



Title	膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング法を用いた肥大心の急性虚血におけるスモールコンダクタンスカルシウム感受性カリウムチャネルの電気生理学的影響および催不整脈機序の解明
Author(s)	高橋, 雅之
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13453号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13453
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91652
Type	theses (doctoral)
File Information	Masayuki_Takahashi.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング法を
用いた肥大心の急性虚血におけるスモールコンダクタンス
カルシウム感受性カリウムチャネルの電気生理学的影響
および催不整脈機序の解明

**(Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels
Affect Electrophysiological States and Ventricular
Arrhythmogenesis during Acute Hypoxia in Hypertrophied
Hearts: Measurement by Dual Optical Mapping Technique)**

2019年3月

北海道大学

高橋 雅之

学位論文

膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング法を
用いた肥大心の急性虚血におけるスモールコンダクタンス
カルシウム感受性カリウムチャネルの電気生理学的影響
および催不整脈機序の解明

**(Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels
Affect Electrophysiological States and Ventricular
Arrhythmogenesis during Acute Hypoxia in Hypertrophied
Hearts: Measurement by Dual Optical Mapping Technique)**

2019年3月

北海道大学

高橋 雅之

目次

発表論文目録.....	1 頁
1. 要旨.....	2 頁
2. 略語表.....	5 頁
3. 緒言.....	6 頁
4. 実験方法.....	9 頁
4.1. 実験動物.....	9 項
4.2. ランゲンドルフ灌流心.....	9 項
4.3. パッチクランプ法.....	10 項
4.3.1. 心筋細胞単離.....	10 項
4.3.2. 単一チャネル記録.....	11 項
4.4. 膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング法.....	12 項
4.4.1. 急性全虚血作製法.....	12 項
4.4.2. 膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング法.....	12 項
4.4.3. 電気生理学的評価.....	13 項
4.4.4. ペーシングプロトコルおよび不整脈発生様式の解析.....	15 項
4.4.5. 薬剤.....	16 項
4.4.6. 統計学的検討.....	17 項
5. 結果.....	18 頁
5.1. パッチクランプ法による SK チャネルの単一チャネル記録.....	18 項
5.2. 虚血モデルにおける膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング法を用いた電気生理学的特性および催不整脈機序の観察.....	20 項
5.2.1. 虚血による活動電位の変化およびそれに対するアパミンの効果.....	20 項
5.2.2. 虚血によるカルシウムトランジェントの変化およびそれに対するアパミンの効果.....	22 項
5.2.3. 虚血によるカルシウムトランジェント時間と活動電位持続時間の差の変化およびそれに対するアパミンの効果.....	24 項
5.2.4. 虚血による催不整脈機序とそれに対するアパミンの効果.....	26 項
5.2.5. 虚血によるカルシウム動態に関わるパラメーターの変化とそれに対するアパミンの効果.....	31 項

5.2.6. 虚血による電気生理学変化および催不整脈性に対する薬物効果： SK チャネル遮断薬と SK 非選択性カリウムチャネル遮断薬の比較	34 項
6. 考察	39 頁
6.1. SK チャネル遮断薬とカルシウム動態.....	39 項
6.2. 肥大心の急性虚血における心室性不整脈発生のメカニズム.....	40 項
6.3. SK チャネル遮断薬と SK 非選択性カリウムチャネル遮断薬.....	41 項
6.4. 本研究の限界.....	42 項
7. 結論	43 頁
8. 謝辞	45 頁
9. 利益相反	46 頁
10. 引用文献	47 項

発表論文目録

本研究の一部は以下の雑誌に現在投稿中である。

1. Masayuki Takahashi, Hisashi Yokoshiki, Hirofumi Mitsuyama, Masaya Watanabe, Taro Tenma, Rui Kamada, Hikaru Hagiwara, Yumi Takahashi, and Toshihisa Anzai
SK channel blockade prevents hypoxia-induced ventricular arrhythmias through inhibition of Ca²⁺/voltage uncoupling in hypertrophied hearts
Circulation Research

1. 要旨

【背景と目的】

心室性不整脈は心臓突然死の主たる要因とされるが、肥大心や虚血心は電気生理学的なリモデリングからその不整脈基質となることが知られている。その背景にはカリウムチャネルの障害やカルシウム動態異常が関与しているとされ、肥大心では早期後脱分極や遅延後脱分極（DAD : delayed afterdepolarization）などの撃発活動が、また虚血心では心筋内の伝導遅延や活動電位持続時間（APD : action potential duration）の不均一性が催不整脈性に寄与するとされる。このような病的心においては、スモールコンダクタンスカルシウム感受性カリウム（SK）チャネルと呼ばれる電位非依存性のカリウムチャネルが機能的に発現していると報告されている。SKチャネルは不全心や肥大心、虚血心といった病的心で細胞内カルシウム濃度上昇に伴って活性化するとされ、SKチャネルが催不整脈性、もしくは抗不整脈性のどちらに働くかは未だ結論が出ていない。我々は、肥大心においてSKチャネルが活性化していること、さらに急性虚血の合併した肥大心では正常心に比べ心室性不整脈発生率が高く、SKチャネル遮断薬が抗不整脈性に働くことを過去に報告した。しかしながら、肥大心の急性虚血におけるSKチャネルの心室性不整脈源生への関与とSKチャネル遮断薬の抗不整脈機序は十分に明らかになってない。そこで今回我々は、肥大心の急性虚血において心室性不整脈が発生するメカニズムを明らかにし、SKチャネル遮断薬が活動電位のみならずカルシウム動態異常を是正することで抗不整脈作用を発揮するのではないかという仮説を立て、検証することとした。

【対象と方法】

肥大心モデルとして18から24週齢の遺伝的肥大心モデルラットであるSpontaneously hypertensive rat（オス）を使用した。ランゲンドルフ灌流心を作製した後、低酸素/無グルコースTyrode液（100%窒素で飽和したグルコースを含まないTyrode液）を灌流することで急性全虚血状態とした。膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピングを用いて、左室前壁の心外膜面を観察対象とした活動電位およびカルシウムトランジェント（CaT : calcium transient）の同時評価を行い、APDやCaT時間（CaTD : calcium transient duration）などを測定した。撮像に際しては、左室心尖部から300msのペーシングサイクル長を基

本とした頻拍ペーシング下でベースライン（非虚血状態）と全虚血 30 分の観察を行った。心室性不整脈誘発性および催不整脈機序解明のため、虚血作製後に心電図同時記録下でペーシング刺激間隔を 20 ないし 10 ms ずつを短縮していき、心室性不整脈が誘発されるか、ペーシング刺激と心室興奮が 1:1 で補足されなくなるまで頻拍ペーシングを行った。これらのプロトコルを対照群（薬物非投与群）と各薬物（アパミンおよび NS8593（SK チャネル遮断薬）、グリベンクラミド（アデノシン三リン酸感受性カリウムチャネル遮断薬）、4-アミノピリジン（一過性外向きカリウム電流阻害薬））投与群で行い比較検討した。

【結果】

急性全虚血により APD₈₀（活動電位の最大振幅に対する 50%脱分極する点から 80%再分極するまでの時間）の短縮、CaTD₈₀（カルシウムトランジェントの最大振幅に対する上行脚の 50%の点から下降脚の 80%の点までの時間）の延長、さらに CaTD₈₀-APD₈₀の開大を認めたが、アパミンの投与によりこれらの変化は抑制された。また CaT 時定数（ τ ：カルシウムトランジェントの最大振幅に対する下降脚の 30%から 100%までを単一指数関数でフィッティングした時間）延長の抑制や、頻拍ペーシング時に観察される拡張期細胞内カルシウムレベル上昇度の減少などがアパミン投与により確認された。催不整脈性機序としては、異所性興奮による撃発活動がその主体的な起源として観察された。ペーシングに伴い対照群では全例で心室性不整脈が誘発されたのに対し、アパミン群では誘発率 37.5%と抗不整脈効果が認められた。SK チャネル遮断薬と SK チャネル非選択性カリウムチャネル遮断薬の効果を比較したところ、抗不整脈性を認めたのは SK チャネル遮断薬（アパミンと NS8593）のみであり、CaTD₈₀-APD₈₀ 開大や τ 延長に対して抑制効果を認めたのも SK チャネル遮断薬のみであった。

【考察】

本研究において、SK チャネルが活性化した急性全虚血状態の肥大心では、SK チャネル遮断薬が活動電位に加えカルシウム動態にも影響を与えることが初めて示唆された。今回、虚血に伴い CaTD-APD 開大が見られたが、SK チャネル遮断薬であるアパミンは APD 短縮と CaTD 延長を抑えることでその開大を抑制した。CaTD-APD 開大は活動電位再分極後に細胞内カルシウム濃度上昇が持続することを意味し、ナトリウム/カルシウム交換機構（NCX）を介した内向き電流の増加とナトリウム過負荷から DAD の発生を促すとされる。さらに

我々はアパミンによる τ 延長抑制を認めた。 τ はカルシウム流出の遅い時相を反映することから NCX 機能のパラメーターであり、急性虚血では NCX の障害から τ 延長を来すことが報告されている。以上の点から、アパミンによるカルシウム動態異常、特に NCX への影響が示唆された。また今回、抗頻拍ペーシングに伴う拡張期のカルシウムレベルの上昇度を定量化し比較したところ、アパミンで上昇度が有意に小さいことが明らかとなり、SK チャネル遮断薬のカルシウム動態への影響を示唆する所見の一つと考えられた。一方、肥大心の急性虚血に生じる心室性不整脈に対してアパミンが抗不整脈作用を示すことが確認された。心室性不整脈の契機としては主に撃発活動が捕らえられ、これは虚血に伴う CaTD-APD 開大により DAD の誘発性が高まっている背景と矛盾しない。過去には、DAD の発生に寄与する SK チャネルの活性化には筋小胞体からの自発的なカルシウム放出が必要であるということや、カルシウムの興奮が活動電位の興奮に先行するという所見を認めることも報告されている。しかしこれらの所見は心内膜側や局所的な虚血領域近傍からみられる所見とされており、今回の心外膜面の観察では捕らえられなかった可能性がある。

【結論】

本研究は特に肥大心の急性虚血において、その催不整脈性に SK チャネルが寄与していること、SK チャネル遮断薬が活動电位だけでなくカルシウム動態の異常も是正することで抗不整脈作用を発揮すること、また心室性不整脈が撃発活動を主たる契機として発生していることを明らかにした点において有意義であると考え。SK チャネルは正常心の活動电位形成に寄与していないという報告もあることから、病的に特異的に作用する抗不整脈薬のターゲットになりうる。一方で今回我々が用いた SK チャネル遮断薬であるアパミンは神経毒として知られており、臨床応用の観点からは今後さらなる SK チャネルの研究とより安全な SK チャネル遮断薬の開発を期待したい。

2. 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

4-AP	4-aminopyridine
APD	action potential duration
APD-ALT	calcium transient alternans
Ca _i	intracellular calcium
CaT	calcium transient
CaT-ALT	calcium transient alternans
CaTD	calcium transient duration
CaTD-APD	Ca _i /V _m uncoupling
DAD	delayed afterdepolarization
EAD	early afterdepolarization
I _{to}	transient outward K ⁺ current
K _{ATP}	adenosine triphosphate sensitive K ⁺
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger
P-ECG	pseudo-electrocardiogram
SERCA	sarcoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SHR	spontaneous hypertensive rat
SK	small-conductance Ca ²⁺ -activated K ⁺
SR	sarcoplasmic reticulum
V _m	membrane potential

3. 緒言

心室細動や心室頻拍といった致死性心室性不整脈は心臓突然死を含めた心疾患に伴う主要な死因の一つであることがよく知られている(Qu and Weiss, 2015)。

心臓突然死の独立した危険因子の一つとしては心肥大が報告されており、その突然死の80%以上に心室性不整脈が関与しているとされる(Haider et al., 1998; Levy et al., 1987)。心肥大における電気生理学的なリモデリングおよび催不整脈性の原因としてはカリウムチャネル活動の変化が報告されており(Furukawa and Kurokawa, 2006)、さらにその背景にはカルシウムチャネルやナトリウム/カルシウム交換機構(NCX: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger)の活性化に伴うカルシウム依存性シグナリングパスウェイの関与が指摘されている(Nuss and Houser, 1993; Sipido et al., 2000)。肥大心における不整脈発生機序として、高血圧モデルを用いた動物実験から後脱分極電位(カルシウム負荷に伴う早期後脱分極電位[EAD: early afterdepolarization]や遅延後脱分極電位[DAD: delayed afterdepolarization])の関与が指摘されている(Aronson, 1981; Ben-David et al., 1992)。

また心室性不整脈を背景とした心臓突然死の原因の一つとして、急性心筋虚血の関与についても過去に報告されている(Luqman et al., 2007)。虚血に伴う嫌気性代謝や代謝性アシドーシスはその電気生理学的影響として細胞外カリウム濃度の上昇やカルシウム動態異常を引き起こすことが動物実験で明らかになっている(Di Diego and Antzelevitch, 2011; Qian et al., 2001; Tsujii et al., 2003)。細胞外カリウム濃度の上昇は心筋内の伝導遅延や活動電位持続時間(APD: action potential duration)の短縮をもたらす、それによる不応期の不均一性が催不整脈作用をもたらすとされる(Di Diego and Antzelevitch, 2011)。虚血によって生じる電気生理学的変化のうち、細胞外カリウム濃度上昇は静止膜電位形成を担うカリウムチャネル電流を増加させることが報告されており(Sakmann and Trube, 1984)、中でもATP濃度の低下により活性化するATP感受性カリウム(K_{ATP} : ATP-sensitive K^+)チャネルがその主要な役割を担うと考えられていた(Billman, 1994; Kantor et al., 1990; Wilde et al., 1990)。しかし一方で、虚血早期の細胞外カリウム濃度に K_{ATP} チャネルが寄与しないという報告(Saito et al., 2005)や虚血類似条件下の肥大心では心筋心内膜側の K_{ATP} チャネルが障害されているという報告(Shimokawa et al., 2007)などもあることから、特に肥大心の心筋虚血において

は他のカリウムチャネルの影響が示唆される。一方で、肥大心に合併した心筋虚血は正常心に比しより大きな電気生理学的異常を生じ、心室性不整脈の発生率も有意に高いことが報告されている(Kohya et al., 1988; Koyanagi et al., 1982)が、その心室性不整脈発生の詳しいメカニズムや電気生理学的な変化は十分に明らかにされていない。

