

香川県立保健医療大学リポジトリ

平成22年度学外研修報告：
心臓イオンチャネルに関する共同研究及びMBE2010参加

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2021-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山主, 智子 メールアドレス: 所属:
URL	https://kagawa-puhs.repo.nii.ac.jp/records/296

平成 22 年度 学外研修報告 —心臓イオンチャネルに関する共同研究及び MBE2010 参加—

山主 智子*

香川県立保健医療大学保健医療学部教養部

Report of Overseas Training in 2010

Tomoko T. Yamanushi*

Department of liberal arts and Sciences, Kagawa Prefectural University of Health Sciences

要旨

2010 年 8 月 10 ～ 30 日に学外研修を行い、英国マンチェスター大学医学・人間科学部循環器学科 Prof. Boyett 研究室にて共同研究及びベルリンで開催された MBE2010 に参加した。

マンチェスター大学では、研究課題「心不全ラットにおけるイオンチャネル類の発現—パート 1 心不全心洞房結節におけるイオンチャネル類の発現—」について、研究結果のまとめ方に関して議論を行った。また、「免疫蛍光抗体染色及び共焦点顕微鏡による単離ラット心筋細胞のイオンチャネルタンパク質の検出における固定法の効果」と題した論文の原稿について議論をおこなった。滞在中にリバプール大学医学部を訪れる機会があり、他の心不全モデル動物について知見を得ることができた。最後に今後の研究についての議論も行った。MBE2010 では、有機物質を用いた分子線エピタキシー法に関して理解し、今後の研究へのアイデアを得ることができた。

本研修に参加することで、多くの経験をし知識を得ることができた。この貴重な機会を与えてくださった香川県に感謝の意を表したい。

Key Words: 心不全 (heart failure), イオンチャネル (ion channel),
洞房結節 (sinoatrial node), MBE2010 (MBE2010)

* 連絡先：〒 761-0123 香川県高松市牟礼町原 281-1 香川県立保健医療大学保健医療学部教養部 山主 智子

* Correspondence to: Tomoko T. Yamanushi, Department of Liberal Arts and Sciences, Kagawa Prefectural University of Health Sciences, 281-1 Murecho-hara, Takamatsu, Kagawa 761-0123 Japan

はじめに

平成 21 年度末、これまで継続させてきたマンチェスター大学との共同研究を維持・発展させたいという強い願いを込めて、「平成 22 年度学外研修計画書」を提出した。この研究グループとは 7 年間ほど共同研究を継続しており、現在は心不全におけるイオンチャネルの変化に焦点を当てている。本計画は幸運にも承認いただき、有意義な研修を行うことができた。この幸運に感謝しつつ、この場を借りて報告したい。

研修の概要

1. 研修先

①マンチェスター大学 医学・人間科学部 循環器学科 Prof. Boyett 研究室 (英国)

②ベルリン会議場及びフンボルト-ベルリン大学(ドイツ)

2. 研修期間

2010 年 8 月 10 日～2010 年 8 月 30 日

3. 研修目的

①研究課題「心不全ラットにおけるイオンチャネル類の発現—パート 1 心不全心洞房結節におけるイオンチャネル類の発現—」について、これまでの研究結果をまとめ、論文にする。

②研究課題「ラット心筋細胞のイオンチャネル類の免疫蛍光抗体染色における固定方法の検討」について、論文をまとめる。

③今後の研究について意見を交換し、共同研究体制を維持する。

④ 16th International Conference on Molecular Bean Epitaxy (MBE2010) に参加し、Molecular Bean を使った生体材料によるエピタキシー研究の知見を得る。

⑤ MBE2010 に参加し、他の研究者と、生体材料によるエピタキシー研究について、今後どういった研究ができるのか検討を行う。

4. 研修内容と結果

①「心不全ラットにおけるイオンチャネル類の発現—パート 1 心不全心洞房結節におけるイオンチャネル類の発現—」

まずこの課題に関するこれまでの研究経緯について、簡単に述べる。

2009 年 1 月 5 日～25 日、国際文化交流事業財団の派遣事業により、研修先①を訪れた際に以下の実験を行った¹⁾。まず事前準備として、モノクロタリンによる右側鬱血性不全ラット (CHF ラット) 及び対照ラットより、洞房結節 (SAN)、右心房 (RA)、右心室 (RV)、左心房 (LA)、左心室 (LV) から 1mm 四方の切片を切除し、凍結後、研修先①へ送付した。研修先にて、送付した心臓サンプルのうち SAN、RA、RV 中のイオンチャネル類 mRNA を定量・ポリメラーゼ連鎖反応法 (q-PCR)

