

学位論文題名

Effects of Ca^{2+} Sensitizers on Contraction, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Transient and Myofilament Ca^{2+} Sensitivity in Diabetic Rat Myocardium: Potential Usefulness as Inotropic Agents

(実験的糖尿病ラット心筋におけるカルシウム感受性増強薬の効果：
強心薬としての有用性)

学位論文内容の要旨

【背景】

糖尿病患者では冠動脈疾患がなくとも心不全死が多いことが疫学的研究から明らかにされており、糖尿病そのものによる心筋障害として ‘diabetic cardiomyopathy’ (糖尿病性心筋症) という名称が与えられている。このような糖尿病患者ではカテコラミンに対する反応性が低下していることが報告されており、我々もヒトにおける糖尿病性心筋症のモデルとして有用であるとされる streptozotocin 誘発性糖尿病ラットにおいて、 β -受容体刺激に対する心筋収縮反応性の減弱を報告してきた (Gando et al., *J Pharmacol Exp Ther* 1997; Tamada et al., *Am J Physiol* 1998)。

近年、従来の強心薬であるジギタリスやカテコラミンに代わる心不全治療薬として数多くの Ca^{2+} sensitizers が開発されてきている。本研究では streptozotocin 誘発性糖尿病ラットにおける Ca^{2+} sensitizers (EMD57033、MCI-154、EGIS-9377) の有用性を検討した。

一方、糖尿病病態における心筋細胞では Ca^{2+} 処理機構が損なわれているため (Hattori et al., *J Physiol* 2000)、細胞の弛緩過程に異常がみられる。EMD57033 は心臓の弛緩を遅延させ拡張期張力を上昇させるという問題点が指摘されており、糖尿病心の拡張機能障害をさらに悪化させる可能性がある。そこで、EMD57033 が左室拡張能に及ぼす影響も検討した。

【方法】

1. 実験的糖尿病ラットの作成

8週令の Wistar ラットに streptozotocin 45 mg/kg を尾静脈より静注し、実験的糖尿病ラットを作成した。対照群には streptozotocin の溶媒のみを静注した。

2. Ca^{2+} sensitizers が実験的糖尿病ラットより単離した心筋細胞の Ca^{2+} transient (CaT) 増加率と細胞長短縮率に及ぼす影響

streptozotocin 投与 4~6 週後に、ランゲンドルフ法によりコラゲナーゼ処理にて心室筋細胞を単離し、CaT と細胞長を indo-1 を用いた顕微測光と video edge detector により同時測定した。

3. EMD57033 が実験的糖尿病ラットより摘出した心室肉柱標本のカルシウム感受性に及ぼす影響

対照および糖尿病ラットの心室筋より標本を摘出し、 β -escin で処理してスキンドファイバーを作成し、

EMD57033(10 μ M)を作用させて得られる pCa-tension curve から Ca²⁺感受性の変化を検討した。

4. 実験的糖尿病ラットから摘出した左室乳頭筋における EMD57033 の収縮力増強作用と弛緩時間延長作用

1Hz で電氣的に駆動した左室乳頭筋 (糖尿病作成後、4~6 週、10 週および 25 週で摘出) に EMD57033(10 μ M)を作用させた際の収縮力増強作用と弛緩時間延長の程度を測定した。

5. ベントバルビタール麻酔下のラットにおいて EMD57033 が左室の収縮能、拡張能に及ぼす影響
麻酔下のラットに EMD57033(30mg/kg i.d)を投与した際の左室の %fractional shortening、E Wave Deceleration time、Isovolumetric Relaxation time の変化を心エコーで評価した。

【結果ならびに考察】

Ca²⁺ sensitizer である EMD57033 は濃度依存性に心筋細胞の細胞長短縮率を増加させたが、CaT の増加を伴わなかった。糖尿病群でも、対照群とほぼ同等の収縮力増加作用が認められた。MCI-154 (100 μ M)、EGIS-9377 (300 μ M) も同様に CaT の増加を伴わずに心筋細胞の細胞長短縮率を増加させた。また MCI-154 (100 μ M) と EGIS-9377 (300 μ M) による収縮力増強作用は対照群と糖尿病群で有意差を認めなかった。これに対して、Ca²⁺ sensitizing action と phosphodiesterase III 阻害効果をもつ pimobendan、 β -受容体刺激薬である isoproterenol は収縮力増加作用とともに CaT の増加を惹起したが、両作用とも糖尿病群で有意に低下していた。

スキンドファイバーにおいては、pCa-tension curve は対照群に比較して糖尿病群でわずかに右方移動していたが、有意差はなかった。EMD57033 は pCa-tension curve を有意に左方移動させたが、この Ca²⁺感受性増強効果は対照群・糖尿病群間で違いは認められなかった。

糖尿病作成後、4~6 週、10 週および 25 週で摘出した左室乳頭筋に EMD57033(10 μ M)を作用させた際の収縮力増強作用は、同週令の対照ラットから摘出した乳頭筋のそれと同程度であった。糖尿病乳頭筋では有意な弛緩時間の延長が見られ、それは EMD57033 によってさらに増加したが、EMD57033 非存在下、存在下での弛緩時間は週令によって差はなかった。また EMD57033 による弛緩時間の増加率は 4~6 週では糖尿病群と対照群は同程度であったが、対照群では週令とともに増加する傾向にあった。