我々は肥大心の急性虚血において K_{ATP} チャネルに代わり影響を及ぼすカリウムチャネルとして、スモールコンダクタンスカルシウム感受性カリウム (SK: small-conductance Ca^{2+} -activated K^+) チャネルに着目した。SK チャネルはC末端にカルモジュリン結合部位を有する6回膜貫通型の α サブユニット4個から形成され、細胞内カルシウム (Ca_i : intracellular calcium) イオン濃度の上昇によって活性化されるとされる電位非依存性カリウムチャネルである(Mahida, 2014)。SK チャネルは生体内に広く分布し、心筋だけでなく末梢神経や骨格筋、平滑筋、血管内皮でも重要な役割を果たしているとされる。神経組織を用いた研究で、細胞内外の対照的なカリウム濃度下においてその電流の大きさは ~ 10 pS程度と報告されている(Adelman et al., 2012)。アパミンはSK チャネルの特異的な遮断薬とされ、SK チャネル電流はアパミン感受性カリウム電流とも呼ばれる。正常心筋においてSK チャネルは活性化しておらず、活動電位形成に寄与しないとされる(Nagy et al., 2009)。しかしながら、過去の研究で肥大心や不全心といった病的心ではSK チャネルが活性化し活動電位形成に重要な役割を果たしているとされ、心室性不整脈の発生にも関わっていると報告されている(Chua et al., 2011; Mizukami et al., 2015)。SK チャネルの活性化が催不整脈性に作用するのか、それとも抗不整脈性に作用するのかについては結論が出ていない(Bonilla et al., 2014; Chang et al., 2013a; Chua et al., 2011; Gui et al., 2013; Hsieh et al., 2013)。過去に我々のグループは肥大心の急性虚血においてアパミンがAPD短縮を抑制し心室性不整脈に抗不整脈性に作用したと報告している(Tenma et al., 2018)が、心室性不整脈が発生する詳細なメカニズムやアパミンによるカルシウム動態を含めた電気生理学的変化までは十分に明らかにできていない。一方で、心室筋におけるSK チャネルの影響に関して、これまでの研究のほとんどはその遮断薬による電気生理学的な変化を評価するにとどまっている。他の臓器、例えば消化管平滑筋細胞においては、パッチクランプ法を用いた直接的な単一チャネル記録としてのSK チャネルの同定と、その遮断薬による電流

の変化について報告している(Koh et al., 1997; Kong et al., 2000)。心室筋における SK チャネル電流に関しては過去の我がグループの報告を含め、細胞全体での電流測定結果が報告されているが(Chang et al., 2013b; Lee et al., 2013; Mizukami et al., 2015; Terentyev et al., 2014; Xu et al., 2003)、単一 SK チャネル電流の動態を報告した先行研究はこれまでにない。

そこで今回我々は、まず肥大心の単離心室筋細胞において SK チャネルの単一チャネル記録が可能かどうかを検証することとした。続いて、肥大心の急性虚血において心室性不整脈が発生するメカニズムを明らかにし、SK チャネル遮断薬が活動電位のみならずカルシウム動態異常を是正することで抗不整脈作用を発揮するのではないかという仮説を立て、膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング法を用いてその仮説を検討することとした。

4. 実験方法

本研究の全実験は、国立大学法人北海道大学の動物実験に関する規定を遵守して行った。

4.1. 実験動物

肥大心モデルとして 18-24 週齢の遺伝的肥大心モデルラットである spontaneously hypertensive rat (SHR) のオスを使用した(Chan et al., 2011)。

4.2. ランゲンドルフ灌流心

軽鎮静を得るために、ジエチルエーテル (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) で充満させた容器におよそ 1 分間ラットを留置した。軽鎮静が得られた後、メドトミジン塩酸塩 (0.15 mg/kg 体重; Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan)、ミダゾラム (2 mg/kg 体重; Astellas Pharma, Tokyo, Japan)、ブトルファノール (2.5 mg/kg 体重; Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan) の 3 種混合液を腹腔内投与し、深鎮静を得た。また抗凝固目的に塩酸ヘパリン (400 IU/kg; AY Pharma, Tokyo, Japan) を腹腔内投与した。その後、心臓摘出のため背臥位の状態で手術台の上に固定し、ピンセットで四肢に刺激を加えても反応がなく十分な鎮静が得られていることを確認した。腹部を横切開し、剣状突起をけん引しながら横隔膜の腹側 (前面) に切開を加え、横隔膜と胸骨および肋骨を切離した。次に、左右両側の肋骨を可能な限り背側で離断し前胸郭を反転させ、心臓を露出させた。胸腺組織を剥離し上行大動脈を大動脈弓部まで露出させた後、下大静脈を離断した。その後、可及的に上行大動脈を大動脈弓部直前で離断し、肺動脈、上大静脈、肺静脈も可能な限り心臓側で離断した。離断した大動脈をピンセットで把持しながらランゲンドルフ装置に接続、3-0 絹糸で固定するとともに 37°C に保温した Tyrode 液による逆行性灌流を開始した (図 1)。Tyrode 液の組成は、143 mM NaCl、5.4 mM KCl、0.33 mM NaH₂PO₄、5 mM HEPES、5.5 mM glucose、0.5 mM MgCl₂、1.8 mM CaCl₂ (NaOH を用いて pH 7.4 に調整) とし、100%酸素で飽和した。冠流量を維持するために、100 cmH₂O を維持するようにランゲンドルフ灌流圧を調節した(Kohya et al., 1988)。灌流心は 37°C に保温されたチャンバー内で固定し、数分間拍動が安定していることを確認した後、実験に使用した。



図 1：ランゲンドルフ灌流装置（左）および実際のランゲンドルフ灌流心の様子（右）

4.3. パッチクランプ法

4.3.1. 心筋細胞単離

4.2 に従ってランゲンドルフ灌流心を作製し、Tyrode 液灌流により拍動が安定したところで灌流液をカルシウム無添加の Tyrode 液に変更した。10 分ほど灌流して拍動が停止したことを確認し、酵素液の灌流に切り替えた。酵素液はカルシウム無添加 Tyrode 液にコラゲナーゼ（0.5 mg/ml、WAKO、Tokyo、Japan）とプロテアーゼ（0.1 mg/ml、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA）を溶解したものを使用した。酵素液を 30 分から 40 分灌流し、最後にカルシウム無添加 Tyrode 液を約 5 分間灌流し酵素液を洗い流した(Mizukami et al., 2015; Shimokawa et al., 2007)。両心房および右室組織を取り除いて残った左室心筋を小切片に切除し、Kraftbrühe 液の中で攪拌した後、100 μ m セルストレーナー（BD Bioscience、Franklin Lakes、NJ、USA）で濾過し冷蔵保存した（4°C）。単離心筋細胞は単離後 2 時間から 8 時間で使用した。Kraftbrühe 液の組成は、70 mM KOH、50 mM L-glutamic acid、40 mM KCl、20 mM Taurine、20 mM

KH₂PO₄、10 mM D-glucose、10 mM HEPES、1 mM EGTA、3 mM MgCl₂ (KOH を用いて pH 7.4 に調整) とした。

4.3.2 単一チャンネル記録法

パッチクランプ法による膜電位固定を行い、単一チャンネル電流記録測定を行った。パッチ電極はガラス管キャピラリー (1.5 OD×1.17×100 L mm、Harvard Apparatus、Holliston、MA、USA) を牽引器 (Model P-97、Sutter Instrument Company、Novato、CA、USA) を用いて二段引きして作製した。ガラス電極の先端の太さは電極内液を充填し、槽内液に先端を浸した時の抵抗値が 2-5 MΩ になるものを使用した。イオンチャンネル電流の測定は Axopatch200B パッチクランプ増幅器 (Axon Instruments、Union City、CA、USA) を用いて行い、Digidata 1440A (Axon Instruments、Union City、CA、USA) を介して A/D 変換してコンピューターに記録した。pClamp10 (Axon Instruments、Union City、CA、USA) に付属しているソフトウェア Clampex10 をパルスプロトコル制御に、Clampfit10 をデータ集計・解析に使用した。

単離心筋細胞が沈殿した Kraftbrühe 液を灌流槽に滴下し、灌流槽に Tyrode 液を満たした後、顕微鏡および電極抵抗の変化を指標に単離細胞と電極を接触させ、シリンジで電極先端にかけていた陽圧を解除しギガオームシールを形成した。ギガシール状態のまま単一チャンネル記録を行う cell-attached 法と、ギガシール状態から電極を持ち上げてパッチ膜を細胞から剥離した状態で単一チャンネル記録を行う excised 法 (inside-out 法) による記録を試みた。Tyrode 液から槽内液に切り替えた後、-60 mV から+80 mV の任意の保持電位で膜電位固定を行い、電流の変化 (チャンネルの開閉) が見られるかを評価した。電極内液の組成は 5 mM KCl、135 mM NaCl、2 mM CaCl₂、10 mM D-glucose、1.2 mM MgCl₂、10 mM HEPES (Tris を用いて pH 7.4 に調整)、槽内液の組成は 140 mM KCl、1 mM EGTA、0.61 mM CaCl₂、10 mM HEPES (Tris を用いて pH 7.4 に調整) とした (Koh et al., 1997; Kong et al., 2000)。パッチクランプ法は室温にて行った (24-25°C)。

4.4. 膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング法

4.4.1. 急性全虚血作製法

前述の通り作製したランゲンドルフ灌流心を低酸素/無グルコース Tyrode 液（100 % 窒素で飽和したグルコースを含まない Tyrode 液）に変更することで急性全虚血心を作製した(Kohya et al., 1988)。虚血作製の間、心臓は左室心尖部から 300 msec のペーシングサイクル長で継続的にペーシング（出力：閾値の 2 倍）を行った。

4.4.2. 膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング法

ランゲンドルフ灌流心の左室心尖部に双極ペーシング電極を留置し、また右室基部と左室基部にそれぞれ心電図記録用の単極電極を装着した。心拍数が安定した後、心拍動によるアーチファクトを除くため灌流液をミオシンIIの特異的阻害薬であるブレビスタチン（10 μM ; TRC、Toronto、Canada）を混和させた Tyrode 液に切り替え灌流を継続した(Fedorov et al., 2007)。心拍動の停止を確認後、細胞内カルシウム感受性色素である Rhod-2AM (1.0 μM ; Dojindo、Kumamoto、Japan)を Tyrode 液に混和させおよそ 10 分間灌流させた。さらに、膜電位感受性色素である RH237 (0.01 μM ; Molecular Probes、OR、USA)を混和させた Tyrode 液を回路内に 5 分かけて注入した。

励起光源として 150 W ハロゲン光源（LEX2-LZ4-G、BrainVision、Tokyo、Japan）を使用し、透過波長域 $520 \pm 40.7 \text{ nm}$ の励起光用バンドパスフィルター（FF01-520/35-25、Semrock、Rochester、NY、USA）およびカットオフ波長 560 nm のダイクロイックミラー（FF560-FDi01-50x70、Semrock、Rochester、NY、USA）を介して、灌流心に照射した。標本からの放射蛍光はカットオフ波長 662 nm のダイクロイックミラー（FF662-FDi01-50x70、Semrock、Rochester、NY、USA）により RH237 用および Rhod-2 用の波長に分離され、膜電位は $>715 \text{ nm}$ のロングパスフィルター（LP715、Edmund Optics Japan、Tokyo、Japan）、カルシウムトランジェントは $575 \pm 20.1 \text{ nm}$ のバンドパスフィルター（P575/15-50、Semrock、Rochester、NY、USA）を介して高感度電荷結合素子（CCD: charge coupled device）カメラ（MiCAM02、BrainVision、Tokyo、Japan）で撮影した。時間分解能は 2.2 msec / frame、空間分解能は 0.2 mm（88×60 ピクセル）とした。撮像は全て左室前壁心外膜面を対象とした（図 2）。撮影したデータは

BV_ana ソフト (version 1604、 BrainVision、 Tokyo、 Japan) を用い、高周波ノイズを除去する目的で 3×3 のスペーシャルフィルター、キュービックフィルターを施した(Laughner et al., 2012)。上記のデジタルフィルタリング施行後、活動電位およびカルシウムトランジェントの同時測定を行った。

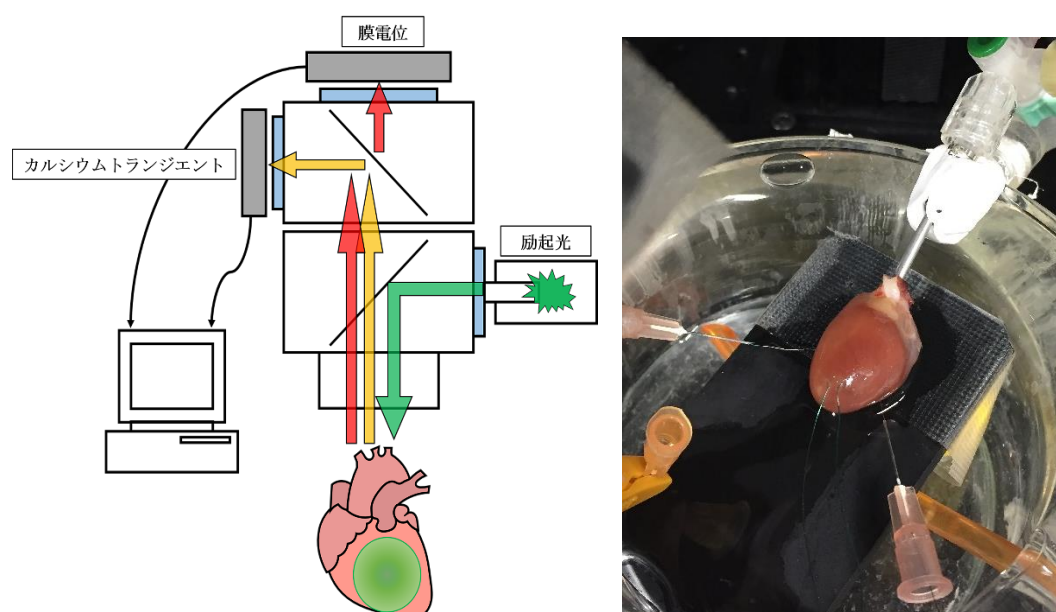


図 2：膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング装置の模式図 (左) および実際の撮像の様子 (右)

4.4.3. 電気生理学的評価

APD は活動電位波形の立ち上がりから最大振幅の 50%時点を局所の脱分極点とし、局所の脱分極点から活動電位の最大振幅に対する 80%再分極した点までの時間 (APD_{80}) と定義した (図 3 左)。同様に、カルシウムトランジェント時間 (CaTD: calcium transient duration) はカルシウムトランジェント波形の最大振幅に対する上行脚の 50%の点から、最大振幅に対する下降脚の 80%までの時間 ($CaTD_{80}$) と定義した (図 3 中)。撮影したデータにおいて、左室活動電位およびカルシウムトランジェントとして妥当であるピクセル (心房電位や心室端を除く) から任意の 9 点 (左室 3 領域 [心尖部、中間部、基部] それぞれから 3 点ずつ) を抽出した。それらの 9 点で APD_{80} および $CaTD_{80}$ を測定し、その平均値を個体固有の APD_{80} および $CaTD_{80}$ と定義した。また $CaTD_{80}$ および APD_{80}

の差 ($\text{CaTD}_{80}-\text{APD}_{80}$) を算出し、 Ca_i/V_m uncoupling として評価した (図 3 右)。

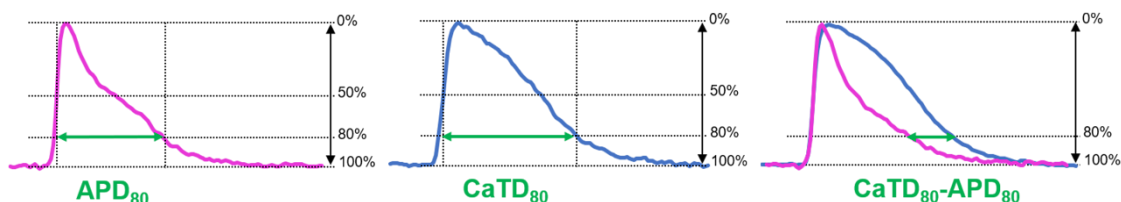


図 3 : 活動電位持続時間 (APD_{80}) (左)、カルシウムトランジェント時間 (CaTD_{80}) (中)、およびカルシウムトランジェント時間と活動電位持続時間の差 ($\text{CaTD}_{80}-\text{APD}_{80}$) (右) の算出法

