

学 位 論 文 題 名

肥大心の左室心筋細胞における
A T P 感受性 K^+ チャネルの性質

—パッチクランプ法を用いた虚血類似条件における検討—

学位論文内容の要旨

I. 背 景

高血圧性心肥大患者では、突然死を含む心臓死が増加するといわれている。心臓突然死の大部分は、頻脈性心室性不整脈による心停止が原因と考えられているが、その最大の原因として、急性心筋梗塞があげられる。動物実験では、冠動脈結紮による心室性不整脈出現は肥大心モデルにおいて増加すると報告されており、急性虚血時の電気生理学的活性は心肥大による修飾を受けていると推測される。ATP 感受性 K^+ チャネル (K_{ATP} チャネル) は心筋虚血などのストレスにより細胞内 ATP の減少が生じると活性化 (開口) し、 K^+ 電流を増加させるという性質を有している。その性質から、 K_{ATP} チャネルは虚血時に生じる電気生理学的変化において重要な役割を担っていると考えられるが、肥大心における K_{ATP} チャネル活性について検討された報告は少ない。一方、左室心筋壁内の電気生理学的性質には貫壁性の不均一性が存在する。さらに、心内膜側では心外膜側に比べ、より虚血に晒され易く、虚血に対する電気生理学的反応にも相違がある事が指摘されているが、肥大心の左室心筋壁内における K_{ATP} チャネル活性の分布およびその虚血による変化についてはよくわかっていない。

II. 目 的

本研究では、肥大心における虚血時の心室性不整脈発生の機序の一つとして、 K_{ATP} チャネルの活性化およびその壁内分布の変化が大きく関与していると仮説をたてた。これを検討するために、正常心と肥大心における心内膜側および心外膜側より単離した左室心筋細胞を用いて、パッチクランプ法により K_{ATP} チャネル電流を計測し、虚血類似条件による相違を比較検討した。

III. 方 法

18 週令から 22 週令の WKY および SHR それぞれより摘出した灌流心の心外膜側および心内膜側より単離した心筋細胞を計測の対象とした。全細胞電流計測では、Perforated patch method を用いて、 -40 mV の保持電位から 0 mV のパルス電位への膜電位固定を与える事により生じる膜電流を、6 秒毎に計測した。コントロールとして 30 秒間の計測後、心筋細胞周囲を虚血類似条件とし、510 秒間計測を続けた。虚血類似条件は、ブドウ糖非含有 Tyrode 液に 2 mM CN $^-$ を添加し、細胞周囲を灌流する事により成立させ、コントロール電流に対する外向き電流の増加分を K_{ATP} チャネル電流とみなした。単一チャネル電流計測では、open cell-attached method を用いて、細胞内電位を -60 mV に膜電位固定し

た時の内向き電流を計測した。細胞表面を 1% digitonin に暴露する事により open cell-attached patch が形成された後、細胞内液の ATP 濃度 (μM) を 0, 3000, 1000, 300, 100, 30 へ変更する事により、 K_{ATP} チャネルの開口確率と細胞内 ATP 濃度の関連を比較検討した。

IV. 結 果

全細胞電流計測の対象となった心筋細胞における細胞膜容量 (C_m) は、心外膜側および心内膜側心筋細胞のいずれにおいても、SHR 群が WKY 群に比べ有意に大きかった。全細胞電流計測では、心筋細胞周囲を虚血類似条件とすると、大部分の細胞で 0 mV における外向き電流に経時的な増加がみられた。この外向き電流の増加分は、 K_{ATP} チャネルの活性化により生じると考えられるため、0 mV における外向き電流の、虚血類似条件前後での差（増加分）を、全細胞 K_{ATP} チャネル電流 ($I_{\text{K,ATP}}$) と定義した。計測した心筋細胞の一部では、虚血類似条件による $I_{\text{K,ATP}}$ の増加が生じなかったため、 K_{ATP} チャネル活性化の有無を比較検討した。SHR 群では、 K_{ATP} チャネルの活性化が心内膜側において少ない傾向がみられたが、統計学的有意差は得られなかった。虚血類似条件による $I_{\text{K,ATP}}$ の増加は、心内膜側心筋細胞では SHR 群が WKY 群に比べ少なかったが、心外膜側では両群間に差はみられなかった。 $I_{\text{K,ATP}}$ 活性化の開始から、 $I_{\text{K,ATP}}$ の最大値に達するまでの時間 ($T_{\text{onset to peak}}$) は、心内膜においては SHR 群が WKY 群に比べ延長していたが、心外膜側では両群間に差がみられなかった。単一チャネル電流計測では、細胞内液の ATP 濃度を 100 μM とした時の K_{ATP} チャネル開口確率 (P_0) は、心内膜側において WKY 群に比較し、SHR 群で有意に小さかった。一方、心外膜側では、SHR 群が WKY 群に比べ小さい傾向を認めたが、有意差には至らなかった。

