

発表番号 59 (0526)

心筋 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の Na^+ 依存性制御機構の生理的役割の解明

岩本 隆宏 (福岡大学医学部薬理学)

喜多 紗斗美 (福岡大学医学部薬理学)

【目的】

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX1) は、心筋興奮収縮連関の Ca^{2+} トランジェントを調節する重要な Ca^{2+} 輸送体である。この輸送体は、“ Na^+ 依存性不活性化” と呼ばれる機構により活性制御されているが、この Na^+ 依存性制御機構の生理的役割は現在不明である。そこで、本研究では、 Na^+ 依存性不活性化機構を破壊した変異型 NCX1 および野生型 NCX1 の心筋特異的高発現マウスを作製することにより、この不活性化機構の生理的役割を個体レベルで解明することを目的とする。

【方法】

Na^+ 依存性不活性化機構を破壊した変異型 NCX1 (Y224W/Y226W/Y228W/Y231W 変異体) および野生型 NCX1 の cDNA を心筋 αMHC プロモーターの制御下に挿入した発現コンストラクトを構築し、心筋特異的高発現マウス (TG マウス) を作製した。NCX1 の発現はウエスタンブロットおよび臓器の免疫染色により確認した。また、循環器系の表現型を調べるため、心臓・血管系の組織学的解析、心エコー解析、心電図・血圧測定などを行なった。

【結果】

変異型 NCX1-TG マウス (ヘテロ接合体) は、正常な妊娠、誕生およびリターサイズを有し、発育的に正常であった。この TG マウスの心臓には、変異型 NCX1 が内因性 NCX1 に較べて約 1.5 倍高発現していた。変異型 NCX1-TG マウスの心臓形態変化を組織学的に観察したところ、14 週齢以上で拡張型心筋症様の心筋リモデリング (左室内腔拡大、心室壁厚減少、心筋壊死、繊維化など) が誘導されることを見いだした。この TG マウスの心機能を心エコー装置 (M モード) で解析すると、左心室拡張期径および左心室収縮期径が増大し、左室内径短縮率が顕著に低下し、心不全状態に陥っていることが確認された。一方、野生型 NCX1 を同程度に高発現する TG マウスでは心筋肥大が誘導されるものの、拡張型心筋症様の心筋リモデリングは認められなかった。

【考察】

以上の結果より、心筋 NCX1 の Na^+ 依存性不活性化機構は心臓の形態および機能の維持に重要な役割を果たすことが示唆された。現在、変異型 NCX1-TG マウスにおいて拡張型心筋症様の心筋リモデリングが誘導される機序について検討中である。

0526

心筋 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の Na^+ 依存性制御機構の生理的役割の解明

岩本 隆宏 (福岡大学医学部薬理学)

喜多 紗斗美 (福岡大学医学部薬理学)

1. 研究目的

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体(NCX)は、細胞膜を介するイオン濃度勾配および電位差を利用して Ca^{2+} を細胞外へ汲み出す重要なトランスポーターである¹⁻⁴⁾。この輸送体は両方向性であることから、特殊な状況下では細胞外から Ca^{2+} を取り込むこともできる。現在、心筋をはじめ様々な臓器に発現する NCX1、脳・骨格筋に特異的に発現する NCX2、NCX3 の 3 種の交換体遺伝子が同定されている。

心筋に発現する NCX1 は、心筋興奮収縮連関の Ca^{2+} トランジェントを調節する重要な Ca^{2+} 輸送体と考えられている。この輸送体は、細胞内 Na^+ シグナルにより不活性化される制御機構を有している(Na^+ 依存性不活性化機構)¹⁻⁴⁾。最近、NCX1 の細胞内特殊領域に PIP_2 が結合すると、この不活性化機構から脱制御され、輸送活性が

亢進することが報告されている⁵⁾。しかし、この不活性化機構の生理的役割は未だに不明である。本研究では、 Na^+ 依存性不活性化機構を破壊した変異型 NCX1 および野生型 NCX1 の心筋特異的高発現マウスを作製することにより、この不活性化機構の役割を個体レベルで解明することを目的とする。

2. 研究方法

1) 心筋特異的 NCX1 トランスジェニックマウスの作製

Na^+ 依存性不活性化機構を破壊した変異型 NCX1 (Y224W/Y226W/Y228W /Y231W 変異体) および野生型 NCX1 (心臓型 NCX1.1) の cDNA を心筋 αMHC プロモーターの制御下に挿入した発現コンストラクトを構築した(図 1 A)。

