モノクロタリン心不全ラットの心室筋細胞における細胞内Ca調節

埼玉医科大学 大学院 臨床医学系 循環器内科学専攻 (指導:西村 重敬教授)

小川 晴美

Cytosolic Calicum Regulation in Ventricular Myocytes of Rats with Monocrotalin-Induced Heart Failure

Harumi Ogawa (Department of Cardiology Saitama Medical University, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Monocrotaline (MCT) has been well known to induce pulmonary hypertension (PH) without changing systemic blood pressure in animal models. We previously reported that pathological hypertrophy occurred in left ventricle (LV) as well as in right ventricle (RV) with MCT-induced PH model although neither pressure or volume overload was burdened on LV. Our purpose is to examine differences in $[Ca^{2+}]_i$ regulation between hypertrophic myocytes with pressure overload (RV myocytes) and those without pressure overload (LV myocytes). Our working hypothesis was that RV remodeling due to both direct mechanical overload and neurohumoral factors may have different effects on myocyte Ca^{2+} regulation in comparison with LV remodeling solely due to neurohumoral factors. We injected MCT or control saline intraperitonealy and observed these rats for 6 weeks. We lost some of them due to pump failure or other complications. Ventricular myocytes were isolated enzymatically from RV and LV free walls 6 weeks after injection. We measured $[Ca^{2+}]_i$ beat to beat basis using fluo-3 as previously reported. In stabilized electrically-activated $[Ca^{2+}]_i$ transients, the peak systolic $[Ca^{2+}]_i$ and the amplitude of $[Ca^{2+}]_i$ significantly increased in LV myocytes of MCT rats as compared with LV myocytes of Sham rats or RV myocytes of MCT rats. The decline phase of $[Ca^{2+}]_i$ transients were also accelerated in LV myocytes of MCT rats. But these parameters were not changed in RV myocytes of MCT rats in comparison with RV myocytes of Sham rats. Protein kinase activation of myocytes increased peak systolic [Ca²⁺]_i but decreased the decline speed of $[Ca^{2+}]_i$ transients in both LV and RV of MCT and Sham. The normalized $[Ca^{2+}]_i$ transients decline speed was not associated with plasma brain natriuretic peptide level (a well known marker of heart failure grading).

To examine whether these Ca²⁺ handling changes were due to Ca²⁺ handling gene expression, we performed RNAse protection assay for sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca ATPase (SERCA) and Na-Ca exchanger (NCX). These assays did not show significant changes in the expression of SERCA and NCX genes.

Thus the Ca²⁺a handling was altered in both LV and RV ventricular myocytes from MCT-induced rat hearts. But the data described above strongly suggested that the alterations of Ca²⁺ handling in MCT rat hearts were not due to the changes in SERCA or NCX gene expression but due to the changes in SERCA and/or NCX functions. The mechanisms in alterations of SERCA and NCX function may involve phosphorylation state of these proteins.

Keywords: Monocrotaline, Congestive Heart Failure, Ventricular Remodeling, Calcium Handling, Fluo-3

緒言

_ 心不全とは多くの疾患の終末像としてみられる病態 医学博士 甲第1017号 平成18年3月24日(埼玉医科大学) であり、心臓のポンプ失調を主な定義とされる. 全身 に血液を送り出すポンプ作用は心臓を構成する心筋 細胞によって担われており、心筋細胞は細胞内のCa²⁺ 濃度の変化により収縮と弛緩を繰り返し、細胞膜の 興奮から収縮までの過程は興奮収縮連関 (excitationcontraction coupling; E-C coupling) と呼ばれる^{1, 2)}. 細胞膜のL型Ca²⁺チャネルであるジヒドロピリジン 受容体 (dihydropyridine receptor; DHPR) より細胞 内に流入した少量のCa²⁺が,筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum; SR) 上にあるリアノジン受容体 (ryanodine receptor; RyR)からのCa²⁺放出を促し (Ca²⁺-induced Ca²⁺ release; CICR),収縮が起こる^{3, 4)}. 弛緩は主に, SR上のCa²⁺-ATP ase (SR Ca²⁺-ATP ase; SERCA2) と形 質膜 (sarcolemma; SL) 上のNa-Ca 交換機構 (Na-Ca exchanger; NCX) から細胞内よりCa²⁺が汲み出され生 じる^{5, 6)}. これらのCaハンドリングに異常をきたし,心 筋細胞の収縮,弛緩不全により心不全となることが知 られている.

