

テクニカルノート

犬心不全モデルにおける心筋筋小胞体の精製
および機能評価

矢野雅文, 松崎益徳

山口大学医学部内科学第2講座 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)

Key words : 心不全, カルシウム, 筋小胞体, リアノジン受容体, Ca^{2+} -ATPase

はじめに

心不全は心筋の収縮, 弛緩の障害を基盤とする症候群であり, その原因として心筋細胞内 Ca^{2+} 調節の異常が最近注目されている. なかでも, 心筋筋小胞体 (SR) は, Ca^{2+} 動員機構に重要な蛋白質 (リアノジン受容体, Ca^{2+} -ATPaseなど) を含んでおり Ca^{2+} は一過性に上昇, 下降する. この現象は Ca^{2+} トランジェントとして知られ, 心収縮, 弛緩を規定する因子として極めて重要である. この Ca^{2+} トランジェントに最も強く影響するのがSRの Ca^{2+} 放出チャンネルであるリアノジン受容体 (収縮期に Ca^{2+} を放出) と Ca^{2+} -ATPase (拡張期に Ca^{2+} を取り込む) である. (図1)

本稿では, 血行動態的にも, また神経体液性因子の点からもヒト心不全に非常に近いとされる頻脈誘発性犬心不全モデルの作成法およびSRの精製法とその機能評価法 (リアノジン受容体数および Ca^{2+} 取り込み能の測定) について述べる.

1. 頻脈誘発性犬心不全モデルの作成法

ビーグル犬を用いて, ハロセン麻酔, 気管内挿管下に左頸部をイソジン消毒し皮膚を小切開後, 左外頸静脈より2対のペースングリードを挿入し, 透視下で右室心尖部まですすめ心内膜側にリードを固定する (スクリュウリードを用いる). 各リードに簡易型のペースメーカーを接続し約180beats/分でペー

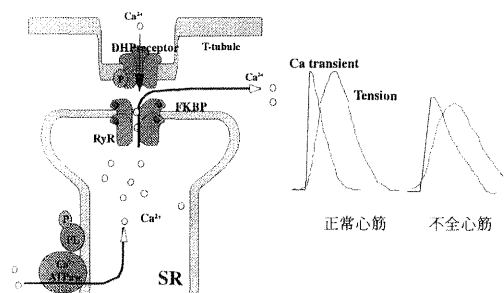


図1 心筋興奮収縮連関 (SR; 筋小胞体, RyRリアノジン受容体, FKBP;FK506 binding protein,PL;ホスホランパン)

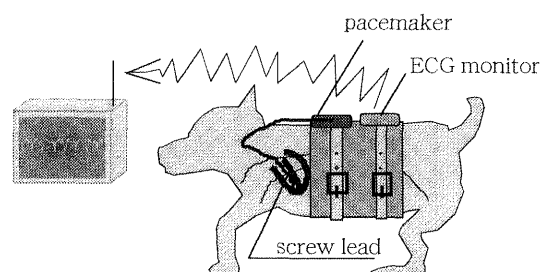


図2

シングし閾値が2ボルト未満であることを確認する (閾値が2ボルト以上であればリード先端部の位置が悪く, 以後の慢性ペースングに耐えないため, 再度位置を変更し固定, 閾値確認を行う). 各リードに植え込み型ペースメーカーを接続し, VVIモードで各リードは125/分ずつペースングしあわせて250/分の高頻度右室ペースングが可能であることを確認する. 各リードを外頸静脈と縫合固定し, 皮膚を縫合, 麻酔をoffとし抜管し手技を終了する.

一週間後 (回復期間) に250/分の高頻度ペースングを開始し, 3-4週間にわたり毎日ペースング状態, 犬の状態 (機嫌, 食欲, 心エコー法による心機

平成12年4月3日受理

能、胸水、腹水など)をチェックする。(図2)通常、3-4週間で不全心は完成し、左室径の増大、駆出率の低下、左室圧一次微分最大値の低下を認め、4-5週以後は高率に胸水、腹水の貯留を認める。

2. 心筋筋小胞体の精製(1)

