477-484.
23. Vollmar AM. The role of atrial natriuretic peptide in the immune system. *Peptides*. 2005;26: 1086-1094.
24. Mattana J, Singhal PC. Effects of atrial natriuretic peptide and cGMP on uptake of IgG complexes by macrophages. *Am J Physiol*. 2003;265: C92-98.
25. Tokudome T, Horio T, Kishimoto I, Soeki T, Mori K, Kawano Y, et al. Calcineurin-nuclear factor of activated T cells pathway-dependent cardiac remodeling in mice deficient in guanylyl cyclase A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides. *Circulation*. 2005;111: 3095-3104.
26. Saito Y, Nakao K, Nishimura K, Sugawara A, Okumura K, Obata K, et al. Clinical application of atrial natriuretic polypeptide in patients with congestive heart failure: beneficial effects on left ventricular function. *Circulation*. 1987;76: 115-124.
27. Li Y, Kishimoto I, Saito Y, Harada M, Kuwahara K, Izumi T, et al. Guanylyl cyclase-A inhibits angiotensin II type 1A receptor-mediated cardiac remodeling, an endogenous protective mechanism in the heart. *Circulation*. 2002;106: 1722-1728.
28. Suwa M, Seino Y, Nomachi Y, Matsuki S, Funahashi K. Multicenter prospective investigation on efficacy and safety of carperitide for acute heart failure in the 'real world' of therapy. *Cir J*. 2005;69: 283-290.
29. Kobayashi S, Susa T, Tanaka T, Wada Y, Okuda S, Doi M, et al. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine reflects symptomatic status and severity of systolic dysfunction in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2011;13: 29-36.
30. Susa T, Kobayashi S, Tanaka T, Murakami W, Akashi S, Kunitsugu I, et al. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a novel biomarker for predicting cardiac events and evaluating the effectiveness of carvedilol treatment in patients with chronic systolic heart failure. *Circ J*. 2011;76: 117-126.
31. Tsutsui H, Ide T, Shiomi T, et al. 8-oxo-dGTPase, which prevents oxidative stress-induced DNA damage, increases in the mitochondria from failing hearts. *Circulation*. 2001;104: 2883-2885.
32. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res*. 2001;88: 529-535.
33. Javadov S, Purdham DM, Zeidan A, Karmazyn M. NHE-1 inhibition improves cardiac mitochondrial function through regulation of mitochondrial biogenesis during postinfarction remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(4):H1722-1730.
34. Javadov S, Baetz D, Rajapurohitam V, Zeidan A, Kirshenbaum LA, Karmazyn M.

Antihypertrophic effect of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 inhibition is mediated by reduced mitogen-activated protein kinase activation secondary to improved mitochondrial integrity and decreased generation of mitochondrial-derived reactive oxygen species. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;317(3):1036-43.

35. Kilic A, Velic A, De Windt LJ, Fabritz L, Voss M, Mitko D, Zwiener M, et al. Enhanced activity of the myocardial Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 contributes to cardiac remodeling in atrial natriuretic peptide receptor-deficient mice. *Circulation.* 2005;112(15):2307-17.

36. Kinoshita H, Kuwahara K, Nishida M, Jian Z, Rong X, Kiyonaka S, et al. Inhibition of TRPC6 channel activity contributes to the antihypertrophic effects of natriuretic peptides-guanylyl cyclase-A signaling in the heart. *Circ Res.* 2010 106(12):1849-60.

37. Klaiber M, Dankworth B, Kruse M, Hartmann M, Nikolaev VO, Yang RB, et al. A cardiac pathway of cyclic GMP-independent signaling of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Nov 8;108(45):18500-18505.

38. Perera RK, Sprenger JU, Steinbrecher JH, Hübscher D, Lehnart SE, Abesser M, et al. Microdomain switch of cGMP-regulated phosphodiesterases leads to ANP-induced augmentation of β -adrenoceptor-stimulated contractility in early cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2015;116(8):1304-11.

39. Bovo E, Mazurek SR, de Tombe PP, Zima AV. Increased energy demand during adrenergic receptor stimulation contributes to Ca²⁺ wave generation. *Biophys J.* 2015;109: 1583-1591.

40. Oda T, Yang Y, Uchinoumi H, Thomas DD, Chen-Izu Y, Kato T, et al. Oxidation of ryanodine receptor (RyR) and calmodulin enhance Ca release and pathologically alter RyR structure and calmodulin affinity. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;85: 240-248.

41. Ellison GM, Torella D, Karakikes I, Purushothaman S, Curcio A, Gasparri C, et al. Acute beta-adrenergic overload produces myocyte damage through calcium leakage from the ryanodine receptor 2 but spares cardiac stem cells. *J Biol Chem.* 2007 282(15):11397-409.

42. Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart.* 2007;93: 903-907.