心不全のモデル^{7,8}としては圧負荷モデル(肺動脈 狭窄,大動脈狭窄,大動脈弁狭窄,腎動脈閉塞,自然 発症)⁹,容量負荷モデル(動静脈シャント,大動脈弁 閉鎖不全)¹⁰,心筋虚血モデル(冠動脈閉塞),薬物モデ ル(アドリアマイシン,アルコール,カテコラミン), 高頻度ペーシングモデル¹⁰,遺伝子改変モデル等が 用いられている.そのひとつにモノクロタリン心不全 モデル^{12,13}がある.モノクロタリンはアルカロイドの 一種であり,肺血管床の障害による肺高血圧モデルと して知られ,肺高血圧症の病態の解明¹⁴⁾や治療^{15,16}に おいて,近年神経体液性因子,機械的ストレス,遺伝 子等さまざまな観点から研究が行われている.

我々は先の研究で、モノクロタリンによる肺高血圧 症ラットにおいて右心室だけでなく、左心室でも肥大 や不全を示唆するデータを得た¹⁷⁰.今回、両心室にお けるCaハンドリングの違いに関して検討した.

方 法

我々はUS National Institutes of Healthより認証されたGuide for the Care and Use of Laboratory Animals に従ってWister ratを飼育し実験に使用した(NIH Publication No.85-23, revised 1996). 埼玉医科大学動物 実験委員会(認定番号000017)の認定のもとに行った. 心不全ラットの作成

6週齢の雄性 Wister rat (128~138 g) 103 匹に 60 mg/ kgの Monocrotaline: MCT (和光純薬,日本)を単回腹腔 内注射した.6週間経過観察し,生存した 35 匹の 12 週 齢の雄性 Wister rat を心不全ラット (以下 MCT ラット と略す)として用いた.

単離心室筋細胞液の作成

Wister rat (128~138 g)の心臓から従来のコラゲ ナーゼ灌流法^{18,19}に基づいて心室筋細胞を単離した. Pentobarbital Sodium (Nembtal²大日本製薬,日本) 1~3 mlを腹腔内注射し麻酔したラットより心臓を摘 出し,素早く大動脈部分でLangendorff灌流装置に接 続した.0 mM Ca²⁺溶液で5分間灌流した後,0.1 mM Ca²⁺溶液の入った酵素液で8~12分灌流した. 灌流液 は37℃, pH 7.4で維持した. 灌流圧が十分に低下した ことを確認した後, 酵素を含まない0.1 mM Ca²⁺溶液(0 mM Ca²⁺に0.1 mM CaCl₂を加えて作成)で5分間洗い, 左心室と右心室を切り出し同溶液中でそれぞれをは さみで細かく切り, 細胞浮遊液を茶漉しでフィルター した. 細胞懸濁液のCa²⁺濃度を1.0 mMまで上昇させ, 室温で保存し単離後6時間以内に使用した.

0 mM Ca²⁺ 溶液の組成は 126 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 16 mM NaOH, 24 mM HEPES, 11 mM glucose, 20 mM taurine, 4 mM creatine monohydrate, 5mM sodium pyruvate, 1mM NaH₂PO₄であり, 0.1 mM Ca²⁺ 溶液は0 mM Ca²⁺ 溶液に0.1 mM CaCl₂を加え, 酵 素液はさらに Worthington Biochemical Corporation, USA 活性 226~284 u/mgの collagenase type 2 100 mg/ dl, SIGMA JAPANの protease 10 mg/dlを加えて作成 した.

細胞内Ca²⁺濃度の測定

単離した細胞はlaminin (Biosciences, USA)でコー ティングしたchamberに付着させ、30分間 98 mM のCa²⁺ 蛍光色素であるfluo-3, AM (Molecular Probes, USA)が含まれたHEPES溶液で感作処理した.その 後fluo-3の含まれない24 mM HEPES溶液で15分以上 洗った.細胞に485 nmの励起光を照射し、530 nmの 蛍光を測定した.530 nmの蛍光強度の増加は細胞内 Ca²⁺ 濃度の増加を意味する.測定には蛍光顕微鏡シス テム (DX-1000, Solamere Technology Group, Salt Lake City, UT)を使用した.灌流速度は約2.0 ml/minとし, chamber内の灌流液は実験中1~1.5 mlでほぼ一定に維 持した.測定は30±1℃で行った.細胞内 Ca²⁺ 濃度の 指標としてF/F0を用いた.F0は細胞を0.25 Hzで電気 刺激したときの拡張終期の530 nmの蛍光値を,Fは実 際の測定値を示す.

