



Title	肥大心における β -アドレナリン受容体刺激を介した不整脈基質：カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼを介した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活性化の役割
Author(s)	鎌田, 塁
Description	配架番号：2371
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12992号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12992
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88957
Type	doctoral thesis
File Information	Rui_Kamada.pdf



学位論文

肥大心における β -アドレナリン受容体刺激を介した不
整脈基質:カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質
キナーゼを介した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活性化の役割

**(Arrhythmogenic β -Adrenergic Signaling in Cardiac
Hypertrophy: The Role of Small Conductance Calcium-
Activated Potassium Channels via Activation of CaMKII)**

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

鎌田 墨

学位論文

肥大心における β -アドレナリン受容体刺激を介した不
整脈基質:カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質
キナーゼを介した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活性化の役割

**(Arrhythmogenic β -Adrenergic Signaling in Cardiac
Hypertrophy: the Role of Small Conductance Calcium-
Activated Potassium Channels via Activation of CaMKII)**

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

鎌田 墨

目次

発表論文目録.....	1 頁
1. 緒言	2 頁
2. 略語表.....	4 頁
3. 実験方法.....	5 頁
3.1 実験動物.....	5 項
3.2 ランゲンドルフ灌流心.....	5 項
3.3 膜電位/細胞内カルシウム光学マッピング法	6 項
3.4 β -アドレナリン受容体刺激による反応.....	7 項
3.5 β -アドレナリン受容体刺激下における不整脈誘発性の検討	7 項
3.6 生化学的検討.....	7 項
3.6.1 心筋標本作製	8 項
3.6.2 タンパク質抽出.....	8 項
3.6.3 タンパク質濃度測定.....	8 項
3.6.4 CaMKII アッセイキットによる CaMKII 活性の測定.....	9 項
3.7 薬剤.....	9 項
3.8 統計学的検討.....	10 項
4. 実験結果.....	10 頁
4.1 動物特性.....	10 項
4.2 β -アドレナリン受容体刺激による反応性.....	10 項
4.3 β -アドレナリン受容体刺激による持続性心室性不整脈に対する薬剤の効果...11 項	
4.3.1 WKY における β -アドレナリン受容体刺激による持続性心室性不整脈の誘発性.....	11 項
4.3.2 SHR における β -アドレナリン受容体刺激による催不整脈性に対するアパミンの効果	13 項
4.4 β -アドレナリン受容体刺激による活動電位に対するアパミンの効果	14 項
4.4.1 WKY における β -アドレナリン受容体刺激による活動電位時間短縮に対するアパミンの効果.....	14 項
4.4.2 SHR における β -アドレナリン受容体刺激による活動電位時間短縮に対するアパミンの効果.....	15 項

4.5	β -アドレナリン受容体刺激におけるカルシウムトランジェントの変化.....	16 項
4.5.1	WKY における β -アドレナリン受容体刺激によるカルシウムトランジェントの変化.....	16 項
4.5.2	SHR における β -アドレナリン受容体刺激によるカルシウムトランジェントの変化.....	16 項
4.6	活動電位回帰曲線	19 項
4.6.1	WKY における β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激とアパミンを併用した際の活動電位回帰曲線.....	19 項
4.6.2	SHR における β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激とアパミンを併用した際の活動電位回帰曲線.....	20 項
4.7	活性化 CaMKII の定量.....	21 項
4.8	β -アドレナリン受容体刺激およびアパミン存在下における KN-93 の活動電位時間およびカルシウムトランジェントの変化.....	21 項
5.	考察.....	23 頁
5.1	β -アドレナリン受容体刺激における電気生理学的変化.....	23 項
5.2	β -アドレナリン受容体刺激におけるカルシウムトランジェントの変化...	24 項
5.3	β -アドレナリン受容体刺激における不整脈基質としての SK チャネルの役割	24 項
5.4	β -アドレナリン受容体刺激と CaMKII 活性.....	25 項
5.5	本研究の限界.....	26 項
6.	総括および結論.....	28 頁
7.	謝辞	29 頁
8.	引用文献	30 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. Rui Kamada, Hisashi Yokoshiki, Hirofumi Mitsuyama, Masaya Watanabe, Kazuya Mizukami, Taro Tenma, Masayuki Takahashi, Shingo Takada, and Toshihisa Anzai
Arrhythmogenic β -adrenergic signaling in cardiac hypertrophy: the role of small conductance calcium activated potassium channels via activation of CaMKII
American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology

本研究の一部は以下の学会で発表予定である

1. Rui Kamada, Hisashi Yokoshiki, Hirofumi Mitsuyama, Masaya Watanabe, Kazuya Mizukami, Taro Tenma, Masayuki Takahashi, Shingo Takada, and Toshihisa Anzai
Arrhythmogenic β -adrenergic signaling in cardiac hypertrophy: the role of small conductance calcium activated potassium channels via activation of CaMKII

第 82 回日本循環器学会学術集会 2018 年 3 月 23 日-25 日 大阪

1. 緒言

心臓突然死の多くは心室細動や心室頻拍といった致死性心室性不整脈によって生じることが知られている¹。β-アドレナリン受容体遮断薬は慢性心不全患者の突然死の抑制に有効であることや²、心筋梗塞後の患者における再発性の持続性心室性不整脈の抑制にも効果的であることも報告されている³。一方、致死性不整脈を有する患者群においては対照群に比し、交感神経が賦活化されていることや動物実験レベルでは交感神経の賦活化によって心室細動発症の閾値が低下するといった報告もなされている^{4,5}。また動物実験においてはβ-アドレナリン受容体刺激による催不整脈性の機序としては、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ (CaMKII: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) を介した筋小胞体からの拡張期のカルシウムリークの上昇から生じる撃発活動による機序が報告されている⁶。β-アドレナリン受容体刺激による電気生理学的な変化としては、有効不応期および活動電位持続時間 (APD: action potential duration) の短縮が報告されている⁷。APD 回帰曲線はある周期で心筋をペーシングした際の APD とそのペーシング周期の差である拡張期時間との間で得られる曲線であるが、拡張期時間が短くなるにしたがってより大きな APD の短縮が起きることで APD 回帰曲線は急峻化する。この曲線が急峻化することにより、APD オルタナンス (一拍毎に APD が変化すること) が生じやすくなるため、不応期の不均一性がもたらされる。その結果、心室細動の発症およびその維持に寄与するとされている⁸。β-アドレナリン受容体刺激下においては APD 回帰曲線の最大傾きが急峻化することも知られている⁹。また、近年の報告ではヒトの不全心に対するβ-アドレナリン受容体刺激にて APD は顕著に短縮し、カルシウムトランジェント時間 (CaTD: Calcium transient duration) と APD との差がより大きくなることで遅延後脱分極 (DAD: delayed afterdepolarization) を生じうることも報告されている¹⁰。上述のように、β-アドレナリン受容体刺激における催不整脈性に関しては種々の報告があるもののその機序は十分な検討はなされていない。

CaMKII はカルシウムカルモジュリン複合体と結合することで活性化され、L 型カルシウムチャネルやホスホランバン、ライアノジン受容体をリン酸化することで細胞内カルシウムハンドリングに重要な役割を担っている¹¹。β-アドレナリン受容体刺激のシグナルにおいても、CaMKII は重要な役割を担っていると報告されており¹²、ラットを用いた研究ではイソプロテレノールを用いたβ-アドレナリン受容体刺激に

て CaMKII 活性の上昇を反映したリン酸化ホスホランバンが増加することや¹³⁻¹⁵、リン酸化ライアノジン受容体タンパクの増加が報告されている¹⁵。我々は過去に肥大型の心室筋において細胞内カルシウムイオンによって調整されるリン酸化 CaMKII が上昇していることを報告している^{16,17}。また CaMKII は種々のカリウムチャネルを制御していることが知られているが^{18,19}、マウスの腸管では CaMKII が small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} (SK チャネル)を制御していることが報告されている²⁰。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チャネルである²¹。生体内では、心筋の他にも末梢神経、骨格筋、平滑筋、血管内皮等に広く分布するとされている²¹。心室筋における役割は十分には解明されていないが、正常心筋におけるは活動電位形成においては、その関与は大きくないとされる²²。一方で、我々のグループならびに Peng-Sheng Cheng らは、肥大型や不全心といった病的な心室筋においては、SK チャネル電流が機能的に発現し、活動電位形成に特異的に関与していることを報告している^{17,23}。また、我々のグループは肥大型の心室筋において SK チャネルがリン酸化 CaMKII を介した制御を受けていることも報告している¹⁷。しかしながら、SK チャネルの活性化が不整脈性に作用するのかもしれないかしくは抗不整脈性に作用するのかは十分な検討はなされていない。今回我々は、肥大型における β -アドレナリン受容体刺激によってリン酸化 CaMKII が上昇し、リン酸化 CaMKII を介した SK チャネルの活性化が活動電位の変化ならびに不整脈の誘発性に関与しているのではないかと仮説をたて検討することとした。

2. 略語表

ANOVA: analysis of variance

APD: action potential duration

APD₉₀: action potential duration at 90% repolarization

CaMKII: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II

CaT: calcium transient

CaTD₉₀: calcium transient duration at 90% repolarization

CCD: charge-coupled device

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid

HRP: horseradish peroxidase

ISO: isoproterenol

LVH: left ventricular hypertrophy

p-CaMKII: phospholylated CaMKII at Thr²⁸⁶

SHR: spontaneously hypertensive rat

SK: small-conductance Ca²⁺-activated K⁺

SVA: sustained ventricular arrhythmia

WKY: Wistar-Kyoto

3. 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。

3.1 実験動物

肥大心モデルとして 18-27 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^{24,25}。また、対照として同週齢の Wistar-Kyoto rat (WKY) のオスを使用した。

3.2 ランゲンドルフ灌流心

軽鎮静を得るため、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 分間ラットを保持した。軽鎮静が得られた後、メデトミジン塩酸塩 (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て、抗凝固目的に塩酸ヘパリン (400 IU/kg) を腹腔内投与した。その後、胸骨上部から剣状突起下まで縦切開し、さらに腹部に横切開を加えた。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、2-0 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。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、WKY で 70 cmH₂O、SHR で 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²⁶。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。