その他、下記の項目をカルシウム動態の評価指標とした(Lang et al., 2015)。カルシウムの早い流出時相と遅い流出時相を評価するため、それぞれ T_{50} および時定数 (τ : decay constant) を計測した。 T_{50} はカルシウムトランジェントの最大振幅から 50% 下降脚までの時間として計測し、時定数はカルシウムトランジェントの最大振幅から 30% と 100% 下降脚の間の曲線を、単一指数関数を用いてフィッティングした ($Ae^{-t/\tau}+B$) (図 4 左)。カルシウムトランジェント波形の変化の指標の一つとして CaTD_{30} と CaTD_{80} の比 ($\text{CaTD}_{30}/\text{CaTD}_{80}$) の評価も行った。また拡張期のカルシウム過負荷を評価する目的として、ペーシング停止前後の拡張期細胞内カルシウムレベルの上昇度を最大振幅に対するパーセンテージとして定量化し比較検討を行った (図 4 右) (Laurita et al., 2003)。なお上記の各項目に関して、ベースライン (非虚血時) から全虚血 30 分における差を Δ と定義した (例: $\Delta\text{APD}_{80} = \text{全虚血 30 分の } \text{APD}_{80} - \text{ベースラインの } \text{APD}_{80}$)。

また心室性不整脈と活動電位およびカルシウムトランジェントの交互脈 (オルタナンス) の関連性を調べるため、活動電位持続時間オルタナンス (APD-ALT: action potential duration alternans) およびカルシウムトランジェントオルタナンス (CaT-ALT: calcium transient alternans) の誘発率および誘発閾値を定量評価した。どちらのオルタナンスもペーシング刺激と心室興奮が 1:1 に繋がらなくなるまで、もしくは心室性不整脈が誘発されるまでペーシング周期を 10-20 ms ずつ短縮することで誘発を試みた。APD-ALT は連続する 2 拍の APD が規則正しく交互に 5 ms 以上変化するもの、また CaT-ALT は連続する 2 拍のカルシ

ウムトランジェントの振幅が規則正しく交互に 10%以上変化するもの、と定義した。オルタナンスの誘発率はパーセンテージであらわされ、誘発閾値はオルタナンスを誘発する最長のペーシングサイクル長とした。

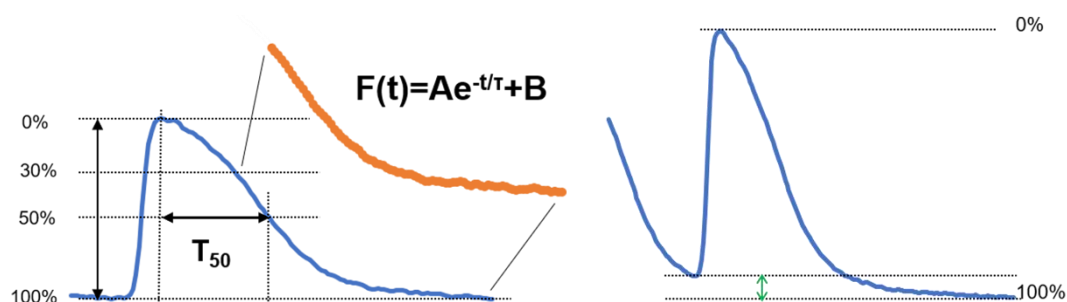


図 4 : T_{50} 、時定数 (τ) (左)、および拡張期細胞内カルシウムレベル (右) の算出法

4.4.4. ペーシングプロトコルおよび不整脈発生様式の解析

ランゲンドルフ灌流心を作製し安定した心拍が得られ、同時光学マッピングの準備が整った段階で、まずはベースライン（非虚血時）でのマッピング撮像を 300 ms のペーシングサイクル長で行った。続いて、上記 4.4.1 に記した手順に従って急性全虚血を作製開始し、全虚血 30 分の時点で再度撮像を行った。その後、S1S1 バーストペーシングプロトコルにより心室性不整脈誘発を試みた。ペーシングサイクル長を 260 ms までは 20 ms ずつ、260 ms 以降は 10 ms ずつ短縮させ、ペーシング刺激と心室興奮が 1:1 で繋がらなくなるか、心室性不整脈が誘発された時点でペーシング中止とした（図 5）。オプティカルマッピングの撮像は各ペーシングサイクル長とも 40 拍ずつ刺激した後に行った。誘発された心室性不整脈が 10 秒間以上の持続した場合のみ、心室性不整脈誘発有りと定義とした。また心室性不整脈の発生様式、誘発率、誘発閾値（心室性不整脈が誘発される最長のペーシングサイクル長）も検証された。すべての過程で右室および左室に留置した電極で心電図を記録し、その心電図記録には PowerLab 4/26 (AD Instruments, Dunedin, New Zealand) が用いられた。

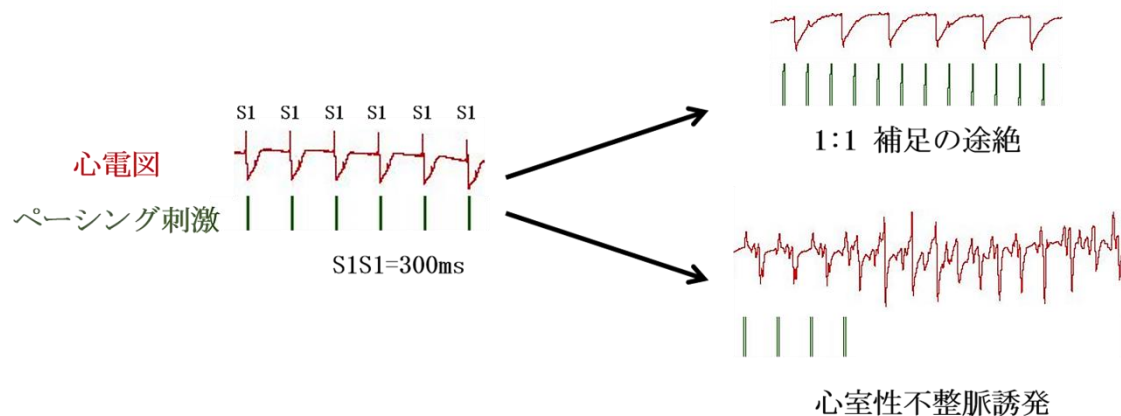


図 5：心室性不整脈誘発のペーシングプロトコル

4.4.5. 薬剤

薬剤効果を調べる目的で、SK チャンネル阻害薬であるアパミン (100 nM ; PEPTIDE、Osaka、Japan) および NS8593 (10 μ M ; Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)、 K_{ATP} チャンネル阻害薬であるグリベンクラミド (10 μ M ; Wako、Osaka、Japan)、一過性外向きカリウム電流 (I_{to} : transient outward K^+ current) 阻害薬である 4-アミノピリジン (4-AP: 4-aminopyridine) (1 mM ; Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA) をそれぞれ Tyrode 液に混入し、虚血 15 分前から灌流させた。同薬剤は虚血作製中も灌流させた。下記に膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング法のプロトコルを示す (図 6)。

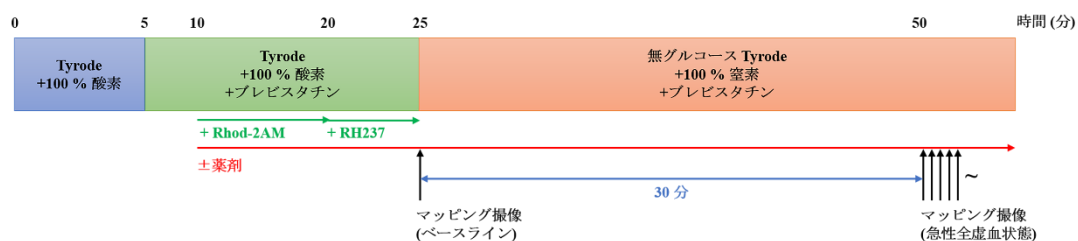


図 6：膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング法のプロトコル

4.4.6. 統計学的検討

得られた数値は平均値±標準誤差で表した。2群間の平均値の差の検定は、F検定による等分散性を確認後に Student's *t*-test を用いた。3群間以上の平均値の差の検定に関しては、必要に応じて one-way ANOVA を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法を用いた。2群間の頻度検定に関しては Fisher の正確検定を用いて行った。p 値<0.05 を有意と定義した。解析ソフトは Prism 6 (GraphPad Software、San Diego、California、USA) を使用した。カルシウムトランジェント波形の単一指数関数フィッティングには Origin 5.0 (Microcal Co.、Northampton、MA、USA) を用いた。

5. 結果

5.1. パッチクランプ法による SK チャネルの単一チャネル記録

パッチクランプ法による電流測定を実現するにあたっていくつかの問題点に直面した。例えば心室筋細胞の単離に関しては、毎回安定して活きの良い細胞が回収できるわけではなく、同じプロトコルで単離を行っても形の保たれた細胞の回収量や、カルシウム負荷に耐えられパッチクランプに使用可能な細胞の割合には各個体間で大きな差があった（約 7% から 40%）。酵素液のコラゲナーゼの濃度や種類、各試薬の灌流時間なども様々変えて試してみたが、上記 4.3.1 で述べたプロトコルと比し明らかに有効な方法は見つけられなかった。図 7 に実際に単離した心室筋細胞の例を示す。また、牽引器の設定が同様でも作製されるパッチ電極の先端形状や抵抗値にばらつきが見られたり、電流記録の際にベースラインノイズやハムが混入し除去に苦慮するなどの問題点も見られた。



図 7：単离心室筋細胞の例（トリパンプルー（DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan）処理後）

cell-attached 法での単一 SK チャネル電流記録を行うため、既報に従い電極内外のカリウム濃度を非対称にした条件（4.3.2）で施行したが、ギガシール状態の作製には成功するもののチャネルの開閉は全く捕らえられなかった。前述のように心室筋細胞での単一 SK チャネル電流記録の報告はないが、ある心房筋細胞を用いた実験では、excised 法（inside-out 法）で非対称のカリウム濃度、

非生理的な高カルシウム濃度の条件下で低確率に記録できたと報告(Xu et al., 2003)されていたため、inside-out 法での記録を試みることにした。

inside-out 法に記録法を変更し、槽内液の自由カルシウムイオン濃度を非生理的な高濃度 ($2 \times 10 \text{ mM}$) に調整した条件などでも手技を行ったが、cell-attached 法と同様、SK チャネルの開閉を捕らえることはできなかった。比較的良好に単離細胞が回収できた連続 10 個体を観察した時に、計 225 回の手技を施行しギガオームシールが形成できたのが 85 回 (37.8%)、そこから excised パッチの状態に移行できた判断されたのが 66 回 (29.3%) であった。そのうち 1 回 (0.44%) だけ、電流のコンダクタンス (約 5-10 pS) から SK チャネル電流の可能性が示唆された記録があったが (図 8)、パッチの状態が維持できず、アパミンによる開閉の抑制効果などを確認することはできなかった。

このように細胞やハードウェア、手技の問題などから、肥大心の単離心室筋細胞を用いた SK チャネルの単一チャネル記録を行うことは非常に困難であると結論付けた。

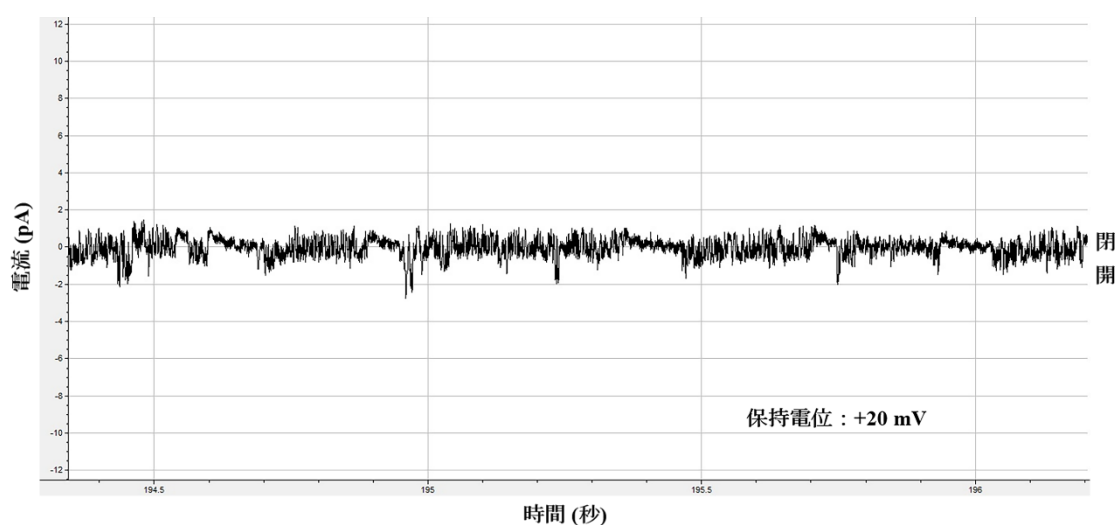


図 8 : inside-out 法での単一チャネル電流記録

5.2. 虚血モデルにおける膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング法を用いた電気生理学的特性および催不整脈機序の観察

5.2.1. 虚血による活動電位の変化およびそれに対するアパミンの効果

図 9A に左室の代表的な全虚血中の活動電位波形と APD₈₀ マップを示す（上段：対照群、下段：アパミン群）。両群ともにベースラインと比較し全虚血 30 分後に APD₈₀ の短縮を認めるが、アパミン群では対照群と比較しその短縮度が小さい。

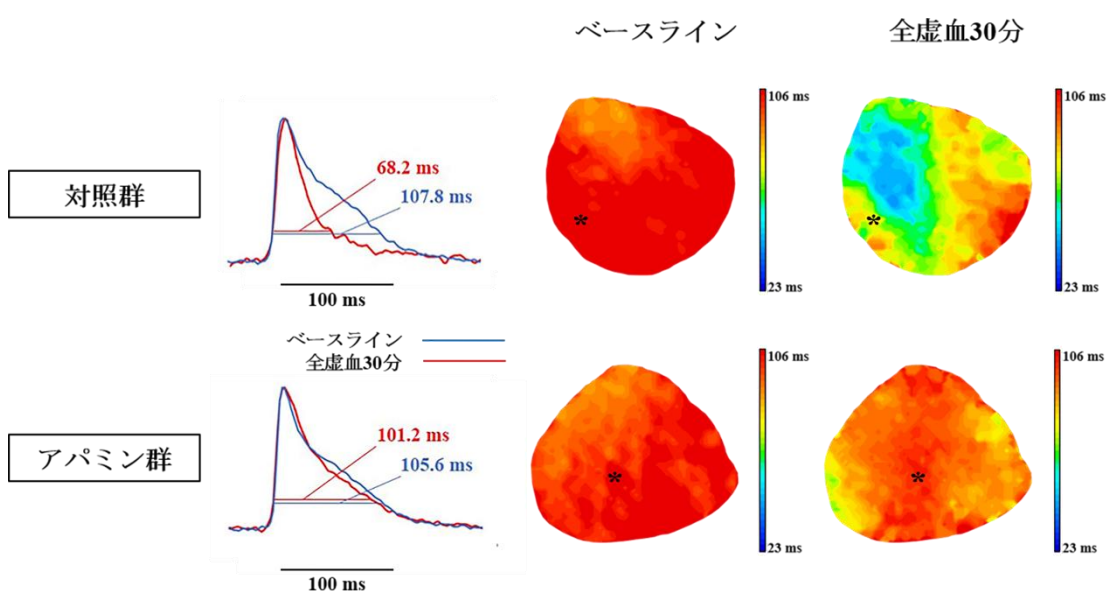


図 9A : 虚血による代表的な左室の活動電位変化と APD₈₀ マップ（上段：対照群、下段：アパミン投与群）

心尖部より 300 ms でペーシング。マップ上の*は図左の代表波形記録部位。

統計学的検討においては、アパミン投与群で APD_{80} の短縮度 (ΔAPD_{80}) に有意な抑制が認められた [ΔAPD_{80} : -23.31 ± 5.394 ms (対照群、 $n = 10$) vs. -4.247 ± 4.124 ms (アパミン群、 $n = 8$)、 $p = 0.0161$] (図 9B)。

