

東邦大学審査学位論文（博士）

博士論文

マウス心室筋の興奮収縮機構および  
アドレナリン $\alpha$ 受容体刺激応答の発達変化

東邦大学大学院 薬学研究科 博士後期課程

濱口 正悟

指導:薬物学教室 田中 光 教授

# 目次

<b>第 1 章 序論</b>	<b>2</b>
<b>第 2 章 実験方法</b>	<b>6</b>
第1節 実験動物	6
第2節 糖尿病マウスの作成	6
第3節 心室筋組織標本の作製	6
第4節 収縮力測定	6
第5節 心室筋活動電位の測定	7
第6節 単離心室筋細胞の調製	7
第7節 落射蛍光顕微鏡を用いた細胞内事象の画像解析	8
第8節 共焦点顕微鏡を用いた細胞内事象の画像解析	9
第9節 膜電位固定法による電流測定	9
第10節 栄養液の組成	10
第11節 統計処理	11
第12節 使用薬物	11
<b>第 3 章 マウス心室筋の興奮収縮機構の発達変化</b>	<b>12</b>
第1節 基本的性質	12
第2節 薬理的検討	20
第3節 考察	23
<b>第 4 章 <math>\alpha</math> 受容体刺激に対する陽性変力反応の機序</b>	<b>27</b>
第1節 $\alpha$ 受容体刺激応答の発達変化	27
第2節 陽性変力反応の機序	28
第3節 考察	35
<b>第 5 章 <math>\alpha</math> 受容体刺激応答の発達変化</b>	<b>38</b>
第1節 陽性変力反応の発達変化	38
第2節 陰性変力反応の発達変化	41
第3節 考察	49
<b>第 6 章 糖尿病マウス心室筋の <math>\alpha</math> 受容体刺激応答</b>	<b>53</b>
第1節 糖尿病マウス心室筋の興奮収縮機構	53
第2節 糖尿病マウス心室筋の $\alpha$ 受容体刺激応答	58
第3節 糖尿病マウス心室筋に対する SERCA 活性化薬の影響	60
第4節 考察	64
<b>第 7 章 総括</b>	<b>70</b>
<b>第 8 章 謝辞</b>	<b>72</b>
<b>第 9 章 参考文献</b>	<b>73</b>

# 第1章 序論

心臓は全身に血液を循環させるポンプの役割を担っており、生涯拍動し続ける。全身の組織は必要な酸素や栄養の取得、老廃物の除去を血液に依存しており、心臓は生体内で最も重要な器官の 1 つである。地球上の動物達はそれぞれ固有の寿命と生活様式を有しているが、心臓にも動物毎に個性がある。一般に心拍数と寿命は逆相関する傾向があり、心拍数の高い動物ほど寿命が短いという関係がある。1 分間の拍動数は象では 20 回、ヒトでは 60 回、汎用実験動物で体の小さいマウスでは 600 回である。これほど拍動頻度に差があるということは、その興奮や収縮の仕組みにも大きな違いがあるはずである。

また、心臓の性質は動物種だけでなく、発達段階、病気の有無などによっても異なり、神経伝達物質や薬物に対する応答も様々である。心臓機能制御の主役である交感神経の伝達物質 noradrenaline は、ほとんどの動物種で  $\beta$  受容体を介して心拍数および心収縮力を増大させる。これに対して、本研究の対象である  $\alpha$  受容体を介した応答は、ウサギ、モルモット、ラット、マウスなど様々な動物種で異なり、またマウスでは発達段階によっても応答が異なる。当研究室では興奮収縮機構やアドレナリン  $\alpha$  受容体刺激応答の発達変化に着目し、モルモットやマウスを用いて検討を行ってきた。これまでは、興奮収縮機構と  $\alpha$  受容体刺激応答の発達変化は別々に検討されてきたが、私は興奮収縮機構と刺激応答の間に何か関連性があるのではないかと考え、マウス心室筋アドレナリン  $\alpha$  受容体刺激応答の発達変化を、刺激応答と興奮収縮機構の関連性を研究するモデルと捉え、研究対象とした。このように心筋の多様性と合目的性について研究することは、心臓の普遍的理解につながると考えている。