3.3 膜電位/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング法

摘出灌流心の心尖部に単極ペーシング電極、右室、左室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、心臓を固定し、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の特異的阻害剤であるブレビスタチン ($10\text{ }\mu\text{M}$; TRC, Toronto, Canada) を混和させた Tyrode 液に切り替え 15 分間灌流を継続した²⁷。心拍動の停止を確認後、膜電位感受性色素である RH237 ($0.01\text{ }\mu\text{M}$, 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。さらに細胞内カルシウム感受性色素である Rhod-2AM ($1.0\text{ }\mu\text{M}$, DOJINDO, Kumamoto, Japan,) を Tyrode 液に混和させおよそ 10 分間灌流させた。150 W ハロゲン光源をフィルターを介して $531 \pm 20\text{ nm}$ の波長に変換し、励起光源として灌流心に照射した。標本からの放射蛍光は膜電位 715 nm 、カルシウム電位 $575 \pm 20\text{ nm}$ のバンドパスフィルターを介して高感度電荷結合素子 (CCD) カメラ (MiCAM02, BrainVision, Tokyo, Japan) で撮影した。時間解像度は 2.2 msec/frame 、空間分解能は 0.2 mm (88×60 ピクセル) とした。左室心尖部から 200 msec のペーシングサイクル長 (出力: 閾値の 2 倍) 下で左室心外膜前面を撮影した。撮影したデータはノイズ除去目的に、BV_ana ソフト (version 1604, BrainVision, Tokyo, Japan) を用いて以下のフィルターを施した。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。上記のデジタルフィルタリング施行後、活動電位時間 (APD) およびカルシウムトランジエント時間 (CaTD) を測定した。APD、CaTD は活動電位波形およびカルシウムトランジエント波形の立ち上がり最大速度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おける 90% 再分極点までの時間 (APD₉₀、CaTD₉₀) と定義した。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エ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) において APD₉₀ および CaTD₉₀ を測定し、その中央値を個体固有の APD₉₀ および CaTD₉₀ と定義した。APD₉₀ マップは BV_ana ソフトを用いて作成した。

β -アドレナリン受容体刺激による APD、CaT の変化に対するアパミン (SK チャネル阻害薬) の効果ならびに β -アドレナリン受容体刺激および CaMKII 阻害薬存在下でのアパミンの効果を検討する目的で以下のプロトコールで検討した。また、APD 回帰曲線 (APD restitution curve) を作成するために、左室心尖部より 200 ms より連続

ペーシング刺激を行い、160 ms までは 10 ms 毎に、155 ms からは 5 ms 毎にペーシングサイクル長を短縮した。1:1 のペーシング捕足が得られなくなるもしくは持続性心室性不整脈が誘発されるまでペーシングサイクル長を短縮した²⁸。WKY、SHR の両群を β -アドレナリン受容体非刺激群、 β -アドレナリン受容体刺激群、 β -アドレナリン受容体刺激ならびにアパミン投与群に分別し、それぞれ膜/細胞内カルシウム同時測定光学マッピング法を用いて APD₉₀ を測定した。APD restitution curve は APD₉₀ を縦軸に拡張期時間 (DI; Diastolic Interval) を横軸とし、プロットした。プロットして得られたものを Origin 5.0 (Microcal Co., Northampton, MA, USA)を用いて非線形回帰曲線へフィッティングし、得られた曲線 $y = A1 \times e^{-(x-x0)/t1} + y0$ の最大の傾きを maximum slope of restitution と定義した。最大傾きは $y = A1 \times e^{-(x-x0)/t1} + y0$ を微分して得られた $y' = -A1/t1 \times e^{-(x-x0)/t1}$ より算出した。

3.4 β -アドレナリン受容体刺激による反応

β -アドレナリン受容体刺激の至適濃度を検討するために、ランゲンドルフ灌流心を作成後にイソプロテレノールを 1nM、30nM、100nM、300nM、1 μ M にて漸増し灌流した。その際にカルシウムトランジェントを上述の光学マッピング法にて測定し、カルシウムトランジェントの基線から頂点までを測定し、ベースラインからの最大反応までの同一個体での相対的な変化を反応・用量曲線を作成し 50%効果濃度 (EC50)を求めた。さらに、イソプロテレノールによる CaT 波高の最大反応を Emax として、両群間で比較検討した。

3.5 β -アドレナリン受容体刺激による不整脈誘発性の検討

β -アドレナリン受容体刺激下および非刺激下、 β -アドレナリン受容体刺激とアパミンを同時投与した際の、持続性心室性不整脈 (SVA: sustained ventricular arrhythmia) の誘発性を検討するために、左室心尖部より 200ms のペーシングサイクル長で 10 発刺激を加え、5 秒の間欠期を置き 10ms 毎にペーシングサイクル長を短縮した。SVA の発生もしくは 1:1 のペーシング補足が得られなくなるまでペーシングサイクル長を短縮した。心電図は右室および左室に装着した電極で PowerLab 4/26 (AD Instruments, Dunedin, New Zealand)を用いて測定した。SVA は 10 秒以上持続する頻脈性持続性心室性不整脈と定義した。

3.6 生化学的検討

3.6.1 心筋標本作製

生体内から迅速に心臓を摘出し、Tyrode 液によるランゲンドルフ灌流を行い、心臓内血液を洗い出した。その後、左室心尖部よりペーシングサイクル長 180ms にてペーシングを行った。ペーシング補足を確認するために心電図電極を右室および左室に装着しモニタリングを行った。ペーシングは 15 分連続で行い、その後左室心筋を切除しベースラインの標本とした。 β -アドレナリン受容体刺激群はランゲンドルフ灌流心を作成後上述の手法でペーシングおよび心電図モニタリングを行い、イソプロテレノール 100 nM (ISO: Isoproterenol) を Tyrode 液に混和し 15 分後に左室心筋を切除した。切除標本は迅速に液体窒素で凍結後に -80°C で保存した。

3.6.2 タンパク質抽出

凍結保存した心筋標本を氷上で解凍した。細胞溶解液は RIPA Lysis Buffer System (Santa Cruz Biotechnology, SC-24948A, TX, USA) を用いた。1 倍溶解液にセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼを阻害するフェニルメチルスルフォニルフルオリド (200mM) を 1ml あたり 10 μ l 加え、プロテアーゼ阻害剤カクテルを 1ml あたり、10 μ l 加えた。さらにオルトバナジン酸ナトリウム水溶液 (100mM) を溶解液 1ml あたり 10 μ l 加え、RIPA バッファーとした。ホモジナイズ用のエッペンドルフチューブにそれぞれ細胞溶解液を 300 μ l、解凍した心筋標本を 20 mg 加え、氷上でホモジナイズした。ホモジナイズしたサンプルは遠心分離し (15,000 g $\times$ 20 分、4°C)、上清を新しいエッペンドルフチューブに移し氷上で保存した。また、長期保存する場合は -80°C で冷凍保存とした。

3.6.3 タンパク質濃度測定

BCATM Protein Assay Reagent A と同 Reagent B (Thermo scientific, IL, USA) を 50 : 1 の割合で混合し、その混合液を GREINER 96-Well CELLSTAR[®] Cell Culture Plates sterile, F-bottom (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) の各ウェルに 200 μ l ずつ分注した。タンパク質濃度の標準検量線を作成する目的に、牛血清アルブミン (2 mg/ml ; Thermo scientific, IL, USA) を標準タンパク質として使用した。同タンパク質を、それぞれ 0、2、4、8、16、32 μ l ずつウェルに注入した。その後、測定

サンプルを 2 μ l ずつ注入した。37°Cで 30 分間インキュベートした後、吸光マイクロプレートリーダー (Multiskan™ GO、Thermo scientific) および専用ソフト (SkanIt™、version 3.2、Thermo scientific) を立ち上げ、「ミキシングあり、単波長、フィルター 540 nm」の設定で測定した。得られたデータより標準タンパク質の平均値における一次直線を算出し検量線を得た。この検量線を基にサンプルタンパク質濃度を算出した。

3.6.4 CaMKII 活性

Cyclex® CaM Kinase II assay kit (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES, MA, USA)を用いて、 β -アドレナリン受容体刺激、 β -アドレナリン受容体非刺激群とし両群での CaMKII 活性を測定した。キットの付属プレートの各ウェルに 1.0 μ g/ μ l に調整した左室心筋標本を 10 μ l ずつ注入した。カルシウム/カルモジュリンを含むキナーゼバッファー 90 μ l、またカルシウム/カルモジュリンを含まないキナーゼバッファー 90 μ l をサンプルを含む各ウェルに注入した。30°Cで 30 分間インキュベートした後、ウォッシュバッファーにて 5 回洗浄した。ホースラディッシュペルオキシダーゼ共役型抗リン酸化シンタイトド-2 抗体を各ウェルに注入し、60 分間室温にてインキュベートした。さらにウォッシュバッファーにて各ウェルを洗浄後に基質溶液を加え、10 分間室温にてインキュベートした。その後反応停止液を加え、光マイクロプレートリーダー (Multiskan™ GO、Thermo scientific) および専用ソフト (SkanIt™、version 3.2、Thermo scientific) を立ち上げ、「ミキシングあり、単波長、フィルター 450 nm」の設定で吸光度を測定した。また CaMKII ポジティブコントロール (Cyclex Co Ltd)を用いて検量線を作成した。検量線より得られた値より、カルシウム/カルモジュリンを含むものを最大 CaMKII 活性とし、カルシウム/カルモジュリンを含まないものを CaMKII の基礎値とし、両者の比を算出し左室心筋の CaMKII 活性として定量した²⁹。

3.7 薬剤

薬剤効果を調べる目的で、 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 (100nM; Sigma Aldrich, Tokyo, Japan)として SK チャネル阻害薬であるアパミン (100 nM ; PEPTIDE, Osaka, Japan)、CaMKII 抑制薬である KN-93 (1 μ M ;

Millipore, MA, USA) をそれぞれ Tyrode 液に混入し、使用した。

3.8 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 また one-way repeated 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。解析ソフトは Prism 6 (GraphPad Software, CA, USA) を使用した。*p* 値<0.05 を有意と定義した。

4. 実験結果

4.1 動物特性

本実験に使用した SHR 群は WKY 群に比較して、左室重量、左室重量体重比ともに有意に高く、実験に用いた週数齢において SHR は肥大心となっている事を確認した。

表 1 動物特性

	WKY (n=12)	SHR (n=12)	P value
体重量 (g)	400 ± 9.92	380 ± 3.26	p = 0.05
心重量 (mg)	1.88 ± 0.06	2.51 ± 0.04	<0.0001
心重量 / 体重量 (mg/g)	4.70 ± 0.14	6.61 ± 0.12	<0.0001

データは平均値±標準誤差。検定：F 検定で等分散性を確認後、Student's *t*-test を用いて検定した。

4.2 β-アドレナリン受容体刺激の反応性

図 1A、B に代表的な WKY 群および SHR 群におけるイソプロテレノールに対するカルシウムトランジェントの反応性の用量・反応曲線および EC₅₀、E_{max} を比較したグラフを示す。また WKY 群、SHR 群それぞれの EC₅₀ を検討したところ、CaT 波高のイソプロテレノール依存性の反応性は両群で有意な差がないことを確

認した。またイソプロテレノールによる CaT 波高の最大反応を $E_{\max}$ として両群で比較検討し、有意な差がないことを確認した。EC₅₀: 60.1 ± 4.29 nM (WKY 群、 $n=3$)、 63.9 ± 8.58 nM (SHR 群、 $n=3$)、 $p=0.712$ 。 $E_{\max}$: $120 \pm 11.3\%$ (WKY 群 $n=3$)、 $146 \pm 30.5\%$ (SHR 群 $n=3$)、 $p=0.46$ 。