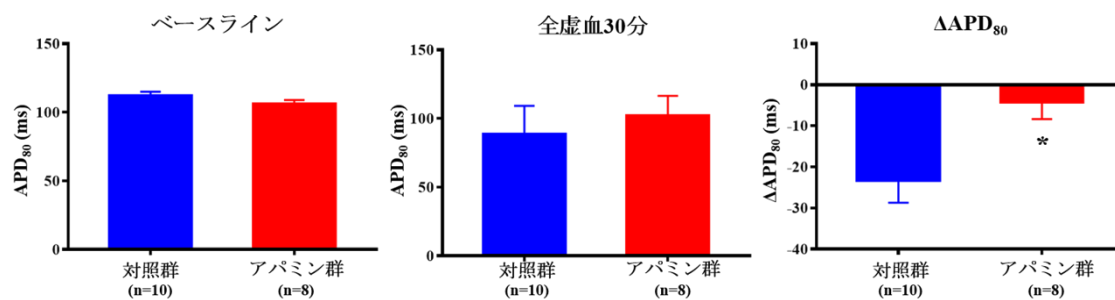


図 9B : 虚血に伴う APD_{80} 短縮に対するアパミンの効果

* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定 : Student's t -test を用いた。

5.2.2. 虚血によるカルシウムトランジェントの変化およびそれに対するアパミンの効果

図 10A に左室の代表的な全虚血中のカルシウムトランジェント波形と CaTD₈₀ マップを示す（上段：対照群、下段：アパミン群）。両群ともにベースラインと比較し全虚血 30 分後に CaTD₈₀ の延長を認めるが、アパミン群では対照群と比較しその延長度が小さい。

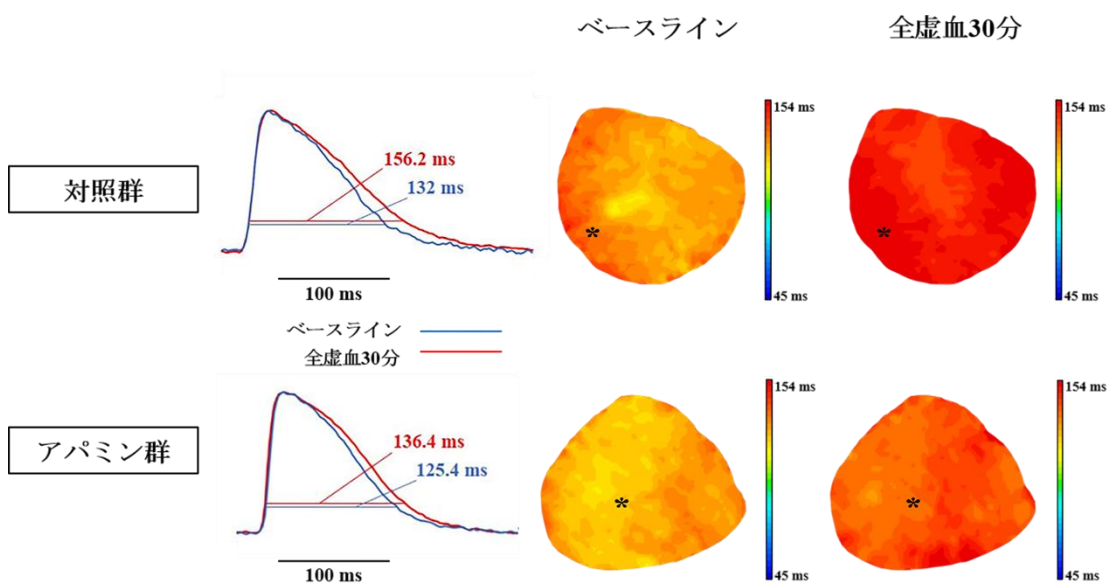


図 10A : 虚血による代表的な左室のカルシウムトランジェント変化と CaTD₈₀ マップ（上段：対照群、下段：アパミン投与群）

心尖部より 300 ms でペーシング。マップ上の*は図左の代表波形記録部位。

統計学的検討においては、アパミン投与群で全虚血 30 分での CaTD_{80} 、また CaTD_{80} の延長度 (ΔCaTD_{80}) に有意な抑制が認められた [CaTD_{80} (全虚血 30 分) : 141.8 ± 2.198 ms (対照群、 $n = 10$) vs. 131.8 ± 2.487 ms (アパミン群、 $n = 8$)、 $p = 0.0082$ 、 ΔCaTD_{80} : 13.62 ± 2.121 ms (対照群) vs. 5.500 ± 1.793 ms (アパミン群)、 $p = 0.0121$] (図 10B)。

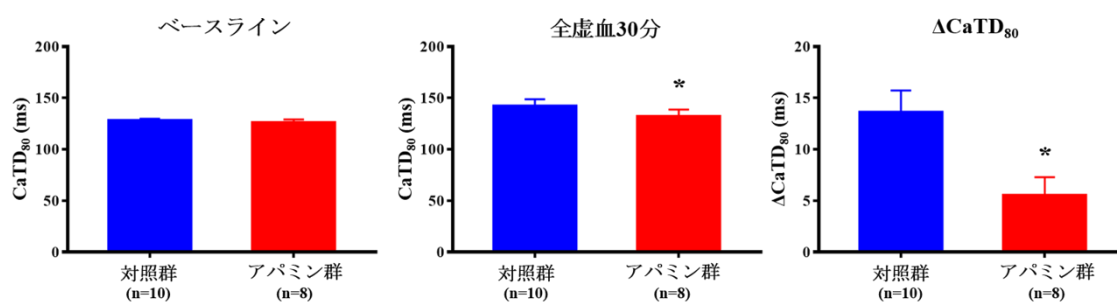


図 10B : 虚血に伴う CaTD_{80} 短縮に対するアパミンの効果

* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定 : Student's t -test を用いた。

5.2.3. 虚血によるカルシウムトランジェント時間と活動電位持続時間の差の変化およびそれに対するアパミンの効果

図 11A に左室の代表的な全虚血中のカルシウムトランジェントと活動電位の重ね合わせ波形を、図 11B にカルシウムトランジェント時間と活動電位持続時間の差である $\text{CaTD}_{80}-\text{APD}_{80}$ のマップを示す（上段：対照群、下段：アパミン群）。代表波形における緑線が $\text{CaTD}_{80}-\text{APD}_{80}$ に相当する部分である。両群ともにベースラインと比較し、全虚血 30 分後にカルシウムトランジェント時間と活動電位持続時間の差に開大を認めるが、アパミン群では対照群と比較しその開大度が小さいことが見て取れる。

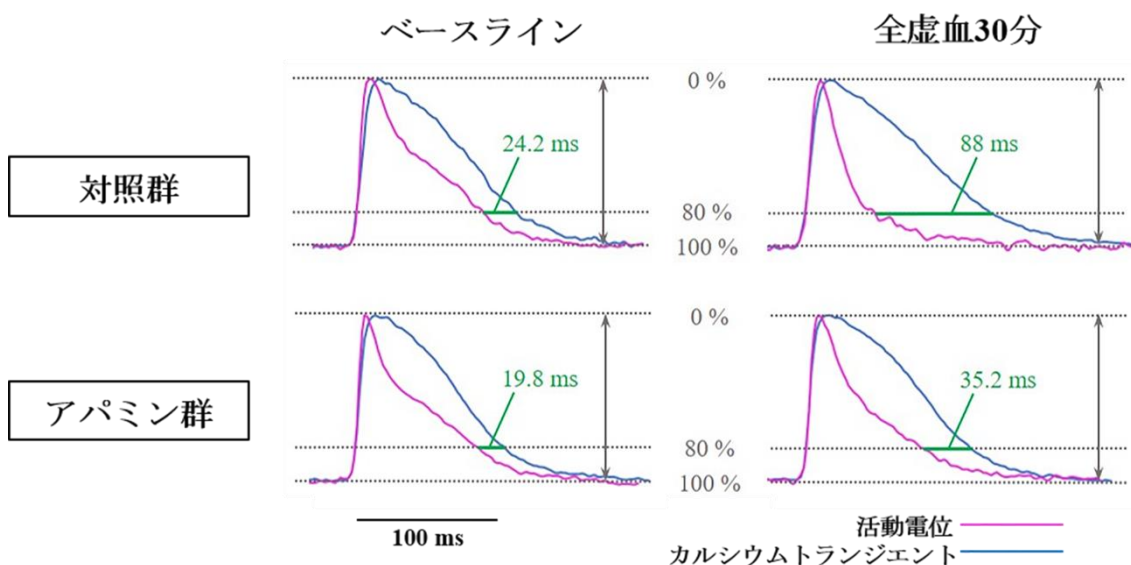


図 11A : 虚血による代表的な左室のカルシウムトランジェントと活動電位の重ね合わせ波形（上段：対照群、下段：アパミン投与群）
心尖部より 300 ms でペーシング。両群とも図 2、3 と同一個体。緑線は CaTD_{80} と APD_{80} の差を示している。

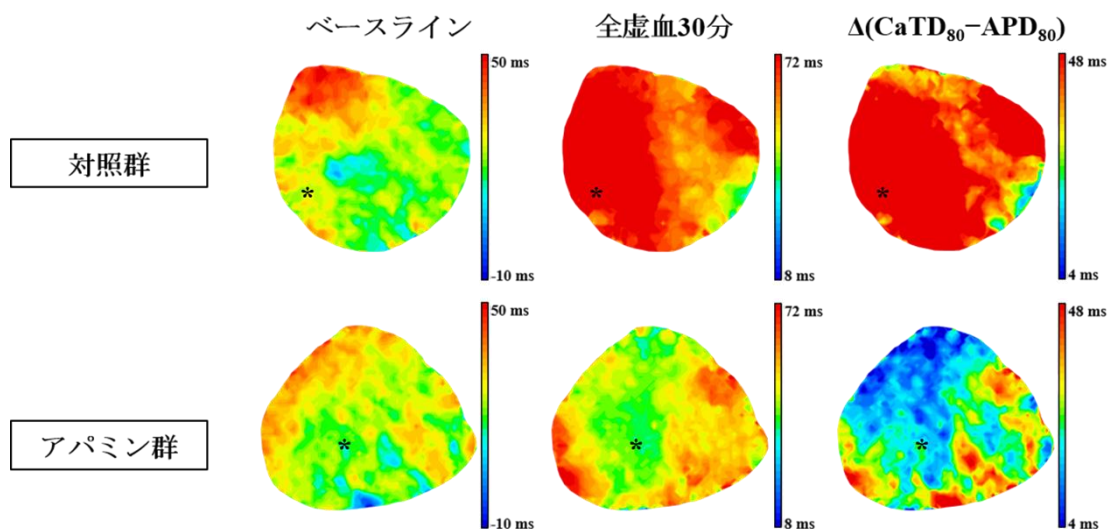


図 11B : ベースラインと全虚血 30 分の $\text{CaTD}_{80}\text{-APD}_{80}$ マップ、および $\Delta(\text{CaTD}_{80}\text{-APD}_{80})$ マップ (上段 : 対照群、下段 : アパミン投与群) マップ上の*は図 4A の代表波形記録部位。

また統計学的検討においては、アパミン投与群で全虚血 30 分での $\text{CaTD}_{80}\text{-APD}_{80}$ 、また $\text{CaTD}_{80}\text{-APD}_{80}$ の開大度 ($\Delta(\text{CaTD}_{80}\text{-APD}_{80})$) に有意な抑制が認められた [$\text{CaTD}_{80}\text{-APD}_{80}$ (全虚血 30 分) : 53.31 ± 6.330 ms (対照群、 $n = 10$) vs. 29.88 ± 4.483 ms (アパミン群、 $n = 8$)、 $p = 0.0111$ 、 $\Delta(\text{CaTD}_{80}\text{-APD}_{80})$: 36.92 ± 4.068 ms (対照群) vs. 9.747 ± 4.738 ms (アパミン群)、 $p = 0.0005$] (図 11C)

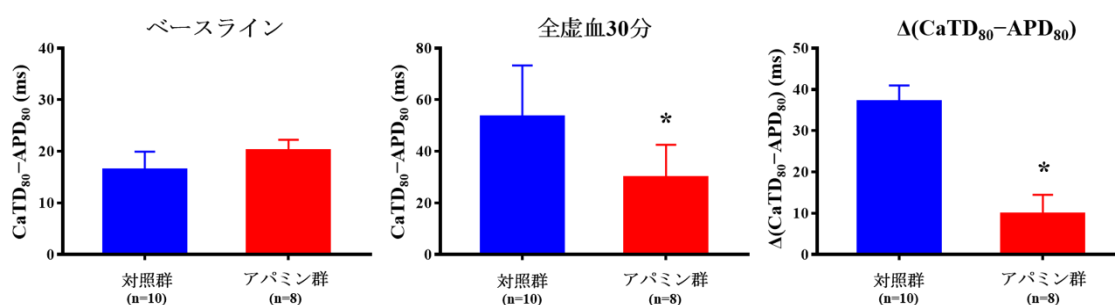


図 11C : 虚血に伴う $\text{CaTD}_{80}\text{-APD}_{80}$ 開大に対するアパミンの効果

* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定 : Student's t -test を用いた。

5.2.4. 虚血による催不整脈機序とそれに対するアパミンの効果

続いて虚血による心室性不整脈の誘発率と誘発閾値に関して、対照群とアパミン群で比較検討を行った (図 12A)。対照群では 10 例中 10 例 (100%) で心室性不整脈の誘発が見られたが、アパミン群では 8 例中 3 例 (37.5%) に留まり、アパミンによる有意な抗不整脈効果が見られた ($p = 0.0065$)。また心室性不整脈の誘発閾値に関しては、アパミン群で高い傾向があるものの、統計学的に有意差は見られなかった ($p = 0.1451$)。