## 興奮収縮機構の多様性

心筋収縮の引き金となるカルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )は、細胞膜の脱分極によって開口した電位依存性の L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルから細胞内へ流入する。哺乳動物成体心室筋の場合、特に細胞膜が細胞中心部に向かって陥入している T 管部分には L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルが高密度に存在しており、そこから流入した  $\text{Ca}^{2+}$ が引き金となり筋小胞体(sarcoplasmic reticulum: SR)のうち T 管と至近距離で対峙している junctional SR のリアノジン受容体(ryanodine receptor: RyR)を開口させる。収縮時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は主としてこの SR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release: CICR)により起きるとされている。 $\text{Ca}^{2+}$ は収縮タンパクのアクチンフィラメント上のトロポニン C と結合し、これによりミオシンフィラメントとの相互作用が生じて収縮が誘起される。その後  $\text{Ca}^{2+}$ は、主に SR の ATP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプ(Sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: SERCA)によって濃度勾配に逆らって再取り込みされるか、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger: NCX)によって細胞外に排出され、その結果、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が減少し、心筋は弛緩する。このように、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化に直接関与する L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル、SR および NCX は心臓がポンプ機能を維持し続ける上で中心的役割を担っている。

さらに、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル、SR および NCX は、動物種や発達段階により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化に寄与する程度が異なると考えられている。心筋において、細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$ 流入させる L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルは脱分極により活性化する性質を持つ。したがって、活動電位のプラトー相の大きさ、すなわち活動電位持続時間(action potential duration: APD)と L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルからの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入量はある程度相関すると考えられ、APD の長い活動電位を持つ心筋ほど、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの筋収縮に対する寄与が大きいと推測される。事実、200 ms 前後の明確なプラトー相をもつモルモット心室筋とプラトー相を欠く成体マウス心室筋の収縮に L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル遮断薬 nifedipine および SR の  $\text{Ca}^{2+}$ 放出チャネル阻害薬 ryanodine を処置すると、nifedipine による収縮力抑制率はモルモット > マウスの順であるが、ryanodine による収縮力抑制率はモルモット < マウスであった (Agata et al., 1994; Tanaka et al., 1998; Tanaka et al., 2009)。このことから、成体マウスは細胞膜上の L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを介する  $\text{Ca}^{2+}$ 流入よりも、SR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出に強く依存した  $\text{Ca}^{2+}$ 動態を示すことがわかる。また、マウスは心重量あたりの SR の量や SERCA 活性が他種と比べて高いという報告もこのことを支持している (Hamilton and Ianuzzo, 1991)。

心筋の発達変化に関しては様々な手法で研究がなされてきた。心電図や心エコーにより拍動そのものを観測することが可能である。マウスの場合、胎生期の 9 日目に心臓の拍動が開始し、胎生期の拍動数は毎分 200 回程度であるが、出生後に上昇して成体では毎分 700 回に達する (Adachi et al., 2013)。心臓拍動の引き金となる電気現象、すなわち活動電位の記録は複数の動物種で行われている。モルモット心室筋の場合、胎生期にまず APD が延長する。胎生期末期に APD は短縮し、出生直後に最短となるが、生後発達に伴い再び延長に転ずる (Agata et al., 1993)。マウスに関しては出生後に APD が短縮して、成体では極めて持続の短い特徴的な波形となることが報告されている (Tanaka et al., 1998)。

前述のように、モルモットとマウスを比較すると心拍数、活動電位波形、イオンチャネルの性質やトランスポーターの動作様式などに違いがあり、興奮収縮機構が異なることが示唆されている。マウスの心臓は発達に伴い、心拍数の増加や APD の短縮が観察されている。すなわち、マウスの心筋も発達に伴い、興奮収縮機構が変化していくことが推測できる。

## $\alpha$ 受容体刺激応答

交感神経終末から遊離される noradrenaline や副腎髄質より血液中に分泌される adrenaline などのカテコールアミンは、心筋細胞膜上のアドレナリン受容体に作用して心拍数および心収縮力を増大させ、心臓のポンプ機能の促進的な調節に重要な役割を果たしている。この心機能促進は  $\beta$  受容体刺激(特に  $\beta_1$  受容体)による細胞内 cAMP の上昇、それに続く L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルや SR 機能の活性化により達成されると考えられてきた。しかし、心筋細胞膜上には  $\alpha$  受容体も存在し、この受容体を介して陽性変力作用が起こることが近年明らかになってきた (Endoh et al., 1991)。その陽性変力反応の機序については、電気生理学的検討により、活動電位持続時間の延長 (Bruckner and Scholz, 1984)、活動電位再分極に関与する  $\text{K}^+$ チャネルの抑制 (Fedida et al., 1990; Tohse et al., 1990)、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ 電流の増大 (Liu et al., 1994; Liu and Kennedy, 1998; Zhang et al.,