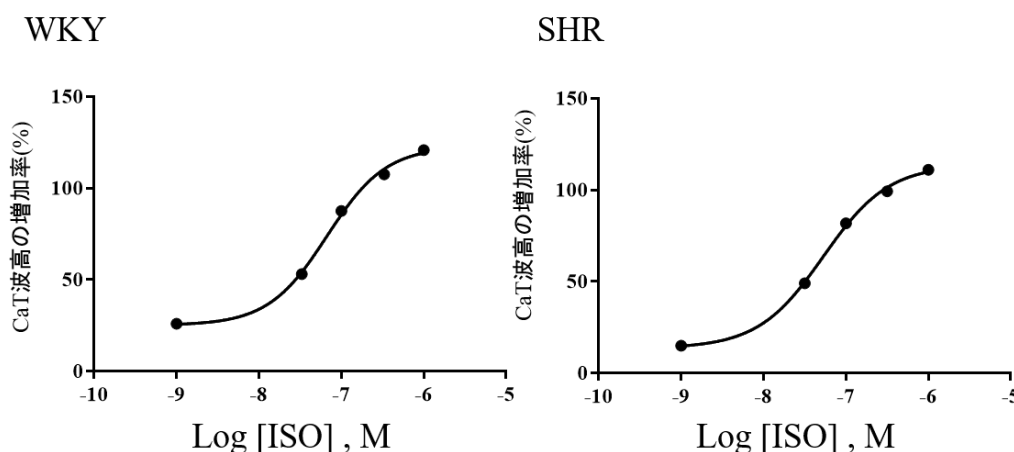


図 1A 代表的な WKY、SHR の用量反応曲線を示す。

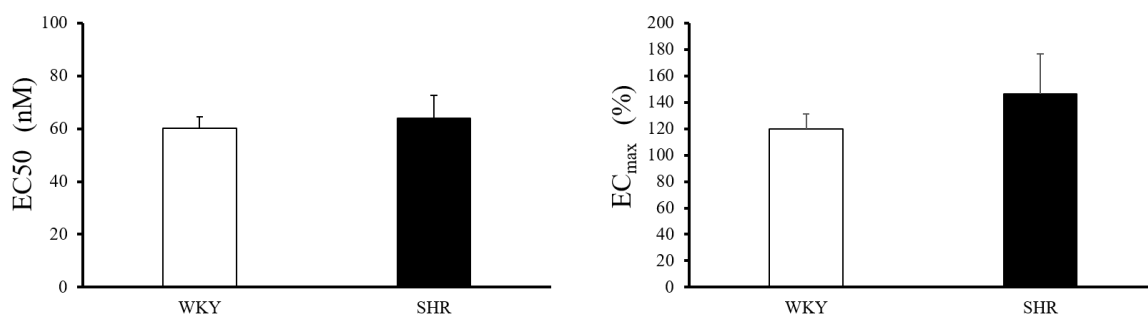


図 1B EC₅₀ および $E_{\max}$ を定量化し比較した結果を示す。EC₅₀: 60.1 ± 4.29 nM (WKY 群、 $n=3$)、 63.9 ± 8.58 nM (SHR 群、 $n=3$)、 $p=0.712$ 。 $E_{\max}$: $120 \pm 11.3\%$ (WKY 群 $n=3$)、 $146 \pm 30.5\%$ (SHR 群 $n=3$)、 $p=0.46$ 。

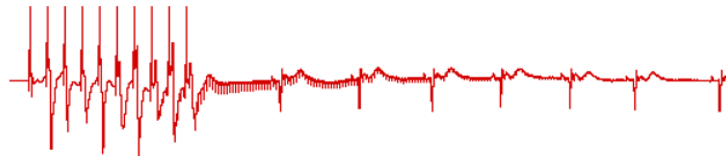
4.3 β -アドレナリン受容体刺激による持続性心室性不整脈に対する薬剤の効果

4.3.1 WKY における β -アドレナリン受容体刺激における持続性心室性不整脈の誘発性

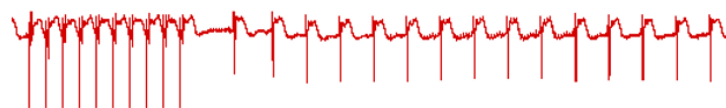
図 2A、図 2B に WKY 群における連続ペーシング刺激下における代表的な心電図

および SVA の発症率を示す。WKY 群においては、ISO (100nM) による β -アドレナリン受容体刺激による SVA の発症率は非刺激群に比し、有意な上昇を認めなかった。また、アパミン (100nM) を追加投与しても SVA の発症に有意な差は認めなかった。

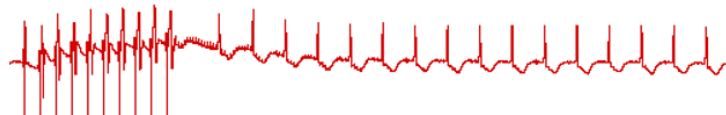
対照



イソプロテレノール



イソプロテレノール + アパミン



1sec

図 2A WKY 群における左室心尖部からの連続ペースティング刺激下における代表的な心電図

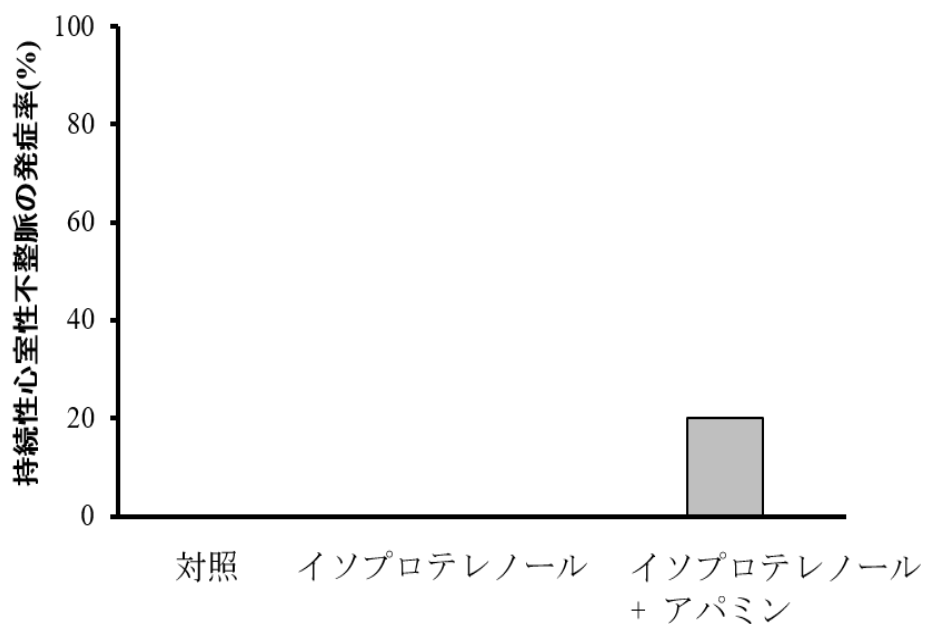


図 2B WKY 群における β -アドレナリン受容体刺激およびアパミンによる SVA 発症率

4.3.2 SHR 群における β アドレナリン受容体刺激による持続性心室性不整脈の誘発性

図 3A、図 3B に SHR 群における連続ペーシング刺激下における代表的な心電図および SVA の発症率を示す。SHR 群においては、ISO (100nM) による β -受容体刺激による SVA の発症率は非刺激群に比し、有意な上昇を認めた。さらに、 β -受容体刺激下にアパミン (100nM) を加えた群では SVA の発症率を有意に低下させた (対照: 0%、 $n=5$ 、vs. イソプロテレノール 71%、 $n=7$ 、 $p=0.02$; イソプロテレノール + アパミン 0%、 $n=7$ 、VS. イソプロテレノール、 $p=0.02$)。

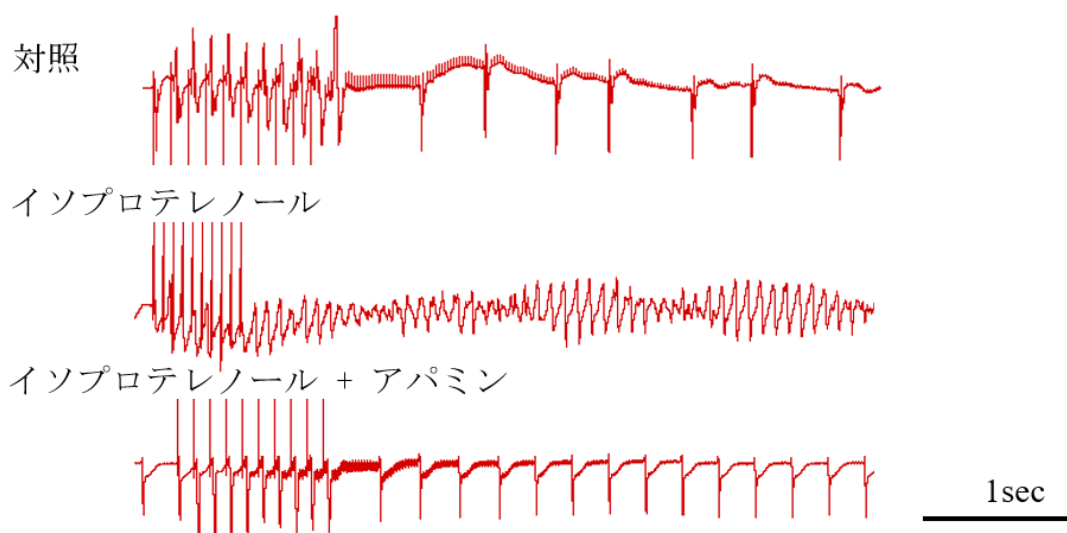


図 3A SHR 群における左室心尖部からの連続ペーシング刺激下における代表的な心電図

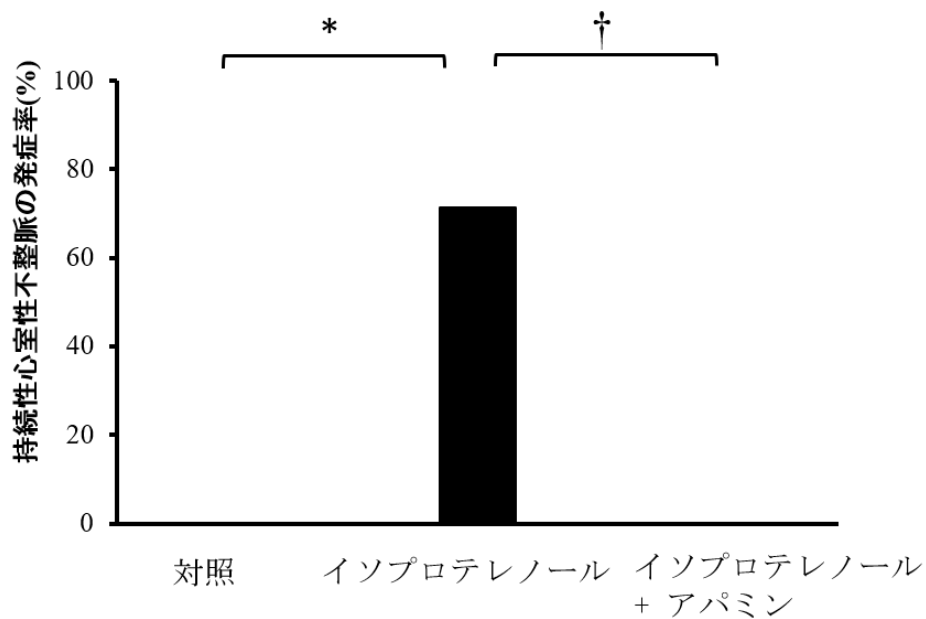


図 3B SHR 群における β 受容体刺激およびアパミンによる SVA 発症率。* $p < 0.05$, vs. 対照、† $p < 0.05$, vs. イソプロテレノール。検定: Fisher の正確検定を行った。