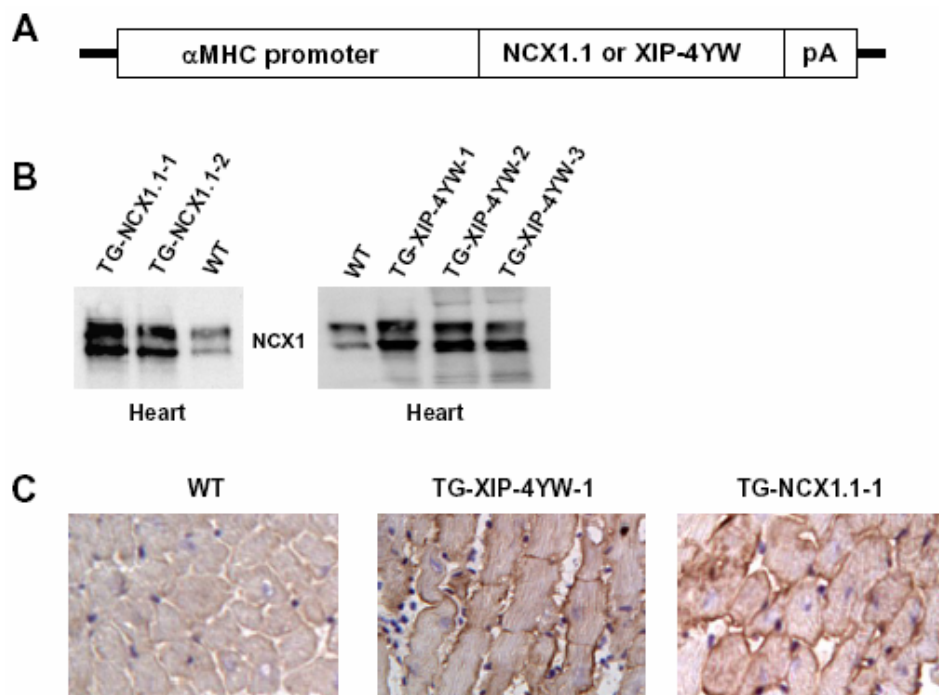


図 1 野生型および変異型 NCX1 の心筋特異的トランスジェニックマウス
A: 発現コンストラクト、B: 心臓における NCX1 の発現量、C: NCX1 抗体による心臓の免疫染色

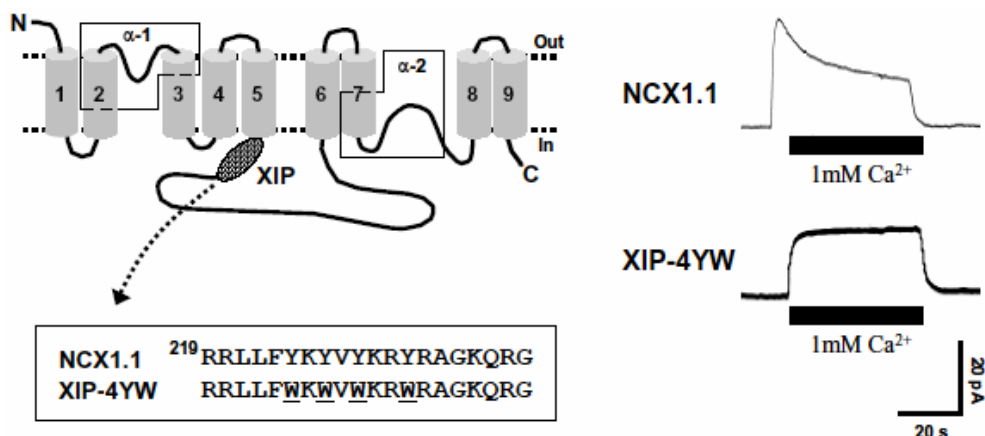


図 2 NCX1 の9回膜貫通型トポロジーモデルおよび野生型 NCX1 もしくは変異型 NCX1 (XIP-4YW) を発現させた繊維芽細胞の外向き NCX 電流

