



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	神経型一酸化窒素合成酵素の抑制を介したSmall-conductance Ca ²⁺ -activated K ⁺ チャネルの活性化の機序と心房細動基質への影響の検討 [全文の要約]
Author(s)	甲谷, 太郎
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：2688 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14946号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86046
Type	doctoral thesis
File Information	KOHYA_Taro_summary.pdf



学位論文（要約）

神経型一酸化窒素合成酵素の抑制を介した
Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} チャネルの
活性化の機序と心房細動基質への影響の検討
(Investigation of the mechanism and the influence on
the atrial arrhythmogenesis of small conductance
 Ca^{2+} -activated potassium channel activation via
neuronal nitric oxide synthase inhibition)

2022年3月

北海道大学

甲谷 太郎

学位論文（要約）

神経型一酸化窒素合成酵素の抑制を介した Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} チャネルの活性化の機序と心房細動基質への影響の検討

(Investigation of the mechanism and the influence on the atrial arrhythmogenesis of small conductance Ca^{2+} -activated potassium channel activation via neuronal nitric oxide synthase inhibition)

2022年3月

北海道大学

甲谷 太郎

要約

【背景と目的】

心房細動は日常診療において遭遇する頻度が最も高い不整脈であり、心血管有害事象のリスクを増加させる。心房細動が持続すると電氣的・構造的リモデリングが進行し、さらに心房細動が持続しやすくなる。近年、正常心室筋にはほとんど発現していない一方で、心房筋に豊富に発現するチャネルとして **small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (SK チャネル)** が注目されている。SK チャネルを阻害することで心室性不整脈を惹起する危険性は低く、従来の抗不整脈薬と比較して安全性に優れた新しい心房細動の治療標的として期待されている。既報では、心房細動モデルにおいて SK チャネル蛋白が増加し、心房細動の発症が増加することが報告されている。SK チャネルの開放は細胞内カルシウム濃度によって調整されるが、心房細動における SK チャネルの活性化の機序については不明である。

一酸化窒素 (NO: nitric oxide) は血管拡張作用だけでなく、即時的なシグナル伝達物質として細胞内カルシウム濃度を制御する。さらに近年、慢性心房細動患者において NO 合成酵素 (NOS: nitric oxide synthase) の一つである神経型 NOS の発現・活性が低下し、活動電位持続時間 (APD) が短縮することが報告され、神経型 NOS は心房細動の電氣的リモデリングに関連することが明らかとなった。従って、神経型 NOS は細胞内カルシウム動態を変化させ SK チャネルの活性に影響を与えることが推測されるが、SK チャネルと神経型 NOS の関連性はこれまでに検討されていない。

以上より、「心房細動における神経型 NOS の抑制による細胞内カルシウム動態の変化が SK チャネルを活性化し、APD の短縮と心房細動の発症を増加させる」という仮説を立てた。本研究では、神経型 NOS の阻害による APD の短縮と心房細動の誘発性が SK チャネルの抑制によってどのように変化するか、カルシウム動態はどのように変化するか、ラットの灌流心を用いて検討した。

【材料と方法】

実験動物として WKY (Wistar-Kyoto) ラットを用いた。神経型 NOS 阻害薬として S-メチル-L-チオシトルリン (SMTC, S-methyl-L-thiocitrulline; 100 nM)、SK チャネル阻害薬としてアパミン (100 nM) を用いた。ランゲンドルフ灌流心において、対照群: Tyrode's 溶液、SMTC 群: Tyrode's 溶液+SMTC、SMTC+アパミン群: Tyrode's 溶液+SMTC+アパミンを灌流液に用いた。SK チャネル蛋白の発現、および機能を確認する目的でウエスタンブロッティングとホールセルパッチクランプ法による全細胞電流を測定した。不整脈の誘発性はランゲンドルフ灌流心を用いて電気刺激による誘発で評価した。活動電位波形と伝導速度の解析には灌流心で膜電位光学マッピングを行った。カルシウム動態の評価には細胞内カルシウム光学マッピングを用いた。心房性不整脈の複雑性を評価するため、電気刺激によって誘発した不整脈中の周波数解析を行った。

