

内因性エンドセリン1の心臓虚血再灌流における
ノルエピネフリン放出と不整脈に対する影響：
モルモット摘出心ランゲンドルフ灌流系による検討

学位論文内容の要旨

【背景】心臓虚血再灌流時において、3種類のノルエピネフリン (NE) 放出様式が存在する。比較的長時間の虚血 (10-40 分) における交感神経終末からの NE 放出は、短時間虚血 (10 分以下) と比較し多量の NE 放出を誘発する。しかし、持続的な虚血下では、過度の NE はエキソサイトーシスよりもむしろ、 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 交換体によりコントロール細胞内 Na^+ 濃度に依存する carrier-mediated 放出により生じる。また、以前の報告で虚血再灌流時の NE 放出が VF 持続時間と正の相関性があることが証明されている。従って、過度の NE 放出の減弱は再灌流性不整脈発生を防止できる可能性があると考えられる。

エンドセリン (ET) -1 は、様々な生理学および病態生理学的状况下で多種多様の生理作用を示す血管内皮由来の内因性ペプチドである。この ET-1 は狭心症や心筋梗塞に罹患した患者や、動物実験モデルの虚血再灌流時に増加することが報告されている。また、虚血再灌流時には、ET-1 の結合部位の増加も認められており、ET-1 が心筋細胞上の ETA 受容体に直接作用し再灌流性不整脈を増悪するとも報告されている。これらの報告は ET-1 が再灌流性不整脈の重要な調節因子の一つであることを示唆している。本研究では、心筋虚血再灌流時に内因性 ET-1 が心臓の交感神経節前線維上の $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 交換体と関連する ETA および ETB 受容体を活性化して NE 放出を調節するか否かを検討した。

【方法】ハートレイ系雄性モルモットの摘出心ランゲンドルフ灌流装置 (大動脈圧 30mm Hg、左室拡張終期圧 10 mmHg) により検討した。30 分間の安定化後、虚血前値として 5 分毎に 30 分間、冠灌流液を収集し、20 分間の常温 (37°C) 虚血後 45 分間再灌流を実施した。再灌流開始後 10 分間は 2 分毎に冠灌流液を回収し、その後 5 分毎に 35 分間冠灌流液を回収した。回収した冠灌流液中の NE および ET-1 を各々高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および酵素結合免疫測定法 (ELISA) にて測定、心電図により再灌流後の不整脈 (心室細動: VF) を観察した。各実験終了後、単離した心臓を湿重量として測定した。なお、本研究で使用した薬剤は全て灌流液に投与し、その使用

濃度は既知の報告に従って決定した。

【結果】 20 分間の虚血後の 45 分間の再灌流時に放出された NE 放出量は 177.43 ± 22.58 pmol/g (であり、大部分の NE 放出量は再灌流直後の 2 分間に生じた。この NE 放出は、NE 運搬体阻害剤であるデシピラミン (DMI、10 nM) または Na⁺-H⁺ 交換体阻害剤の 5-*N*-ethyl-isopropyl-amiloride (EIPA、10 μM) により有意に抑制 ($p < 0.01$) されたことから Carrier-Mediated の NE 放出であると示唆された。ET 変換酵素阻害剤であるホスフォラミドン (3 μM) は再灌流間の NE 放出を約 58% 抑制し、さらに、再灌流直後に放出された ET-1 濃度を著明に減少させた ($p < 0.05$)。ET 受容体非選択的遮断薬である PD142893 (1 μM)、または ETA 受容体選択的遮断薬である BQ123 (10 μM) は顕著に再灌流時の NE 放出を抑制した ($p < 0.01$) が、ETB 受容体選択的遮断薬である BQ788 (300 nM) は再灌流時の NE 放出を逆に約 62% ($p < 0.01$) も増加させた。対照群および BQ788 の存在下でのみ、VF 出現率は 100% であった。20 分間の虚血後、対照群では再灌流直後から 40.11 ± 7.08 秒 (例数 = 6) 持続した。しかし、DMI、EIPA、ホスフォラミドン、PD142893、BQ123 により VF は完全に消失した。その一方で、BQ788 は対照群と有意な差を認めなかった (41.83 ± 36.34 秒,)。これら NE 放出量と VF 持続時間には正の相関性 ($r = 0.8496$, $p < 0.001$) が認められた。虚血直前および再灌流後 45 分時点での冠灌流速度、心拍数および Left Ventricular Developed Pressure において、BQ123 群のみ全てのパラメーターで有意な改善が認められた。