により定量した。またこの時にプライマーや試薬の購入が間に合わなかったものについては、共同研究者 Dr. Yanni が後日定量を行った。これらのイオンチャネルについて、対照群と比較して有意差があった心不全群のイオンチャネル発現を矢印で示したのが表 1 である (この結果については、第 20 回国際心臓研究会 (京都、2010 年 5 月 12-16 日) にて発表した)²⁾。

さらにこの派遣から帰国後、本学に於いて、心不全ラット及び対照ラットより心臓を摘出し、ランゲンドルフ装置下にて、心臓の心電図を記録した (この部分については第 20 回国際心臓研究会で発表した³⁾が、再度新たにデータを取り直したため未発表データ)。また心不全ラット及び対照ラットの心臓及び肺の病理標本作製し、観察し、病理学的評価を行った (未発表データ)。この間、研修先では、共同研究者 Dr. Yanni が、さらなるイオンチャネル及び細胞外マトリックスタンパク質の mRNA 発現量を定量した³⁾。またイオンチャネルの mRNA 発現量を基に、共同研究者の Prof. Zhang のグループが、コンピューターモデリングにより、心不全心の心臓拍動をシミュレーションした (未発表データ)。

以上の実験については本学及び研修先で別々に実験が進められたために、e-mail や電話などで結果を交換し合うだけでは、お互いに結果を理解し合うのは非常に難しい。今回の研修により、直接議論し合う事により、論文の構想を練ることができた。まず最初に、実験を行った者が議論しながら図・表を作成し、これらについて検討し、図・表の順番すなわち論文本文の構成を決めた。Prof. Zhang らの心不全心の心臓拍動シミュレーションについて解析が間に合わず、図・表の作成は任せることとなった。実はこの論文については、既に Dr. Yanni と山主の間での e-mail のやり取りにより下書きを開始していた。この下書きに、今回作成した図・表を追加して、results の部分をさらに書き進めた (下書き第 11 版)。しかしこの時点では、discussion の部分がまだ不十分であり、この部分を仕上げるのには時間切れとなった。そのため論文の執筆は、今後 e-mail でのやり取りにより共著者が加筆してゆく形をとる事となった。以上の結果のうち未発表の部分については、本報告の中では公表することは差し控えたい。

(本実験は、全て香川県立保健医療大学「香川県立保健医療大学動物実験に関する指針」に従っておこなった。)

②「ラット心筋細胞の免疫蛍光抗体染色における固定方法の検討」

本研究に関しては、4 年程前から実験を開始し、実験については完了しており、既にいくつかの学会で結果を発表している^{4,5)}。論文については、既に山主がまとめ、共同研究者 Dr. Dbryznski との議論により、加筆修正を昨年行った。そのため今回の研修では、この既に執筆中の論文についての議論を中心におこなった。研究内容に

については、既に発表しているものを参照していただきたい^{4, 5)}。

今回は修正版を持参し、さらに議論し、改稿を進めた(第27版)が、これについては時間切れとなった。そこで改稿は本学にて行い、e-mailのやり取りで議論し、投稿することで合意した。現時点では、既に改稿を行った第41版を、Dr. Dbryznskiに送付し、返信を待っている。改稿論文では図・表を大幅に変更してしまったが、この点は未発表であるため、変更点の詳細などについてここで述べることは差し控えたい。

③リバプール大学訪問

今回の研修中に、マンチェスター大学の共同研究者らと共に、リバプール大学医学部循環器学科を訪れる機会に恵まれた。この研究室では、心臓上行大動脈の一部に人工的に炎症を誘発させることで心不全を起こすモデルを使っている。今回、このモデルに興味があったため同行させてもらった。共同研究者らは、MCT誘発による心不全モデルを当大学研究室でも作製できるようにするためにライセンスを取得の申請をする必要がある。その

ためにMCTモデルの詳細を知るという理由で、同行させてくれた。

心臓上行大動脈の炎症によるモデルは、動物を一度開腹し、心臓上行大動脈の一部を削り取る手術を施す事により作製する。詳細については1週間かけて習う必要があると言う。また英国の実験動物使用に関する厳しいライセンスのため、外部者に対して動物を見せる訳にはいかないという事で、摘出した心臓から心電図を記録する部分のみ見学させていただいた。