1998)が報告されており、活動電位再分極に関与する  $K^+$ チャネルの抑制により間接的に、加えて直接的な L 型  $Ca^{2+}$ チャネルの活性化により細胞外からの  $Ca^{2+}$ 流入が増大することがその陽性変力反応の主たる機序であると考えられている(Terzic et al., 1992;Fedida, 1993)。 $\alpha$  受容体刺激刺激に対して陽性変力反応を示すことが、ヒト(Bruckner et al., 1984)、ウサギ(Endoh and Schumann, 1975)、ウシ(Bruckner and Scholz, 1984)、ネコ(Hartmann et al., 1988)、ブタ(Meyer et al., 1993)の心室筋で報告されている。また、モルモット(Dirksen and Sheu, 1990)、ラット(Skomedal and Osnes, 1983)の心室筋では二または三層性の複雑な変力反応を示す。

マウス心室筋の場合、幼若期では他の動物種同様に  $\alpha$  受容体刺激に対して陽性変力反応を示すが、生後 2 週齢前後を境に陰性変力反応に反転することが当研究室の間仁田によって見出された(Tanaka et al., 1995a)。現在までのところ、陰性変力反応が観察されることおよび発達に伴い応答が反転することは他の動物種において報告されておらず、マウス特有の現象である。当研究室はこの発達変化に興味を持ち、長年研究してきた。その結果、whole cell voltage clamp 法を用いた電流測定により、成体心筋では  $\alpha$  受容体刺激により NCX 電流が増加することが明らかとなった(Nishimaru et al., 2001)。さらに、成体マウスでは巨大な一過性外向き  $K^+$ 電流(transient outward current:  $I_{to}$ )により急速な再分極が起こり、プラトー相を欠く特徴的な活動電位波形が見られるが、これにより収縮期後半での NCX による  $Ca^{2+}$ 排出が新生仔マウスや他種の心筋に比べ顕著であることに起因し、 $\alpha$  受容体刺激に対して陰性変力反応を示すという結論に至った(Nishimaru et al., 2001)。しかし、現在のところ幼若心筋において観察される  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応の機序、および発達に伴い陽性変力反応から陰性変力反応へと転じる仕組みは明らかにされていない。本研究では、陽性変力反応の機序を解明し、それが発達に伴い陰性変力反応に転ずる仕組みを興奮収縮機構と関連づけて理解することを目的とした。

## 糖尿病マウス

私は心筋の刺激応答の多様性について、興奮収縮機構の観点から法則性を見出し、統一的に理解したいと考えている。そこで、発達変化において見られたものと同様の  $\alpha$  受容体刺激応答と興奮収縮機構の関連性が病態時の変化においても見られるか否か検討するため、糖尿病マウス心筋に注目した。

糖尿病状態の心筋では自律神経支配に影響が出ることが報告されている。糖尿病ラット心筋では、 $\beta_1$ 、 $\beta_2$  受容体のタンパク発現量の減少や(Dincer et al., 2001)、 $\beta$  受容体刺激に対する陽性変時反応および陽性変力反応の減弱(Dincer et al., 1998;Kamata et al., 1997;Kamata et al., 2006)、また  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応の増大も報告されている(Kamata et al., 1997;Kamata et al., 2006)。さらに糖尿病状態の心筋では、興奮収縮機構に関与する L 型  $Ca^{2+}$ チャネル、SR、NCX 機能にも影響が出ると報告されており(Jourdon and Feuvray, 1993;Golfman et al., 1998;Zhong et al., 2001)、興奮収縮機構が正常時と異なる可能性がある。そこで、糖尿病マウスを刺激応答と興奮収縮機構の関連性を検討するためのもう一つのモデルと捉え、糖尿病モデルマウス心筋の  $\alpha$  受容体刺激応答および興奮収縮機構について検討した。

