糖尿病ラットの心筋細胞における Ca^{2+} 代謝と細胞収縮の異常

林 秀晴*¹ 野田直久*² 加藤秀樹*² 佐藤 洋*² 寺田 肇*² 山崎 昇*³

streptozotocin (45 mg/kg) 静注 8 週後の糖尿病 (DM) ラットの心室筋細胞を用いて, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と細胞収縮の異常に関する検討をした. 蛍光色素の fura-2 により測定した静止細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は, DM 群では 53 ± 3 (平均 $\pm$ SE) nM と, 対照群の 75 ± 5 nM に比し有意に低値だった ($p < 0.01$). また, SBFi により測定した DM 群の $[\text{Na}^+]_i$ は, 対照群に比し有意に低値だったが, Na^+/H^+ 交換の阻害剤である hexamethylene amiloride ($1 \mu\text{M}$) を灌流後には, 両群間で差を認めなかった. また, indo-1 により測定した Ca^{2+} transient の拡張期と peak 値, および細胞周囲径の変化は, DM で低値だった ($p < 0.05$). DM ラットの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 低値の機序として, Na^+/H^+ 交換活性の低下による $[\text{Na}^+]_i$ 低値に基づく可能性が示唆された. また, Ca^{2+} transient の peak 値の低下は, 筋小胞体から放出される Ca^{2+} の減少による可能性が考えられる. 以上より, 糖尿病性心筋症の発症および収縮力低下における Ca^{2+} 代謝異常の関与が示唆された.

(心電図 17: No. 4, 342~347, 1997)

I. はじめに

糖尿病患者において原因不明の心機能低下が認められ, 糖尿病性心筋症と呼ばれているが¹⁾, その成因

として微小血管や, 細胞および細胞内小器官の異常が報告されている^{2)~4)}. 一方, 細胞膜の Ca^{2+} -ATPase⁵⁾ や $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換の活性低下⁶⁾ や, 筋小胞体の Ca^{2+} -ATPase の活性低下^{7), 8)} が報告されているため, 糖尿病性心筋症の発症および収縮力低下における Ca^{2+} 代謝異常の関与が示唆されてきた. これらの異常からは糖尿病性心筋症における Ca^{2+} 過負荷の関与が示唆されてきたが⁹⁾, 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定はされていなかった. そこで, 蛍光色素法を用いて¹⁰⁾, 糖尿病ラットより分離した心筋細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と細胞収縮の異常に関する検討を行なった^{11), 12)}. また, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 低下の原因の一つと

Key Words ● fura-2
● indo-1
● $[\text{Ca}^{2+}]_i$
● Ca^{2+} transient
● $[\text{Na}^+]_i$

* 1 浜松医科大学光量子医学研究センター

(〒 431-31 浜松市半田町 3600)

* 2 浜松医科大学第三内科

* 3 浜松医科大学

Alterations in Ca^{2+} metabolism and cell contraction in diabetic rat myocytes.

Hideharu Hayashi, Naohisa Noda, Hideki Katoh, Hiroshi Satoh, Hajime Terada, Noboru Yamazaki

して考えられる細胞内 Na^+ 濃度 ($[\text{Na}^+]_i$) の関与も検討した¹³⁾.

II. 方 法

1. 糖尿病心室筋細胞

体重 200~220 g の Wistar ラット に streptozotocin (45 mg/kg) 静注 8 週後の糖尿病ラットと、buffer を静注した対照ラットより、collagenase を用いた酵素法により心室筋細胞を分離した¹¹⁾.

2. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定¹¹⁾

蛍光色素の fura-2/AM (5 μM) を 37°C で 40 分間負荷した. 高感度 (SIT) テレビカメラと細胞内イオン濃度解析装置 (ARGUS: 浜松ホトニクス) を使用し, 340/380 nm の波長で励起時の 510 nm での蛍光像を求めた. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ には, ionomycin (10 μM) を用いた *in vivo* 較正曲線より換算した.

3. $[\text{Na}^+]_i$ の測定¹³⁾

sodium-binding benzofuran isophthalate (SBFI)/AM (5 μM) を室温で 30 分間負荷し, 340/380 nm の波長で励起時の 510 nm での蛍光像を取得した. $[\text{Na}^+]_i$ は, gramicidin (10 μM) を用いた *in vivo* 較正曲線より算出した.