こちらからは、MCT誘発モデルについて、作製の仕方、心不全を誘発するまでの動物の体重、生存率などの変化について説明をした。

また最後に、動物の心臓をCTスキャンし、3次元構築した写真を見せていただいた。Prof. Boyettらは、マンチェスター大学病院のCTスキャンにより同様の写真を撮ったが解像度が悪く成功しなかった。今回の写真は、工学部で主に材料材質などを知るために用いられるCTを使って行った。非常にクリアな画像であった。今後、心不全心を用いてCTスキャンし、心不全心の内部構造を知ることができることが期待される。これは全く異なる様々な分野が協力してできる研究である。将来的には、こういった異なる分野の協力体制による研究が必要不可欠になってくる。チャンスがあれば、こういった研究には是非参加してみたいものである。

④今後の研究計画

研究課題「心不全ラットにおけるイオンチャネル類の発現」についてはパート2が既に計画されている。本学からは、既に作製モデル動物のサンプルを、マンチェスター大学へ送付してある。従って、今後は現在執筆途中の2論文を仕上げると共に、さらに課題を進めてゆきたい。本研究は、心不全への遺伝子治療の基礎になるものと確信している。またこういった心不全動物に効果のある機能性食品、薬品を摂取させた場合、イオンチャネルはどのように変化するのが興味の持たれるところである。是非とも研究を進めてゆきたいと願っている。

⑤MBE2010参加

MBE2010は、2010年8月23-27日、フンボルト-ベルリン大学主催で、フンボルト-ベルリン大学及びベルリン会議場にて行われた分子線エピタキシー法に関する国際会議である(図1)。これは、特定の物質や、特定の組成で結晶成長をさせ、新しい物質を作るのに使われる方法である。また作製した物質の物理化学的性質などの解析まで含めての分野である。

今回の会議では、ナノ・ワイヤーやカンタム・ドットに関する発表が盛況であり、新しい物質を工業への応用させることを考慮した研究が主流で

表1 正常ラットに比較したCHFラットのイオンチャネル類のmRNA発現の変化。

Ion channel investigator	Summary of changes mRNA expression in CHF heart		
	RV	RA	SAN
TbX3 (T-box transcription factor)	-	-	↓
HCN1 (responsible for the pacemaker current, I_h)	-	-	↓
HCN4 (responsible for the pacemaker current, I_h)	-	-	↓
Cav1.2 (α_{1C} , responsible for the L-type Ca^{2+} currents, I_{CaL})	↓	-	-
Cav1.3 (α_{1C} , responsible for the L-type Ca^{2+} currents, I_{CaL})	-	-	↓
Cav3.1 (responsible for the T-type Ca^{2+} currents, I_{CaT})	-	-	↓
NCX1 (responsible for the Na^+/Ca^{2+} current, I_{NCX})	↑	-	↓
SERCA2a (SR/ER calcium pump)	↓	-	↓
RyR2 (ryanodine receptor 2, intracellular calcium release channel)	-	-	↓
RyR3 (ryanodine receptor 3, intracellular calcium release channel)	↑	-	-
Cx40 (gap junction protein)	-	-	↑
Cx43 (gap junction protein)	-	↑	-
Cx45 (gap junction protein)	↑	↑	-
Cx30.2 (gap junction protein)	-	-	↓
Kv1.4 (in part responsible for the transient outward current, I_{to})	↓	-	↓
Kv1.5 (responsible for the ultra-rapid current, I_{Kur})	↓	-	↓
Kir2.1 (in part responsible for I_{K1})	-	-	-
Kir2.2 (in part responsible for I_{K1})	-	-	↓
Kir3.4 (responsible for I_{KACD} current)	-	-	-
Kir6.1 (responsible for the ATP-sensitive K^+ current, I_{KATP})	↑	-	-
Kir6.2 (responsible for the ATP-sensitive K^+ current, I_{KATP})	↓	↓	↓
SUR1 (regulatory subunit of $K_{G.2}$)	↓	↓	↓
SUR2 (regulatory subunit of muscle-specific K_{ATP} channel)	-	-	↓
ERG (responsible for rapid delayed rectifier K^+ currents, I_{Kr})	↓	↓	↓

CHFラットSAN, RA, RV中のイオンチャネル類mRNAについて、対照ラットと比較して有意な変化が見られたものを矢印で示した。変化の見られなかったものは-で示した。