HEPES溶液の組成は126 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 13 mM NaOH, 1.08 mM CaCl₂, 24 mM HEPES, 11 mM glucoseであり,室温25℃でpH7.4に調 整した.

<u>実験プロトコール(Fig. 1a, b)</u>

12 週齢の雄性 Wister ratから単離した心室筋細胞を 用い,細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i)を測定した.心室筋細 胞を2-3 分安静にしたのち拡張期を1-2 分記録し,その 後,電気刺激により収縮を誘発して,選択的 β -アド レナリンアゴニストである Isoproterenol (Iso),アデニ ル酸シクラーゼを活性化する Forskolin (For), PDE III 阻害薬である Milrinone (Mil)の10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M 濃度における [Ca²⁺]_iの変化をモニターした (Fig. 1a, b)に示すように解析を行い, -amp/ tauをCa低下速 度と考えた.

<u>ノーザンブロッティング</u>

解説書に従いZolB (Tel Test Inc.) を用いて左心室よ

りmRNAを抽出し, 10 μgずつ定量した後, アガロー スゲル上で電気泳動し, Hybond-N 膜上にブロット した. 従来の方法に従って, SERCA2a, dihydropyridine sensitive Ca²⁺ channel receptorのα1 subunit, ryanodine receptor(RyR2)に対するプローブでブロッ ティングした. RyR2のcDNAは, 久留米大学医学部

竹島浩氏から寄贈されたものを使用した. それぞ れのcDNAは, [α -P32]dCTPにてラベルし, ハイブ リダイゼーションを行い, Fuji image analyzer (Fujix bas2000;Fujifilm)を用いて定量化した.

データ処理

カルシウム発光シグナルおよび細胞収縮はアナログ アンプ(日本光電)により処理した後, ADコンバーター (Digidate 1200)によりオンラインで時系列データ記録 ソフト(Axoscope)を用いて汎用 PC(コンパック社製) によりハードディスク装置に保存した.解析および図 作成にはソフトウェア(ORIGIN)を使用した.データ は平均値±標準誤差で表示し比較を行った.P<0.05 を統計学的有意とした.

結 果

(1) 薬剤投与前(Table 1)

薬物投与前のShamラット,MCTラットにおける 単離心室筋細胞における細胞内 Ca²⁺ 動態をTable 1に 示す.振幅 (amplitude:amp) に関してはShamラットと 比較して,MCTラットでは大きく,左心室(LV)では 有意差を認めた (P<0.01).Shamラット,MCTラッ トともに右心室(RV)と比較してLVで大きく,MCT ラットでは有意差を認めた (P<0.05).</p>

心室筋細胞の弛緩能の指標となる[dCa/dt], [amp/ tau]に関してもShamラットと比較して, MCTラット では大きく, LVでは有意差を認めた(P<0.01). Sham ラット, MCTラットともにRVと比較してLVで大きく, MCTラットでは有意差を認めた(P<0.001).

[dCa/dt], [amp/tau]は[Ca²⁺]_iに依存するため, 電気 刺激を行った直後5拍の記録を用いて[systolic Ca²⁺]と の関係を検討した.

(2) 電気刺激直後(Fig. 2, Fig. 3)

心室筋細胞を3分間無刺激下に観察した後,収縮 を誘発する電気刺激直後5拍の[amp/tau]を縦軸に, [systol]を横軸にプロットし,データ解析ソフトによ り自動フィットを行った(Fig. 2).いずれの直線も よくフィットしていた.LVではShamラット,MCT ラットの [amp/tau]と[systol]の傾きは相違を認めな かった.RVではShamラットと比較してMCTラット は[systol]に対する[amp/tau]がより小さく,傾きは緩 やかであり,Ca低下速度が低下していることが考え られた.

そのため, [amp/tau]を弛緩能の指標, [systol]を収 縮能の指標とし, その傾きのT検定を行った. LVでは 有意差を認めなかったが, RVでは有意差 (P<0.05) を 認め, 弛緩能が低下していることが示唆された.