4.4 β -アドレナリン受容体刺激による活動電位に対するアパミンの効果

4.4.1 WKY における β -アドレナリン受容体刺激による活動電位時間短縮に対するアパミンの効果

図 4A に WKY 群における左室の代表的な活動電位波形および APD_{90} マップを示す。対照に比べ、ISO (100nM) による β -アドレナリン受容体刺激にて APD_{90} の有意な短縮を認めたが、ISO (100nM) 存在下にアパミンを加えても APD_{90} の有意な延長を認めなかった [APD_{90} : 100.3 ± 3.84 msec (対照, $n = 7$) vs. 91.8 ± 2.70 msec (イソプロテレノール, $n = 7$), $p = 0.03$; 91.8 ± 2.70 msec (イソプロテレノール) vs. 93.3 ± 2.83 msec (イソプロテレノール + アパミン, $n = 7$), $p = 0.83$] (図 4B)。

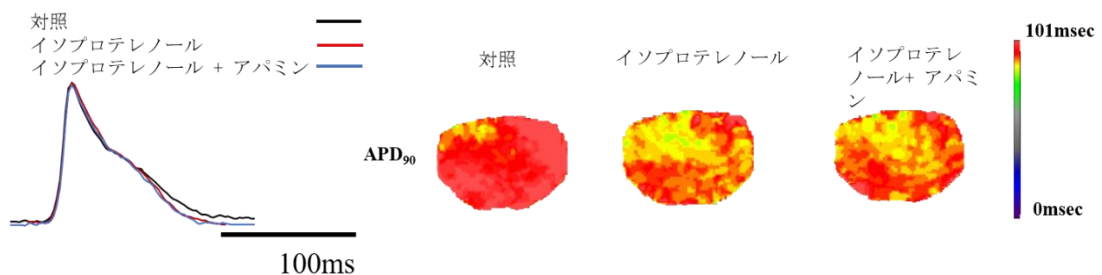


図 4A WKY における β -受容体刺激および β -受容体刺激下のアパミン投与における代表的な活動電位変化と APD_{90} マップ

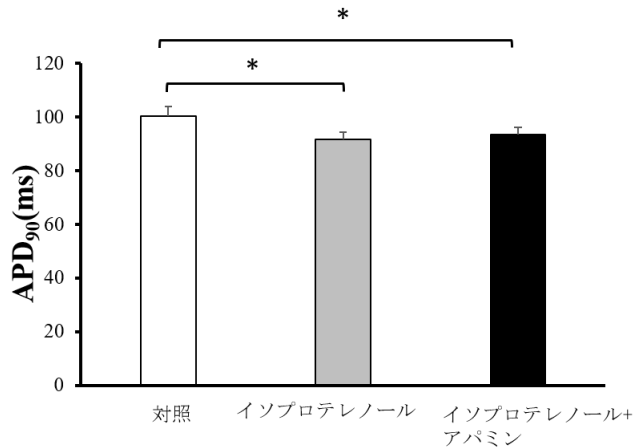


図 4B WKY における β -受容体刺激および β -受容体刺激下のアパミン投与における APD_{90} の変化。* $p < 0.05$, vs. 対照。検定: one-way repeated measures ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた。

4.4.2 SHR における β アドレナリン受容体刺激による活動電位時間短縮に対するアパミンの効果

図 5A に SHR 群における左室の代表的な活動電位波形および APD_{90} マップを示す。対照に比べ、ISO (100nM) による β -アドレナリン受容体刺激にて APD_{90} の有意な短縮を認め、ISO (100nM) 存在下にアパミンを加えたところ APD_{90} の延長を認めた [APD_{90} : 134.4 ± 5.50 msec (対照, $n = 10$) vs. 116.6 ± 5.05 msec (イソプロテレンール, $n = 10$), $p = 0.0007$; 116.6 ± 5.05 msec (イソプロテレンール) vs. 125.4 ± 3.80 msec (イソプロテレンール + アパミン, $n = 10$), $p = 0.011$] (図 5B)。

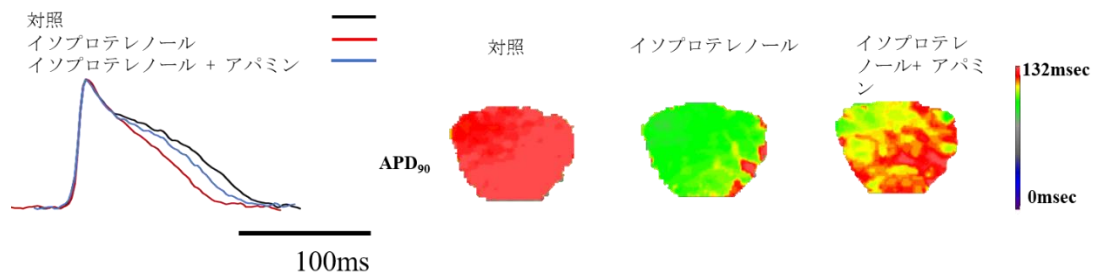


図 5A SHR における β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激下のアパミン投与における代表的な活動電位変化と APD_{90} マップ

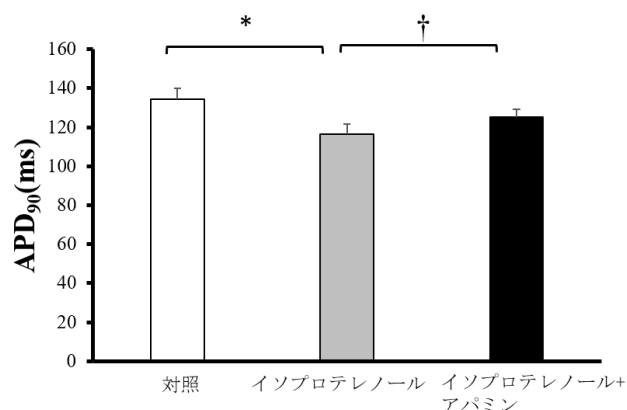


図 5B SHR における β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激下のアパミン投与における APD₉₀ の変化。* $p < 0.05$, vs. 対照, † $p < 0.05$, vs. イソプロテレノール。検定: one-way repeated measures ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた。

4.5 β -アドレナリン受容体刺激による細胞内カルシウム動態の変化

4.5.1 WKY における β -アドレナリン受容体刺激による細胞内カルシウム動態の変化

図 6A に WKY 群における左室の代表的なカルシウムトランジエント波形および CaTD₉₀ マップを示す。コントロール群に比べ、ISO (100nM) による β -アドレナリン受容体刺激にて CaTD₉₀ の有意な短縮を認めたが、ISO (100nM) 存在下にアパミンを加えても CaTD₉₀ の有意な延長を認めなかった [CaTD₉₀: 133.3 $\pm$ 1.60 msec (対照, n = 7) vs. 114.4 $\pm$ 4.4 msec (イソプロテレノール, n = 7), $p = 0.01$; 114.4 $\pm$ 4.4 msec (イソプロテレノール, n = 7) vs. 115.0 $\pm$ 2.7 msec (イソプロテレノール + アパミン, n = 7), $p = 0.89$] (図 6B)。またカルシウムトランジエント波形の上行脚の頂点の波高に対する 10% の波高から 90% の波高までの時間を rise time と定義し³⁰、測定した結果を図 6B に示した。対照に比べ、rise time は ISO 投与にて有意に短縮したが、ISO 存在下にアパミンを投与しても rise time に有意な変化を認めなかった [Rise time 11.2 $\pm$ 0.14 msec (対照, n = 7) vs. 9.65 $\pm$ 0.41 msec (イソプロテレノール, n = 7), $p < 0.0001$; 9.65 $\pm$ 0.41 msec (イソプロテレノール群, n = 7) vs. 10.1 $\pm$ 0.33 msec (イソプロテレノール + アパミン, n = 7), $p = 0.37$] (図 6B)。

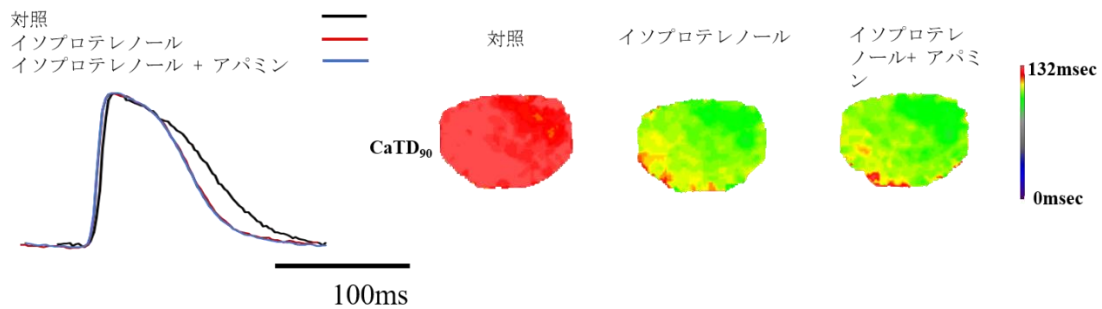


図 6A WKY における β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激下のアパミン投与における代表的なカルシウムトランジェント変化と CaTD_{90} マップ

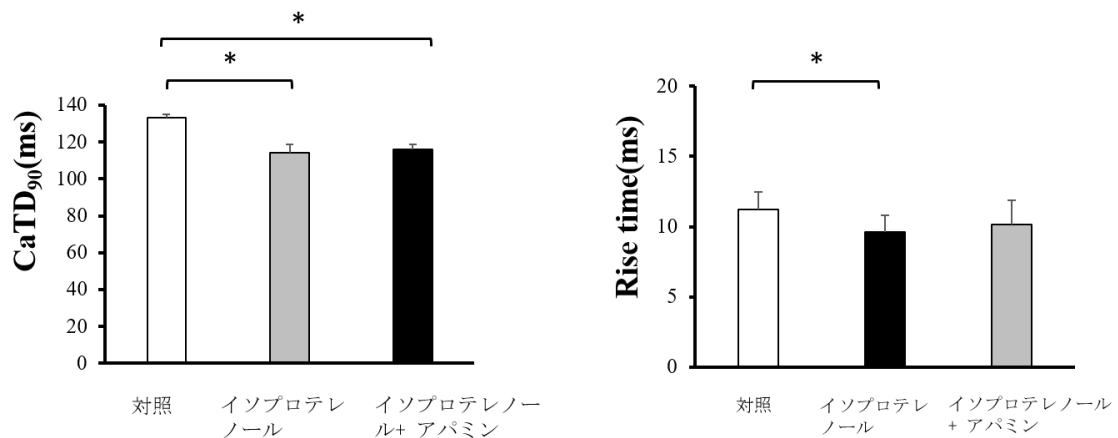


図 6B WKY における β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激下のアパミン投与における CaTD_{90} および risetime の変化。* $p < 0.05$, vs. 対照。検定: one-way repeated measures ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた。

4.5.2 SHR における β -アドレナリン受容体刺激による細胞内カルシウム動態の変化

図 7A に SHR 群における左室の代表的なカルシウムトランジェント波形および CaTD_{90} マップを示す。コントロール群に比べ、ISO (100nM) による β -アドレナリン受容体刺激にて CaTD_{90} の有意な短縮を認めたが、ISO (100nM) 存在下にアパミンを加えても CaTD_{90} の有意な延長を認めなかった [CaTD_{90} : 140.6 ± 5.21 msec (対照, $n=10$) vs.