【考察】 これらの結果から、心臓虚血再灌流の状況下で内因性 ET-1 が ETA 受容体を活性化することにより心臓の交感神経終末における carrier-mediated NE 放出および再灌流性不整脈を増悪し、反対に ETB 受容体を活性化することにより NE 放出および再灌流性不整脈を抑制することを証明した。また、ET 変換酵素阻害剤による ET-1 産生の抑制が NE 放出および再灌流性不整脈を減弱することを証明した。これらから、局所的な ET-1 産生が心筋虚血再灌流時における NE 放出を調節し、再灌流性不整脈に関与することが考えられた。

【結論】 心筋虚血の際、交感神経終末から放出される NE は、冠血管を収縮させ、また心筋内の Ca 濃度を上昇させ、致死的不整脈を惹起する。本研究により、将来的に ETA 受容体遮断薬または ETB 受容体作用薬は致死的な再灌流性不整脈の防止に役立つ可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 筒 井 裕 之
副 査 教 授 三 輪 聡 一

学 位 論 文 題 名

内因性エンドセリン1の心臓虚血再灌流における ノルエピネフリン放出と不整脈に対する影響： モルモット摘出心ランゲンドルフ灌流系による検討

本研究の目的は、心臓虚血再灌流時に内因性 ET-1 が心臓の交感神経節前線維上の ET 受容体を活性化して Carrier-mediated NE 放出を調節するか否かを検討することである。モルモットの摘出心ランゲンドルフ灌流装置により検討した。30 分間の安定化後、虚血前値として 5 分毎に 30 分間、冠灌流液を収集し、20 分間の常温 (37°C) 虚血後 45 分間再灌流を実施した。冠灌流液中の NE および ET-1 を各々高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および酵素結合免疫測定法 (ELISA) にて測定、心電図により再灌流後の不整脈 (心室細動: VF) を観察した。なお、本研究で使用した薬剤は全て灌流液に投与し、その使用濃度は既知の報告に従って決定した。20 分間の虚血後の 45 分間の再灌流時に放出された NE 放出量は NE 運搬体阻害剤であるデシピラミン (DMI または $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 交換体阻害剤の 5-*N*-ethyl-isopropyl-amiloride (EIPA, 10 μM) により有意に抑制されたことから Carrier-Mediated の NE 放出であると示唆された。ET 変換酵素阻害剤であるホスフォラミドン (3 μM) は NE 放出を約 58% 抑制し、さらに再灌流直後に放出された ET-1 濃度を著明に減少させた。ET 受容体非選択的遮断薬である PD142893 (1 μM)、または ETA 受容体選択的遮断薬である BQ123 は顕著に NE 放出を抑制したが、ETB 受容体選択的遮断薬である BQ788 は NE 放出を逆に約 62% も増加させた。対照群および BQ788 の存在下でのみ、VF 出現率は 100% であった。同様に VF 持続時間に関しても BQ788 存在下でのみ対照群と比較し有意差を認めなかった。虚血直前および再灌流後 45 分時点での冠灌流量、心拍数および Left Ventricular Developed Pressure において、BQ123 群のみ全てのパラメーターで有意な改善が認められた。以上により、心臓虚血再灌流の状況下で内因性 ET-1 が ETA 受容体を活性化することにより心臓の交感神経終末における carrier-mediated NE 放出および再灌流性不整脈を増悪し、反対に ETB 受容体を活性化することにより NE 放出および再灌流性不整脈を抑制することが示唆された。このことから、内因性 ET-1 が NE 放出に関与することが示唆された。ET-1 が心筋虚血

再灌流性不整脈を誘起することがこれまでの研究で解っている。本研究の ET 各種薬物による NE 放出の変化は, ET-1 が交感神経に作用し NE 放出を調節していることを示唆していると考えられる。しかしながら, 本研究では内因性 ET-1 の NE 放出調節機序を明らかにすることが出来なかった。このことをより明らかにするためには, 心筋の条片を使用し, 細胞内情報伝達機構を解明すること, 二重免疫染色により交感神経上の ET 受容体を検討することが必要と考えられ, 今後の検討課題である。

公開発表では, 副査の筒井教授から, ET-1 による NE 放出が PKC 依存性か否か, 三輪教授から, 外因性エンドセリン-1 の使用した時の NE 放出量, 主査の安田教授から, 心筋保護に関して臨床応用に必要な実験に関して等の質問がなされた。申請者は自らの実験結果, この分野に関する文献などをもとに, 誠実かつ妥当な回答を成しえた。

本研究は, 心臓虚血再灌流性不整脈に対する ETA 受容体遮断薬の臨床応用, 機序解明の一端を担い, 再灌流性不整脈予防および心筋保護の今後の展開に重要な寄与を要するものと評価される。

審査員一同は, 申請者の学識に合わせて, この研究が関連領域研究とその臨床応用への可能性を評価し, 大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士(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。