Fig. 1a. [Ca²⁺]_i transients. fluo-3 で感作処理を行い, イオノ マイシンにより細胞膜に穴を開け, マンガンでキレートし, 細胞内 Ca²⁺ 濃度を測定した.



Fig. 1b. Analysis with Curve fitting. 図に示すように解析を行い, -amp/tauをCa低下速度と考えた.

Table 1. Stabilized	$[Ca^{2+}]$	i transients	(0.25 Hz)
---------------------	-------------	--------------	------------



薬物投与前の単離心室筋細胞における細胞内 Ca²⁺ 動態を示す. MCT: Monocrotaline, LV: Left Ventricle, RV: Right Ventricle. (3)SERCAとNCXの遺伝子発現解析(Fig. 4, Fig. 5)

そこで, Ca低下速度を規定しているSERCA(Fig. 4) とNCX(Fig. 5)のmRNAを測定した. SERCA, NCXと もにSham, MCT間で有意差を認めなかった.

(4) 薬剤投与時 (Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10, Fig. 11)

次に薬剤投与時のCaトランジェントの典型像をLV (Fig. 6), RV (Fig. 7)別に示す.縦軸が[Ca²⁺]_iで,横軸 が時間である. Milと比較して, Iso, For投与群のピー クは高く, Iso投与群ではより低濃度の時点で高いピー



Fig. 2. Relationship between systolic [Ca²⁺]_i and [Ca²⁺]_i decline speed (-amp/tau). 心室筋細胞を3分間無刺激下に観察した後,収縮を誘発する電気刺激直後5拍の [amp/tau] を縦軸に, [systol] を横軸にプロットした. いずれの直線もよくフィットしていた.

LV: Left Ventricle, RV: Right Ventricle, MCT: Monocrotaline.



Fig. 3. Comparison of normalized [Ca²⁺]_i decline speed (-amp/tau/sytolic [Ca²⁺]_i). Fig. 2 に示した直線の傾きのT検定を行い, RV で有意差を認めた.

LV: Left Ventricle, RV: Right Ventricle, MCT: Monocrotaline.

クを認めている.

[amplitude] (Fig. 8), [dCadt] (Fig. 9), [amp/tau] (Fig. 10) それぞれにおける濃度変化時の推移をグラフに示す. 縦軸は[amplitude], [dCadt], [amp/tau] それぞれの値であり, log 表示とした. 横軸はIso, For, Milそれぞれの投与薬剤濃度である.

Iso, For投与群のLV[amplitude]では低濃度での反応 性が有意差を認めないもののShamラットと比較して MCTラットにおいて低い傾向がみられた.LV[dCadt], [amp/tau]に関してはIso投与群では[amplitude]と同



Fig. 4. Quantification of SERCA mRNA. Ca 低下速度を規定 している SERCA の mRNA を測定した. 上段にノーザンブ ロッティング,下段にT検定を示したが,LV, RV ともに 有意差を認めなかった.

SERCA: Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase, GAPDH: Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase, LV: Left Ventricle, RV: Right Ventricle, MCT: Monocrotaline.



Fig. 5. Quantification of NCX mRNA. Ca 低下速度を規定している NCX の mRNA を測定した.上段にノーザンブロッティング,下段に T 検定を示したが,LV, RV ともに有意差を認めなかった.

NCX:Na-Ca Exchanger, GAPDH: Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase, LV: Left Ventricle, RV: Right Ventricle, MCT: Monocrotaline. 様の傾向を示した. For 投与群では逆にShamラット と比較してMCTラットでより高い反応性を認めた. い ずれも低濃度では反応性に相違が生じているが高濃 度ではほぼ同程度の反応性を示した. Mil 投与群の LV[amplitude]はShamラットに対してMCTラットで 反応性が低いものの,逆にLV[dCadt],[amp/tau]は Shamラット比較してMCTラットで反応性が高くなっ ている傾向を示した.

Iso, For投与群のRV[amplitude]ではShamラット, MCTラットに明らかな反応性の違いは認めず,



Fig. 6. LV における Ca トランジェントの典型像である. 縦軸が [Ca²⁺]_i で, 横軸が時間で あり, 上段に sham, 下段に MCT を示す.

LV: Left Ventricle, Iso: Isoproterenol, For: Forskolin, Mir: Milrinone.



