

[課題番号]

2007A1839

[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：従来  $\text{Ca}^{2+}$ 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 (図 a,b)。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 線回折撮影法を確立した (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、またナノメーター・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：心肥大は心不全を発症させる独立した危険因子である。今回我々はマウスにおいて病的な心肥大におけるクロスブリッジ動態について検討した。

実験の方法：8 週齢オスの C59BL6 マウスに上行大動脈縮窄術を施行。手術後 8 週目に圧負荷により左室肥大を呈していることを心臓超音波図で確認の上、生体内の心臓より X 線回折像を撮影した。X 線回折像の実際の撮影法について述べる。イソフルレン吸入麻酔下で動物の大胸筋を左側のみ剥離。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。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た。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した。ビームサイズは  $0.25 \times 0.10 \text{ mm}^2$  で、15msec のフレームを一回につき計 70 コマ撮像した。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) の経時的変化を求めた。

結果：心肥大を呈した群では非手術群に比べ、X 線回折像が撮影できる範囲が広がっていた。得られた像よりクロスブリッジ動態について検討したところ、病的な心肥大群では拡張末期から収縮期にかけて、本来はクロスブリッジの形成とともにサルコメア長が短縮することを反映して、フィラメント間の距離は逆に広がっていくはずであるが、局所的にむしろフィラメント間の距離が近づく、つまりサルコメア長が長くなる領域があることを確認した (図 c 左)。このような領域ではクロスブリッジが収縮期に形成されているものの、周囲の正常な動きを示している部位と比較すると劣っていた (図 c 右)。このことはミオシンとアクチンの相互作用が起こっているにもかかわらず、周囲の発生張力に負けてしまい、収縮期にもかかわらず伸展させられてしまっていることを示唆する。さらに大変興味深いことに、そうした領域では拡張末期のフィラメント間の距離が正常な動きを示す部位と比して広がっていることも判明した。一方、心肥大群でも収縮期に心筋がきちんと収縮している部位については非手術群とほぼ同様のクロスブリッジ動態を呈していた。

考察：心肥大群では収縮期に架橋形成がおこるにもかかわらず、周囲の発生張力に負けてしまうために心筋自体は収縮できずにむしろ引き伸ばされてしまう部位が局所的に生じていたが、このような部位では拡張末期のフィラメント間の距離が広がっていた。その機序として心筋細胞周囲の繊維化に伴い血液流入による受動的伸展が障害されていることも推定できるが、拡張末期のフィラメント間の距離が正常に収縮したときの距離よりもさらに大きくなっていることを考えると、周囲の繊維化により心筋細胞が圧縮を受けない限り説明がつかない。つまり、心筋細胞自体が腫脹している可能性が示唆される。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)。つまり、局所的な心筋細胞の腫脹によりフィラメント間の距離が遠ざかることで、カルシウム感受性が低下している可能性が考えられる。

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。