図 2 に示すように、この変異型 NCX1 では、野生型 NCX1 と異なり Na^+ 依存性不活性化は認められない⁶⁾。トランスジェニックマウスを作製するため、発現コンストラクトから約 9.0 kb の遺伝子導入断片を調整し、C57BL/6J マウス (C57BL/6J 雄 × C57BL/6J 雌) の受精卵の前核にマイクロインジェクションした。そして、常法に従って⁷⁾、変異型 NCX1 のトランスジェニックマウスを 3 系統 (TG-XIP-4YW-1, TG-XIP-4YW-2, TG-XIP-4YW-3)、また野生型 NCX1 (TG-NCX1.1-1, TG-NCX1.1-2) のトランスジェニックマウスを 2 系統作製した。

2) 心筋特異的 NCX1 トランスジェニックマウスの特性解析

NCX1 の発現は、ウエスタンブロット法および心臓組織の免疫染色により確認した。また、マウスの心室筋から心筋膜小胞を作製し、既に報告した方法⁸⁾に従って Na^+ 依存性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 取り込み活性を測定した。また、循環器系の表現型を調べるため、心臓・血管系の組織学的解析、心エコー解析、心電図・血圧測定などを行なった。

3. 研究結果

変異型 NCX1 トランスジェニックマウス (3 系統のヘテロ接合体) および野生型 NCX1 トランスジェニックマウス (2 系統のホモ接合体) は、正常な妊娠、誕生およびリターサイズを有し、発育的に正常であった。これらのトランスジェニックマウスの外観および挙動も正常であった。

トランスジーンを発現をウエスタンブロットにより確認したところ、変異型 NCX1 トランスジェニックマウスの心臓には内因性 NCX1 の約 1.5~2 倍に相当する変異型 NCX1 の発現が観察された。野生型 NCX1 トランスジェニックマウスの心臓には、約 2~3 倍のトランスジーンに由来する野生型 NCX1 の発現が確認された (図 1 B)。な

お、他の臓器における NCX1 の発現レベルは変化していなかった。また、NCX1 抗体により心筋組織を免疫染色すると、これらトランスジェニックマウスの心筋細胞膜および T 管膜に、変異型 NCX1 もしくは野生型 NCX1 が高発現していることが確認された (図 1 C)。

代表的な変異型 NCX1 トランスジェニックマウス (TG-XIP-4YW-1) および野生型 NCX1 トランスジェニックマウス (TG-NCX1.1-1) から心筋小胞膜を調整し、その Na^+ 依存性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 取り込み活性を測定したところ、これら両トランスジェニックマウスの心筋細胞膜には機能的な NCX1 が活性比で野生型の 2~3 倍量過剰発現していることが示された (図 3)。

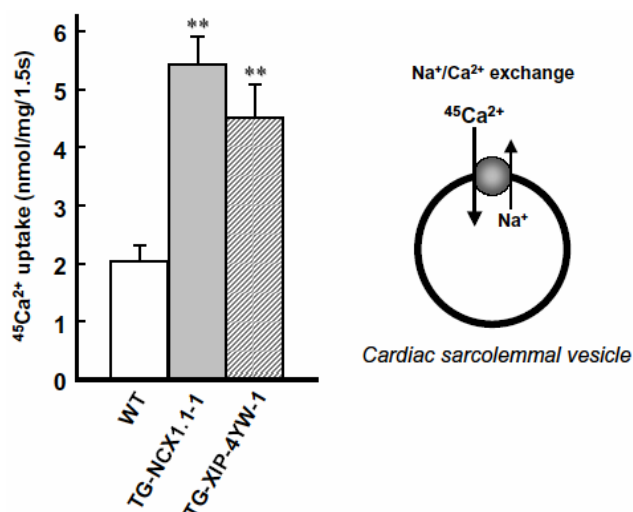


図 3 野生型および変異型 NCX1 の心筋特異的トランスジェニックマウスの心筋小胞膜への Na^+ 依存性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 取り込み反応