4. Ca^{2+} transient と細胞収縮の測定¹²⁾

indo-1/AM (2 μM) を 37°C で 5 分間負荷した細胞を, field stimulation により 1 Hz で刺激し, 2 台の SIT カメラを用いて, 360 nm で励起時の 405/480 nm での蛍光強度比を 33 msec 毎に取得することにより Ca^{2+} transient を算出した. indo-1/AM 負荷法による蛍光強度比は, 未加水分解物の残存により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の絶対値への変換が困難であるために, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は蛍光強度比として示した. 細胞収縮の測定には, 細胞周囲径の変化率として, (拡張期最大周囲径—収縮期最小周囲径)/拡張期最大周囲径を用いた.

結果は平均 $\pm$ SE で示し, $p < 0.05$ を有意な差とした.

図1 糖尿病ラットの静止心室筋細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

fura-2 によって測定した対照群 (Normal: $n = 36$) および糖尿病ラット群 (D.M.: $n = 61$) の $[\text{Ca}^{2+}]_i$. bar は平均 $\pm$ SE を示す¹¹⁾.

III. 結 果

1. 糖尿病ラットの特徴¹¹⁾

糖尿病ラットの血糖値は $559 \pm 7 \text{ mg/dl}$ と, 対照群の $164 \pm 5 \text{ mg/dl}$ に比し高値であった ($p < 0.01$). また, 糖尿病ラットにおける心体重比は

4.46±0.12 と，対照群の 3.00±0.10 に比し有意に高値であった ($p<0.01$).

2. 糖尿病ラット静止心室筋細胞の $[Ca^{2+}]_i$ ¹¹⁾ (図 1)

糖尿病ラットの $[Ca^{2+}]_i$ は 53 ± 3 nM と，対照群の 75 ± 5 nM に比し有意に低かった ($p<0.01$). また，2', 7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF) で測定した細胞内 pH は，両群で差を認めなかった(糖尿病 7.06 ± 0.02 : 対照 7.07 ± 0.02)¹¹⁾.

3. 糖尿病ラット静止心室筋細胞の $[Na^+]_i$ ¹³⁾

糖尿病心における $[Ca^{2+}]_i$ 低下は， $[Na^+]_i$ の低下

図2 糖尿病ラットの静止心室筋細胞における細胞内 Na^+ 濃度 ($[Na^+]_i$)

sodium-binding benzofuran isophthalate (SBFI) によって測定した対照群 (Normal: $n=100$) および糖尿病ラット群 (D.M.: $n=88$) の $[Na^+]_i$. bar は平均±SE を示す¹³⁾.

に基づく可能性が考えられるため，SBFI を用いて $[Na^+]_i$ を測定した. 図2に示す如く，糖尿病心筋の $[Na^+]_i$ は 9.2 ± 0.4 mM と対照群の 12.0 ± 0.3 mM に比し有意に低値だった ($p<0.01$).

糖尿病心筋における $[Na^+]_i$ 低値の原因が， Na^+/H^+ 交換活性の低下による可能性を検討するために， Na^+/H^+ 交換の選択的阻害剤である hexamethylene amiloride (HMA) の $[Na^+]_i$ に及ぼす影響を検討した. 図3に示す如く， $1\mu M$ の HMA を40分間灌流後の $[Na^+]_i$ には，糖尿病群および対照群の間で差を認めなかった. このことから，糖尿病ラット心の $[Na^+]_i$ 低下において Na^+/H^+ 交換活性の低下が関与していることが示唆された.

4. 糖尿病ラット心室筋細胞の Ca^{2+} transient と細胞収縮¹²⁾

Ca^{2+} transient と細胞周囲径の変化の典型例を図

図3 糖尿病ラット心筋細胞の $[Na^+]_i$ に及ぼす hexamethylene amiloride (HMA) の影響

HMA ($1\mu M$) を40分間投与前後の対照群 (Normal: $n=30$) および糖尿病ラット群 (D.M.: $n=30$) の $[Na^+]_i$. 平均±SE を示す. ** $p<0.01$ v.s. normal, † $p<0.05$ and †† $p<0.01$ v.s. control¹³⁾.

