

## 学位論文題名

# 肥大心における心室性不整脈の催誘発性機序の解明： カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II を 介した活動電位持続時間交互性変動の影響

## 学位論文内容の要旨

### 【背景と目的】

高血圧性心肥大を有する患者では、致死的心室性不整脈による突然死が増加することが知られているが、その発生機序については不明な点も多い。T波交互脈は、心筋細胞の再分極のばらつきにより生じ、肥大心の催不整脈性を説明しうるひとつの現象と考えられる。T波交互脈は活動電位持続時間 (APD) の交互性変動 (APD オルタナンス) によって生じるものとされており、APD オルタナンスの出現は心室細動の前兆現象として知られている。また APD オルタナンスは細胞内  $Ca^{2+}$  の変動により出現するものと考えられており、細胞内  $Ca^{2+}$  サイクリングに関わる様々な機構の異常により APD オルタナンスが出現することが基礎実験やシミュレーションにより示されている。  $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMK II) はこれら  $Ca^{2+}$  サイクリングに携わる種々のタンパクをリン酸化することにより細胞内  $Ca^{2+}$  の調節に重要な役割を担っており、肥大心においてその活性が高まっていることが報告されている。本研究では、肥大心における致死的不整脈の基盤として APD オルタナンスが生じやすく、その発生機序に CaMK II が関与している仮説をたて検証した。

### 【対象と方法】

正常対照として 18 週齢から 24 週齢の WKY ラット、高血圧肥大心として同週齢の自然発症高血圧ラット (SHR) を用いた。エーテル吸入下に心臓を摘出しランゲンドルフ法により摘出心を灌流した。APD の測定法として膜電位光学マッピング法を用いた。膜電位感受性色素 Di4-ANEPPS 2.5  $\mu$ M を灌流したのち Blebbistatine 10  $\mu$ M を投与し電氣的活動を維持させたまま拍動を停止させた。左室心尖部より刺激間隔 300ms より頻回刺激を行い、1 分ずつ刺激間隔を短縮し不整脈の誘発を試みた。各々の刺激において左室前壁にハロゲン光源をあて光シグナルに変換された活動電位を測定し、専用のソフトにて APD を解析し刺激頻度増加に伴う APD オルタナンスの出現を観察した。CaMK II の APD オルタナンスに与える影響を調べるため選択的 CaMK II 阻害剤 KN-93 1  $\mu$ M ならびにその非活性アナログである KN-92 1  $\mu$ M を投与し、同様のプロトコールで心室頻回刺激を行い光学マッピング法を用いて APD を測定した。

### 【結果】

SHR では体重当たりの左室重量が有意に増加しており心肥大が形成されていることが確認された (WKY 3.06  $\pm$  0.12mg/g (n=10) vs SHR 4.04  $\pm$  0.07mg/g (n=10); p<0.01)。心室頻回刺激を与えたときの膜電位光学マッピングによる APD 測定では、刺激間隔を短縮すると徐々に APD は短縮したが、いずれの刺激間隔でも SHR で有意に APD の延長が認められた

( $p < 0.01$ )。さらに刺激間隔を短縮させると WKY、SHR ともにオルタナンスが出現したが、SHR の方がより長い刺激間隔でオルタナンスが出現した。オルタナンスが出現する最長刺激間隔 (オルタナンス出現刺激間隔閾値) は WKY の  $130 \pm 12$  ms ( $465 \pm 45$  bpm) に対し SHR では  $159 \pm 18$  ms ( $382 \pm 43$  bpm) と。SHR で有意に ( $p < 0.001$ ) オルタナンス出現刺激間隔閾値の上昇が認められ、SHR では頻回刺激により APD オルタナンスが起りやすいことが判明した。選択的 CaMK II 阻害剤 KN-93 を投与したところ SHR では有意にオルタナンス出現刺激間隔閾値が短縮した (SHR+KN-93  $130 \pm 12$  ms vs SHR  $159 \pm 18$  ms ;  $p < 0.01$ )。一方、CaMK II 阻害非活性アナログの KN-92 投与では APD オルタナンス出現時刺激間隔閾値に差はなく、SHR のにおける APD オルタナンス出現閾値の変化は CaMK II 阻害によるものと考えられた。また刺激頻度短縮による持続性心室細動の誘発率は SHR で有意に高く (WKY 1/10 vs SHR 6/10;  $p < 0.05$ )、心室細動誘発時の刺激間隔は SHR で有意に長かった (WKY  $96 \pm 4$  ms vs SHR  $129 \pm 7$  ms ;  $p < 0.01$ )。一方 KN-93 投与 SHR では持続性心室性不整脈は誘発されなかった ( $p < 0.05$  vs SHR)。

#### 【考察】

今回我々の研究において、肥大大心では APD オルタナンスが生じやすく心室性不整脈の出現に関連していること、さらに肥大大心における APD オルタナンスの出現には CaMK II が密接に関与していることが判明した。過去に肥大大心において APD オルタナンスの誘発性と不整脈の関連を検討した報告はなく、CaMK II が心肥大の APD オルタナンス出現に関与していることも明らかな知見である。今回我々は、18 週齢から 24 週齢の比較的若い SHR を用いている。この期間の SHR では心肥大は進行しているが、心不全に至っていない時期であり、心肥大そのものがすでに APD オルタナンスの出現に影響を与えていることが明らかとなった。