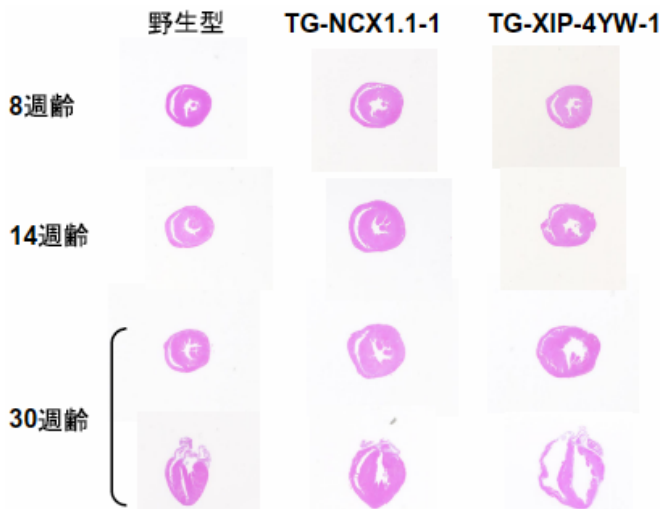
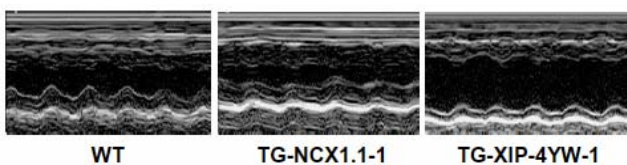


図 4 野生型および変異型 **NCX1** の心筋特異的トランスジェニックマウス心臓の水平断面像及び垂直断面像(ヘマトキシリン・エオジン染色)

変異型 **NCX1** トランスジェニックマウス (TG-XIP-4YW-1) および野生型 **NCX1** トランスジェニックマウス (TG-NCX1.1-1) の心筋組織学的な変化を経時的に調べたところ、TG-XIP-4YW-1 では生後 8 週から心筋の繊維化および壊死が認められた。この心筋障害の程度は週齢とともに悪化した。また、それに伴った左室内腔拡大や心室壁厚減少などの拡張型心筋症様の心筋リモデリングが観察された (図 4, 図 5)。一方、TG-NCX1.1-1 では、生後 8 週から心肥大傾向、14 週で有意な心肥大が観察されたが、細胞障害は認められなかった (図 4, 図 5)。



	WT	TG-NCX1.1-1	TG-XIP-4YW-1
HR, bpm	351.5 ± 23.3	359.0 ± 17.9	301.0 ± 16.1
LVEDD, mm	3.2 ± 0.1	2.7 ± 0.1	4.7 ± 0.2
LVESD, mm	1.7 ± 0.2	1.4 ± 0.1	3.8 ± 0.2
IVST, mm	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.05*	0.5 ± 0.02
LVPWT, mm	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.03*	0.5 ± 0.1
FS, %	46.5 ± 3.4	48.6 ± 2.3	19.7 ± 1.6**
EF	0.83 ± 0.04	0.85 ± 0.02	0.46 ± 0.03**

図 6 野生型および変異型 **NCX1** の心筋特異的トランスジェニックマウス心臓(25 週齢)の超音波心臓図 (M モード) 及び心機能パラメーター計測値

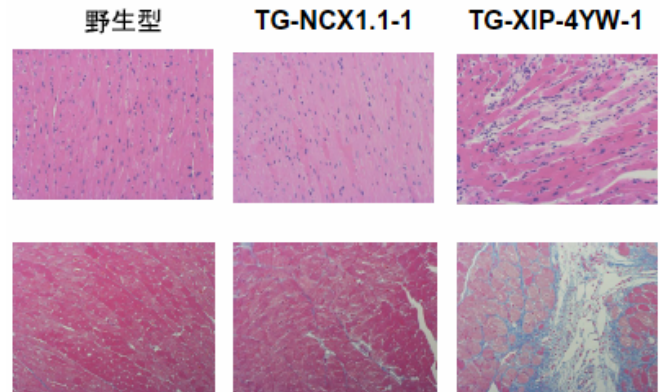


図 5 野生型および変異型 **NCX1** の心筋特異的トランスジェニックマウス 30 週齢のヘマトキシリン・エオジン染色 (上段) およびアザン染色 (下段) による光学顕微鏡像

さらに、変異型 **NCX1** トランスジェニックマウス (TG-XIP-4YW-1) の心機能を心エコー装置 (Mモード) で解析すると、左心室拡張期径および左心室収縮期径が増大し、さらに左室内径短縮率が顕著に低下し、心不全状態に陥っていることが確認された (図 6)。一方、野生型 **NCX1** を同程度に高発現するトランスジェニックマウスでは心筋肥大が誘導されるものの、拡張型心筋症様の心筋リモデリングは認められなかった (図 6)。