Fig. 7. RV における Ca トランジェントの典型像である. 縦軸が [Ca²⁺]_i で,横軸が時間であり,上段に sham,下段に MCT を示す. RV: right ventricle, Leo: Jeopretarenel, For: Forskelin, Mir: Milrinene

RV: right ventricle, Iso: Isoproterenol, For: Forskolin, Mir: Milrinone.

RV[dCadt], [amp/tau]に関しては有意差を認めない もののいずれも低濃度ではShamと比較してMCTの反 応性が低かった. Mil 投与群に関してはLVと同様の反 応性を示した.

薬物に対する反応性に関しては、薬剤投与前の時点 でLV[Ca²⁺]_iの上昇を認めるため、解釈は難しいが、以 上の所見を認めるため、ピーク時においてFig. 2と同 様に縦軸に[amp/tau]、横軸に[systol]をプロットし、 フィットを行った (Fig. 11). いずれもよくフィットし ていた. Iso, For投与群のLV, RVともにShamラット と比較してMCTラットで[systol]に対する[amp/tau] がより小さく、傾きが緩やかであり、Ca低下速度が 低下していることが考えられた. Mil 投与群に関して



Fig. 8. amplitude の濃度変化時の推移をグラフに示す.縦軸は [amplitude] の値であり, log 表示とした. LV: Left Ventricle, RV: Right Ventricle, Iso: Isoproterenol, For: Forskolin, Mir: Milrinone, MCT: Monocrotaline.



Fig. 9. dCadt の濃度変化時の推移をグラフに示す. 縦軸は [dCadt] の値であり, log 表示とした.

LV: Left Ventricle, RV: Right Ventricle, Iso: Isoproterenol, For: Forskolin, Mir: Milrinone, MCT: Monocrotaline.

はLV, RVともにShamラット, MCTラットで明らか な違いは認めなかった.

(5)BNPとの関係(Fig. 12, Fig. 13)

ここで心不全の重症度や予後と相関することが知ら れているBNP²⁰⁻²²⁾と、収縮能 [systol], 弛緩能 [amp/ tau]との関係を検討した (Fig. 12, Fig. 13). 縦軸にFig. 3で示した [systol] と [amp/tau] の傾き、横軸に BNPを プロットし、相関の有無を検討したが、両者の明らか な相関は認めなかった (Fig. 12).

また, Fig. 11で示した薬剤投与後のピーク時の [systol]と[amp/tau]の傾きはIso, For, Mil投与群のい ずれにおいても, LV, RVともに相関関係を認めな かった. (Fig. 13).



Fig. 10. amp/tau の濃度変化時の推移をグラフに示す.縦軸は [amp/tau] の値であり, log 表示とした. LV: Left Ventricle, RV: Right Ventricle, Iso: Isoproterenol, For: Forskolin, Mir: Milrinone, MCT: Monocrotaline.



Fig. 11. Relationship between systolic $[Ca^{2+}]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$ decline speed (-amp/tau) after drug treatment. 薬剤投与後の ピーク時において Fig. 2 と同様に縦軸に [amp/tau], 横軸に [systol] をプロットし、フィットを行った.

LV: Left Ventricle, RV: Right Ventricle, MCT: Monocrotaline.

考察

薬物を投与しない状況下ではSham ラットと比較し てMCTラットで,RVと比較してLVで $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を 認め, [dCadt], [amp/tau]の上昇もみられたが,弛緩能の指標となる <math>[dCadt], $[amp/tau] は <math>[Ca^{2+}]_i$ に影響を 受けるため, $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がみられない安静時 (rest) の状態での弛緩能を評価したところ,LVでは変化を 認めないものの,RVで弛緩能が低下していることが 示唆された.



Fig. 12. Relationship between [BNP] and normalized [Ca²⁺]_i activated decline (-amp/tau/systolic [Ca²⁺]_i) in MCT rats. Fig. 3 で示した [systol] と [amp/tau] の傾きを縦軸に, BNP を横軸にプロットしたが,明らかな相関は見られなかった. LV: Left Ventricle, RV: Right Ventricle, MCT: Monocrotaline, BNP:Brain Natriuretic Peptides.



Fig. 13. Relationship between [BNP] and normalized [Ca²⁺]_i PKA activated decline (-amp/tau/systolic [Ca²⁺]_i) in MCT rats. Fig. 11 で示した薬剤投与後のピーク時の [systol] と [amp/ tau] の傾きを縦軸に, BNPを横軸にプロットしたが, 明ら かな相関は見られなかった.