さらに糖尿病マウス心筋の興奮収縮機構に関して、近年心不全の要因の一つとして注目されている拡張機能障害という観点からも検討した。心筋拡張機能障害の基礎疾患には高血圧や冠動脈疾患などがあるが、糖尿病によっても引き起こされることが近年明らかになってきており、糖尿病患者における死亡の主要な原因とも言える。糖尿病性心筋障害(diabetic cardiomyopathy)という病態が存在しており、冠動脈狭窄や高血圧の基礎疾患がなく、心筋肥大、心筋間質の繊維化、心筋内小冠動脈の肥厚とムコポリサッカライドの沈着による内腔狭小化の病理組織所見を有すると定義されている。心筋細胞内のカルシウム輸送障害や代謝異常により早期から拡張機能障害が認められるとされ、これは明らかな心不全症状が出現する前から存在すると報告されている(Borlaug and Kass, 2006)。また、様々な糖尿病モデル動物でも程度の差はあるものの心筋拡張機能障害が報告されている。したがって、糖尿病状態の心筋では、心筋細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  handling の破綻が推測される。本研究では、心筋の弛緩を担う SR の ATP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ(SERCA)に注目し、拡張機能障害が引き起こされる機序の検討を行った。

## 本研究の目的

私は心筋の刺激応答の多様性について、興奮収縮機構の観点から法則性を見出し、統一的に理解したいと考えている。そこで、マウス心室筋アドレナリン  $\alpha$  受容体刺激応答の発達変化を、刺激応答と興奮収縮機構の関連性を研究するモデルと捉え、研究対象とした。本研究では、 $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応の機序を解明し、それが発達に伴い陰性変力反応に転ずる仕組みを興奮収縮機構と関連付けて理解することを目的とした。さらに発達変化において見られたものと同様の  $\alpha$  受容体刺激応答と興奮収縮機構の関連性が、病態時の変化においても見られるか否か検討するため、糖尿病マウス心筋にも注目した。

## 第2章 実験方法

### 第1節 実験動物

胎生期(胎生 16~18 日齢)、新生仔期(生後 0~2 日齢)、1 週齢、2 週齢、4 週齢の ddY 系マウスを使用した。すべての動物は三協ラボサービスより購入し、東邦大学薬学部実験動物センターにて飼育したのち使用した。

### 第2節 糖尿病マウスの作成

4 週齢の ddY 系雄性マウスに streptozotocin (200 mg/kg)を腹腔内投与し、4~6 週間飼育後、血糖値が 350 mg/dl 以上のものを糖尿病マウスとして用いた。対照群として、streptozotocin の溶媒である生理食塩水を同量投与したものを正常マウスとして用いた。

### 第3節 心室筋組織標本の作製

胎生期マウスは、ddY 系マウス妊娠母体の頸椎を脱臼させ致死せしめた後、腹部を切開し、胎仔を摘出した。胎仔の胸部を切開し、心臓を摘出し、予め 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> 混合ガスを飽和させておいた Krebs-Henseleit (組成は本章第 10 節に記載)中で心房と心室を分離した後、Krebs-Henseleit 中で室温保存し、順次実験に使用した。標本は、収縮力測定では心室全体、活動電位測定では右心室遊離壁を短冊状に切り離して作成し、実験に用いた。

新生仔期マウスは、頸椎脱臼させ、直ちに開胸、心臓を摘出し、予め 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> 混合ガスを飽和させておいた Krebs-Henseleit 中で心房と心室を分離し、収縮力測定では心室全体、活動電位測定では右心室遊離壁を短冊状に切り離して作成し、実験に用いた。

1 週齢、2 週齢、4 週齢マウスおよび糖尿病マウスは、頸椎脱臼させ、直ちに開胸、心臓を摘出し、予め室温下で 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> 混合ガスを飽和させておいた Krebs-Henseleit 中で心臓内の血液を十分に洗い流した後、心房と心室を分離し、右心室遊離壁を短冊状に切り離して作製、実験に用いた。

