

学 位 論 文 題 名

Histamine H1-receptor-mediated increase in the Ca^{2+} + transient without a change in the Ca^{2+} + current in electrically stimulated guinea pig atrial myocytes

(モルモット単離心房筋細胞を用いたヒスタミンH1-受容体刺激による細胞内 Ca^{2+} 動態と膜電流の変化における検討)

学位論文内容の要旨

多くの哺乳動物の心臓において、histamine は心筋収縮力増強作用を示す事が知られているが、その作用を介する histamine 受容体サブタイプには種差がみられ、また心筋の部位によっても違いが認められている。モルモットにおいては、histamine の陽性変力作用は、心室筋においては主に H2-受容体が関与するが、心房筋においては H1-受容体のみを介して惹起される。

H2-受容体刺激による陽性変力作用は、 β -受容体刺激の場合と同様に adenylate cyclase の活性化により生じた細胞内 cyclic AMP の増加によって、L 型 Ca^{2+} チャネルがリン酸化され細胞内への Ca^{2+} 流入が増加し、また筋小胞体の phospholamban のリン酸化の結果、筋小胞体への Ca^{2+} 取り込み増加による Ca^{2+} 放出量の増加を引き起こすことが、その作用機序とされている。一方、H1-受容体を介した陽性変力作用に関与している細胞内情報伝達機構については、未だに解明されておらず、心房筋細胞内で H1-受容体刺激によってイノシトールリン酸化代謝回転が亢進することや、cyclic GMP 産生量が増加することが知られているが、これまでの報告では、これらの機構では、その陽性変力作用を説明できないとされている。モルモット左心房標本においては、histamine の陽性変力作用は、活動電位幅の延長を伴うこと、そして持続的な心筋力増加が dihydropyridine Ca^{2+} チャネル拮抗薬によって消失することから、H1-受容体刺激による陽性変力作用の発現には、活動電位幅延長作用の結果として、 Ca^{2+} チャネルより流入する Ca^{2+} 量の増加が関与すると推測された。

本研究では histamine H1-受容体を介する心筋の陽性変力作用を、より詳細に解明すべく、モルモット単離心房筋細胞を用いて、細胞内カルシウム動態を示す Ca^{2+} トランジェントおよび膜電流の変化を検討した。

モルモットの心臓を摘出し、Langendorff 装置にて灌流し、collagenase 処置により、心房筋から単離細胞を得た。単離した心房筋細胞に Indo-1/AM を負荷し、一波長励起二波長測光での蛍光強度比を測定して細胞内 Ca^{2+} 濃度を算出した。ま

たパッチクランプ法を用いて活動電位、膜電流を測定した。

モルモット単離心房筋細胞を 0.5Hz で電氣的に駆動した時、histamine 及び isoproterenol は、濃度依存性に Ca^{2+} トランジェントを増加した。しかしながら、histamine により引き起こされる Ca^{2+} トランジェントの増加は、isoproterenol のその約 50% に満たなかった。histamine により引き起こされる Ca^{2+} トランジェントの増加は、histamine H1-受容体拮抗薬である chlorpheniramine では有意に抑制されたが、H2-受容体拮抗薬である cimetidine では影響されなかった。このことは、histamine の Ca^{2+} トランジェントの増強作用は、H1-受容体を介していることが示唆された。

L 型 Ca^{2+} チャネル拮抗薬である nifedipine を前処置すると、この histamine により惹起される Ca^{2+} トランジェントの増加は、ほぼ完全に消失した。筋小胞体 Ca^{2+} ATPase 阻害薬である cyclopiazonic acid での前処置では、histamine の作用には影響を及ぼさなかった。すなわち、H1-受容体刺激による心筋細胞の Ca^{2+} トランジェントの増加は、筋小胞体に蓄積された Ca^{2+} の放出によるものではなく、細胞外からの Ca^{2+} 流入によるものであることが示唆された。

