

学位論文題名

肥大型および拡張型心筋症ハムスターの $\alpha 1$ 受容体および

Angiotensin II受容体刺激に対する

心筋電気生理学的・力学的反応特性

—心筋症ハムスター心室筋の電気薬理学的解析—

学位論文内容の要旨

I. 研究目的

遺伝的心筋症ハムスター BIO14.6および BIO53.58は、各々ヒトの肥大型心筋症および拡張型心筋症のモデル動物として広く用いられている。

一般に心筋症の病態の成立、進展に catecholamine や angiotensin II (Ang II) などの神経液性因子が重要な役割を演じていると推測されている。中でも、アドレナリン作動性 $\alpha 1$ 受容体および Ang II 受容体刺激は心筋細胞の肥大や細胞内カルシウム過負荷による心筋細胞障害を惹起している可能性がある。一方、両受容体刺激とも心室筋に対して陽性変力作用を有していることから、心筋症における心機能障害の成立・進展要因としてばかりでなく、心機能低下に対する代償機転としての役割も注目されている。従って、心筋症モデル動物においてこれらの神経液性因子に対する反応性を検討することは、それらの病態生理を理解する上で重要と考えられる。

そこで、本研究は2つの異なった心筋症モデルハムスター(BIO14.6と BIO53.58)において、心室筋の $\alpha 1$ 受容体および Ang II 受容体刺激時に生じる活動電位変化が、正常ハムスターのそれとどのように異なるかを明らかにし、遺伝的心筋症における病態の特性、進展様式との関連性を検討することを目的におこなった。

II. 実験方法

1. 実験動物

14~20週齢の BIO14.6, BIO53.58および正常対照群として、同一の週齢の F1 β ハムスターを用いた。

2. 摘出乳頭筋標本を用いた実験

常法によりハムスター左心室から乳頭筋を摘出し灌流槽に置いた。一端を張力トランスデューサーに連結して、乳頭筋標本の発生張力 (DT) を測定しながら、微小電極を刺入し細胞内電位を記録した。標本は0.5Hzの電気刺激により駆動した。灌流液には modified Tyrode 液 (組成 (mM): NaCl 125; KCl 4.0; CaCl₂ 2.7; MgCl₂ 0.5; NaH₂PO₄ 1.8; NaHCO₃ 25; glucose 5.6, pH 7.4) を95% O₂ + 5% CO₂ の混合ガスで酸素化して用いた。温度を30.0 ± 1.0°Cに維持し、10 ml/min の流速で表面灌流した。

3. 単一心室筋細胞を用いた実験

コラゲナーゼ (0.01% wt/Vol., 和光純薬) を含んだ無 Ca²⁺ HEPES 緩衝 Tyrode 液で Langendorff の方法に準じて摘出心臓を灌流した後、心臓を細切して単一心室筋細胞を分離した。分離した細胞は高カリウム、低クロール、無カルシウム液中に懸濁させて4°Cで保存し、実験に供した。膜電位固定は、KOH 110; KCl 20; MgCl₂ 1.0, K₂-ATP 5; K₂-creatine phosphate 5; aspartic acid 90~100; EGTA 10 mM (pCa 8, pH 7.4) を含んだパッチ電極を用いておこなった。用いた HEPES 緩衝 Tyrode 液は、NaCl 143; KCl 5.4; CaCl₂ 1.8; MgCl₂ 0.5; NaH₂PO₄ 0.3; HEPES-NaOH buffer (pH 7.4) 5.5; glucose 5.6 mM を含んでいる。

III. 実験結果

14~20週齢の BIO 14.6, BIO 53.58の体重は同週齢の F1βより有意に低値であった。心重量/体重比は BIO 14.6で有意に高値であり、肉眼的にも心室壁の肥厚を認めた。薬物投与前の活動電位では、BIO 14.6の90%再分極時間 (APD₉₀)、50%再分極時間 (APD₅₀) が共に、F1βに比して有意に短縮していた。薬物投与前に発生張力およびその乳頭筋断面積による標準化値は、BIO 14.6と BIO 53.58のいずれにおいても F1βよりも低値であった。

β遮断薬 (propranolol, 1 μM) 存在下で phenylephrine (PHE) は、濃度依存性に活動電位持続時間 APD を延長し、陽性変力反応をもたらした。APD₂₀ の延長率は3群間に差が認められなかったが、APD₉₀ の延長率は、PHE 30 μMにおいて BIO 14.6で56.8 ± 13.2% (M ± SEM, n = 6) と、F1βの10.5 ± 4.0% (n = 6) に比べて有意に亢進していた。さらに、BIO 14.6では陽性変力反応も、PHE 3 μM, 30 μMで、F1βに比して有意に亢進していた。これに対して BIO 53.58では APD₉₀ 延長反応、陽性変力反応とも F1βとはほぼ同等であった。