117.5 ± 4.31 msec (イソプロテレノール、n=10)、 $p=0.0005$; 117.5 ± 4.31 msec (イソプロテレノール、n=10) vs. 118.6 ± 3.66 msec (イソプロテレノール + アパミン、n=10)、 $p=0.94$](図 7B)。rise time は ISO 投与にて有意に短縮したが、ISO 存在下にアパミンを投与しても rise time に有意な変化を認めなかった[Rise time 16.0 ± 1.45 msec (対照、n=10) vs. 12.4 ± 1.11 msec (イソプロテレノール、n=10)、 $p=0.0007$; 12.4 ± 1.11 msec (イソプロテレノール、n=10) vs. 13.8 ± 1.40msec (イソプロテレノール + アパミン、n=10)、 $p=0.11$](図 7B)。

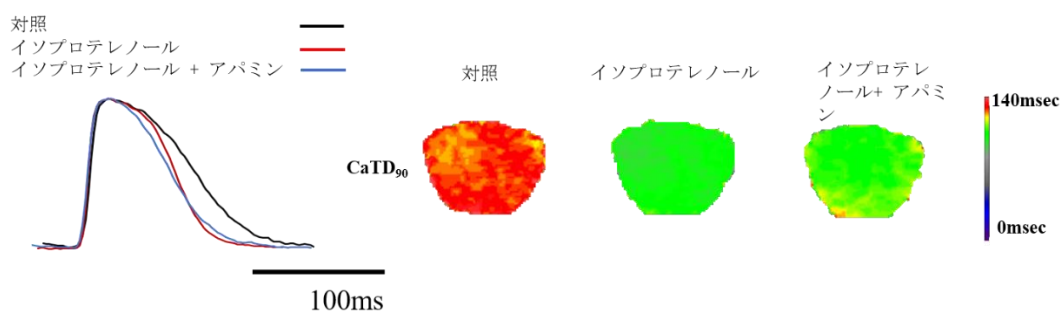


図 7A SHR における β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激下のアパミン投与における代表的なカルシウムトランジェント変化と CaTD₉₀ マップ

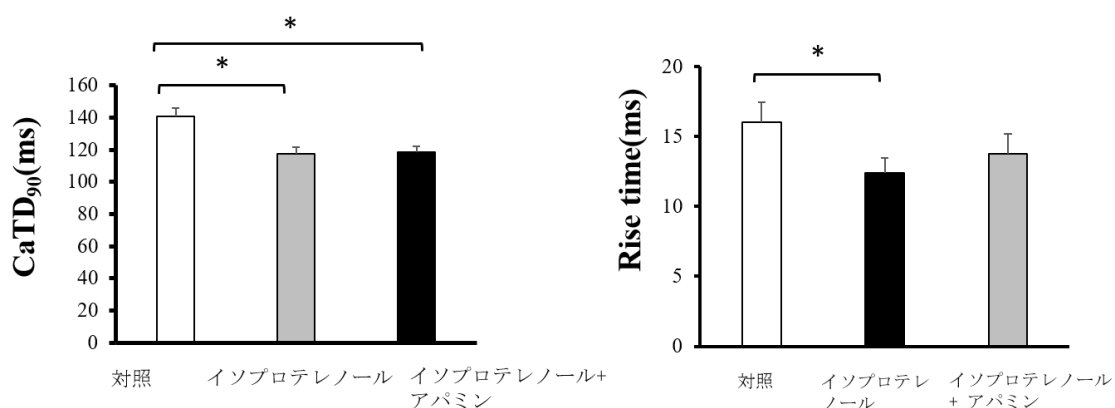


図 7B SHR における β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激下のアパミン投与における CaTD₉₀ および rise time の変化。* $p < 0.05$, vs. 対照。検定: one-way repeated measures ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた。

4.6 活動電位回帰曲線

4.6.1 WKY における β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激とアパミンを併用した際の活動電位回帰曲線

WKY において対照、イソプロテレノールおよびイソプロテレノール + アパミンの3群で活動電位回帰曲線(APDR curve: action potential duration restitution curve)を作成した。代表的な APDR curve を図 8A に示す。得られた APDR curve の最大傾きを対照、イソプロテレノールおよびイソプロテレノール + アパミンの3群で測定し比較したが3群間に有意な変化を認めなかった[maximum slope of restitution: 0.43 ± 0.08 (対照, $n=4$) vs. 0.50 ± 0.05 (イソプロテレノール, $n=4$) vs. 0.46 ± 0.07 (イソプロテレノール + アパミン, $n=4$)、 $p=0.75$] (図 8B)。

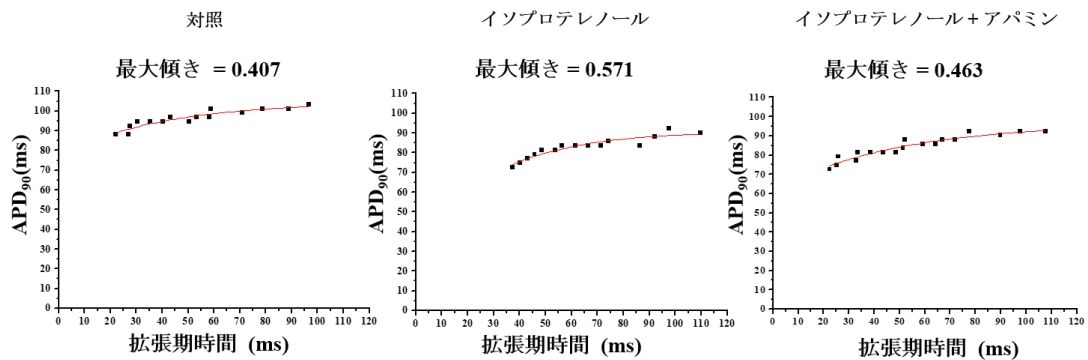


図 8A WKY における対照、 β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激下のアパミン投与における代表的な APDR curve

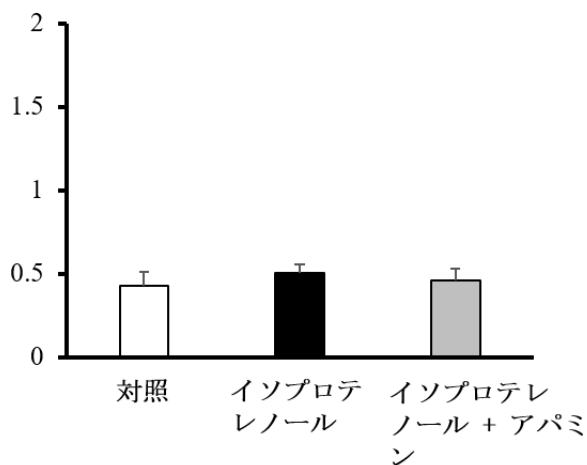


図 8B WKY における対照、 β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受

容体刺激下のアパミン投与における APDR curve の最大傾きの変化

4.6.2 SHR における β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激とアパミンを併用した際の活動電位回帰曲線

SHR において対照、イソプロテレノールおよびイソプロテレノール + アパミンの 3 群で活動電位回帰曲線(APDR curve: action potential duration restitution curve)を作成した。代表的な APDR curve を図 9A に示す。得られた APDR curve の最大傾きを対照、イソプロテレノールおよびイソプロテレノール + アパミンの 3 群で測定した。対照に比し、イソプロテレノールでは有意に最大傾きが増大したが、この変化はイソプロテレノール + アパミンで有意に低下した [maximum slope of restitution: 0.42 ± 0.05 (対照, $n=4$) vs. 1.55 ± 0.31 (イソプロテレノール, $n=5$), $p=0.01$; vs. 0.44 ± 0.15 (イソプロテレノール + アパミン, $n=4$), $p=0.02$] (図 9B)。

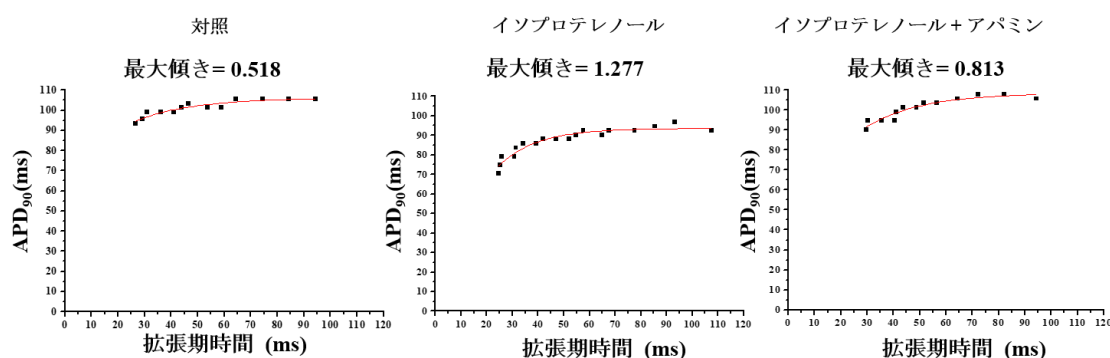


図 9A SHR における対照、 β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激下のアパミン投与における代表的な APDR curve