パッチクランプ法における電流固定法を用いて電気刺激を与えた際の活動電位波形をみると、histamine と isoproterenol は両者とも、心房筋細胞において活動電位幅を延長した。 Co^{2+} あるいは nifedipine 存在下で Ca^{2+} 電流を消失させて活動電位の変化を観察すると、isoproterenol による活動電位幅の延長効果は認められず、むしろ活動電位幅短縮作用が認められた。しかしながら、histamine では活動電位幅延長作用はこのような状況下でも認められた。また histamine による活動電位幅の延長作用は、chlorpheniramine により消失した。すなわち、histamine は H1-受容体を介して、活動電位幅を延長するが、その延長作用は L 型 Ca^{2+} チャネルの活性化によるものではないと考えられる。

電位固定法においては、細胞外の K^{+} イオンを Cs^{+} イオンに置換し、-40 mV から -10 mV の脱分極刺激を与え、L 型 Ca^{2+} 電流のみを単離してみると、isoproterenol では著明な増強効果をもたらしたが、histamine では有意な効果を示さなかった。

さらにランプ・パルス法により、histamine 感受性の電流の特性を検討したところ、内向整流性電流であり、その逆転電位は K^{+} の平衡電位の極めて近似していた。このことから、histamine は L 型 Ca^{2+} 電流を増強させることによるのではなく、 K^{+} 電流を抑制することにより活動電位を延長させることが明らかになった。

以上の結果から、モルモット心房筋細胞においては、histamine は H1-受容体を介して、外向 K^{+} 電流を抑制することにより活動電位幅を延長させ、その結果として L 型 Ca^{2+} チャネルを介して流入する Ca^{2+} 量が増加することで、細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させるものと結論される。この細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が H1-受容体刺激による心筋収縮力増加に関与するものであろうと推測される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顯
副 査 教 授 菅 野 盛 夫
副 査 教 授 安 田 慶 秀

学 位 論 文 題 名

Histamine H1-receptor-mediated increase in the Ca^{2+} + transient without a change in the Ca^{2+} + current in electrically stimulated guinea pig atrial myocytes

(モルモット単離心房筋細胞を用いたヒスタミンH1-受容体刺激による細胞内 Ca^{2+} 動態と膜電流の変化における検討)

多くの哺乳動物の心臓において、histamineは心筋収縮力増強作用を示す事が知られているが、その作用を介するhistamine受容体サブタイプには種差がみられ、また心筋の部位によっても違いが認められている。モルモットにおいては、histamineの陽性変力作用は心室筋においては主にH2-受容体が関与するが、心房筋においてはH1-受容体のみを介して惹起される。H2-受容体刺激による陽性変力作用は、その作用機序がほぼ解明されている。一方、H1-受容体を介した陽性変力作用に関与している細胞内情報伝達機構については、未だに解明されていない。

本研究の目的はhistamine H1-受容体を介する心筋の陽性変力作用を、より詳細に解明することであり、モルモット単離心房筋細胞を用いて細胞内カルシウム動態を示す Ca^{2+} トランジェントおよび膜電流の変化を検討した。

実験方法は、モルモットの心臓をLangendorff装置にて灌流しcollagenase処置して心房筋から得られた単離細胞を用いた。単離した心房筋細胞にIndo-1/AMを負荷し、一波長励起二波長測光での蛍光強度比を測定して細胞内 Ca^{2+} 濃度を算出し、またパッチクランプ法を用いて活動電位、膜電流を測定した。

結果：モルモット単離心房筋細胞を0.5Hzで電氣的に駆動した時、histamine及びisoproterenolは、濃度依存性に Ca^{2+} トランジェントを増加した。しかし、histamineにより引き起こされる Ca^{2+} トランジェントの増加は、isoproterenolのその約50%に満たなかった。histamineにより引き起こされる Ca^{2+} トランジェントの増加は、histamine H1-受容体拮抗薬であるchlorpheniramineでは有意に抑制されたが、H2-受容体拮抗薬であるcimetidineでは影響されなかった。このことはhistamineの Ca^{2+} トランジェントの増強作用がH1-受容体を介していることを示唆するものであった。