4に示した。上段の対照ラット (normal) では、 $[Ca^{2+}]_i$ を反映する 405/480 nm の蛍光強度比 (●) が、拡張期の 0.47 から刺激後約 100 msec で peak に達し、0.58 まで上昇した。これに比して、下段の糖尿病ラット (D.M.) では拡張期 0.43, 刺激後の peak でも 0.50 といずれも対照ラットより低値であった。また、細胞周囲径の変化 (○) も、糖尿病ラットでは対照に比して低値であった。

糖尿病群 6 例, 対照群 5 例における 405/480 nm の比で示した Ca^{2+} transient の拡張期の値 (糖尿

病 0.43 ± 0.01) : 対照 0.48 ± 0.01 ; $p < 0.01$) と peak 値 (糖尿病 0.49 ± 0.02 : 対照 0.56 ± 0.01 ; $p < 0.05$) は、ともに糖尿病ラットで低値だった。細胞周囲径の変化も、糖尿病ラットでは $2.9 \pm 0.3\%$ と、対照群の $5.2 \pm 0.9\%$ に比し有意に低値だった ($p < 0.05$)。

IV. 考 察

今回の検討では、糖尿病ラットの心室筋細胞の $[Ca^{2+}]_i$ は、対照群に比し有意に低値だった。糖尿病

図4 対照 (Normal) および糖尿病ラット心 (D.M.) における Ca^{2+} transient と細胞周囲径の変化の典型例
 黒丸は indo-1 の 405/480 nm の蛍光比で $[Ca^{2+}]_i$ を示し, 白丸は細胞周囲径の変化を示す。細胞は field stimulation により 1 Hz で刺激した¹²⁾。

心筋細胞における $[Ca^{2+}]_i$ に関しては、対照と差を認めないとの報告もあるが¹⁴⁾、最近、Lagadic-Gossman ら¹⁵⁾ も $[Ca^{2+}]_i$ および Ca^{2+} transient の低下を報告している。Horackova ら¹⁶⁾ も、ラジオアイソトープ法を用いて、糖尿病ラット心筋細胞の Ca^{2+} 含量が減少していることを報告している。本研究で示された糖尿病心筋細胞における $[Ca^{2+}]_i$ の低下は、細胞膜の Ca^{2+} -ATPase や Na^+/Ca^{2+} 交換の活性低下や、筋小胞体の Ca^{2+} -ATPase の活性低下では説明できない。糖尿病心筋の $[Ca^{2+}]_i$ が低値である理由としては、Bergh ら¹⁷⁾ により報告されている Ca^{2+} 流入の減少により説明可能である。

一方、糖尿病心筋では Na^+/K^+ -ATPase 活性¹⁸⁾ や Na^+/H^+ 交換活性が低下していること^{19),20)} が報告されているため、糖尿病心筋における $[Na^+]_i$ の異常が、 Na^+/Ca^{2+} 交換を介して $[Ca^{2+}]_i$ の異常と関連している可能性も考えられる。

本研究においては糖尿病心筋細胞の $[Na^+]_i$ 低下を認めたが、 Na^+/H^+ 交換の選択的阻害剤である HMA の灌流により、糖尿病群と対照群の間における $[Na^+]_i$ の差異は消失した¹³⁾。このことは、糖尿病心筋における Na^+/H^+ 交換活性の低下^{19),20)} により $[Na^+]_i$ が低下し、 Na^+/Ca^{2+} 交換を介して $[Ca^{2+}]_i$ も低下している可能性が示唆された。しかし、糖尿病心筋における $[Na^+]_i$ に関しては、上昇している²¹⁾ との報告もあって一致していないため、さらに検討が必要である。