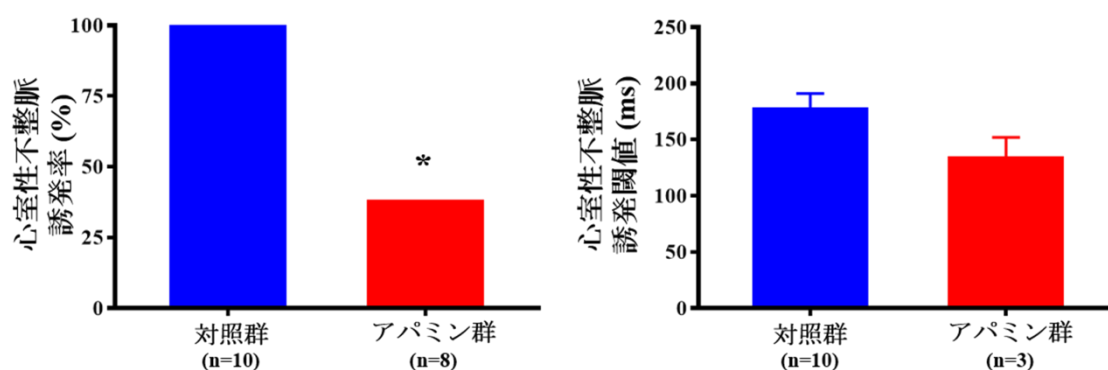


図 12A : 虚血に伴う心室性不整脈の誘発率と誘発閾値、およびそれに対するアパミンの効果

誘発率は対照群 (n = 10) とアパミン群 (n = 8) で比較し、そのうち心室性不整脈が誘発された対照群 (n = 10) とアパミン群 (n = 3) で誘発閾値を比較した。* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定 : Fisher の正確検定 (誘発率)、Student's *t*-test (誘発閾値) を用いた。

心室性不整脈の起こり始めを捕らえるため、オプティカル撮像のタイミングに合わせた 5 から 12 拍の短い頻拍ペーシングで心室性不整脈誘発を試みた。5 個体で計 99 回の誘発を行い心室性不整脈は 21 回誘発され、そのうち 14 回でオプティカルでの起こり始めの撮像に成功した。心室性不整脈のほとんどは心室細動であり (12 例、85.7%)、他 2 例がリエントリー機序で生じた心室頻拍であった。12 例の心室細動のうち、11 例は異所性興奮による撃発活動を起源として発生しており、残り 1 例はペーシング刺激の影響により起源が判別困難であった。4 例 (36.4%) は心尖部側から、7 例 (63.6%) は心基部側からの異所性興奮であった。

図 12B に代表的な心室性不整脈（心室細動）発生場面を捕らえた心電図およびオプティカルマッピング像を示す。心電図を見るとペーシングを開始して4拍目までは1:1補足をしているが、ペーシング5拍目は心室性期外収縮に伴い無補足ペーシングとなっており、そこから引き続き心室細動へと移行している。またその際の活動電位波形を見ると、5拍目の期外収縮が遅延後脱分極電位（DAD）であることがわかる。

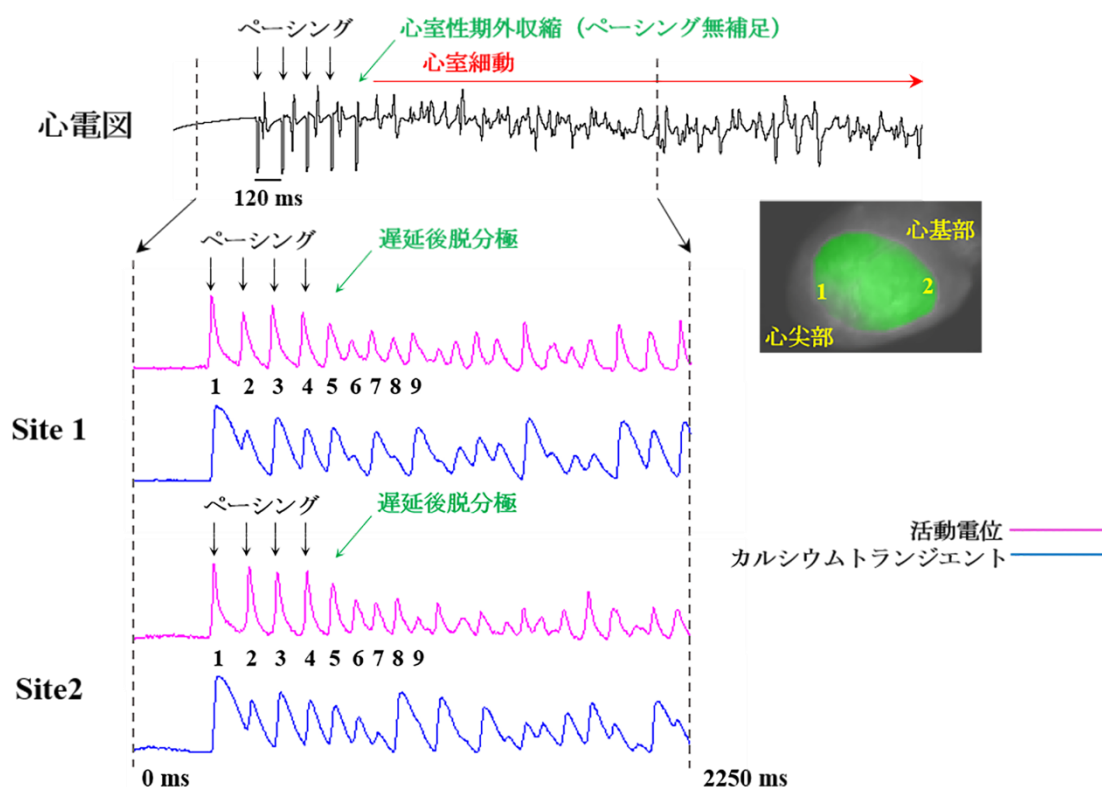


図 12B：代表的な心室性不整脈（心室細動）発生場面

活動電位およびカルシウムトランジエント波形は、付随する左室前面のマップ上の Site 1（心尖部側）および Site 2（心基部側）で記録した。

図 12C に同イベントの 4 から 9 心拍目の活動電位興奮伝播の様子を示す。4 心拍目は心尖部からペーシング補足に伴う興奮の発生が見られ、それが心基部方向へ伝播している。5 心拍目も心尖部側から興奮が発生しているが 4 心拍目の発生部位とは異なっており（異所性興奮 1）、やや遅れて心基部側からも興奮が発生し（異所性興奮 2）、互いの興奮が心中間部で衝突している。その後、興奮の発生やその伝播はランダムに生じている。心室細動で見られた 11 例の撃発活動のうち、約半数の 6 例（54.5%）で図 12C のような複数個所からの興奮が見られた。

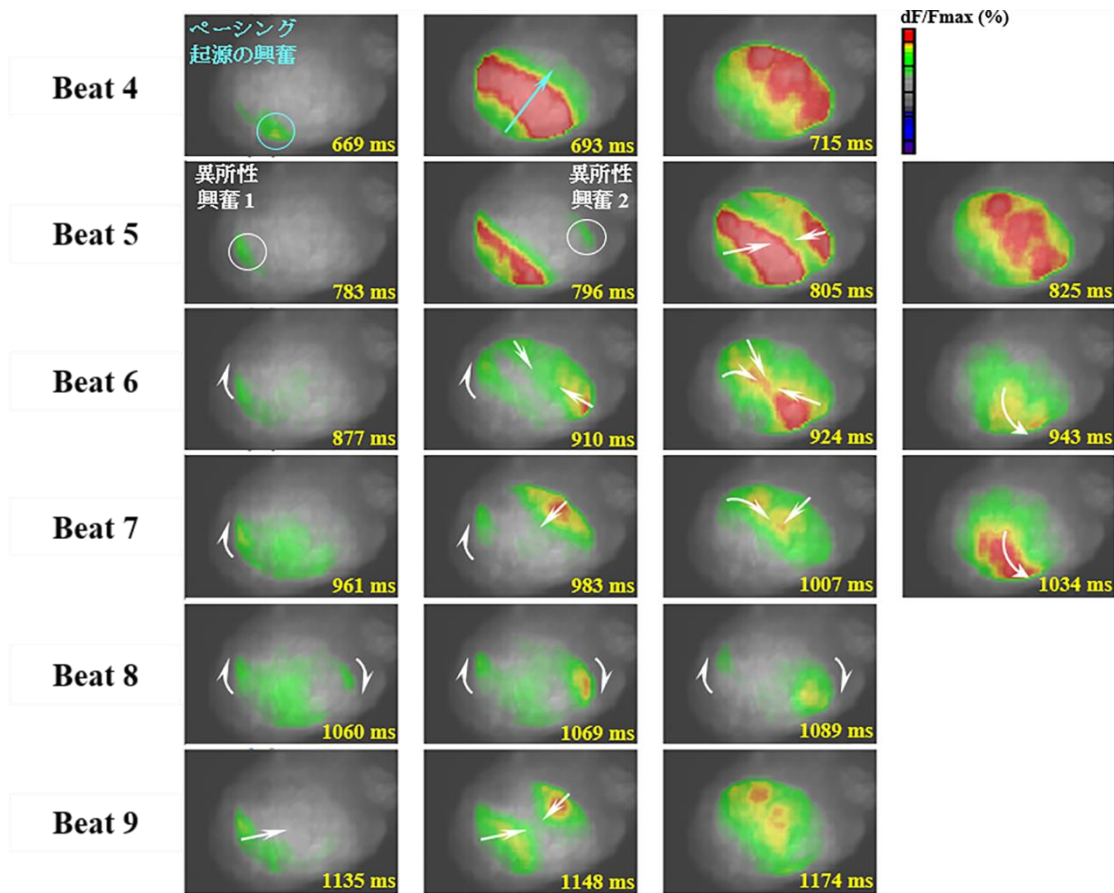


図 12C : 代表的な心室性不整脈（心室細動）発生時の活動電位興奮伝播の様子

図 12D は同イベントの活動電位およびカルシウムトランジェントの重ね合わせ波形を示す。遅延後脱分極電位（5 心拍目）の前の 4 拍を見ると、活動電位がいずれも完全に再分極してから次の脱分極へと移行しているのに対し、カルシウムトランジェントは不十分な再分極のまま次の脱分極へと移っている。

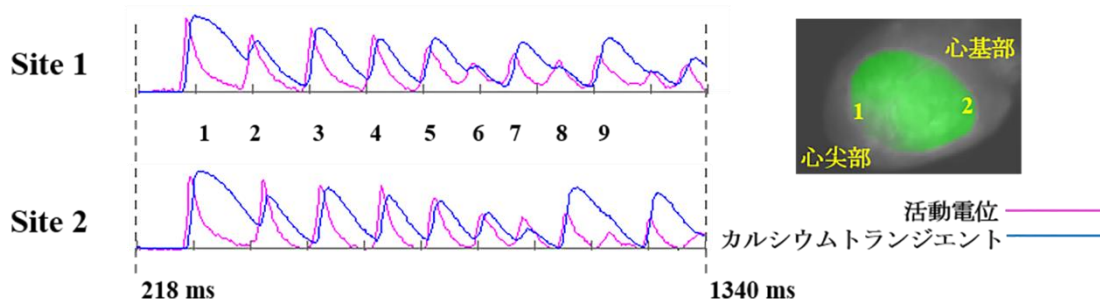


図 12D：代表的な心室性不整脈（心室細動）発生時の活動電位およびカルシウムトランジェントの重ね合わせ波形

また不整脈発生機序との関連として、活動電位およびカルシウムトランジェントのオルタナンス（それぞれ APD-ALT、CaT-ALT とする）についても解析を行った。APD-ALT については対照群、アパミン群とも誘発率が低く、統計学的有意差もつかなかった ($p = 1.0$) (図 12E)。

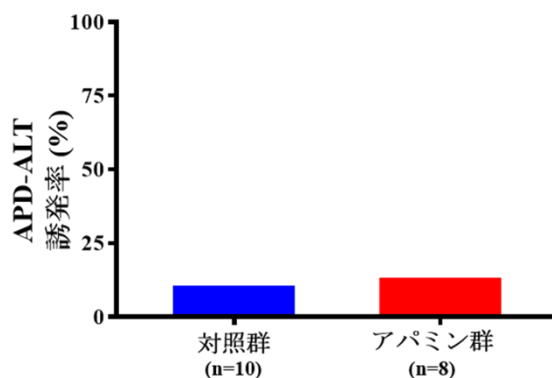


図 12E：虚血における APD-ALT 誘発率とそれに対するアパミンの効果

* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定：Fisher の正確検定を用いた。

CaT-ALT に関しては、その誘発率は統計学的に同程度であった ($p = 0.3137$) が、誘発閾値については有意にアパミン群で高かった [CaT-ALT 誘発閾値 : 193.3 ± 20.28 ms (対照群、 $n = 6$) vs. 128.6 ± 5.084 ms (アパミン群、 $n = 7$)、 $p = 0.0067$] (図 12F)。

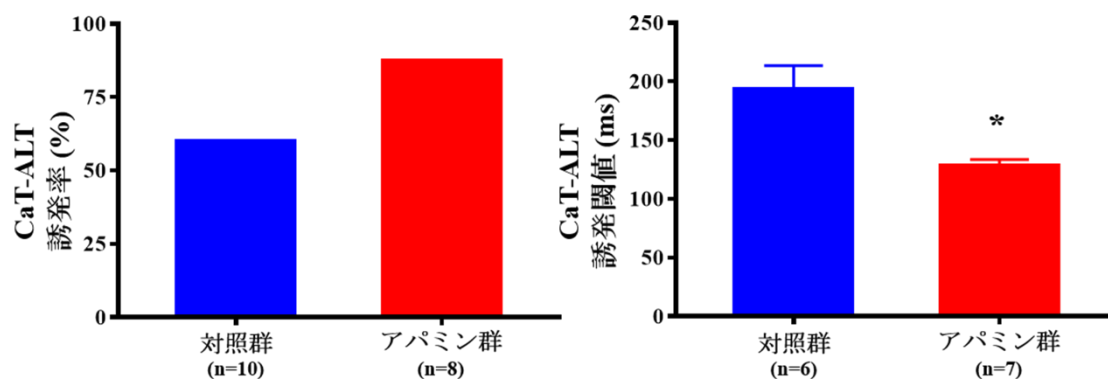


図 12F : 虚血における CaT-ALT 誘発率と誘発閾値、およびそれに対するアパミンの効果

誘発率は対照群 ($n = 10$) とアパミン群 ($n = 8$) で比較し、そのうち CaT-ALT が誘発された対照群 ($n = 6$) とアパミン群 ($n = 7$) で誘発閾値を比較した。

* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定 : Fisher の正確検定 (誘発率)、Student's *t*-test (誘発閾値) を用いた。

5.2.5. 虚血によるカルシウム動態に関わるパラメーターの変化とそれに対するアパミンの効果

次に虚血によるカルシウム動態に関わる各種パラメーターの変化と、それに対するアパミンの効果を検証した。

図 13A に虚血に伴うカルシウムトランジェントの時定数（以下、 τ ）の変化とその代表的な波形を示す。対照群と比し、アパミン群では全虚血 30 分での τ が短く、虚血に伴う τ 延長 ($\Delta\tau$) が有意に抑制されていた [τ (全虚血 30 分) : 47.82 ± 1.357 ms (対照群、 $n = 10$) vs. 41.76 ± 1.523 ms (アパミン群、 $n = 8$)、 $p = 0.0090$ 、 $\Delta\tau$: 6.649 ± 1.306 ms (対照群) vs. 0.6720 ± 0.9513 ms (アパミン群)、 $p = 0.0028$]。