麻酔下のラットにおいては、左室収縮機能に対する EMD57033 の効果は 4~6 週の糖尿病ラットと対照ラットで差を見なかった。左室拡張能は糖尿病群で低下していたが、EMD57033 を投与しても左室拡張能を反映するパラメーターを悪化させなかった。

以上の結果から、EMD57033 の適当量では糖尿病心において拡張機能を悪化させずに収縮機能を改善することが期待される。すなわち EMD57033 のような Ca²⁺ sensitizers は、糖尿病患者の心不全時の治療薬として、特に集中治療医学領域においてカテコラミンなどの従来の強心薬よりも有用である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顯
副 査 教 授 劍 物 修
副 査 教 授 丸 藤 哲

学位論文題名

Effects of Ca^{2+} Sensitizers on Contraction, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Transient and Myofilament Ca^{2+} Sensitivity in Diabetic Rat Myocardium: Potential Usefulness as Inotropic Agents

(実験的糖尿病ラット心筋におけるカルシウム感受性増強薬の効果：
強心薬としての有用性)

申請者は実験的糖尿病ラットから単離した心筋細胞において β 受容体刺激薬である isoproterenol と主として PDEIII 阻害作用を有する Pimobendan による反応が減弱しているのに対して、より Ca^{2+} 感受性増強作用の強い EMD57033、MCI-154、EGIS-9377 は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Transient を増加させずに、細胞長短縮率を増加させることを示した。さらにその作用が対照ラットと糖尿病ラットで差を認めないことから、糖尿病性心筋症においては cAMP を介する陽性変力作用は期待できないが、 Ca^{2+} sensitizer による陽性変力作用は十分期待できることを示した。また Ca^{2+} sensitizer はその作用機序から心臓の拡張機能障害を惹起するが、EMD57033 による左室乳頭筋の等尺収縮における弛緩時間延長作用は 50% 弛緩時間の増加率で比較すると対照群と糖尿病群で同程度であり、*In vivo* でも EMD57033 (経口投与) は両群において左室拡張能を示すパラメータを変化させずに左室収縮力を増強させないことから、EMD57033 が糖尿病ラットが本来もつ拡張能障害を悪化させることなく陽性変力作用を発揮することを示した。

口頭発表の後、主査と副査から以下の質問があり、申請者は過去の文献および自分自身の見解に基づいて的確に回答した。会場からの質問はなかった。

1. 糖尿病性心筋症のおこるメカニズムは？
→ 高血糖によるフリーラジカルの産生や PKC の活性化が、遺伝子レベルで心臓の収縮制御タンパクに影響を及ぼしている可能性がある。
2. 3つの Ca^{2+} sensitizer の臨床応用に対する見解は？
→ まだ動物実験の段階で臨床応用には数年かかると思われる。より純粋な Ca^{2+} sensitizer (EMD57033) の臨床応用については特に期待されることである。
3. 糖尿病性心筋症以外の心不全(例えば敗血症)に対して Ca^{2+} sensitizer は有効か？

→敗血症ではGsタンパクの減少が心機能低下の原因とされており、その下流（トロポニンCとCa²⁺の相互作用）に作用点のあるCa²⁺ sensitizerは効果が期待できる。

4. β 受容体を介した情報伝達系において、糖尿病で障害を受けているのはどこか？
cAMPを介さないジギタリスによる陽性変力作用は期待できないのか？

→糖尿病性心筋では、ホスホランバンのリン酸化による筋小胞体のCa²⁺摂取に障害がある。またNa⁺-Ca²⁺交換系にも異常があり、細胞外Ca²⁺濃度が急激に変化した場合には細胞内に流入するCa²⁺を処理しきれなくなりCa²⁺過剰負荷となってしまう。よってジギタリスはその作用機序を考えるとCa²⁺過剰負荷を助長することになる。

5. 糖尿病心筋症において、 β 受容体以外の受容体を介した細胞内情報伝達系に変化はあるのか？

→ α 受容体、ムスカリン受容体、エンドセリン受容体を介する反応は変化していないといわれている。

6. 糖尿病心筋症で拡張機能障害がおこる機序は？

→筋小胞体機能の低下により、拡張期の細胞内Ca²⁺濃度の減衰が障害されて、トロポニンCとCa²⁺の結合が解離しづらくなるのが原因である。

7. Ca²⁺ sensitizerの作用機序は？

→Ca²⁺ sensitizerはトロポニンCとCa²⁺の親和性を増強させたり、アクチンとミオシンのクロスブリッジの回転速度を上げたりして作用を表す。個々の薬剤の作用点に関しては、明確な結論は出ていない。

8. 糖尿病ラットの乳頭筋では弛緩時間の増加が認められたのに、心エコーでは拡張能障害が認められなかったことについての考察は？

→心エコーにおける拡張能を示すパラメータがRR間隔で除したものであることを考慮すると、糖尿病ラットの徐脈傾向が影響を及ぼしている可能性がある。またEMD57033の経口投与による血中濃度の上昇が十分でなかった可能性も否めない。

9. Ca²⁺感受性増強作用をもつ薬物の心不全における臨床試験の成績について

→EMD57033のようなよりCa²⁺感受性増強作用の強い薬物が用いられれば、有効性を示すデータが得られた可能性があると考えている。

本研究は糖尿病性心筋症における心不全治療薬としてCa²⁺ sensitizerが有効である可能性を示唆した点で高く評価された。今後Ca²⁺ sensitizerの生体での有効性についてさらなる検討が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。