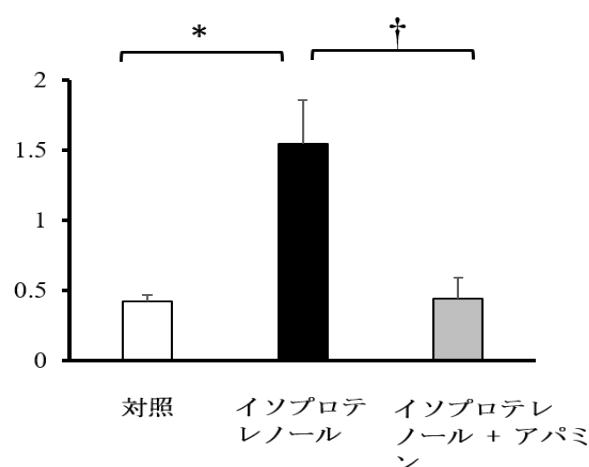


図 9B SHR における対照、 β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激下のアパミン投与における APDR curve の最大傾きの変化。 $*p < 0.05$, vs. 対照、 $\dagger < 0.05$, vs. イソプロテレノール。検定: one-way ANOVA を行い、事後検定は Tukey の多重比較検定を用いた。

4.7 活性化 CaMKII の定量

WKY、SHR 両群における対照と β -アドレナリン受容体刺激下における CaMKII 活性を Cyclex[®] CaM Kinase II assay kit を用いて測定した。結果を図 10 に示す。

WKY 群では CaMKII 活性は対照およびイソプロテレノールでは有意な差は認めなかった [$33.5 \pm 2.9\%$ (対照, $n=3$) vs. $36.0 \pm 1.0\%$ (イソプロテレノール, $n=3$), $p=0.47$]。一方で、SHR 群においては対照に比し、イソプロテレノールで有意に CaMKII 活性が上昇していた [$40.3 \pm 1.3\%$ (対照, $n=3$) vs. $46.1 \pm 0.9\%$ (イソプロテレノール, $n=3$), $p=0.02$]。

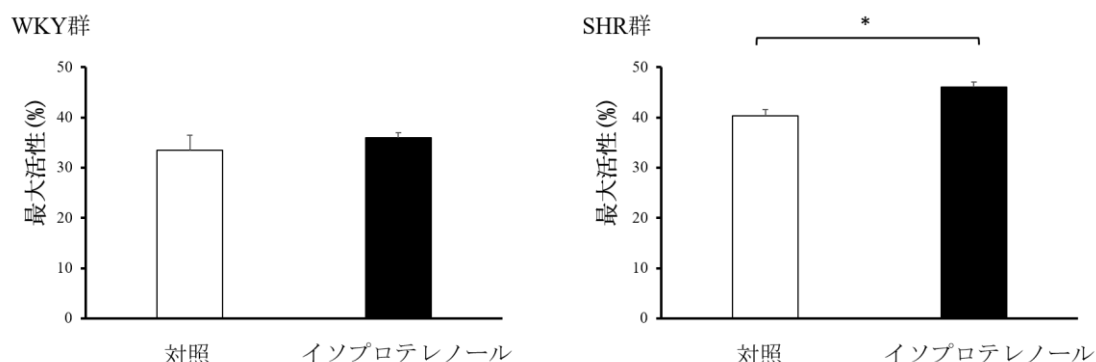


図 10 対照群およびイソプロテレノール (100nM) 群における CaMKII 活性。 $*p < 0.05$, vs. 対照。

4.8 β -アドレナリン受容体刺激およびアパミン存在下における KN-93 の活動電位時間およびカルシウムトランジェントの変化

ISO(100nM)による β -アドレナリン受容体刺激および CaMKII 阻害薬である KN-93 を加えた群と ISO (100nM)、KN-93 およびアパミンを投与した群にて活動電位およびカルシウムトランジェントの変化を測定した結果を図 9A に示す。ISO + KN-93 と ISO + KN-93 + apamin では APD_{90} の有意な変化を認めなかった [APD_{90} : 110.0 ± 2.60 msec (イソプロテレノール + KN-93, $n=8$) vs. 110.8 ± 2.20 msec (イソプロテレノール

+KN-93 + アパミン、 $n=8$)、 $p=0.68$](図 11A)。一方、カルシウムトランジェントに関しても ISO + KN-93 と ISO + KN-93 + apamin で CaTD_{90} の有意な変化を認めなかった [CaTD_{90} : 111.4 ± 3.2 msec (イソプロテレノール + KN-93、 $n=8$) vs. 111.7 ± 2.3 msec (イソプロテレノール + KN-93 + アパミン、 $n=8$)、 $p=0.88$](図 11B)。

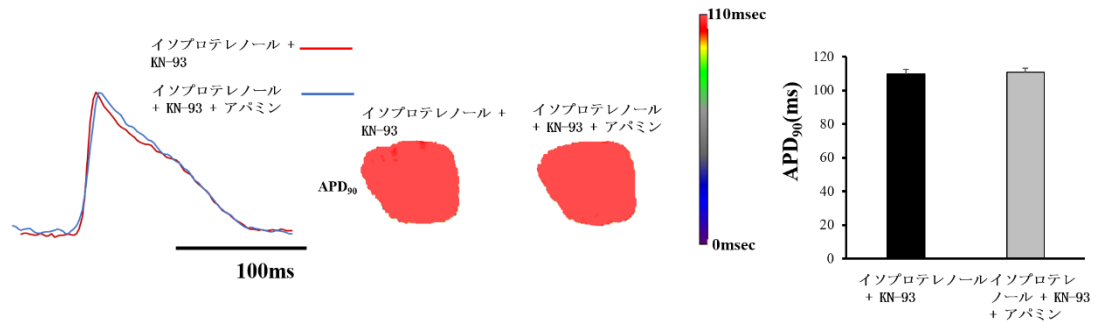


図 11A SHR におけるリン酸化 CaMKII 阻害下における β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激下のアパミン投与における代表的な活動電位変化と APD₉₀ マップ、APD₉₀ の変化

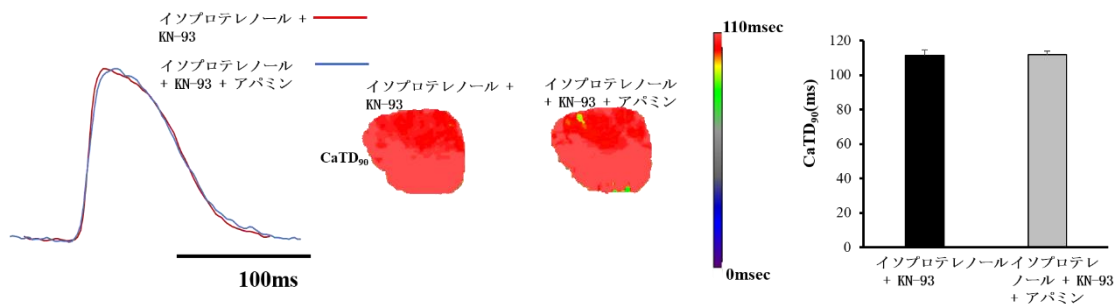


図 11B SHR におけるリン酸化 CaMKII 阻害下における β -アドレナリン受容体刺激および β -アドレナリン受容体刺激下のアパミン投与における代表的な細胞内カルシウム動態波形と CaTD₉₀ マップ、CaTD₉₀ の変化

5. 考察

我々は本研究を通じて以下の知見を明らかにした。SK チャネル電流が肥大心モデルにおける β -アドレナリン受容体刺激下の電気生理学的変化の一部を担い、持続性心室性不整脈の発症に関与していることである。さらに肥大心においては、 β -アドレナリン受容体刺激によって CaMKII 活性が上昇しており、CaMKII 活性の抑制によってアパミンによる APD の延長が抑制されることである。また、肥大心モデルにおける β -アドレナリン受容体刺激下の不整脈に関しては、APD 回帰曲線の最大傾きが上昇すること、またその変化は SK 電流をアパミンにて阻害することで抑制した点である。

5.1 β -アドレナリン受容体刺激下における電気生理学的変化

β -アドレナリン受容体刺激による活動電位時間の変化については、以下のような報告がなされている。ウサギの正常心にイソプロテレノールによる β -アドレナリン受容体刺激を行うと APD は有意に短縮し³¹、ヒト不全心を用いた研究でも β -アドレナリン受容体刺激により APD が短縮することが知られている¹⁰。しかしながら、APD 短縮の機序については再分極を担う外向きカリウムチャネルの関与が知られているものの、完全には解明されていない³²⁻³⁴。 β -アドレナリン受容体刺激は遅延整流性カリウムチャネル電流を有意に増大させ、さらには内向き整流性カリウムチャネル電流も中等度に増大させることが報告されているが、急速活性型整流性カリウムチャネル電流は僅かに減少することが報告されている^{32 33 34 35}。今回我々は、肥大心モデルおよび正常心モデルにイソプロテレノール 100nM による β -アドレナリン受容体刺激を行った。正常心モデルおよび肥大心モデルの両群で β -アドレナリン受容体刺激において有意に APD が短縮することを確認した (図 4A、4B および 5A、5B)。一方、 β -アドレナリン受容体刺激の存在下に SK チャネル阻害薬であるアパミン (100nM)を加えたところ、正常心モデルでは有意な延長は認めなかったが、肥大心モデルではアパミンによる有意な APD の延長を認めた (図 4A、4B および 5A、5B)。SK チャネルは 3 種類のサブタイプがあることが知られている³⁶。その中でも、最もアパミンに対する親和性が高いものは SK2 チャネルであるとされる^{36,37}。我々は過去に、肥大心モデルである SHR において SK2 タンパクの発現が有意に上昇していることを報告している¹⁷。従って、肥大心モデルの β -アドレナリン受容体刺

激による APD の短縮機序に SK2 チャンネル電流が寄与していることが示唆される。

5.2 β -アドレナリン受容体刺激下における細胞内カルシウム動態の変化

β -アドレナリン受容体刺激にて WKY 群、SHR 群の両群にて CaTD は有意に短縮し rise time も有意に短縮した (図 6A、6B および図 7A、7B)。これらの結果は、 β -アドレナリン受容体刺激で CaTD が短縮するという過去の報告と矛盾しない^{10 31 38}。また、本研究では WKY 群、SHR 群の両群において β -アドレナリン受容体刺激下のアパミンの投与は CaTD ならびに rise time に、影響を与えなかった。また、 β -アドレナリン受容体刺激による CaT 波高の増加の程度に関しても、WKY 群および SHR 群の両群において有意な差を認めなかった。これらの結果から、正常心モデル、肥大心モデルの両群ともに β -アドレナリン受容体刺激による細胞内カルシウム動態は同様の变化を示すことを確認できた。既報では、SK チャンネルは細胞内カルシウム濃度の変化で活性化するのではなく、SK チャンネルタンパクへの修飾がカルシウム感受性を変化させると報告されている²¹。実際に、我々は正常心筋細胞においては、高濃度の細胞内カルシウム濃度 ($pCa=5$)でも、SK チャンネル電流の活性化は極めて減弱していることを報告している¹⁷。本研究での、肥大心でのみ β -アドレナリン受容体刺激下にアパミンによる APD の延長が観察されたことも、細胞内カルシウム動態の変化のみでは説明し得えない。肥大心では、SK チャンネル電流の制御がリン酸化 CaMKII によって制御される報告¹⁷と矛盾しない結果と考えられる。