α遮断薬 (prazosin, 1 μM) および β遮断薬 (propranolol, 1 μM) 存在下で Ang II は、

濃度依存性に活動電位持続時間 APD を延長し、陽性変力反応をもたらした。APD₂₀ の延長率は 3 群間に差が認められなかった。しかし、APD₉₀ の延長率は、BIO 14.6, BIO 53.58 とともに F 1 β に比べて低い傾向にあり、陽性変力反応は Ang II 0.1 μ M, 1 μ M において、BIO 14.6 では 18.4 \pm 6.9%, 24.7 \pm 11.0% (n=6) と、F 1 β の各々 48.2 \pm 7.7%, 53.8 \pm 8.5% (n=6) に比べて、 α 1 刺激の場合とは逆に、有意に低下していた。BIO 53.58 の陽性変力反応も、Ang II 0.1 μ M で 24.8 \pm 3.4%, 1 μ M で 33.5 \pm 5.5% (n=6) と、F 1 β に比べて有意に低下していた。

BIO 14.6 および F 1 β より得た単一心室筋細胞における膜電位固定法による実験で、propranolol 存在下で PHE は一過性外向き電流 (I_{to}) と内向き整流カリウム電流 (I_{K1}) を抑制したが、 I_{to} の抑制度は両ハムスター間に差がなかった。(PHE 30 μ M; BIO 14.6 vs. F 1 β , 16.5 \pm 4.1% (n=9) vs. 17.5 \pm 4.3% (n=7))。しかし、PHE による I_{K1} 抑制作用は BIO 14.6 で有意に増強 (PHE 30 μ M; BIO 14.6 vs. F 1 β , 44.4 \pm 13.3% (n=5) vs. 1.3 \pm 1.9% (n=4) しており、BIO 14.6 の α 1 の受容体刺激による APD 延長反応の亢進には、この I_{K1} 抑制作用の増強が関与することが示唆された。

IV. 考 察

本研究において、肥大型心筋症モデルである BIO14.6 と拡張型心筋症モデルである BIO53.58 を用い、心筋症の発症ならびに進展に関連がある α 1 受容体および Ang II 受容体を刺激した際の心筋の電気生理学的・力学的反応特性を明らかにした。

α 1 受容体刺激は、電気生理学的に活動電位持続時間 (APD) を延長させて、陽性変力作用発現に寄与するとされている。本研究において、BIO14.6 における α 1 受容体刺激に対する陽性変力反応の亢進は APD 延長反応の増強を伴って生じていることが明らかとなった。すなわち、APD のより大きな延長によってプラトー相に流入するカルシウムイオン量が対照群に比べて多くなり、そのためより強い陽性変力反応が生じたものとも考えられる。このような細胞内カルシウム過負荷は、代償機能として収縮力を増強する反面、心筋症ハムスター心筋に生じる細胞障害の原因となっている可能性もある。これに対して、拡張型心筋症モデルの BIO 53.58 においては α 1 受容体を介する APD 延長反応、陽性変力反応が対照群と変わらなかったことは興味深い。

BIO 14.6 に認められた α 1 受容体刺激時の APD 延長反応亢進の膜電流レベルにおける機序としては、一過性外向き電流 (I_{to}) もしくは内向き整流カリウム電流 (I_{K1}) の抑制度の差に由来する可能性がある。しかし、本研究において、前者の抑制度は BIO 14.6 と F 1 β で差がない

のに対し、後者は $F1\beta$ に比べて BIO14.6 でより強く抑制されたことから、 I_{K1} 抑制度の差が BIO 14.6 における APD 延長反応亢進の膜電流レベルにおける機序として関与しているものと考えられた。

一方、Ang II による心筋細胞活動電位の変化については今まで十分検討されていないが、本研究は Ang II 受容体刺激によっても APD が延長することを明らかにした。Ang II 受容体刺激による APD 延長や陽性変力反応が、 $F1\beta$ に比べて BIO 14.6, BIO 53.58 において低下していることも明らかとなり、両モデルにおける心収縮低下および心不全への進展に少なくとも一部寄与するものと考えられた。そのイオン電流機序は今後の研究課題である。

BIO 14.6 では $F1\beta$ に比べて、 $\alpha 1$ 受容体刺激に対する反応性は亢進していたが、Ang II 受容体刺激に対する反応性は低下していた。両受容体がどちらもイノシトールリン脂質代謝回転を細胞内情報伝達系の最終共通経路としていることを考慮すると、受容体数が高値となっている $\alpha 1$ 受容体とは反対に、Ang II 受容体数が今回検討した BIO 14.6 において低下しているか、あるいは受容体と G 蛋白、phospholipase C との共役が障害されているとも考えられた。BIO 14.6 にみられた $\alpha 1$ 受容体刺激に対する反応性の亢進が BIO 53.58 で認められなかったことは、BIO 53.58 では心肥大が生じないという BIO 14.6 との病態経路の違いを説明できるものかもしれない。