4. 考察および今後の課題

以上の結果は、心筋 **NCX1** の Na^+ 依存性不活性化機構が心臓の形態および機能の維持に重要な役割を果たしていることを示唆している。近年、心筋 Ca^{2+} シグナルの異常が心筋症の発症に密接に関係していることが報告されている⁹⁾。たとえば、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の機能低下およびリアノジン受容体の Ca^{2+} 漏出異常は心筋症の発症原因となることが知られている⁷⁾。そこで、 Na^+ 依存性不活性化機構を破壊した変異型 **NCX1** を発現する心筋細胞では、異常な Ca^{2+} シグナルが引き起こされ、心筋症が誘導された可能性が推察される。

現在、これを実証するため、トランスジェニックマウスの単離心筋細胞における Ca^{2+} シグナルを詳細に解析中である。また、野生型 **NCX1** と変異型 **NCX1** の心筋高発現マウスにおいて心臓の表現型が異なっていることに注目し、その原因を解明するために、マイクロアレイ解析を実施することを計画している。今後、このような研究を進展させ、心筋 **NCX1** の Na^+ 依存性不活性化機構の役割をさらに解明していきたいと考えている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を頂いた(財)ソルト・サイエンス研究財団に心より感謝いたします。

文 献

1. Iwamoto, T. Sodium-calcium exchange inhibitors: therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Future Cardiol.* 1: 519–529, 2005.
2. Iwamoto, T., Kita, S., and Katsuragi, T. Salt-sensitive hypertension, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, and vascular smooth muscle. *Trends Cardiovasc. Med.* 15: 273–277, 2005.
3. Iwamoto, T. Vascular $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger: implications for the pathogenesis and therapy of salt-dependent hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290: R536–R545, 2006.
4. Iwamoto, T., and Kita, S. Hypertension, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, and Na^+ , K^+ -ATPase. *Kidney Int.* in press.
5. Hilgemann, D.W., and Ball, R. Regulation of cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP_2 . *Science.* 273: 956–91996, 1996.
6. Iwamoto, T., Kita, S., Uehara, A., Imanaga, I., Matsuda, T., Baba, A., and Katsuragi, T. Molecular determinants of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange (NCX1) inhibition by SEA0400. *J. Biol. Chem.* 279: 7544–7553, 2004.
7. Iwamoto, T., Kita, S., Zhang, J., Blaustein, M.P., Arai, Y., Yoshida, S., Wakimoto, K., Komuro, I., and Katsuragi, T. Salt-sensitive hypertension is triggered by Ca^{2+} entry via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger type-1 in vascular smooth muscle. *Nature Med.* 10: 1193–1199, 2004.
8. Iwamoto, T., Watano, T., and Shigekawa, M. A novel isothiourea derivative selectively inhibits the reverse mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in cells expressing NCX1. *J. Biol. Chem.* 271: 22391–22397, 1996.
9. Yano, M., Yamamoto, T., Ikeda, Y., and Matsuzaki, M. Mechanisms of Disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 3: 43–52, 2006.

0526

Physiological role of Na⁺-dependent regulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger

Takahiro Iwamoto and Satomi Kita

Department of Pharmacology, School of Medicine, Fukuoka University,

Summary

Na⁺/Ca²⁺ exchange is the primary mechanism of Ca²⁺ extrusion from cardiac myocytes during diastole. There are many reports indicating that NCX1 expression levels are elevated in heart failure; however, the role of NCX1 in the pathophysiology of cardiac disease is not well understood. To determine the *in vivo* cardiac function of NCX1, we generated transgenic mice with cardiac-specific overexpression of NCX1.1, and also mice where the exchanger had a mutated XIP region (Y224W/Y226W/Y228W/Y231W), devoid of Na⁺-dependent inactivation. Cardiac-specific overexpression of exchangers in these transgenic mice was confirmed by western blotting and immunohistochemistry with an anti-NCX1 antibody. Increased Na⁺/Ca²⁺ exchange activities were also demonstrated by measuring ⁴⁵Ca²⁺ uptake into membrane vesicles and exchange currents in whole cell patch-clamp myocytes. We found that homozygous NCX1.1-transgenic mice, but not heterozygous mice, develop cardiac hypertrophy, and heterozygous NCX1.1 mutant-transgenic mice produce dilated cardiomyopathy. These models will be useful for understanding the role of NCX1 in cardiac disease.