糖尿病心筋の収縮力低下に関する報告は多いが、その原因は未だ明らかにされていない。心筋の張力発生は興奮・収縮連関の3つの要素により決定される²²⁾。つまり、(1) $[Ca^{2+}]_i$ の周期的変化いわゆる Ca^{2+} transient, (2) 心筋線維の Ca^{2+} に対する感受性 (Ca^{2+} sensitivity), (3) 最大 Ca^{2+} 活性化張力である。既に、糖尿病ラット心筋における収縮蛋白の異常として、myosin ATPase 活性の低下や myosin isozyme の分布異常が報告されているが³⁾、 Ca^{2+} sensitivity に関しては低下²³⁾ または上昇²⁴⁾ との報告があり一定していない。一方、前述のごとく静止心筋細胞の

$[Ca^{2+}]_i$ が対照群に比し低値であるため、 Ca^{2+} 代謝異常が糖尿病心筋の収縮力低下に関与している可能性が考えられる。fura-2 は2波長励起が必要なため、 Ca^{2+} transient のように $[Ca^{2+}]_i$ の速い変化を観察することには困難を伴っている。indo-1 法¹⁰⁾ は1波長励起2波長蛍光で $[Ca^{2+}]_i$ を測定するため、2台の高感度テレビカメラを用いることにより、 Ca^{2+} transient の測定が可能であった。

今回、糖尿病ラット心筋細胞の Ca^{2+} transient において拡張期および peak 値の低下を認めたことから、糖尿病心筋が収縮力の低下を示す原因として Ca^{2+} transient の低下の関与が考えられる。このような Ca^{2+} transient の異常を引き起こす機序には Ca^{2+} 電流の関与も考えられ、実際に streptozotocin の静注24~30週後には Ca^{2+} 電流が減少すると報告されている²⁵⁾。しかし、streptozotocin 静注8週後までの糖尿病ラットでは Ca^{2+} 電流は変化していないと報告されているため²⁶⁾、今回使用した糖尿病ラットにおいては、 Ca^{2+} 電流減少の関与は少ないことが示唆される。

一方、ラットにおける Ca^{2+} transient の大きさを規定する因子としては筋小胞体からの Ca^{2+} 放出量が最も大きいとされていること、そして糖尿病心筋における筋小胞体の Ca^{2+} -ATPase の活性低下が報告されていることから^{7),8)}、筋小胞体が放出し得る Ca^{2+} 蓄積量の減少が起これ、 Ca^{2+} transient が低下している可能性が考えられる。実際、rapid cooling contracture による評価により、筋小胞体内の Ca^{2+} 含量は減少していると報告されている^{27),28)}。

以上より、糖尿病性心筋症の発症および収縮力低下における Ca^{2+} 代謝異常の関与が示唆された。糖尿病の病期により Ca^{2+} 代謝異常の差異があることも考えられるため、更に検討が必要である。