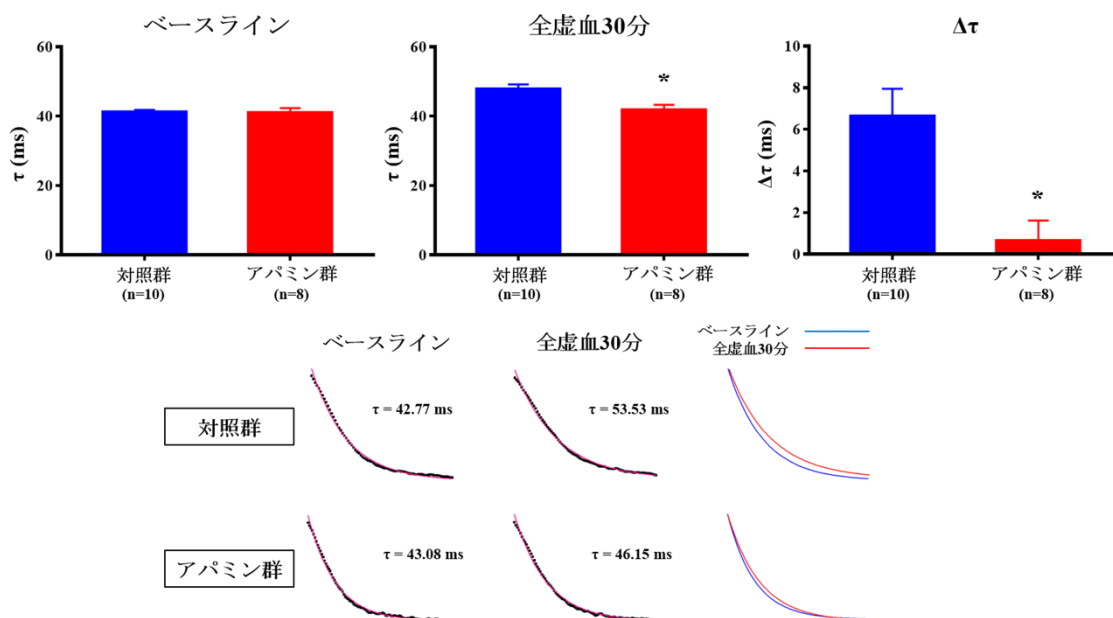


図 13A : 虚血におけるカルシウムトランジェントの時定数 (τ) の変化とそれに対するアパミンの効果、およびそれぞれの代表波形

* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定 : Student's t -test を用いた。

また図 13B に虚血に伴う T_{50} の変化とその代表的な波形を示す。両群でベースライン、全虚血 30 分の値に有意差はなく、虚血に伴う ΔT_{50} はアパミン群で小さい傾向にあったが統計学的有意差は認めなかった ($p = 0.2048$)。

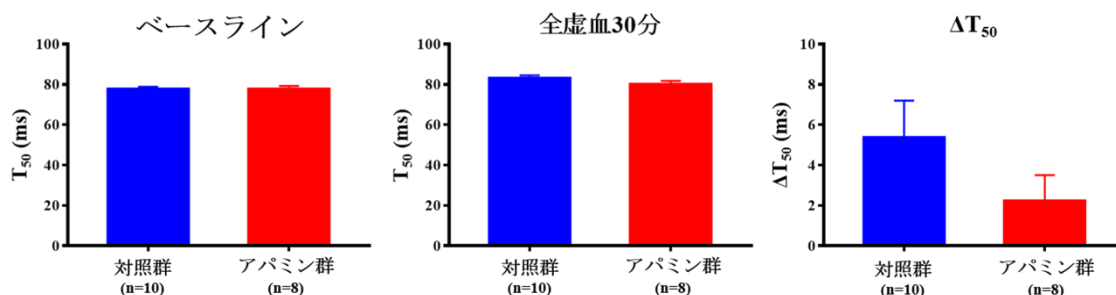


図 13B : 虚血における T_{50} の変化とそれに対するアパミンの効果

* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定 : Student's t -test を用いた。

図 13C は虚血に伴う 30%および 80%再分極したカルシウムトランジェント時間の比 ($\text{CaTD}_{30}/\text{CaTD}_{80}$) の変化を表している。ベースラインから全虚血 30 分後かけて対照群では $\Delta \text{CaTD}_{30}/\text{CaTD}_{80}$ が減少するのに対し、アパミンではむしろ増大傾向であった ($p = 0.0497$)。

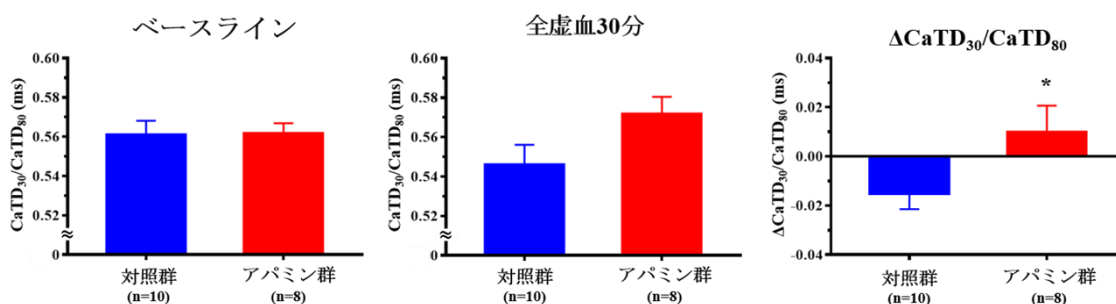


図 13C : 虚血における $\text{CaTD}_{30}/\text{CaTD}_{80}$ の変化とそれに対するアパミンの効果

* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定 : Student's t -test を用いた。

最後に頻拍ペーシング時の拡張期細胞内カルシウムレベルの上昇度を対照群とアパミン群で比較を行った (図 13D)。対照群と比較し、アパミン群では拡張期のカルシウムレベル上昇度が有意に抑制されていた [拡張期細胞内カルシウムレベル上昇度: $10.44 \pm 1.641\%$ (対照群, $n = 5$) vs. $5.73 \pm 0.663\%$ (アパミン群, $n = 5$)、 $p = 0.0287$]。

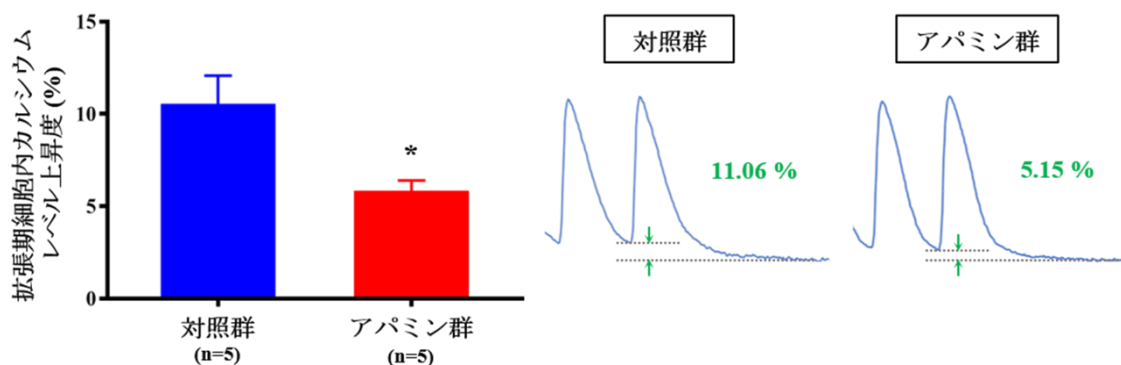


図 13D : 虚血における拡張期細胞内カルシウムレベル上昇度とそれに対するアパミンの効果、およびその代表波形

いずれの個体もペーシングサイクル長 190 ms でペーシングした時の値を用いた。* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定: Student's *t*-test を用いた。

5.2.6. 虚血による電気生理学変化および催不整脈性に対する薬物効果：

SK チャンネル遮断薬と SK 非選択性カリウムチャンネル遮断薬の比較

活動電位の再分極過程にはさまざまなカリウムチャンネルが関与しているため、活動電位持続時間短縮を抑制しうる他のカリウムチャンネル遮断薬に関しても、虚血に伴う催不整脈性および電気生理学的变化への影響を検証した。SK チャンネル遮断薬としてはアパミン (SK チャンネルのポアブロッカー) のほかに NS8593 (SK チャンネルのカルシウム感受性モジュレーター) を使用した。また SK 非選択性カリウムチャンネル遮断薬として、グリベンクラミド (K_{ATP} チャンネルブロッカー) および 4-AP (I_{to} ブロッカー) を用いた。統計学的検討はいずれも対照群との比較を行った。

図 14A は心室性不整脈の誘発率を示している。対照群では全例で心室性不整脈が誘発されたのに対し、アパミン群では 8 例中 3 例 (37.5%)、NS8593 群では 4 例中 1 例 (25%) と、SK チャンネル遮断薬では有意に心室性不整脈誘発が抑制された [アパミン群 : $p = 0.0065$ 、NS8593 群 : $p = 0.0110$]。一方、グリベンクラミド群および 4-AP 群では抗不整脈効果は認めなかった。

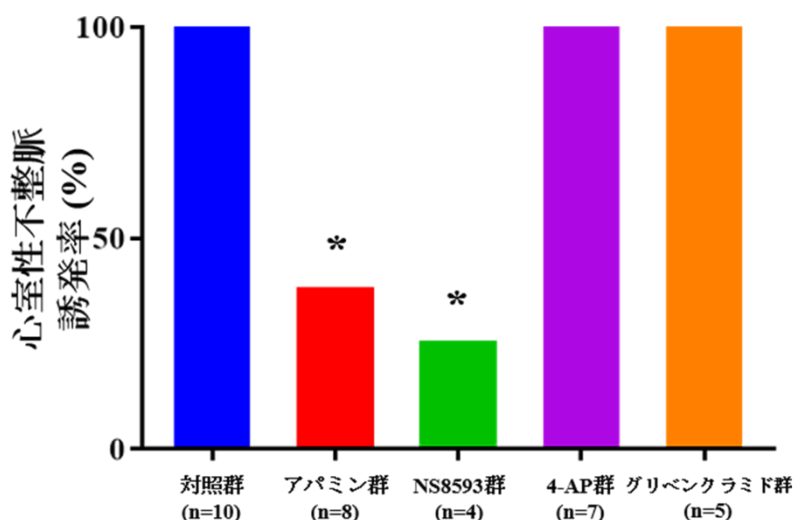


図 14A : 虚血に伴う心室性不整脈誘発率およびそれに対するカリウムチャンネル遮断薬の効果

* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定 : Fisher の正確検定を用いた。

図 14B は虚血に伴う APD₈₀ の変化度 (Δ APD₈₀) を示している。対照群と比較し、アパミン群では有意に Δ APD₈₀ 短縮が抑制され ($p = 0.0409$)、NS8593 群ではむしろ Δ APD₈₀ の延長が見られた ($p = 0.0027$)。また 4-AP 群では対照群と比しより大きな Δ APD₈₀ 延長が認められた ($p = 0.0010$)。

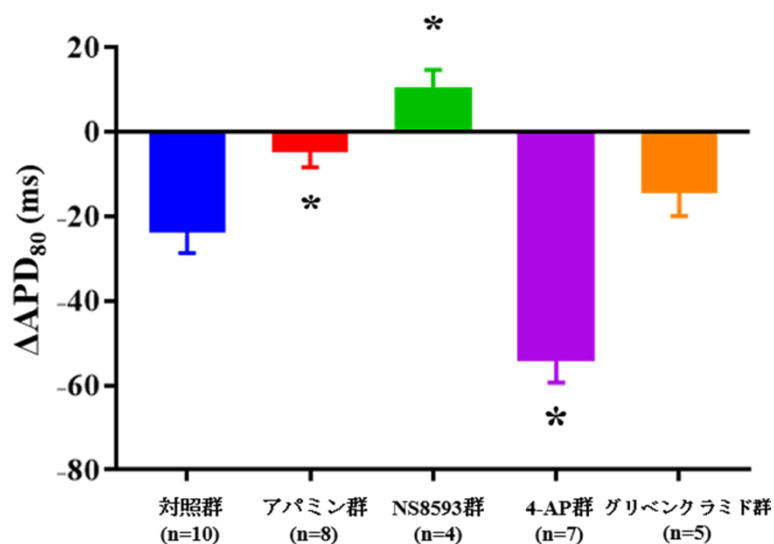


図 14B : 虚血に伴う APD₈₀ の変化およびそれに対するカリウムチャンネル遮断薬の効果

* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定 : one-way ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた。

図 14C は虚血に伴う CaTD_{80} の変化度 (ΔCaTD_{80}) を示している。対照群と比較し、アパミン群と 4-AP 群では有意な ΔCaTD_{80} の延長抑制が認められた [アパミン群 : $p = 0.0326$ 、4-AP 群 : $p = 0.0280$]。

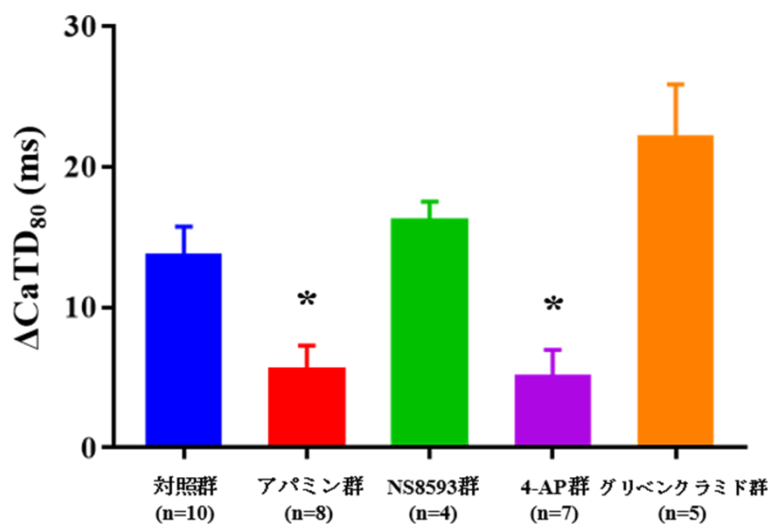


図 14C : 虚血に伴う CaTD_{80} の変化およびそれに対するカリウムチャンネル遮断薬の効果

* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定 : one-way ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた。

図 14D は虚血に伴う $\text{CaTD}_{80}\text{-APD}_{80}$ の変化度 ($\Delta(\text{CaTD}_{80}\text{-APD}_{80})$) を示している。対照群と比較し、アパミン群と NS8593 群では有意な $\Delta(\text{CaTD}_{80}\text{-APD}_{80})$ の開大抑制が認められた [アパミン群 : $p = 0.0031$ 、4-AP 群 : $p = 0.0081$]。