正常および心不全の心臓を摘出し、腱索、繊維成分を除去した後、左室心筋のみ(約40-50g)を分離し、solution I (30mM Tris-malate, 0.3M sucrose, 5mg/l leupeptin and 0.1mM PMSF, at pH 7.0) 中で、ホモジネートする。心筋ホモジネートは5,500g10分で遠心し、supernatantを4層のガーゼで濾した後、12,000gで20分遠心する。再度supernatantを4層のガーゼで濾した後、143,000gで30分遠心しpelletをsolution II (0.6M KCl, 30mM Tris-malate, 0.3M sucrose, 5mg/l leupeptin, 0.1mM PMSF, at pH 7.0) でsuspendし約30分つけ込む(この間にミオシン分画がsupernatantに移行する)。143,000gで45分間遠心し、pelletをsolution I でsuspendする。143,000gで45分間遠心しsolution III (0.1M MCl, 20mM Tris-malate, 0.3M sucrose, 5mg/l leupeptin, 0.1mM PMSF, at pH 7.0) で、蛋白濃度が10-20mg/mlになるようsuspendし(約5cc) -80°Cで冷凍保存し、1-2ヶ月以内に使用する。

3. リアノジン結合実験(2)

SRの Ca^{2+} 放出チャンネルであるリアノジン受容体の数(Bmax)と親和性(Kd)を $[^3H]$ ryanodineを用いて測定する。

心筋SR (0.1mg/ml) を0-10nMの $[^3H]$ ryanodineとともに、25mM imidazol 1 M KCl, 0.95mM EGTA, 1.103 mM $CaCl_2$ (free Ca^{2+} = 20 μ M) , pH 7.4の溶液中で120分間、36°Cでincubateする(リアノジンのリアノジン受容体への結合は Ca^{2+} 濃度、温度、時間が重要である)。溶液はミリポアフィルター(pore size 0.45 μ m)を用いて濾し、 $[^3H]$ ryanodineを除いた上述のsolution 5mlで2回washする。フィルター上のtotal radioactivityをシンチレーションカウンターを用いて測定する。この際、nonspecific radioactivityは1 μ Mのcold ryanodineを用いて測定し、total countとnonspecific countの差(特異的radioactivity)をリアノジン結合量(pmol/mg protein)

として求める。Schachard plotからBmax, Kdを求める。

4. SR Ca^{2+} 取り込み能の測定(3)

心筋SR (0.2mg/ml) を0.15M KCl, 1mM $MgCl_2$, 30 μ M $^{45}CaCl_2$ (1mCi) , 10mM NaN₃ and 20mM MOPS, pH 7.1の溶液(2ml)中で室温下でincubateする。1mMのATPを添加後、経時的(30秒, 1分, 3分, 5分)にミリポアフィルター(pore size 0.45 μ m)を用いて濾し、washing solution (0.15M KCl, 20mM MOPS, pH 7.1, 30mM EGTA, 15 μ M ruthenium red) 5mlで2回washする。フィルター上のtotal radioactivityを経時的にシンチレーションカウンターを用いて測定しSRに能動的に取り込まれた Ca^{2+} 量をnmol/mgとして算出する。正常では5分ほどで Ca^{2+} 取り込みはsaturateし、 Ca^{2+} 取り込み量は10nmol/mg前後で不全心はその約半分に低下している。

おわりに

心筋の収縮能および拡張能は心筋細胞内 Ca^{2+} 動態により制御されており、なかでも心筋筋小胞体機能はその中心的役割を果たしている。心不全では、心筋筋小胞体機能異常による細胞内 Ca^{2+} overloadをきたし、心収縮、拡張障害を生じていることが指摘されている。一方、本稿で概説した頻脈誘発性心不全モデルは、血行動態的にもまた神経体液性因子の面からもヒトの心不全に極めて近いため、本モデルを使用し、心筋筋小胞体の機能評価をする事はヒトの心不全時の心収縮障害、拡張障害のメカニズムを解明するうえで、また新しい心不全治療薬の開発を目指す上でも有用である。

文 献

- 1) Kranias E, Schwarts A, Jungmann RA. Characterization of cyclic 3':5'-AMP-dependent protein kinase in sarcoplasmic reticulum and cytosol of canine myocardium. *Biochim Biophys Acta*. 1982;709:28-37.
- 2) Yano M, Yamamoto T, Kohno M, Hisaoka T, Tanigawa T, Ueyama T, Hisamatsu Y, Ohkusa T, Konishi M, Matsuzaki M. Polylysine-induced rapid Ca^{2+}

release from cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32:96-100.

- 3) Yamamoto T, Yano M, Kohno M, Hisaoka T, Ono K, Tanigawa T, Saiki Y, Hisamatsu Y, Ohkusa M, Matsuzaki M. Abnormal Ca^{2+} release from cardiac sarcoplasmic reticulum in tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res.* 1999;44:146-155.