L型Ca²⁺チャネル拮抗薬であるnifedipineで前処置すると、histamineにより惹起されるCa²⁺トランジェントの増加は、ほぼ完全に消失した。筋小胞体Ca²⁺ ATPase阻害薬であるcyclopiazonic acidでの前処置では、histamineの作用には影響を及ぼさなかった。すなわち、H₁-受容体刺激による心筋細胞のCa²⁺トランジェントの増加は、筋小胞体に蓄積されたCa²⁺の放出によるものではなく、細胞外からのCa²⁺流入によるものであることが示唆された。

パッチクランプ法における電流固定法を用いて電気刺激を与えた際の活動電位波形への検討では、histamineとisoproterenolは両者とも心房筋細胞の活動電位幅を延長した。Co²⁺あるいはnifedipine存在下でCa²⁺電流を消失させて活動電位の変化を観察すると、isoproterenolによる活動電位幅の延長効果はみられず、むしろ活動電位幅短縮作用が認められた。しかし、histamineでは活動電位幅延長作用はこのような状況下でも認められた。またhistamineによる活動電位幅の延長作用は、chlorpheniramineにより消失した。すなわち、histamineはH₁-受容体を介して活動電位幅を延長するが、その延長作用はL型Ca²⁺チャネルの活性化によるものではないと考えられた。

電位固定法で細胞外のK⁺イオンをCs⁺イオンに置換し、-40mVから-10mVの脱分極刺激を与えL型Ca²⁺電流のみを単離すると、isoproterenolでは著明な増強効果をもたらしたが、histamineでは有意な効果を示さなかった。ランプ・パルス法により、histamine感受性の電流の特性の検討では、内向整流性電流となっており、その逆転電位はK⁺の平衡電位の極めて近似していた。このことから、histamineが活動電位を延長させる機序はL型Ca²⁺電流を増強させることによるのではなく、K⁺電流を抑制することによりことが明らかになった。

以上の結果から、モルモット心房筋細胞においては、histamineはH₁-受容体を介して、外向K⁺電流を抑制することにより活動電位幅を延長させ、その結果としてL型Ca²⁺チャネルを介して流入するCa²⁺量が増加することで、細胞内Ca²⁺濃度を増加させるものと考察され、この細胞内Ca²⁺濃度の上昇がH₁-受容体刺激による心筋収縮力増加に関与するものであらうと結論した。

学位論文の公開発表に際して、副査の安田教授からはH₁-受容体を介する陽性変力作用を強心剤として臨床的応用の可能性は、他の強心剤との効果の差はどうか、副査の菅野教授からは、ヒト心筋でのH₁-受容体存在の可能性について、またH₁-受容体が収縮力以外の面でK channelを介して心臓に影響を与えている可能性はあるか、循環器内科佐久間博士からは、心房組織でのtwitch tensionの幅がヒスタミン刺激で延びること、Ca²⁺感受性あるいはC-kinaseとの関係はどうか、さらには主査の北畠教授からは今回得られた知見に基づく臨床への具体的な応用、発展性について等の質問があったが、申請者は豊富な実験結果と、蓄積された学識をでもって、誠実に、かつ概ね適切に回答し得た。

ヒスタミンH₁-受容体刺激による細胞内Ca²⁺動態と膜電流の変化を明らかにし、H₁-受容体刺激による心筋収縮力増加の情報伝達系経路を考察した本研究は、臨床においても、開心術における心筋保護や周術期の不整脈治療、新しい強心薬の開発等に、新

たな重要な示唆を設定するものと評価できる。

審査員一同は、申請者の豊富な学識に併せて、本研究が関連領域研究の進展に与える成果を評価し、申請者が博士（医学）を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。