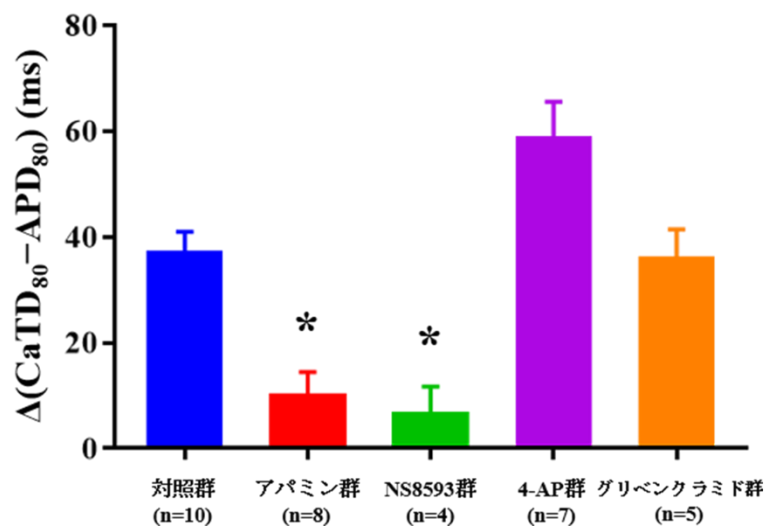


図 14D : 虚血に伴う $\text{CaTD}_{80}\text{-APD}_{80}$ の変化およびそれに対するカリウムチャンネル遮断薬の効果

* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定 : one-way ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた。

図 14E は虚血に伴うカルシウムトランジェントの時定数の変化度 ($\Delta\tau$) を示している。 $\Delta\tau$ に関しては、唯一アパミン群のみ対照群と比較し有意な延長抑制効果が認められた ($p = 0.0028$)。

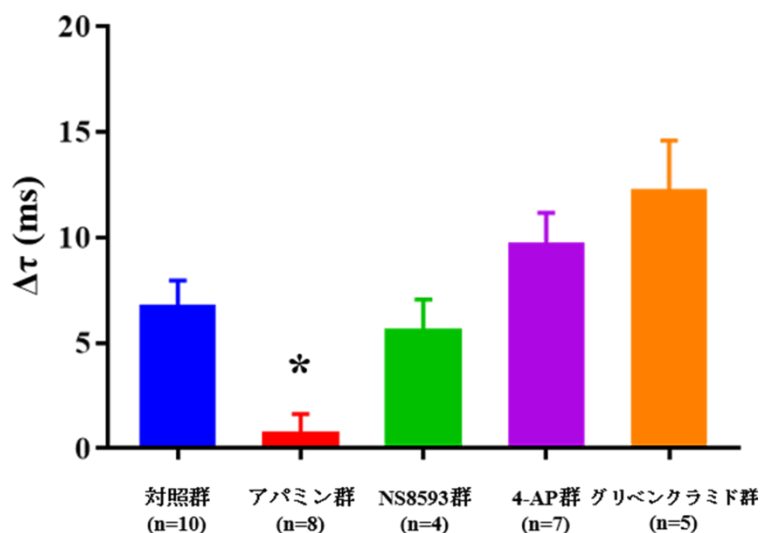


図 14E : 虚血に伴うカルシウムトランジェントの時定数 (τ) の変化およびそれに対するカリウムチャンネル遮断薬の効果

* $p < 0.005$ vs. 対照群。検定 : one-way ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた。

6. 考察

我々は本研究を通じて、肥大心では急性虚血において SK チャネルが活性化し撃発活動を主体とした機序で催不整脈性に関与していること、SK チャネル遮断薬が APD の短縮だけでなくカルシウム動態にも影響を及ぼすことで抗不整脈効果を発揮すること、またこのような電気生理学的変化は他のカリウムチャネル遮断薬では得られないことを明らかにした。

6.1. SK チャネル遮断薬とカルシウム動態

病的心における SK チャネル遮断薬の電気生理学的影響についてはこれまで複数の報告がある。それらの研究で使用されているモデルは不全心(Bonilla et al., 2014; Chang et al., 2013a; Chang et al., 2013b; Chua et al., 2011; Hsieh et al., 2013) や虚血心(Gui et al., 2013; Lee et al., 2013)であり、主として見られる電気生理学的変化は APD の延長や虚血による APD 短縮の抑制とされる。しかしながら、SK チャネルとカルシウム動態との関連性についてはこれまではっきりと述べられてはいない。我々の研究で、SK チャネル遮断薬であるアパミンが APD 短縮を抑制するだけでなく、カルシウム動態異常にも影響を及ぼすことが明らかになった。特にアパミンは①CaTD や CaTD-APD の開大 (Ca_i/V_m uncoupling 増加)、 τ の延長を抑制し、②拡張期細胞内カルシウムレベルを低下させ、③CaT-ALT 誘発閾値を上昇させた。

これらのパラメーターの中で、特に Ca_i/V_m uncoupling 増加の抑制が抗不整脈効果につながるカルシウム動態異常是正のキーポイントの一つと考えられた。 Ca_i/V_m uncoupling の増加は活動電位の再分極後に依然細胞内カルシウム濃度が高い状態が続くことを意味する。この電気生理学的に不安定な時間は、NCX を介した内向き電流の増加とナトリウム過負荷を生じ、DAD の発生を促すとされる(Lang et al., 2015; Lou et al., 2011; Ogawa et al., 2009; Tang et al., 2012)。Chua らのウサギの不全心を用いた実験で、除細動後の Ca_i/V_m uncoupling 増加がその後の心室細動再発に関係していたと報告している(Chua et al., 2011)。また τ も NCX と関連したパラメーターの一つとされている(Lang et al., 2015; Laurita et al., 2003)。NCX は主にカルシウム流出の遅い時相に関与するとされ、単一指数関数にて定量化される。Camacho らによれば、ラットの虚血心を用いた実験で虚血の時間経過とともに τ は延長し、これは急性虚血に伴う NCX の障害を示唆していると報告されている(Camacho et al., 1994)。本研究ではアパミン投与により Ca_i/V_m uncoupling 増加と τ 延長の抑制効果を認めており、これらは SK チャネル遮断薬による虚血に伴うカルシウム動態異常、特に NCX への影響を示唆するものと考えられる。

一方で我々は、直接細胞内カルシウム濃度を計測することが困難であったため、代わりとして虚血状態における抗頻拍ペーシングに伴う拡張期のカルシウムレベルの上昇度を定量化し評価を行った(Laurita et al., 2003)。より高い拡張期カルシウムレベル上昇はより高い細胞内カルシウム濃度を意味し、さらにはカルシウム過負荷や細胞内カルシウムの流出機能の障害を示唆する。今回の研究で、同じペーシングサイクル長での拡張期カルシウムレベル上昇度を対照群とアパミン群で比較したとき、後者の方が上昇度が有意に小さいことが明らかとなった。これも SK チャネル遮断薬のカルシウム動態への影響を示唆する所見の一つと考えられる。

6.2. 肥大心の急性虚血における心室性不整脈発生のメカニズム

SK チャネル遮断薬と心室性不整脈の関連性について病的心を用いた報告は過去にいくつかあるが、その影響は抗不整脈性(Chua et al., 2011; Gui et al., 2013; Hsieh et al., 2013)と催不整脈性(Bonilla et al., 2014; Chang et al., 2013a)のどちらも報告があり、未だ結論は出していない。

今回の我々の研究では、肥大心の急性虚血においてカルシウム過負荷に伴う撃発活動を契機に生じた心室性不整脈に対し、SK チャネル遮断薬であるアパミンが抗不整脈性に作用することが確認された。特に肥大心や不全心において、NCX の障害は筋小胞体 (SR: sarcoplasmic reticulum) カルシウム ATP ポンプ (SERCA: SR Ca^{2+} -ATPase) のダウンレギュレーションと共に拡張期カルシウム濃度の上昇や τ の延長、頻拍時の細胞内カルシウム濃度上昇を生じさせると言われている(Baartscheer et al., 2003; Hasenfuss, 1998)。肥大心においては SK チャネル活性化(Mizukami et al., 2015; Tenma et al., 2018)だけでなく、そのような細胞内カルシウム濃度の上昇も Ca_i/V_m uncoupling 増加に寄与することで、撃発活動を誘発していると考えられる。

一方で、DAD の発生に寄与する SK チャネルの活性化には筋小胞体からの自発的なカルシウム放出が重要であるという報告(Terentyev et al., 2014)や、心筋梗塞モデルで梗塞領域近傍からカルシウムの興奮が活動電位の興奮に先行する

“ Ca^{2+} prefluorescence” という所見を伴う心室性期外収縮が心室細動を引き起こしたという報告(Chou et al., 2007)がある。今回我々の観察で、心室性不整脈が起こる直前の拡張期のカルシウムレベル上昇が維持されており、カルシウムを主体とした興奮が催不整脈機序を担っていると考えられたが、一方で前述のような自発的な筋小胞体からのカルシウム放出や “ Ca^{2+} prefluorescence” といった現象は捕らえられなかった。この原因として2つの可能性が考えられた。第一に、今回用いたモデルが“全”虚血であるため、冠動脈結紮を用いた局所の虚血モデルなどと比べ組織学的変化が異なっている可能性である。特に虚血急性

期 15 分から 30 分に生じる撃発活動は主に梗塞境界域から発生すると言われて
いる(Di Diego and Antzelevitch, 2011)。全虚血モデルは局所の虚血モデルより均
一な変化を来しており、明確な虚血と非虚血の境界がないため、今回の限られ
た観察領域の中で局所の興奮を捕らえるのは困難であった可能性が考えられ
る。第二に、心室性不整脈の契機となる撃発活動が心外膜側ではなく、心筋中
層や心内膜側から生じている可能性である。Katra と Laurita は、自発的な筋小
胞体からのカルシウム放出やカルシウム契機の撃発活動が心外膜側よりも心内
膜側で頻回に観察されたと報告している(Katra and Laurita, 2005)。我々の実験で
は心外膜面の観察のみにとどまっているため、心内膜側から生じたカルシウム
源生の興奮を捕らえられなかった可能性がある。

6.3. SK チャネル遮断薬と SK 非選択性カリウムチャネル遮断薬

我々はアパミンのほか、活動電位に影響を及ぼしうる他の SK チャネル遮断
薬および SK 非選択性カリウムチャネル遮断薬を使用し、APD 短縮を含めた電
気生理学的変化や心室性不整脈の誘発性に対する影響を評価した。今回の研究
において抗不整脈作用は SK チャネル遮断薬（アパミンと NS8593）のみに認め
られ、CaTD-APD 開大と τ 延長の抑制効果をとともに認めたのはアパミンのみで
あった。

アパミンが SK チャネルのポアブロッカーであるのに対し、NS8593 は SK チ
ャネルのネガティブモジュレーターであり、カルシウムに対する SK チャネル
の濃度反応曲線を右方シフトさせると言われている(Strobaek et al., 2006)。
NS8593 は 3 つの SK チャネルのサブタイプ (SK1-3) を同等にブロックする。
過去の研究では心房細動に対する抗不整脈効果が報告されているが(Diness et
al., 2010; Qi et al., 2014; Skibsbye et al., 2014)、心室性不整脈や病的心に対する効
果は確認されていない。我々の研究で NS8593 は虚血に伴う APD 短縮を抑制す
るところかむしろ APD の延長を来した。一方で Δ CaTD と Δ τ の変化について
は NS8593 群と対照群で有意差がなかった。APD の延長に関してはアパミンと
比べて強力なチャネル遮断作用を示唆する可能性があるが、NS8593 による心
室への電気生理学的作用についてはまだ十分に明らかではなく、更なる検証が
必要と考えられる

SK 非選択性カリウムチャネル遮断薬として、グリベンクラミドと 4-AP が
用いられた。グリベンクラミドは K_{ATP} チャネル遮断薬である。 K_{ATP} チャネルは
虚血に伴う ATP 減少によって活性化するカリウムチャネルの一つで、虚血によ
る電気生理学的変化および心室性不整脈に重要な役割を果たす(Billman, 1994;
Wilde et al., 1990)。しかしながら、過去の我々の報告同様(Tenma et al., 2018)、
本研究においてもグリベンクラミドは抗不整脈効果も有意な APD 短縮抑制効

果も示さず、この一因として肥大心における K_{ATP} チャネルの障害が考えられた (Shimokawa et al., 2007)。一方、4-AP は I_{to} の遮断薬であり、再分極の早期に影響するとされる (Akar and Akar, 2007)。過去にラットの虚血再灌流モデルを用いた実験で、4-AP には急性虚血の進行に伴う APD_{90} 短縮の抑制作用や抗不整脈作用が認められなかったという報告がある (Baiardi et al., 2002)。カルシウム動態への影響については述べられていないが、今回観察された肥大心の急性虚血における 4-AP の効果はこれと矛盾しない結果と考えられる。

6.4. 本研究の限界

我々は、肥大心の急性虚血においてアパミンがカルシウム動態に影響を与え、特に NCX の活動に重要な役割を果たしているとは結論付けたが、直接的に NCX の活動を評価することはできなかった。アパミンがカルシウム動態にどのようなメカニズムで影響を与えているのかも十分には解明できておらず、これらは今後の研究課題と考えられる。さらに今回の実験では心外膜面の観察しかできておらず、不整脈機序のより詳細な解明のためには心内膜面まで含めた貫壁性の観察などが必要と考えられる。また前述のように、SK チャネルの役割を語る上で電流そのものを評価できなかった点も、本研究における限界と考えられる。

7. 結論

本研究では、肥大心ラットの左室心室筋において急性全虚血時に生じる下記のような現象を確認した。

電気生理学的変化に関して

- ① 肥大心では急性虚血に伴い APD 短縮を認めるが、SK チャネル遮断薬は APD 短縮を抑制する
- ② 肥大心では急性虚血に伴い CaTD 延長を認めるが、SK チャネル遮断薬は CaTD 延長を抑制する
- ③ 肥大心では急性虚血に伴い CaTD-APD 開大を認めるが、SK チャネル遮断薬は CaTD-APD 開大を抑制する

また特にアパミンに関して

- ④ 肥大心では急性虚血に伴いカルシウムトランジェントの時定数 (τ) 延長を認めるが、アパミンは τ 延長を抑制する
- ⑤ 頻拍ペーシング時の拡張期細胞内カルシウムレベル上昇はアパミンにより抑制される

催不整脈機序に関して

- ⑥ 肥大心の急性虚血に伴う心室性不整脈誘発率は SK チャネル遮断薬により抑制される
- ⑦ 肥大心の急性虚血に生じる心室性不整脈は主として異所性興奮による撃発活動を契機として発生する

再分極に関与するカリウムチャネルの影響に関して

- ⑧ 肥大心の急性虚血に伴う心室性不整脈に対して SK チャネル遮断薬で抗不整脈性を認めたが、SK 非選択性カリウムチャネル遮断薬では認められなかった
- ⑨ 肥大心の急性虚血に伴う電気生理学的変化において、有意な APD 短縮抑制や CaTD-APD 開大抑制は SK チャネル遮断薬でのみ認められた

上記の結果は、特に肥大心の急性虚血において、その催不整脈性に SK チャネルが寄与しており、SK チャネル遮断薬であるアパミンは活動電位だけでなくカルシウム動態の異常も是正することで抗不整脈作用を発揮すること、また心室性不整脈が撃発活動を主たる契機として発生していることを明らかにした点において有意義であると考えられる。

SK チャネルは正常心の活動電位形成に寄与していないという報告もあることから、病的に特異的に作用する抗不整脈薬のターゲットになりうる可能性がある。さらに SK チャネル遮断薬はカルシウム動態を安定化させることで、抗