V. 考 察

今回の検討では、肥大心において K_{ATP} チャネルの活性化が減弱している事および、さらにその変化は、虚血に晒されやすい心内膜側に生じている事が示された。冠動脈閉塞による急性心筋虚血が生じると、心筋細胞では外来性の酸素およびブドウ糖の供給が急激に減少し、そのため細胞内におけるエネルギー産生が障害され、細胞内 ATP の減少をもたらす。この際にみられる K_{ATP} チャネルの活性化は、活動電位持続時間（活動電位幅）を短縮し、その結果として細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制する事により、虚血による心筋細胞障害から保護する機能を担っていると考えられている。この活性化の低下が心内膜側のみに生じる事は、活動電位持続時間に代表される電気生理学的特性の心筋壁内における不均一性を増強させ得る。心筋壁内における活動電位幅の不均一性は、phase 2 reentry による不整脈発生の基質になり得ると考えられているが、肥大心における虚血時の致死性不整脈発症増加には、本実験で得られた K_{ATP} チャネル活性化の低下が、その機序の一つとして関わっている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 筒 井 裕 之

副 査 教 授 三 輪 聡 一

副 査 教 授 川 口 秀 明

学 位 論 文 題 名

肥大心の左室心筋細胞における

ATP感受性 K^+ チャネルの性質

—パッチクランプ法を用いた虚血類似条件における検討—

高血圧性心肥大患者では、突然死を含む心臓死が増加するといわれている。心臓突然死の大部分は、頻脈性心室性不整脈による心停止が原因と考えられているが、その最大の原因として、急性心筋梗塞があげられる。動物実験では、冠動脈結紮による心室性不整脈出現は肥大心モデルにおいて増加すると報告されており、急性虚血時の電気生理学的活性は心肥大による修飾を受けていると推測される。ATP感受性 K^+ チャネル(K_{ATP} チャネル)は心筋虚血などのストレスにより細胞内ATPの減少が生じると活性化(開口)し、 K^+ 電流を増加させるという性質を有している。このため K_{ATP} チャネルは虚血時に生じる電気生理学的変化において重要な役割を担っていると考えられるが、肥大心における K_{ATP} チャネル活性について検討された報告は少ない。一方、左室心筋壁内の電気生理学的性質には貫壁性の不均一性が存在する。心内膜側では心外膜側に比べ、より虚血に晒され易く、虚血に対する電気生理学的反応にも相違がある事が指摘されているが、肥大心の左室心筋壁内における K_{ATP} チャネル活性の分布およびその虚血による変化についてはよくわかっていない。

本研究では、肥大心における虚血時の心室性不整脈発生の機序の一つとして、 K_{ATP} チャネルの活性化およびその壁内分布の変化が大きく関与していると仮説をたて、これを検討するために、正常心と肥大心における心内膜側および心外膜側より単離した左室心筋細胞を用いて、パッチクランプ法により K_{ATP} チャネル電流を計測し、虚血類似条件による相違を比較検討した。

18週令から22週令のWKYおよびSHRそれぞれより摘出した灌流心の心外膜側および心内膜側より単離した心筋細胞を計測の対象とした。全細胞電流計測では、Perforated patch methodを用いて0 mVへ膜電位固定を与える事により生じる膜電流を経時的に計測した。

虚血類似条件は、ブドウ糖非含有 Tyrode 液に 2 mM CN^- を添加し、細胞周囲を灌流する事により成立させ、コントロール電流に対する外向き電流の増加分を K_{ATP} チャネル電流 ($\text{I}_{\text{K,ATP}}$) とみなした。単一チャネル電流計測では、open cell-attached method を用いて、細胞内電位を -60 mV に膜電位固定した時の内向き電流を計測した。細胞表面を 1% digitonin に暴露する事により open cell-attached patch が形成された後、細胞内液の ATP 濃度 (μM) を 0, 3000, 1000, 300, 100, 30 へ変更する事により、 K_{ATP} チャネルの開口確率と細胞内 ATP 濃度の関連を比較検討した。

全細胞電流計測における虚血類似条件による $\text{I}_{\text{K,ATP}}$ の増加は、心内膜側心筋細胞では SHR 群が WKY 群に比べ少なかったが、心外膜側では両群間に差はみられなかった。 $\text{I}_{\text{K,ATP}}$ 活性化の開始から、 $\text{I}_{\text{K,ATP}}$ の最大値に達するまでの時間は、心内膜において SHR 群が WKY 群に比べ延長していたが、心外膜側では両群間に差がみられなかった。単一チャネル電流計測では、細胞内液の ATP 濃度を 100 μM とした時の K_{ATP} チャネル開口確率 (P_0) は、心内膜側において SHR 群で有意に小さかったが心外膜側では差を認めなかった。

今回の検討では、肥大心において K_{ATP} チャネルの活性化が減弱している事および、さらにその変化は、虚血に晒されやすい心内膜側に生じている事が示された。肥大心における虚血時の致死性不整脈発症増加には、本実験で得られた K_{ATP} チャネル活性化の低下が、その機序の一つとして関わっている可能性が示唆された。

口頭発表に際し、副査の川口教授から K_{ATP} チャネル活性化の変化をもたらす機序についてと K_{ATP} チャネルの活性化における G 蛋白の関与についての質問がなされた。次いで副査の三輪教授より、オープンセルアタッチ法におけるジギトニンの使用についておよび虚血類似条件におけるサイアナイド使用の意義についてのコメントと質問がなされた。最後に主査の筒井教授から肥大心モデルとして使用した SHR の特徴についてのコメントと、その心筋細胞を使用する意義についての質問がなされ、いずれの質問に対しても、申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識により、概ね適切な回答を行った。

この論文は、肥大心における虚血時の心室性不整脈発症リスクの増加に対する肥大心心内膜側 K_{ATP} チャネルの活性化の低下の関与を指摘したとして意義のあるものと評価され、審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位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。