LV: Left Ventricle, RV: Right Ventricle, MCT: Monocrotaline, BNP:Brain Natriuretic Peptides.

薬物投与時の反応性に関しては、薬物投与前の [Ca²⁺]_iがLVでより高いことより解釈が難しいが、薬物 に対する反応性が同じであればpeak Caと[amp/tau] との関係も同様であると考えられる. Iso, For 投与群 のLV, RVにおいて, Shamラットと比較してMCTラッ トでは[systol]に対する[amp/tau]がより小さかった. 心不全では過リン酸化状態であり、PKA活性化をして もpositive lusitrophicは得にくかった.

Caハンドリングに関わる蛋白にはSERCA, NCX, RyR, ホスホランバンなどが知られており, SERCA はSERCA1a, 1b, 2a, 2b, 3の5つのアイソフォーム が存在し,心筋に発現しているのはSERCA2aである. また, NCXにはNCX1, 2, 3の3つのアイソフォーム があり,心筋にはNCX1が発現している.不全心筋細 胞ではSERCAの発現・機能低下^{23, 24}, NCX発現・機 能亢進が生じていると動物実験やヒト心臓²⁵⁻²⁷⁾で報告 されている.

SERCAの機能低下としてはSERCA機能の抑制を 行っているホスホランバンの関与が考えられている. 心不全時にホスホランバンの蛋白発現は低下してお らず,リン酸化低下によるSERCA活性低下があると の報告が多い²⁸⁾. NCX機能亢進²⁹⁾に関してはSERCA 機能の低下を補うためとの報告もあるが,NCXよる Caハンドリングは複雑な機構が関与しており,さま ざま研究が行われている.本研究ではSERCA,NCX のmRNAはともにShamラット,MCTラット間,LV, RV間で有意差を認めなかったが,MCTラットでは 明らかに[Ca²⁺]_iの上昇を認めており,RVだけでな く,LVにおいてもSERCA,NCXの機能障害が示唆さ れた.これにtranscriptionやtranslationの制御が変化し ているというよりはタンパクリン酸化レベルでの変化 の寄与が大きいことを示唆している.

結論

本研究結果からモノクロタリン心不全モデルにお けるCaハンドリングの変化は、上昇したCaハンド リングの遺伝子発現の変化だけでは説明できず、むし ろ神経体液性因子や機械的ストレスによって特異的に 細胞内シグナリングにおける変化から生じた可能性が あることが示唆された.

Caハンドリングにおける蛋白への治療が注目され ているが,蛋白発現だけでなく,リン酸化等の活性経 路も治療の標的として重要であると考えられる.

謝 辞

稿を終えるにあたり,ご指導ご校閲を賜りました 埼玉医科大学循環器内科学教室 西村重敬教授,同 河本修身助教授,埼玉医科大学非常勤講師 八尾厚史 (東京大学循環器内科 助手)の御厚意に深く感謝いた します. この内容の一部は第9回日本心不全学会(2005年 山口)において発表した.

引用文献

- Callewaert G. Excitation-contraction coupling in mammalian cardiac cells. Cardiovasc. Res. 1992;26: 923-32.
- Barry WH, Bridge JHB. Intracellular calcium homeostasis in cardiac myocytes. Circulation 1993; 87:1806-15.
- Alexandre F. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am. J. Physiol. 1983;245:C1-C14.
- Sham JSK, Cleeman L, Morad M. Gating of the cardiac Ca²⁺ release channel: The role of Na⁺ current and Na⁺-Ca²⁺ exchange. Science. 1992; 255: 850-3.
- Barry WH, Hasin Y, and Smith TW. Sodium Pump Inhibition, Enhanced calcium influx via sodiumcalcium exchange, and positive inotropic response in cultured heart cells. Circ. Res. 1985;56:231-41.
- Bers DM. Mechanisms Contributing to the Cardiac Inotropic Effect of Na pump inhibition and reduction of extracellular Na. J. Gen. Physiol. 1987;90:479-504.
- Smith HJ, Nuttall A. Experimental models of heart failure. Cardiovasc. Res. 1985;19:181-6.
- Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. Cardiovasc. Res. 1998;39:89-105.
- Fan D, Wannenburg T, de Tombe PP. Decreased Myocyte Tension development and calcium responsiveness in rat right ventricular pressure overload. Circulation 1997;95:2312-7.
- 10) Brown LA, Nunez DJ, Brookes CIO, Wilkins MR. Selective increase in endothelin-1 and endothelin a receptor subtype in the hypertrophied myocardium of the aorto-venacaval fistula rat. Cardiovasc. Res. 1995;29:768-74.
- 11)O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF, Kääb S, Tunin R, Marbán E. Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardiainduced heart failure, I experimental studies. Circ. Res. 1999;84:562-70.
- 12)Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. Am. J. Physiol. 1980;239: H692-H702.
- 13)Werchan PM, Summer WR, Gerdes AM, McDonough KH. Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. Am. J. Pysiol. 1989;256;H1328-36.