〔文 献〕

- 1) Fein FS, Sonnenblick EH: Diabetic cardiomyopa-

- thy. *Prog Cardiovasc Res* 27 : 255, 1985
- 2) Gøtzsche O : Myocardial cell dysfunction in diabetes mellitus. A review of clinical and experimental studies. *Diabetes* 35 : 1158, 1986
- 3) Dillmann WH : Diabetes and thyroid-hormone-induced changes in cardiac function and their molecular basis. *Ann Rev Med* 40 : 373, 1989.
- 4) Rodrigues B, McNeill JH : The diabetic heart : metabolic causes for the development of a cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 26 : 913, 1992
- 5) Heyliger CE, Prakash A, McNeill JH : Alterations in cardiac sarcolemmal Ca^{2+} pump activity during diabetes mellitus. *Am J Physiol* 252 : H540, 1987
- 6) Makino N, Dhalla KS, Elimban V, Dhalla NS : Sarcolemmal Ca^{2+} transport in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats. *Am J Physiol* 253 : E202, 1987
- 7) Penpargkul S, Fein F, Sonnenblick EH, Scheuer J : Depressed cardiac sarcoplasmic reticular function from diabetic rats. *J Mol Cell Cardiol* 13 : 303, 1981
- 8) Lopaschuk GD, Tahiliani AG, Vadlamudi RVSV, Katz S, McNeill JH : Cardiac sarcoplasmic reticulum function in insulin- or carnitine-treated diabetic rats. *Am J Physiol* 245 : H969, 1983
- 9) Dhalla NS, Pierce GN, Innes IR, Beamish RE : Pathogenesis of cardiac dysfunction in diabetes mellitus. *Can J Cardiol* 1 : 263, 1985
- 10) Hayashi H, Miyata H : Fluorescence imaging of intracellular Ca^{2+} . *J Pharmacol Toxicol* 31 : 1, 1994
- 11) Noda N, Hayashi H, Miyata H, Suzuki S, Kobayashi A, Yamazaki N : Cytosolic Ca^{2+} concentration and pH of diabetic rat myocytes during metabolic inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 24 : 435, 1992
- 12) Noda N, Hayashi H, Satoh H, Terada H, Hirano M, Kobayashi A, Yamazaki N : Ca^{2+} transients and cell shortening in diabetic rat ventricular myocytes. *Jpn Circ J* 57 : 449, 1993
- 13) Katoh H, Noda N, Hayashi H, Satoh H, Terada H, Ohno R, Yamazaki N : Intracellular sodium concentration in diabetic rat ventricular myocytes. *Jpn Heart J* 36 : 647, 1995
- 14) Yu Z, Quamme GA, McNeill JH : Depressed $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses to isoproterenol and cAMP in isolated cardiomyocytes from experimental diabetic rats. *Am J Physiol* 266 : H2334, 1994
- 15) Lagadic-Gossmann D, Buckler KJ, Le Prigent K, Feuvray D : Altered Ca^{2+} handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *Am J Physiol* 270 : H1529, 1996
- 16) Horackova M, Murphy MG : Effects of chronic diabetes mellitus on the electrical and contractile activities, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ transport, fatty acid profiles and ultrastructure of isolated rat ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 411 : 564, 1988
- 17) Bergh CH, Hjalmarson A, Sjögren KG, Jacobsson B : The effect of diabetes on phosphatidylinositol turnover and calcium influx in myocardium. *Horm Metabol Res* 20 : 381, 1988
- 18) Kjeldsen K, Brændgaard H, Sidenius P, Larsen JS, Nørgaard A : Diabetes decreases Na^+-K^+ pump concentration in skeletal muscles, heart ventricular muscle, and peripheral nerves of rat. *Diabetes* 36 : 842, 1987
- 19) Lagadic-Gossmann D, Chesnais JM, Feuvray D : Intracellular pH regulation in papillary muscle cells from streptozotocin diabetic rats : an ion-sensitive microelectrode study. *Pflügers Arch* 412 : 613, 1988
- 20) Pierce GN, Ramjiawan B, Dhalla NS, Ferrari R : Na^+-H^+ exchange in cardiac sarcolemmal vesicles isolated from diabetic rats. *Am J Physiol* 258 : H255, 1990
- 21) Lagadic-Gossmann D, Feuvray D : Intracellular sodium activity in papillary muscle from diabetic rat hearts. *Exp Physiol* 76 : 147, 1991
- 22) Kusuoka H, Koretsune Y, Chacko VP, Weisfeldt ML, Marban E : Excitation-contraction coupling in postischemic myocardium. *Circ Res* 66 : 1268, 1990
- 23) Bielefeld DR, Pace CS, Boshell BR : Altered sensitivity of chronic diabetic rat heart to calcium. *Am J Physiol* 245 : E560, 1983
- 24) Murat I, Veksler VI, Ventura-Clapier R : Effects of halothane on contractile properties of skinned fibers from cardiomyopathic animals. *J Mol Cell Cardiol* 21 : 1293, 1989
- 25) Wang DW, Kiyosue T, Shigematsu S, Arita M : Abnormalities of K^+ and Ca^{2+} currents in ventricular myocytes from rats with chronic diabetes. *Am J Physiol* 269 : H1288, 1995
- 26) Jourdon P, Feuvray D : Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *J Physiol* 470 : 411, 1993
- 27) Bouchard RA, Bose D : Influence of experimental diabetes on sarcoplasmic reticulum function in rat ventricular muscle. *Am J Physiol* 260 : H341, 1991
- 28) Yu Z, Tibbits GF, McNeill JH : Cellular functions of diabetic cardiomyocytes : contractility, rapid-cooling contracture, and ryanodine binding. *Am J Physiol* 266 : H2082, 1994