HOKKAIDO UNIVERSITY

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［全文の要約］
Author(s)	髙橋, 雅之
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2467 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13453号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74701
Type	doctoral thesis
File Information	Masayuki_Takahashi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

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

髙橋　雅之

学位論文（要約）

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

髙橋　雅之

1. 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。　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。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、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: Na^+/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 。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。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。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。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）の短縮をもたらし、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。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、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。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。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。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。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。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。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。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。

2. 方法

肥大心モデルとして遺伝的肥大心モデルラットである Spontaneously hypertensive rat（SHR）を使用した。ランゲンドルフ灌流心を作成した後、低酸素/無グルコース 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膜電位およびカルシウムトランジエント（CaT：calcium transient）の同時評価を行い、活動電位持続時間（APD：action potential duration）や CaT 時間（CaTD：calcium transient duration）などを測定した。またカルシウム動態の評価指標としては、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エ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エ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。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。心室性不整脈誘発性および催不整脈機序解明のため、虚血作成後に心電図同時記録下で左室心尖部からの高頻度ペーシング刺激を行い、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ペーシング間隔を短縮した。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［いずれも 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。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 を用いて行い、対応のある 2 群間の平均値の差の検定は Paired *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。

3．結果

急性全虚血により APD_{80}（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、$CaTD_{80}$（カルシウムトランジエ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 $CaTD_{80}$−APD_{80} の開大を認めた。アパミンの投与によりこれらの変化は有意に抑制された。また虚血に伴い CaT 時定数（τ）の延長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が見られたが、アパミンはこれらに対して有意に抑制効果を発揮した。活動電位だけでなく、カルシウム動態へのアパミンの影響が確認された。また催不整脈性機序としては、カルシウム過負荷に伴う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%と明らかな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、SK チャネル遮断薬（アパミンと NS8593）では抗不整脈効果を認めたが、SK チャネル非選択性カリウムチャネル遮断薬（グリベンクラミドと 4-アミノピリジン）では抗不整脈効果が認められなかった。また虚血に伴う $CaTD_{80}$−APD_{80} 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。

4. 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カルシウム過負荷に伴う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が、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、観察法や採用したモデルの影響から本研究ではそれらが捕らえられなかったものと考えられた。

5. 結論

本研究は肥大心の急性虚血において、心室性不整脈がカルシウム過負荷に伴う撃発活動を主たる契機として発生していること、その催不整脈性に SK チャ

ネルが寄与していること、そして SK チャネル遮断薬が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を初めて明らかにした。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、病的心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。