HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ミトコンドリアへのカルシウム取り込み亢進による心室性不整脈の抑制に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	萩原, 光
Description	配架番号：2619
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14498号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81737
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hikaru_Hagiwara_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　萩原　光

学 位 論 文 題 名

ミトコンドリアへのカルシウム取り込み亢進による心室性不整脈の抑制に関する研究

（Enhanced calcium uptake into mitochondria mitigates ventricular arrhythmia in heart failure）

【背景と目的】人口の高齢化、生活習慣病に伴う冠動脈疾患の増加などにより、本邦の心不全患者は増加しており、今後も増加していくことが予測されている。心不全患者の予後改善のために、致死的な心室性不整脈への治療法の確立が望まれる。しかし、これまでの薬剤は心不全患者への使用において有害事象が多く、効果的な抗不整脈薬の開発は依然として今後の課題である。心不全で起きる心室性不整脈の原因の一つに、再分極終了直後に活動電位を伴う遅延後脱分極が知られている。遅延後脱分極とは、細胞内カルシウム濃度上昇の代償過程での、ナトリウム―カルシウム交換を介する脱分極である。そのような細胞内カルシウム上昇の一因として、カルシウムウェーブが知られている。カルシウムウェーブは、小胞体からのカルシウム漏出に起因するが、まず、ライアノジンレセプター II の構造的、機能的障害によって小胞体からのカルシウム漏出が起き、それが他の小胞体のライアノジンレセプターに結合し、カルシウム放出をさらに誘起させ、カルシウム放出が次々に伝播する現象である。細胞内カルシウムの調整は、小胞体、細胞膜のナトリウム―カルシウム交換機構以外にも、ミトコンドリアが関与する。カテコラミン誘発性多型性心室頻拍モデルマウスは、ライアノジンレセプター II 機能障害に起因したカルシウムウェーブによる心室性不整脈を主原因とする。最近、この動物モデルを用いて、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みを促進することによってカルシウムウェーブが抑制され、抗不整脈作用を示すことが報告された。一方、心不全患者の心室性不整脈に対して、このようなカルシウム取り込み促進が効果的であるか否かはわかっていない。本研究は、心不全においてライアノジンレセプター II から漏れ出たカルシウムをミトコンドリアに取り込ませることによる心室性不整脈への影響について明らかにすることを目的とする。

【材料と方法】C57BL/6J マウスの左冠動脈前下行枝を結紮し心筋梗塞モデルマウスを作製した。結紮 4 から 6 週間後のマウスを心不全モデルマウス (HF 群) とし、偽手術をしたマウスをコントロール群 (sham 群) とした。エコーで心機能や心室内腔、壁厚を計測した。MCU タンパク質発現量をポリアクリルアミドゲル電気泳動法で評価した。ミトコンドリアへのカルシウム取り込みの促進は、主要なカルシウム流入経路である Mitochondrial calcium uniporter (MCU) を活性化するケンペロールを用いた。単離ミトコンドリアでケンペロールによるミトコンドリアへのカルシウム取り込み能の変化を評価した。単離心筋細胞を用い、落射蛍光顕微鏡でカルシウムウェーブを、共焦点レーザー顕微鏡でカルシウムスパーク、活動電位に伴う細胞質内全体のカルシウムイオン濃度の上昇であるカルシウムトランジェントを、穿孔パッチクランプ法で活動電位の発生を評価した。ランゲンドルフ灌流心で心室性不整脈の発症について検討した。頸動脈から左室に挿入したマイクロマノメータチップカテーテルで左室内圧を測定し、血行動態を評価した。

【結果】HF 群は sham 群と比較して、左室の拡大と収縮率低下を認め、心重量、肺重量の増加を認めた。MCU タンパク質発現は、 HF 群と sham 群で有意差がなく、いずれの群もケンペロールによって、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みは促進した。 sham 群では、拡張期のカルシウムウェーブはβアドレナリン受容体刺激薬であるイソプロテレノールの

添加、イソプロテレノールとケンペロールの添加により変化しなかった。しかし、HF 群では、イソプロテレノールの添加により拡張期のカルシウムウェーブを認める細胞の割合、1 細胞あたりで認められるカルシウムウェーブの平均回数が増加した。イソプロテレノールに加え、ケンペロールを添加すると、カルシウムウェーブを認める細胞の割合に有意差はなかったが、1 細胞あたりで認められるカルシウムウェーブの平均回数は、有意に低下した。また、HF 群において、イソプロテレノール、ケンペロール、MCU 阻害薬を添加すると、カルシウムウェーブの回数は再度増加した。 HF 群でのカルシウムスパークの頻度は、イソプロテレノールで増加するが、ケンペロールの追加によって低下した。拡張期にみとめる自発的な活動電位の回数は、イソプロテレノールで増加し、ケンペロールの添加により抑制された。小胞体カルシウム貯蔵量と関連しているカルシウムトランジェントの振幅は変わらなかった。ケンペロールは、心室性不整脈の発生を抑制し、血行動態への急性効果を認めなかった。

【考察】本研究では、HF 群と sham 群で MCU タンパク質発現量に変化がなかった。圧負荷誘発心不全では、MCU タンパク質発現の増加が報告されている。虚血性心不全と、圧負荷誘発心不全では、MCU タンパク質への影響が異なることが示唆される。

HF 群の単離心筋細胞において、MCU 作動薬であるケンペロールが、イソプロテレノールによるカルシウムウェーブ、カルシウムスパークの発生頻度を抑制した。これは、カテコラミン誘発多形性心室頻拍モデルマウスと同様であり、ライアノジンレセプターからのカルシウム漏出を、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みが代償する点で同様である。ケンペロールは、MCU 選択的活性化剤ではないが、MCU 阻害薬をケンペロールの存在下に追加投与すると、カルシウムウェーブが抑制できなかったことから、ケンペロールによるカルシウムリークの代償は、MCU の活性化に起因すると考えられる。

カルシウムトランジェントの振幅は小胞体カルシウム貯蔵量と関連しており、 MCU 活性化によってカルシウムトランジェントの振幅に変化がなかっことから、小胞体内カルシウム貯蔵量に変化はないと考えられる。心筋収縮は小胞体からのカルシウム放出に依存しており、血行動態に変化がなかったことからも、カルシウム貯蔵量に変化がなく、ケンペロール投与による安全性が期待される。

【結論】不全心において、ケンペロールによるミトコンドリアへのカルシウム取り込みの促進は、小胞体からのカルシウムリークを代償し、致死性心室性不整脈を抑制する可能性が示唆される。これまでの抗不整脈薬の治療標的と異なる、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みに着目した治療戦略は、心不全患者における心室性不整脈治療の新たな選択肢になることが期待される。