5.3 β -アドレナリン受容体刺激と CaMKII 活性

本研究においては、イソプロテレノールに対する CaT 波高の濃度依存性、最大濃度における CaT の相対的増加が WKY 群、SHR 群の両群において有意な差がないことを確認できた (図 1A、1B)。過去の報告ではイソプロテレノールによる β -アドレナリン受容体刺激における相対的な CaT の増大は WKY 群および SHR 群の両群において有意な差を認めなかったと報告されており³⁹、我々の結果と矛盾しない。WKY ラットおよび SHR の左室乳頭筋を用いた研究では、心不全を合併していない SHR 群と WKY 群における β -アドレナリン受容体の密度に両群間における有意な差を認めなかったと報告している⁴⁰。また同報告においては、イソプロテレノールおよびアデニル酸シクラーゼを直接的に活性化するホルスコリンを投与し陽性変力作用を WKY 群と

SHR 群で比較したところ、SHR 群ではいずれの薬剤投与によっても陽性変力作用が減弱していることが判明した。従って、肥大心における β -アドレナリン受容体刺激は、 β 受容体より下流のシグナルが障害されていることが示唆される。一方、過去の研究では、イソプロテレノールによる β -アドレナリン受容体刺激のシグナルにおいて CaMKII は重要な役割を担っているとされている¹²。また CaMKII の活性化は肥大心や不全心筋への進展の制御にも関与していると報告されている⁴¹。イソプロテレノール (100nM) による β -アドレナリン受容体刺激下で CaMKII 活性を測定したが、特に SHR 群では CaMKII 活性が有意に上昇していることを確認した(図 10)。またイオンチャネルの制御においてはウサギの心筋細胞にアデノウイルスをベクターとして CaMKII δ を過剰発現させたモデルにおいては 24 時間以内にカリウム電流が増大すること、またその一部のカリウム電流が Autocamtide-2-related peptide (AIP:CaMKII 阻害薬)によって抑制されることが報告されている⁴²。この結果は急性の CaMKII 活性の上昇がカリウム電流を増大させ APD の短縮に寄与することを示唆している⁴²。一方、我々は β -アドレナリン受容体刺激下でのアパミンによる APD の延長が CaMKII 阻害薬である KN93 の投与にて抑制されることを見出した。この結果は、過去に我々が報告した心臓における SK チャネル電流が CaMKII によって制御されることや¹⁷、腸管平滑筋細胞における SK チャネル電流の制御を CaMKII が担っているとする報告²⁰ をより支持する結果であると考えられる。

5.4 β -アドレナリン受容体刺激による不整脈基質形成における SK チャネルの役割

心室性不整脈と SK チャネル電流との関連に関しては、ウサギの不全心モデルにおける再発性の心室細動と過剰な APD の短縮を SK チャネル電流の阻害にて抑制し得たとの報告がある²³。その一方で、房室ブロックを伴った頻脈誘発性の不全心モデルにおいては、アパミンを投与することで QT 間隔が延長し、torsade de pointes 様の心室頻拍を惹起したとの報告もある⁴³。APD 回帰曲線は拡張期時間と APD との間で得られる曲線であるが、拡張期時間が短くなるにしたがってより大きな APD の短縮が起きることで APD 回帰曲線は急峻化する。この曲線が急峻化することにより、APD オルタナンス(一拍毎に APD が変化すること)が生じやすくなるため、不応期の不均一性がもたらされる。その結果、心室細動の発症およびその維持に寄与するとされている⁸。ウサギの不全心モデルにおいては、アパミンは長いもしくは短いペーシン

グ周期長における心室筋の APD の延長をもたらし、APD 回帰曲線の平坦化に寄与すると報告されている⁴⁴。またヒトにおける β -アドレナリン受容体刺激における APD 回帰曲線解析の研究では、 β -アドレナリン受容体刺激にて APD 回帰曲線の最大傾斜が急峻化したと報告されている⁹。さらに交感神経を賦活化したウサギにおいても APD 回帰曲線の最大傾斜は増大し、同報告では副交感神経を賦活化することで APD 回帰曲線の最大傾斜が平坦化し、心室細動発症の閾値を上昇させたと報告している⁴⁵。我々は、正常心モデル群および肥大心モデルにて β -アドレナリン受容体刺激における催不整脈性と β -アドレナリン受容体刺激存在下にアパミンを投与した際の催不整脈性について検討した。WKY 群では β -アドレナリン受容体刺激下においても持続性心室性不整脈の発症頻度は上昇しなかった(図 2A、2B)。一方で、SHR 群では β -アドレナリン受容体刺激において有意に持続性心室性不整脈の発症頻度が上昇した(図 3A、3B)。さらに β -アドレナリン受容体刺激存在下にアパミンを加えて、持続性心室性不整脈の誘発性を検証したところ有意に心室性不整脈を抑制した(図 3A、3B)。また、WKY 群および SHR 群それぞれにおいて APD 回帰曲線の解析を行った。WKY 群では、対照、ISO、ISO+アパミンにおいて APD 回帰曲線の最大傾斜に有意な差を認めなかったが(図 8A、8B)、SHR 群においては β -アドレナリン受容体刺激にて APD 回帰曲線の最大傾斜が急峻化し、アパミンの投与にて平坦化した(図 9A、9B)。これらの結果は、肥大心では β -アドレナリン受容体刺激による SK チャネル電流の増大が APD 回帰曲線の最大傾斜をより急峻化させ、持続性心室性不整脈の発症、維持に寄与していることが示唆される。

5.5 本研究の限界

我々が本研究に用いた肥大心モデルとして SHR を使用した。SHR は遺伝的高血圧モデルとして幅広く使用されているが⁴⁶、本研究で得られた知見を肥大心として一般化して論じる際には、ほかの肥大心モデルでの検討も要すると考えられる。また本研究では、SK チャネル阻害薬としてアパミンを使用した。アパミンは心臓における特異的な SK チャネル電流阻害薬として報告されているものの²¹、アパミンの非特異的効果の影響も報告されており³⁷、本研究の結果を一般化するためには他の SK チャネル阻害薬での検討も必要と考える。また本研究では、 β -アドレナリン受容体刺激下の左室心筋の活動電位における SK チャネル電流に着目して研究を遂行しており、 β -

アドレナリン受容体刺激における APD 短縮の機序を完全に明らかにしたわけではない。またリン酸化 CaMKII 阻害薬として広く用いられている KN-93 を使用したが、KN-93 自体のカルシウムチャネル電流^{47,48}や急速活性型整流性カリウムチャネル電流への影響も報告されており⁴⁹、本研究の結果をより一般化するには他のリン酸化 CaMKII 阻害薬の使用や、他のチャネルへの影響を極力排除した検討も必要と考える。

6. 総括及び結論

本研究では、正常心ラットおよび肥大心ラットの左室心筋における β -受容体刺激に対する下記の現象を確認した。

① 急性の β -アドレナリン受容体刺激によって正常心、肥大心ともに APD の短縮を認める。

② 急性の β -アドレナリン受容体刺激によって正常心、肥大心ともに CaT 波高の増幅および CaTD の短縮を認める。

③ 急性の β -アドレナリン受容体刺激時に連続的心室ペーシングを施行し、ペーシング周期長を短縮すると、肥大心では有意に心室性不整脈の発症および APD 回帰曲線の最大傾斜の急峻化を認めるが、正常心では認めない。

β -アドレナリン受容体刺激下の APD 短縮の機序として、

④ 正常心では β -アドレナリン受容体刺激下でのアパミンによる APD 延長を認めないが、肥大心ではアパミンによる APD 延長を認める。

受容体刺激における催不整脈性と SK チャネルとの関連

⑤ 肥大心では、 β 受容体刺激による心室性不整脈発症率が上昇し、APD 回帰曲線の最大傾斜を急峻化させたが、アパミンの投与が APD 回帰曲線の最大傾斜を平坦化させ、催不整脈性を減じる。

β -アドレナリン受容体刺激における SK チャネルの制御

⑥ β -アドレナリン受容体刺激によって肥大心では CaMKII 活性が上昇する。

⑦ 肥大心では β -受容体刺激下にリン酸化 CaMKII を阻害することで、アパミンによる APD の延長を抑制する。

上記の結果からは、肥大心においては β -アドレナリン受容体刺激による催不整脈性には SK チャネルが寄与しており、その上流には CaMKII の活性が関与している点を発見したことは有意義な点と考える。器質的心疾患における突然死の抑制には β 遮断薬が有効と考えられるが、副作用の観点から β 遮断薬が十分に使用できない際などは SK チャネルを特異的に阻害することで催不整脈性を減じることができる可能性がある。一方、SK チャネル阻害薬であるアパミンは神経毒として知られおり、臨床応用に使用することが困難であることから、今後はより心臓特異的な SK チャネルを制御しうる治療が発展することを期待したい。

7. 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科内科学講座循環病態内科学分野 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北海道大学大学院医学研究科内科学講座循環病態内科学分野 横式尚司講師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学大学院医学研究科内科学講座循環病態内科学分野 三山博史助教、渡邊昌也助教、天満太郎医員並びに国立病院機構北海道医療センター循環器内科 水上和也医師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科内科学講座循環病態内科学分野 高橋雅之医師並びに循環病態内科学教室員、実験助手の皆様、医局秘書の皆様に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。