【結果】

WKY ラットにおいて、SK2、SK3、および神経型 NOS のタンパク発現を認めた。ホールセルパッチクランプによる全細胞電流測定で、SK チャネル電流は対照群で認められ、SMTC 群では対照群と比較して SK チャネル電流が増加している傾向であった。SMTC 群では心房性不整脈の発症が増加し、SMTC+アパミン群では発症が抑制された。SMTC 群は、対照群と比較して APD の短縮と空間的分散の増大を認め、アパミンはこれらの変化を改善させた。伝導速度は、対照群と SMTC 群で有意差を認めなかった。細胞内カルシウム動態に関わる指標（カルシウムトランジェント持続時間、立ち上がり時間、半減期時間、時定数）は、いずれも、SMTC、アパミン投与によって変化しなかった。心房性不整脈の周波数解析から求めたドミナントフリークエンシーは SMTC 群で高値であり、アパミンの追加により低下した。

【考察】

SMTC によって生じる心房性不整脈の発生の増加が、SK チャネル特異的阻害薬であるアパミンの追加投与によって抑制された。この結果から、神経型 NOS 阻害による心房性不整脈の誘発性の増加に SK チャネルの活性化が寄与していることが明らかとなった。リエントリー性不整脈の発症には、興奮波長 [不応期 (APD で近似) ×伝導速度] が影響し、興奮波長が短いほど不整脈の発症は増加する。このため、誘発性の変化に影響する電気生理的機序を明らかにするため、光学マッピングを用いて APD と伝導速度について解析した。SMTC は APD の短縮と空間的分散を増加させ、これらの変化はアパミンによって改善した。このことから、神経型 NOS 阻害による APD の短縮と空間的分散の増加には SK チャネルの活性化が関与しており、これらの電気生理的变化によって神経型 NOS の阻害は心房性不整脈の発症を増加させたと考えられた。さらに、不整脈の複雑性を示すドミナントフリークエンシーは、SMTC 投与下にアパミンを追加することで低下した。これは、SMTC によって心房性不整脈の誘発性が高まったという解釈を支持する結果であり、興奮波長の短縮や不応期の不均一性の増大とも矛盾しない結果であった。SK チャネルの開口は細胞内カルシウム濃度で制御されるため、神経型 NOS が SK チャネルを活性化する機序として、細胞内カルシウム動態の変化を介した機序が想定された。SMTC はカルシウム動態を反映する CaTD を変化させることなく APD を短縮し、さらにアパミンの追加投与によって APD の短縮のみが抑制された。さらに、リアノジン受容体からのカルシウム放出を反映するカルシウム蛍光強度の“立ち上がり時間”、小胞体に局在するカルシウムポンプ (SERCA: sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase) と Na⁺/Ca²⁺交換体 (NCX: Na⁺/Ca²⁺ exchanger) による細胞質からのカルシウムの排出機能を反映する“半減期時間”と“時定数”についても解析をおこなったが、SMTC は細胞内カルシウム動態に関連するこれらのパラメータを全く変化させなかった。以上より、神経型 NOS 阻害はカルシウム動態を変化さ

せずに SK チャネルを活性化することが明らかとなった。神経型 NOS 阻害が SK チャネルを活性化する機序として、チャネル蛋白の直接的な修飾の関与が示唆された。

【結論】

薬理的な神経型 NOS の阻害によって、SK チャネルが活性化し APD の短縮と空間的分散の増加が生じ、その結果心房性不整脈の発症が増加した。予想していた神経型 NOS 阻害によるカルシウム動態の変化は認められず、神経型 NOS 阻害による SK チャネルの活性化の機序は、タンパクの翻訳後修飾などチャネルへの直接的影響が考えられた。今後の研究によって、神経型 NOS の阻害が SK チャネルを活性化させる機序の解明が望まれる。心房細動治療において SK チャネルに着目した治療戦略は、心室性不整脈を惹起しない新たな不整脈薬物治療として今後の研究の発展が期待される。