- 14) Brunner F. Cardiac endothelin and big endothelin in right-heart hypertrophy due to monocrotalineinduced pulmonary hypertension in rat. Cardiovasc. Res. 1999;44:197-206.
- 15) Brunner F, Wölkart G, and Haleen S. Defective intracellular calcium handling in monocrotalineinduced right ventricular hypertrophy:protective effect of long-term endothelin-A receptoer blockade with 2-benzo[1, 3]dioxol-5-yl-3-bensyl-4(4-methoxyphenyl-)-4-oxobut-2-enoate-sodium(PD 155080). JPET 2002;300:442-9.
- 16) Chen L, Gan XT, Haist JV, Feng Q, Lu X, Chakarabarti S, et al. Attenuation of compensatory right ventricular hyphertrophy and heart failure following monocrotaline-induced pulmonary vascular injury by the Na⁺-H⁺ exchange inhibitor cariporide. JPET 2001;298:469-76.
- 17) 堀田ゆりか. モノクロタリン心不全モデルにおける レニン-アンギオテンシン系遮断の効果. Thesis 投稿中.
- 18) Yao A, Su A, Nonaka A, Zubair I, Lu L, Philipson KD, et al. Effects of overeexpression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanter on [Ca²⁺]_i transients in murine ventricular myocytes. Circ. Res. 1998;82:657-65.
- 19) Kohmoto O, Ikenouchi H, Hirata Y, Momomura S, Serizawa T, Barry WH. Variable effects of endothelin-1 on [Ca²⁺]_i transients, pHi, and contraction in ventricular myocytes. Am. J. Physiol. 1993;265:H793-H800.
- 20)Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. Nature. 1988;332:78-81.
- 21) McDonagh T.A, Robb S.D, Murdoch D.R, Morton JJ, Ford I, Morrison CE, et al. Biochemical detection of left-ventricular systolic dysfunction. Lancet. 1998; 351:9-13.
- 22) Wallén T, Landahl S, Hedner T, Nakao K, Saito Y. Brain natriuretic peptide predicts mortality in the elderly. Heart. 1997;77:264-7.
- 23) LekanneDeprez RH, van den Hoff MJB, de Boer PAJ, Ruijter JM, Maas AAW, Chamuleau RAFM, et al. Changing patterns of gene expression in the pulmonary trunk-banded rat heart. J Mol Cell Cardiol. 1998;30:1877-88.
- 24) Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, DiSalvo TS, Kang ZB, Matsui T, et al. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aorticbanded rats in transition to heart failure. PNAS. 2000;97:793-8.
- 25) Mercadier JJ, Lompré AM, Duc P, Boheler KR,

Fraysse JB, Wisnewsky C, et al. Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. J. Clin. Invest. 1990;85:305-9.

- 26)Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Böhm M, Hasenfuß G, et al. Gene expression of cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure. Circ. Res. 1994;75:443-53.
- 27) Markus M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, et al. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. Circulation 1995;92:778-84.

© 2007 The Medical Society of Saitama Medical University

- 28)Schmidt U, Hajjar RJ, Kim CS, Lebeche D, Doye AA, and Gwathmey JK. Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca²⁺-ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. Am. J. Physiol. 1999;277:H474-80.
- 29)Markus F, Robert HGS, Frank S, Konrad F, Michael S, Ferdinand KR, et al. Congestive heart failure/valvular hear disease/tranplantation: evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na⁺-Ca²⁺exchanger in failing human myocardium. Circulation 1996;94:992-1002.

http://www.saitama-med.ac.jp/jsms/