APD オルタナンスとは心拍毎に APD が変化、すなわち long-short-long を繰り返す現象のことを言い、APD オルタナンスは細胞内  $Ca^{2+}$  動態 ( $Ca^{2+}$  トランジェント) のオルタナンスを伴う。肥大大心では定常時においても CaMK II 活性が亢進し  $Ca^{2+}$  トランジェントが増大している。頻回刺激により細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が増加すると肥大大心では CaMK II がすでに活性化状態であるために刺激毎の細胞内  $Ca^{2+}$  のホメオスタシスを保てず正常心に比しより早期に  $Ca^{2+}$  変動が出現し APD オルタナンスが生じるものと推測される。CaMK II 阻害剤である KN-93 投与により APD オルタナンス出現閾値が上昇したことは CaMK II の抑制が刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を抑制し細胞内  $Ca^{2+}$  の変動を減少させたためと推察される。

さらに本研究では、頻回刺激による不整脈の誘発性についても検討したが、SHR では WKY に比し有意に心室細動の出現閾値が低く、持続性心室性不整脈の誘発率が高かった。また CaMK II 阻害剤 KN-93 投与により誘発率が減少した。KN-93 の抗不整脈作用は過去にも報告され、これらの報告では KN-93 投与による早期後脱分極の抑制を機序としているが、今回の結果から KN-93 の抗不整脈作用には CaMK II 阻害による APD オルタナンス抑制も関与することが示唆された。

#### 【結語】

肥大大心では CaMK II 活性亢進により活動電位持続時間オルタナンスが生じやすいことが、致死的心室性不整脈の催誘発性機序の一つである。

# 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

### 肥大心における心室性不整脈の催誘発性機序の解明： カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II を 介した活動電位持続時間交互性変動の影響

高血圧性心肥大を有する患者では、致死的心室性不整脈による突然死が増加することが知られているが、その発生機序については不明な点も多い。活動電位持続時間 (APD) の交互性変動 (オルタナンス) は致死的心室性不整脈の出現機序の一つとして考えられている。肥大心では APD オルタナンスが出現しやすく、それが不整脈出現基質となっていること、またその出現にカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMK II) が関与していると仮説を立て実験を行った。正常対照として WKY、高血圧肥大心として SHR を用いた。ランゲンドルフ法にて灌流した摘出心の頻回刺激を行い APD の変化を膜電位光学マッピング法を用いて測定した。結果、SHR では WKY と比べ有意に APD の延長が認められ、APD オルタナンスがより長い刺激間隔において出現した ( $130 \pm 12$  ms ( $465 \pm 45$  bpm) vs  $159 \pm 18$  ms ( $382 \pm 43$  bpm);  $p < 0.01$ )。CaMK II 阻害剤である KN-93 投与後、APD オルタナンス出現時の刺激間隔の短縮が認められた ( $159 \pm 18$  ms vs  $130 \pm 12$  ms;  $p < 0.01$ ) が、WKY では KN-93 投与による APD オルタナンスへの影響は認められなかった。また SHR では WKY に比べ持続性心室細動の誘発率が有意に高かった (1 例/10 例 vs 6 例/10 例;  $p < 0.05$ ) が、KN-93 投与により心室細動は誘発されなくなった。以上の結果より、肥大心では APD オルタナンスが出現しやすいことが致死的心室性不整脈の発生基盤となっており、CaMK II が強く関与していることが判明した。

この学位論文について審査担当教授より質問があった。まず、測定方法として、左室前壁一ポイントのみで評価している事に対する妥当性については、今回の用いた膜電位光学マッピング法では  $96 \times 64$  ピクセルの活動電位情報が得られるが、予備実験として左室前壁の任意の数点で APD のばらつきを調べたところばらつきはなく、代表する一点を用いることの妥当性が確認された。CaMK II 阻害が逆に  $\text{Ca}^{2+}$  負荷を高めてしまう可能性については、機序的に CaMK II 阻害によりホスホランバンの活性を抑制することで逆に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を高めてしまう可能性はあるが、本研究結果から、CaMK II 阻害がリアノジン受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出抑制効果がより大きいいため細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を抑え APD オルタナンス

スの出現を抑制したのではないかと推測される。これに関しては実際細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を測定していないため推測の域を超えないため更なる検討が必要と考えられた。SHR における CaMKII 以外の、チャンネルなどが APD オルタナンスに影響を与えているものについては、SHR では一過性外向きカリウム電流  $I_{to}$  が低下していると報告されており、外向き電流の低下による APD の延長は  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を増やし細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 負荷を増していることが推測される。よって  $I_{to}$  の低下は SHR における APD オルタナンス易出現性の一因となっている可能性がある。審査担当教授より細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を変えることにより、Ca サイクリングを担う構成要素のうち、いずれが重要なのかある程度判断できるのではないかと指摘があった、またリアノジン受容体、SERCA を直接抑制して APD オルタナンスの出現を調べることが必要ではないかと指摘もあったが、正常心ではリアノジン受容体、SERCA の抑制で APD オルタナンスの出現を抑制したとの報告が既にあり、今回は肥大心に特徴的な機序として CaMKII に着目し研究を行った。指摘されたように、より選択的な機序を同定することは、心機能全体にあたえる影響が少ない点で重要であるためさらなる検討が必要であると考えられた。さらに APD オルタナンスの出現閾値を変化させたことだけが心室性不整脈の出現に影響を与えたのかは、本研究の結果のみで判断することは難しい。心室内での APD オルタナンスの出現閾値のばらつきや、オルタナンスの大きさなどを細かに検討する必要があるであろう。

この論文は、肥大心における致死的不整脈の発生基質を調べられた点で高く評価され、今後の臨床における不整脈治療に応用されることが期待される。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。