あった。近年では、生命科学への応用、すなわち有機物質を用いた分子線エピタキシー法に関する研究が考えられている。例えば、カンタム・ドットは、組織の免疫蛍光抗体法の蛍光物質の代わりに用いることができる。蛍光の退色という問題を回避することができ、一度染色したサンプルは長期にわたって保存できる。今回の会議では有機物質に関する発表は比較的少なかったが、分子線エピタキシー法に関してより深く学ぶ事ができた。また会議の中で、他の研究者と知り合うことができ、議論し、自分の研究の中でこの方法を用いる事ができると確信した。現在、この方法を用いるためのサンプルを作製している。次回の第17回同会議は2年後の2012年9月に奈良で開催される事が決定している。次回の会議では是非演題を発表したいと考えている。

総 括

研修の最大の目的であった目的①について、議論を行い、図・表作成を行った。これら、図・表を元に論文執筆の方針を決めることができた。この方針に従って、既に執筆中の論文を、早急に仕上げたいと考えている。本論文は心不全に於けるイオンチャネルの役割を解明する上で重要であり、また心不全の遺伝子治療の可能性を示すものであると考えている。

目的②については、既に執筆中の論文から大幅に改良を行う事ができた。こちらも早い時期に仕上げたいと考えている。目的③については、今後進めてゆくという事で合意した。さらに目的にはなかったリバプール大学への訪問ができ、別の心不全モデルについての知見を得、またCTスキャンによる高い解像度の画像を見る事もできた。

目的④、⑤に関しては、分子線エピタキシー法に関する知見を得、今後の研究への応用についての計画を立てることができた。今後、この研究については発展させてゆきたいと考えている。

謝 辞

本研修により、現在進行中の研究をさらに発展させ、また今後の研究計画について考慮することができた。さらに思いもかけず様々な知見を得るという幸運に恵まれた。本研修に関わった全ての方々及びご援助いただいた香川県に深く感謝する。



図1 MBE2010が開催されたベルリン会議場正面玄関

文 献

- 1) 山主智子, 心不全における心臓拍動発生領域のイオンチャネルの発現異常に関する共同研究及びその他の資料収集等, 国際交流共済広報 第35号 平成21年7月1日発行
- 2) Tomoko T. Yamanushi, Joseph Yanni, Halina Dobrzynski, Hideaki Kabuto and Mark R. Boyett "Changes in ion channel expression in the rat sinoatrial node in right-sided congestive heart failure" XX world congress ISHR Kyoto 2010 Abstracts P.129
- 3) J. Yanni, T. Yamanushi, H. Dobrzynski and M.R. Boyett "Remodelling of the extracellular matrix in the rat sinoatrial node in congestive heart failure" The Physiological Society meeting (Dublin, UK) July 2009
- 4) Yamanushi, T. T., Boyett, M. R. and Dobrzynski H. "The effect of different fixation protocols on immunocytochemical labelling of ion channels in rat ventricular myocytes" Joint International Meeting of The Physiological Society & FEPS (Bristol, UK). July 2005
- 5) Yamanushi, T. T., Hirakawa, E., Boyett, M. R. and Dobrzynski, H. "The effect of four fixation treatments on the detection of ion channel proteins with immunocytochemistry and confocal microscopy in rat ventricular myocytes" The 16th International Microscopy Congress (Sapporo, Japan) September 2006

Abstract

From 10th to 30th August 2010, as a part of overseas training, I visited the Laboratory of Prof. Boyett at Cardiovascular Medicine, Faculty of Medical and Human Sciences, University of Manchester in the United Kingdom and attended the meeting of MBE2011 held in Berlin.

At University of Manchester, we discussed how to summarize the results of our research on “Changes in ion channels expression in right-sided congestive heart failure in rats-part1: under sinoatrial node dysfunction-”. We also discussed about the draft of the paper titled “The effect of fixative on the detection of ion channel proteins in isolated rat ventricular myocytes by immunofluorescence labelling and confocal microscopy”. During my stay in England, I had a chance to be introduced to other heart failure models at Faculty of Medicine, University of Liverpool. At last, we had a discussion about our collaborative research in future. At the meeting of MBE2010, I learned about molecular epitaxy with organic substances and got ideas for my research.

I got a lot of knowledge and experience through this overseas training. I wish to express my gratitude to Kagawa Prefecture providing me with this valuable opportunity.

受付日 2010 年 10 月 14 日

受理日 2010 年 12 月 13 日