8. 引用文献

- 1 Bayes de Luna, A., Coumel, P. & Leclercq, J. F. Ambulatory sudden cardiac death: mechanisms of production of fatal arrhythmia on the basis of data from 157 cases. *Am. Heart J.* 117, 151-159 (1989).
- 2 Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 353, 2001-2007 (1999).
- 3 Nademanee, K., Taylor, R., Bailey, W. E., Rieders, D. E. & Kosar, E. M. Treating electrical storm : sympathetic blockade versus advanced cardiac life support-guided therapy. *Circulation* 102, 742-747 (2000).
- 4 Han, J., Garciadejalon, P. & Moe, G. K. ADRENERGIC EFFECTS ON VENTRICULAR VULNERABILITY. *Circ. Res.* 14, 516-524 (1964).
- 5 Meredith, I. T., Broughton, A., Jennings, G. L. & Esler, M. D. Evidence of a selective increase in cardiac sympathetic activity in patients with sustained ventricular arrhythmias. *N. Engl. J. Med.* 325, 618-624 (1991).
- 6 Curran, J., Hinton, M. J., Rios, E., Bers, D. M. & Shannon, T. R. Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ. Res.* 100, 391-398 (2007).
- 7 Litovsky, S. H. & Antzelevitch, C. Differences in the electrophysiological response of canine ventricular subendocardium and subepicardium to acetylcholine and isoproterenol. A direct effect of acetylcholine in ventricular myocardium. *Circ. Res.* 67, 615-627 (1990).
- 8 Weiss, J. N., Chen, P. S., Wu, T. J., Siegerman, C. & Garfinkel, A. Ventricular fibrillation: new insights into mechanisms. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1015, 122-132 (2004).
- 9 Taggart, P., Sutton, P., Chalabi, Z., Boyett, M. R., Simon, R., Elliott, D. & Gill, J. S. Effect of adrenergic stimulation on action potential duration restitution in humans. *Circulation* 107, 285-289 (2003).
- 10 Lang, D., Holzem, K., Kang, C., Xiao, M., Hwang, H. J., Ewald, G. A., Yamada, K. A. & Efimov, I. R. Arrhythmogenic remodeling of beta2 versus beta1 adrenergic signaling in the human failing heart. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 8, 409-419 (2015).
- 11 Erickson, J. R. & Anderson, M. E. CaMKII and its role in cardiac arrhythmia. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 19, 1332-1336 (2008).
- 12 Yoo, B., Lemaire, A., Mangmool, S., Wolf, M. J., Curcio, A., Mao, L. & Rockman, H. A. Beta1-adrenergic receptors stimulate cardiac contractility and CaMKII activation in vivo and enhance cardiac dysfunction following myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1377-1386 (2009).
- 13 Kuschel, M., Karczewski, P., Hempel, P., Schlegel, W. P., Krause, E. G. & Bartel, S. Ser16 prevails over Thr17 phospholamban phosphorylation in the beta-adrenergic regulation of cardiac relaxation. *Am. J. Physiol.* 276, H1625-1633 (1999).
- 14 Said, M., Mundina-Weilenmann, C., Vittone, L. & Mattiazzi, A. The relative relevance of phosphorylation

- of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of beta-adrenergic stimulation. *Pflugers. Arch.* 444, 801-809 (2002).
- 15 Ferrero, P., Said, M., Sanchez, G., Vittone, L., Valverde, C., Donoso, P., Mattiazzi, A. & Mundina-Weilenmann, C. Ca^{2+} /calmodulin kinase II increases ryanodine binding and Ca^{2+} -induced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release kinetics during beta-adrenergic stimulation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43, 281-291 (2007).
 - 16 Mitsuyama, H., Yokoshiki, H., Watanabe, M., Mizukami, K., Shimokawa, J. & Tsutsui, H. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II increases the susceptibility to the arrhythmogenic action potential alternans in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 307, H199-206 (2014).
 - 17 Mizukami, K., Yokoshiki, H., Mitsuyama, H., Watanabe, M., Tenma, T., Takada, S. & Tsutsui, H. Small-conductance Ca^{2+} -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 (2015).
 - 18 Xiao, L., Coutu, P., Villeneuve, L. R., Tadevosyan, A., Maguy, A., Le Bouter, S., Allen, B. G. & Nattel, S. Mechanisms underlying rate-dependent remodeling of transient outward potassium current in canine ventricular myocytes. *Circ. Res.* 103, 733-742 (2008).
 - 19 Mustroph, J., Maier, L. S. & Wagner, S. CaMKII regulation of cardiac K channels. *Front. Pharmacol.* 5, 20 (2014).
 - 20 Kong, I. D., Koh, S. D., Bayguinov, O. & Sanders, K. M. Small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels are regulated by Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II in murine colonic myocytes. *J. Physiol.* 524 Pt 2, 331-337 (2000).
 - 21 Adelman, J. P., Maylie, J. & Sah, P. Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels: form and function. *Annu. Rev. Physiol.* 74, 245-269 (2012).
 - 22 Nagy, N., Szuts, V., Horvath, Z., Seprenyi, G., Farkas, A. S., Acsai, K., Prorok, J., Bitay, M., Kun, A., Pataricza, J., Papp, J. G., Nanasi, P. P., Varro, A. & Toth, A. Does small-conductance calcium-activated potassium channel contribute to cardiac repolarization? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47, 656-663 (2009).
 - 23 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., Ogawa, M., Weiss, J. N., Lin, S. F., Ai, T. & Chen, P. S. Small-conductance calcium-activated potassium channel and recurrent ventricular fibrillation in failing rabbit ventricles. *Circ. Res.* 108, 971-979 (2011).
 - 24 Bing, O. H., Brooks, W. W., Robinson, K. G., Slawsky, M. T., Hayes, J. A., Litwin, S. E., Sen, S. & Conrad, C. H. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 383-396 (1995).
 - 25 Chan, V., Fenning, A., Levick, S. P., Loch, D., Chunduri, P., Iyer, A., Teo, Y. L., Hoey, A., Wilson, K.,

- Burstow, D. & Brown, L. Cardiovascular changes during maturation and ageing in male and female spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 57, 469-478 (2011).
- 26 Kohya, T., Yokoshiki, H., Tohse, N., Kanno, M., Nakaya, H., Saito, H. & Kitabatake, A. Regression of left ventricular hypertrophy prevents ischemia-induced lethal arrhythmias. Beneficial effect of angiotensin II blockade. *Circ. Res.* 76, 892-899 (1995).
- 27 Fedorov, V. V., Lozinsky, I. T., Sosunov, E. A., Anyukhovskiy, E. P., Rosen, M. R., Balke, C. W. & Efimov, I. R. Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. *Heart Rhythm* 4, 619-626 (2007).
- 28 Goldhaber, J. I., Xie, L. H., Duong, T., Motter, C., Khuu, K. & Weiss, J. N. Action potential duration restitution and alternans in rabbit ventricular myocytes: the key role of intracellular calcium cycling. *Circ. Res.* 96, 459-466 (2005).
- 29 Pezhouman, A., Singh, N., Song, Z., Nivala, M., Eskandari, A., Cao, H., Bapat, A., Ko, C. Y., Nguyen, T., Qu, Z., Karagueuzian, H. S. & Weiss, J. N. Molecular Basis of Hypokalemia-Induced Ventricular Fibrillation. *Circulation* 132, 1528-1537 (2015).
- 30 Laurita, K. R. & Singal, A. Mapping action potentials and calcium transients simultaneously from the intact heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H2053-2060 (2001).
- 31 Hoeker, G. S., Hood, A. R., Katra, R. P., Poelzing, S. & Pogwizd, S. M. Sex differences in beta-adrenergic responsiveness of action potentials and intracellular calcium handling in isolated rabbit hearts. *PLoS One* 9, e111411 (2014).
- 32 Volders, P. G., Stengl, M., van Opstal, J. M., Gerlach, U., Spatjens, R. L., Beekman, J. D., Sipido, K. R. & Vos, M. A. Probing the contribution of IKs to canine ventricular repolarization: key role for beta-adrenergic receptor stimulation. *Circulation* 107, 2753-2760 (2003).
- 33 Harmati, G., Banyasz, T., Barandi, L., Szentandrassy, N., Horvath, B., Szabo, G., Szentmiklosi, J. A., Szenasi, G., Nanasi, P. P. & Magyar, J. Effects of beta-adrenoceptor stimulation on delayed rectifier K(+) currents in canine ventricular cardiomyocytes. *Br. J. Pharmacol.* 162, 890-896 (2011).
- 34 Zhu, Y., Ai, X., Oster, R. A., Bers, D. M. & Pogwizd, S. M. Sex differences in repolarization and slow delayed rectifier potassium current and their regulation by sympathetic stimulation in rabbits. *Pflugers. Arch.* 465, 805-818 (2013).
- 35 Banyasz, T., Jian, Z., Horvath, B., Khabbaz, S., Izu, L. T. & Chen-Izu, Y. Beta-adrenergic stimulation reverses the I Kr-I Ks dominant pattern during cardiac action potential. *Pflugers. Arch.* 466, 2067-2076 (2014).
- 36 Kohler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V., Maylie, J. & Adelman, J. P. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273, 1709-1714 (1996).
- 37 Schetz, J. A. & Anderson, P. A. Pharmacology of the high-affinity apamin receptor in rabbit heart.

- Cardiovasc. Res.* 30, 755-762 (1995).
- 38 Dries, E., Santiago, D. J., Johnson, D. M., Gilbert, G., Holemans, P., Korte, S. M., Roderick, H. L. & Sipido, K. R. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and nitric oxide synthase 1-dependent modulation of ryanodine receptors during beta-adrenergic stimulation is restricted to the dyadic cleft. *J. Physiol.* 594, 5923-5939 (2016).
 - 39 Bing, O. H., Brooks, W. W., Conrad, C. H., Sen, S., Perreault, C. L. & Morgan, J. P. Intracellular calcium transients in myocardium from spontaneously hypertensive rats during the transition to heart failure. *Circ. Res.* 68, 1390-1400 (1991).
 - 40 Atkins, F. L., Bing, O. H., DiMauro, P. G., Conrad, C. H., Robinson, K. G. & Brooks, W. W. Modulation of left and right ventricular beta-adrenergic receptors from spontaneously hypertensive rats with left ventricular hypertrophy and failure. *Hypertension* 26, 78-82 (1995).
 - 41 Anderson, M. E., Brown, J. H. & Bers, D. M. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51, 468-473 (2011).
 - 42 Wagner, S., Hacker, E., Grandi, E., Weber, S. L., Dybkova, N., Sossalla, S., Sowa, T., Fabritz, L., Kirchhof, P., Bers, D. M. & Maier, L. S. Ca/calmodulin kinase II differentially modulates potassium currents. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 2, 285-294 (2009).
 - 43 Chang, P. C., Hsieh, Y. C., Hsueh, C. H., Weiss, J. N., Lin, S. F. & Chen, P. S. 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 (2013).
 - 44 Hsieh, Y. C., Chang, P. C., Hsueh, C. H., Lee, Y. S., Shen, C., Weiss, J. N., Chen, Z., Ai, T., Lin, S. F. & Chen, P. S. Apamin-sensitive potassium current modulates action potential duration restitution and arrhythmogenesis of failing rabbit ventricles. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 6, 410-418 (2013).
 - 45 Ng, G. A., Brack, K. E., Patel, V. H. & Coote, J. H. Autonomic modulation of electrical restitution, alternans and ventricular fibrillation initiation in the isolated heart. *Cardiovasc. Res.* 73, 750-760 (2007).
 - 46 Doggrel, S. A. & Brown, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* 39, 89-105 (1998).
 - 47 Anderson, M. E., Braun, A. P., Wu, Y., Lu, T., Wu, Y., Schulman, H. & Sung, R. J. KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca^{++} /calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 996-1006 (1998).
 - 48 Pellicena, P. & Schulman, H. CaMKII inhibitors: from research tools to therapeutic agents. *Front. Pharmacol.* 5, 21 (2014).
 - 49 Hegyi, B., Chen-Izu, Y., Jian, Z., Shimkunas, R., Izu, L. T. & Banyasz, T. KN-93 inhibits IKr in mammalian cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 89, 173-176 (2015).