今後、肥大型および拡張型心筋症モデルハムスターでの実験成績がヒトの心筋症にもあてはまるか否か、臨床的な検討も必要であると思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕
副 査 教 授 古 舘 正 従
副 査 教 授 小 山 富 康

遺伝的心筋症ハムスター BIO 14.6 および BIO 53.58 は、各々ヒトの肥大型心筋症および拡張型心筋症のモデル動物として広く用いられている。一般に心筋症の病態の成立、進展に catecholamine や angiotensin II (Ang II) などの神経液性因子が重要な役割を演じていると推測されている。中でも、アドレナリン作動性 $\alpha 1$ 受容体および Ang II 受容体刺激は心筋細胞の肥

大や細胞内カルシウム過負荷による心筋細胞障害を惹起している可能性がある一方で、両受容体刺激とも心室筋に対して陽性変力作用を有していることから、心筋症における心機能障害の成立・進展要因としてばかりでなく、心機能低下に対する代償機転としての役割も注目されている。そこで、本研究は2つの異なった心筋症モデルハムスター（BIO 14.6とBIO 53.58）において、心室筋の α_1 受容体およびAng II受容体刺激時に生じる活動電位変化が、正常ハムスターのそれとどのように異なるかを明らかにし、遺伝的心筋症における病態の特性、進展様式との関連性を検討することを目的におこなった。

実験材料として、14~20週齢のBIO 14.6、BIO 53.58および正常対照群として、同一週齢のF1 β ハムスターを用いて次の実験をおこなった。① 摘出した左室乳頭筋に対し、微小電極法および圧トランスデューサーを用いて、各々活動電位および等尺性張力を同時記録し、phenylephrini (PHE) もしくはAng IIを投与した際の変化を観察した。② コラゲナーゼにより単離した単一心室筋細胞に対し、パッチクランプ法を用いて膜電流を記録し、薬剤投与前後での変化を観察した。

PHEは濃度依存性に活動電位持続時間APDを延長し、陽性変力反応をもたらしたが、BIO 14.6における90%再分極時間APD₉₀の延長反応および陽性変力反応はF1 β に比べて有意に亢進していた。一方、BIO 53.58のAPD₉₀延長反応、陽性変力反応はF1 β とほぼ同等であった。PHEは一過性外向き電流(I_{to})と内向き整流カリウム電流(I_{K1})を抑制したが、 I_{to} の抑制度はBIO 14.6とF1 β の間で差がなかったのに対し、 I_{K1} 抑制作用はBIO 14.6で有意に増強しており、BIO 14.6の α_1 受容体刺激によるAPD延長反応の亢進には、この I_{K1} 抑制作用の増強が関与することが示唆された。

Ang IIもまた濃度依存性にAPDを延長し、陽性変力反応をもたらしたが、BIO 14.6、BIO 53.58におけるAPD₉₀延長反応、陽性変力反応はF1 β に比べて低下していた。Ang IIはカルシウム電流(I_{Ca})を増加させ I_{Ca} を抑制したが、 I_{Ca} の増加反応はBIO 14.6において減弱しており、APD延長反応低下の膜電流機序であると考えられた。

以上の結果より、BIO 14.6では α_1 受容体刺激に対する反応は亢進しているが、Ang II受容体刺激に対する反応は低下していること、一方、BIO 53.58では α_1 受容体刺激に対する反応は対照群と同等であるが、Ang II受容体刺激に対する反応は低下していることが明らかになった。また、これら反応性の相違が、両モデルにおける病態の特性・進展様式と関連性を有することが示された。

試問にあたり古館教授より①ハムスターHCMとヒトHCM病型との対応、②心室各所での

反応の均一性, ③ヒト HCM で認められる脂肪酸代謝の低下が電流系の変化により説明し得るか否か, に関して, また小山教授より①ハムスター心筋症の遺伝的欠失およびそのヒト HCM 遺伝子との関連性, ②Ang II 受容体密度の変動についての質問がなされた。これに対し申請者は概ね妥当な回答を行った。その後行われた古舘・小山両副査教授との試問においても, 概ね適切な回答がなされた。

本研究は, 2系の心筋症ハムスター心室筋の α_1 受容体および Ang II 受容体刺激に対する反応性を電気薬理的に解析した最初の報告であり, 学位論文として価値を認めるものである。