

[課題番号] 2006B1706

[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：Ca<sup>2+</sup>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、またナノメートル・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。

目的：従来、犬の単離心筋にて収縮頻度の増加により peak tension が増強する”Positive Staircase”現象がクロスブリッジ形成の増加に伴うことが報告されている(Matsubara I, Yagi N, et al. Nature. 1978;273:67)。一方、げっ歯類では収縮頻度の増加によりむしろ peak tension が減弱するといわれている(”Negative Staircase”現象)。今回我々はマウスにおいてクロスブリッジ動態が収縮頻度によりどのような影響を受けるのか検討した。

実験の方法：小角散乱カメラ、検出器等をセットする。イソフルレン吸入麻酔下で8週齢オスのC57/BL6マウスに経内頸動脈的にカニューレーションを行った後、動物の大胸筋を左側のみ剥離する。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する。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る。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する。ビームサイズは0.25 X 0.10 mm<sup>2</sup>で、15msecのフレームを一回につき計70コマ撮像する。ベースラインの撮像後、徐拍化するためにZatebradine (UL-FS 49：洞結節インヒビターであり心拍数のみ減少させ、左室心筋自体の収縮・拡張能や末梢血管抵抗には影響を及ぼさない心臓過分極活性化サイクリックヌクレオチド依存性チャンネル(I<sub>f</sub>)開口ブロッカー)をカニューレより

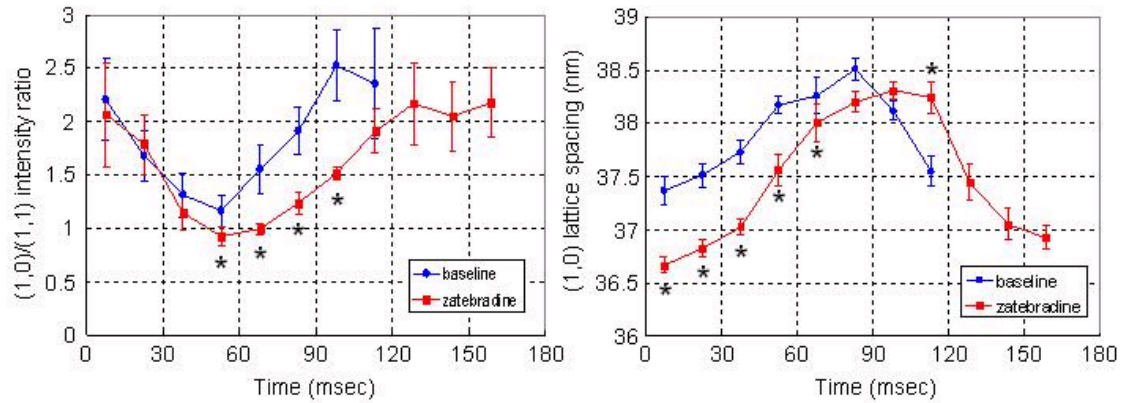
4. 5mg/Kg ボーラス投与する。心拍数がベースラインの約6割まで低下・安定するまで約10分待った後、再度撮像を行う。撮影した像より(1, 0)/(1, 1)反射の強度比(アクチン-ミオシン架橋形成の程度を反映)ならびに(1, 0)格子間隔(ミオシンフィラメント間の距離と相関)の経時的变化を求める。

結果: Zatebradineにより正常洞調律下で心拍数は $533 \pm 4$ 拍/分より $317 \pm 14$ 拍/分まで低下し、特に拡張期の延長を認めた(Figure)。徐拍化により拡張末期のミオシンフィラメント間の距離がベースラインより有意に狭くなっていたが(Figure)、これは心筋がより伸展していることを意味する。一方、収縮期の(1, 0)/(1, 1)反射の強度比は徐拍化によりベースラインより有意に小さくなっており(Figure)、これはアクチン-ミオシン架橋形成量が増大していることを意味する。また、収縮期のミオシンフィラメント間の距離は徐拍化した後でもベースラインと同程度まで広がっており(Figure)、心筋の収縮自体も増強していることが示唆された。

考察: 心筋長に依存して発生張力が増加する現象はフランク・スターリングの法則としてよく知られているが、その機序のひとつとして心筋の伸展に伴いミオシンヘッドとアクチンの距離が近づくことで、互いに相互作用が容易となることを共同研究者の八木が報告している(Yagi et al. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.* 448:153-160, 2004)。マウスでは心拍数の低下に伴い、拡張期の延長とともに心筋がより伸展されていた。フランク・スターリングの法則の分子機序がフィラメント間の距離に依存するならば、徐拍化によるクロスブリッジ形成量増加は拡張末期のフィラメント間の距離が近づくことによるカルシウム感受性の増加による可能性がある。我々のデータはマウスでは生体内での心拍数変化に伴うクロスブリッジ動態の変化には収縮頻度より、フランク・スターリングの法則則に基づくサルコメア長変化のほうがより大きな影響を及ぼすことを示唆する大変興味深いものである。

生体内で動的な心臓よりX線回折を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。

Effects of lowering HR on the cross-bridge activity of mouse heart muscle



X-ray diffraction from the cardiac muscle provides two main equatorial reflections, (1,0) and (1,1). The intensity ratio (IR) of the (1,0) and (1,1) reflections corresponds to the amount of cross-bridges, and the (1,0) lattice spacing (LS) indicates the distance between thick filaments. The abscissa is time after the R-wave in ECG. Bolus injection of 4.5mg/kg zatebradine, a direct sinus node inhibitor without negative inotropic effects, in sinus rhythm reduced HR from  $533 \pm 4$  to  $317 \pm 14$  bpm. The end-diastolic (1,0) LS decreased significantly (37.4 to 36.7nm), showing a longer stretching of muscle, and the systolic (1,0)/(1,1) IR decreased by 21%, indicating a larger cross-bridge formation. \* $P < 0.05$  vs. baseline by paired *t*-test.