不整脈だけでなく細胞保護的に作用する可能性もある。一方で SK チャネルとカルシウム動態の関係性についてはまだ十分に明らかになっておらず、我々が今回主として用いたアパミンが神経毒という問題点もある(Habermann, 1984)。臨床応用の観点から、今後さらなる SK チャネルの研究とより安全な SK チャネル遮断薬の開発を期待したい。

8. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた北海道大学大学院医学研究院内科学講座循環病態内科学教室 安斉俊久教授に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました市立札幌病院循環器内科 横式尚司部長に深謝と共に厚く御礼申し上げます。重ねて、親身なご助言を頂きました北海道大野記念病院循環器内科 三山博史医師、北海道大学大学院医学研究院内科学講座循環病態内科学教室 渡邊昌也助教並びに天満太郎特任助教に深く感謝の意を表します。また、御協力をいただきました北海道大学大学院医学研究院内科学分野循環病態内科学教室 鎌田 墨医員、萩原 光医員、高橋佑美医員並びに循環病態内科学教室員の先生方に深く感謝申し上げます。また本研究の実験遂行にあたり多大なご助力をいただきました実験助手の山根美和子様、木村友紀様、また医局秘書室の皆様にも厚く御礼を申し上げます。本研究は多くの実験動物の尊い生命の犠牲の賜物であることをここに銘記いたします。

最後に、この研究生生活をあらゆる面で支えてくれた妻の愛美と息子の陽仁に心から感謝いたします。

9. 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

10. 引用文献

- Adelman, J.P., Maylie, J., and Sah, P. (2012). Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels: form and function. *Annu. Rev. Physiol.* 74, 245-269.
- Akar, J.G., and Akar, F.G. (2007). Regulation of ion channels and arrhythmias in the ischemic heart. *J. Electrocardiol.* 40, S37-41.
- Aronson, R.S. (1981). Afterpotentials and triggered activity in hypertrophied myocardium from rats with renal hypertension. *Circ. Res.* 48, 720-727.
- Baartscheer, A., Schumacher, C.A., Belterman, C.N., Coronel, R., and Fiolet, J.W. (2003). $[\text{Na}^{+}]_i$ and the driving force of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 57, 986-995.
- Baiardi, G., Carrion, A., Petrich, E.R., and Zumino, A.P. (2002). 4-Aminopyridine: effects on electrical activity during ischemia and reperfusion in perfused rat hearts. *Mol. Cell. Biochem.* 233, 85-90.
- Ben-David, J., Zipes, D.P., Ayers, G.M., and Pride, H.P. (1992). Canine left ventricular hypertrophy predisposes to ventricular tachycardia induction by phase 2 early afterdepolarizations after administration of BAY K 8644. *J. Am. Coll. Cardiol.* 20, 1576-1584.
- Billman, G.E. (1994). Role of ATP sensitive potassium channel in extracellular potassium accumulation and cardiac arrhythmias during myocardial ischaemia. *Cardiovasc. Res.* 28, 762-769.
- Bonilla, I.M., Long, V.P., 3rd, Vargas-Pinto, P., Wright, P., Belevych, A., Lou, Q., Mowrey, K., Yoo, J., Binkley, P.F., Fedorov, V.V., *et al.* (2014). Calcium-activated potassium current modulates ventricular repolarization in chronic heart failure. *PLoS One* 9, e108824.
- Camacho, S.A., Brandes, R., Figueredo, V.M., and Weiner, M.W. (1994). Ca^{2+} transient decline and myocardial relaxation are slowed during low flow ischemia in rat hearts. *J. Clin. Invest.* 93, 951-957.
- Chan, V., Fenning, A., Levick, S.P., Loch, D., Chunduri, P., Iyer, A., Teo, Y.L., Hoey, A., Wilson, K., Burstow, D., *et al.* (2011). Cardiovascular changes during maturation and ageing in male and female spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 57, 469-478.
- Chang, P.C., Hsieh, Y.C., Hsueh, C.H., Weiss, J.N., Lin, S.F., and Chen, P.S. (2013a). Apamin induces early afterdepolarizations and torsades de pointes ventricular arrhythmia from failing rabbit ventricles exhibiting secondary rises in intracellular calcium. *Heart Rhythm* 10, 1516-1524.
- Chang, P.C., Turker, I., Lopshire, J.C., Masroor, S., Nguyen, B.L., Tao, W., Rubart, M.,

- Chen, P.S., Chen, Z., and Ai, T. (2013b). Heterogeneous upregulation of apamin-sensitive potassium currents in failing human ventricles. *J. Am. Heart Assoc.* 2, e004713.
- Chou, C.C., Zhou, S., Hayashi, H., Nihei, M., Liu, Y.B., Wen, M.S., Yeh, S.J., Fishbein, M.C., Weiss, J.N., Lin, S.F., *et al.* (2007). Remodelling of action potential and intracellular calcium cycling dynamics during subacute myocardial infarction promotes ventricular arrhythmias in Langendorff-perfused rabbit hearts. *J. Physiol.* 580, 895-906.
- Chua, S.K., Chang, P.C., Maruyama, M., Turker, I., Shinohara, T., Shen, M.J., Chen, Z., Shen, C., Rubart-von der Lohe, M., Lopshire, J.C., *et al.* (2011). Small-conductance calcium-activated potassium channel and recurrent ventricular fibrillation in failing rabbit ventricles. *Circ. Res.* 108, 971-979.
- Di Diego, J.M., and Antzelevitch, C. (2011). Ischemic ventricular arrhythmias: experimental models and their clinical relevance. *Heart Rhythm* 8, 1963-1968.
- Diness, J.G., Sorensen, U.S., Nissen, J.D., Al-Shahib, B., Jespersen, T., Grunnet, M., and Hansen, R.S. (2010). Inhibition of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels terminates and protects against atrial fibrillation. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 3, 380-390.
- Fedorov, V.V., Lozinsky, I.T., Sosunov, E.A., Anyukhovskiy, E.P., Rosen, M.R., Balke, C.W., and Efimov, I.R. (2007). Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. *Heart Rhythm* 4, 619-626.
- Furukawa, T., and Kurokawa, J. (2006). Potassium channel remodeling in cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 41, 753-761.
- Gui, L., Bao, Z., Jia, Y., Qin, X., Cheng, Z.J., Zhu, J., and Chen, Q.H. (2013). Ventricular tachyarrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves activation of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 304, H118-130.
- Habermann, E. (1984). Apamin. *Pharmacol. Ther.* 25, 255-270.
- Haider, A.W., Larson, M.G., Benjamin, E.J., and Levy, D. (1998). Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J. Am. Coll. Cardiol.* 32, 1454-1459.
- Hasenfuss, G. (1998). Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 37, 279-289.
- Hsieh, Y.C., Chang, P.C., Hsueh, C.H., Lee, Y.S., Shen, C., Weiss, J.N., Chen, Z., Ai, T., Lin, S.F., and Chen, P.S. (2013). Apamin-sensitive potassium current modulates action potential duration restitution and arrhythmogenesis of failing rabbit ventricles. *Circ.*

- Arrhythm. Electrophysiol. 6, 410-418.
- Kantor, P.F., Coetzee, W.A., Carmeliet, E.E., Dennis, S.C., and Opie, L.H. (1990). Reduction of ischemic K⁺ loss and arrhythmias in rat hearts. Effect of glibenclamide, a sulfonylurea. *Circ. Res.* 66, 478-485.
- Katra, R.P., and Laurita, K.R. (2005). Cellular mechanism of calcium-mediated triggered activity in the heart. *Circ. Res.* 96, 535-542.
- Koh, S.D., Dick, G.M., and Sanders, K.M. (1997). Small-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels activated by ATP in murine colonic smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 273, C2010-2021.
- Kohya, T., Kimura, S., Myerburg, R.J., and Bassett, A.L. (1988). Susceptibility of hypertrophied rat hearts to ventricular fibrillation during acute ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20, 159-168.
- Kong, I.D., Koh, S.D., Bayguinov, O., and Sanders, K.M. (2000). Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels are regulated by Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II in murine colonic myocytes. *J. Physiol.* 524 Pt 2, 331-337.
- Koyanagi, S., Eastham, C., and Marcus, M.L. (1982). Effects of chronic hypertension and left ventricular hypertrophy on the incidence of sudden cardiac death after coronary artery occlusion in conscious dogs. *Circulation* 65, 1192-1197.
- Lang, D., Holzem, K., Kang, C., Xiao, M., Hwang, H.J., Ewald, G.A., Yamada, K.A., and Efimov, I.R. (2015). Arrhythmogenic remodeling of beta2 versus beta1 adrenergic signaling in the human failing heart. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 8, 409-419.
- Laughner, J.I., Ng, F.S., Sulkin, M.S., Arthur, R.M., and Efimov, I.R. (2012). Processing and analysis of cardiac optical mapping data obtained with potentiometric dyes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303, H753-765.
- Laurita, K.R., Katra, R., Wible, B., Wan, X., and Koo, M.H. (2003). Transmural heterogeneity of calcium handling in canine. *Circ. Res.* 92, 668-675.
- Lee, Y.S., Chang, P.C., Hsueh, C.H., Maruyama, M., Park, H.W., Rhee, K.S., Hsieh, Y.C., Shen, C., Weiss, J.N., Chen, Z., *et al.* (2013). Apamin-sensitive calcium-activated potassium currents in rabbit ventricles with chronic myocardial infarction. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 24, 1144-1153.
- Levy, D., Anderson, K.M., Savage, D.D., Balkus, S.A., Kannel, W.B., and Castelli, W.P. (1987). Risk of ventricular arrhythmias in left ventricular hypertrophy: the Framingham Heart Study. *Am. J. Cardiol.* 60, 560-565.
- Lou, Q., Fedorov, V.V., Glukhov, A.V., Moazami, N., Fast, V.G., and Efimov, I.R. (2011). Transmural heterogeneity and remodeling of ventricular excitation-contraction coupling in human heart failure. *Circulation* 123, 1881-1890.

- Luqman, N., Sung, R.J., Wang, C.L., and Kuo, C.T. (2007). Myocardial ischemia and ventricular fibrillation: pathophysiology and clinical implications. *Int. J. Cardiol.* 119, 283-290.
- Mahida, S. (2014). Expanding role of SK channels in cardiac electrophysiology. *Heart Rhythm* 11, 1233-1238.
- Mizukami, K., Yokoshiki, H., Mitsuyama, H., Watanabe, M., Tenma, T., Takada, S., and Tsutsui, H. (2015). Small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ current is upregulated via the phosphorylation of CaMKII in cardiac hypertrophy from spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309, H1066-1074.
- Nagy, N., Szuts, V., Horvath, Z., Seprenyi, G., Farkas, A.S., Acsai, K., Prorok, J., Bitay, M., Kun, A., Pataricza, J., *et al.* (2009). Does small-conductance calcium-activated potassium channel contribute to cardiac repolarization? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47, 656-663.
- Nuss, H.B., and Houser, S.R. (1993). T-type Ca²⁺ current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ. Res.* 73, 777-782.
- Ogawa, M., Morita, N., Tang, L., Karagueuzian, H.S., Weiss, J.N., Lin, S.F., and Chen, P.S. (2009). Mechanisms of recurrent ventricular fibrillation in a rabbit model of pacing-induced heart failure. *Heart Rhythm* 6, 784-792.
- Qi, X.Y., Diness, J.G., Brundel, B.J., Zhou, X.B., Naud, P., Wu, C.T., Huang, H., Harada, M., Aflaki, M., Dobrev, D., *et al.* (2014). Role of small-conductance calcium-activated potassium channels in atrial electrophysiology and fibrillation in the dog. *Circulation* 129, 430-440.
- Qian, Y.W., Clusin, W.T., Lin, S.F., Han, J., and Sung, R.J. (2001). Spatial heterogeneity of calcium transient alternans during the early phase of myocardial ischemia in the blood-perfused rabbit heart. *Circulation* 104, 2082-2087.
- Qu, Z., and Weiss, J.N. (2015). Mechanisms of ventricular arrhythmias: from molecular fluctuations to electrical turbulence. *Annu. Rev. Physiol.* 77, 29-55.
- Saito, T., Sato, T., Miki, T., Seino, S., and Nakaya, H. (2005). Role of ATP-sensitive K⁺ channels in electrophysiological alterations during myocardial ischemia: a study using Kir6.2-null mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H352-357.
- Sakmann, B., and Trube, G. (1984). Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J. Physiol.* 347, 641-657.
- Shimokawa, J., Yokoshiki, H., and Tsutsui, H. (2007). Impaired activation of ATP-sensitive K⁺ channels in endocardial myocytes from left ventricular hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H3643-3649.

Sipido, K.R., Volders, P.G., de Groot, S.H., Verdonck, F., Van de Werf, F., Wellens, H.J., and Vos, M.A. (2000). Enhanced Ca^{2+} release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. *Circulation* 102, 2137-2144.

Skibsbjerg, L., Poulet, C., Diness, J.G., Bentzen, B.H., Yuan, L., Kappert, U., Matschke, K., Wettwer, E., Ravens, U., Grunnet, M., *et al.* (2014). Small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels contribute to action potential repolarization in human atria. *Cardiovasc. Res.* 103, 156-167.

Strobaek, D., Hougaard, C., Johansen, T.H., Sorensen, U.S., Nielsen, E.O., Nielsen, K.S., Taylor, R.D., Pedarzani, P., and Christophersen, P. (2006). Inhibitory gating modulation of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels by the synthetic compound (R)-N-(benzimidazol-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamine (NS8593) reduces afterhyperpolarizing current in hippocampal CA1 neurons. *Mol. Pharmacol.* 70, 1771-1782.

Tang, L., Joung, B., Ogawa, M., Chen, P.S., and Lin, S.F. (2012). Intracellular calcium dynamics, shortened action potential duration, and late-phase 3 early afterdepolarization in Langendorff-perfused rabbit ventricles. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 23, 1364-1371.

Tenma, T., Mitsuyama, H., Watanabe, M., Kakutani, N., Otsuka, Y., Mizukami, K., Kamada, R., Takahashi, M., Takada, S., Sabe, H., *et al.* (2018). Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel activation deteriorates hypoxic ventricular arrhythmias via CaMKII in cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 315, H262-H272.

Terentyev, D., Rochira, J.A., Terentyeva, R., Roder, K., Koren, G., and Li, W. (2014). Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release is both necessary and sufficient for SK channel activation in ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 306, H738-746.

Tsujii, E., Tanaka, H., Oyamada, M., Fujita, K., Hamamoto, T., and Takamatsu, T. (2003). In situ visualization of the intracellular Ca^{2+} dynamics at the border of the acute myocardial infarct. *Mol. Cell. Biochem.* 248, 135-139.

Wilde, A.A., Escande, D., Schumacher, C.A., Thuringer, D., Mestre, M., Fiolet, J.W., and Janse, M.J. (1990). Potassium accumulation in the globally ischemic mammalian heart. A role for the ATP-sensitive potassium channel. *Circ. Res.* 67, 835-843.

Xu, Y., Tuteja, D., Zhang, Z., Xu, D., Zhang, Y., Rodriguez, J., Nie, L., Tuxson, H.R., Young, J.N., Glatter, K.A., *et al.* (2003). Molecular identification and functional roles of a Ca^{2+} -activated K^{+} channel in human and mouse hearts. *J. Biol. Chem.* 278, 49085-49094.