### 第4節 収縮力の測定

心室筋組織標本の一端を、organ bath 中で一方を虫ピンで、他方を歪みトランスデューサー(TB-611T、日本光電)の先端に固定したステンレス製ピンに刺し、栄養液を満たした organ bath 中で水平に保持した。標本は刺激装置(DPS-07、ダイヤモンドカル)よりシリコンブロックに取り付けた一対の白金線双電極を介して幅 3 ms、閾値の 1.5 倍の電圧で定頻度刺激することにより駆動した。刺激頻度は特に断りのない限り 1 Hz で行い、organ bath 内の液温は 36±0.5°C に保った。発生張力はトランスデューサーを介して歪圧力用アンプ(AP-621G、日本光電)により増幅し、ポリグラフ上に等尺性に記録した。静止張力は各標本が最大の張力を発生するように設定した。



## 第5節 心室筋活動電位の測定

心室筋組織標本の一端を 20 ml の Krebs-Henseleit を満たした organ bath 内のシリコンブロック上に虫ピンで固定し、他方を刺激装置と接続した白金双極電極で水平に保持した後、持続時間 1 ms、閾値の 1.5 倍の矩形波により 1 Hz の定頻度刺激を与えた。Organ bath 内の温度を  $36 \pm 0.5^\circ\text{C}$  に保ち、少なくとも 60 分以上の incubation 後に活動電位の記録を開始した。細胞内活動電位は 3 M KCl 溶液を充填したガラス微小電極(CD-2、KEN ENTERPRIZE)を細胞内に刺入し、電極内のプローブから得た電気信号を高インピーダンス型アンプで増幅後、オシロスコープ(CS-4125、KENWOOD)でモニターしつつ、微小電極用アンプ(MEZ-7101、日本光電)を介してアナログ・デジタルコンバータ(ANALOG-PRO DMA、カノープス電子)により sampling し、パーソナルコンピュータ(PC9801FA、日本光電)に取り込んだ。活動電位波形の解析には ANALYSIS ソフトウェアを使用した。活動電位波形のパラメータとして、静止膜電位(resting membrane potential: RP)、overshoot (OS)、action potential amplitude (AMP)、活動電位持続時間(action potential duration: APD)、最大立ち上がり速度(maximum rate of rise:  $\dot{V}_{\max}$ )を ANALYSIS により解析した。

## 第6節 単离心室筋細胞の調製

### 1 週齢、2 週齢、4 週齢マウスおよび糖尿病マウス

冠動脈より collagenase(ヤクルト)を灌流させることにより単离心室筋細胞を調製した。マウスより心臓を摘出後、大動脈内を大動脈弁方向に逆行性に Normal Tyrode 液(組成は本章第 10 節に記載)を満たしたカニューレを挿入し、Langendorff 灌流標本を作製した。Normal Tyrode 液の灌流により標本の拍動の安定を確認後(5~10 分後)、以下の順で栄養液を灌流した。流速は 2.0 ml/min で一定させて灌流した。

Ca<sup>2+</sup>除去 Tyrode 液 (約 20 分)

Collagenase (0.2 mg/ml)添加 Ca<sup>2+</sup>除去 Tyrode 液 (約 30 分)

Ca<sup>2+</sup>除去 Tyrode 液 (約 20 分)

KB 液 (約 20 分)

KB 液(組成は本章第 10 節に記載)を灌流後、心室筋部分に KB 液中で切り込みを入れ、軽く振騰した後、200  $\mu\text{m}$  のナイロンメッシュで濾過し、細胞懸濁液を得た。栄養液は全て 100% O<sub>2</sub> で十分に通気しておき、 $36 \pm 0.5^\circ\text{C}$  に保持した。また、単離した心室筋細胞は実験に用いるまで室温下、KB 液中に保存した。

## 胎生期、新生仔期マウス

心臓が小さく Langendorff 灌流標本を作成することが困難であるため、チャンク法を用いた。Normal Tyrode 液中で、マウスより心臓を摘出し心房を取り除いた後、Ca<sup>2+</sup>除去 Tyrode 液に約 20 分浸し、その後、Collagenase (12 mg/ml)を添加した Ca<sup>2+</sup>除去 Tyrode 液中で、37°C に保持し、約 30 分ゆっくり振とうした。組織標本を KB 液中に約 20 分浸した後、切り込みを入れピペティングにより細胞懸濁液を得た。単離した心室筋細胞は室温下、KB 液中に保存した。

## 第7節 落射蛍光顕微鏡を用いた細胞内事象の画像解析

### Ca<sup>2+</sup> transient の測定

調製したマウス単離心室筋細胞を用い、カルシウムイオン蛍光プローブである Indo-1 のアセトキシメチル体(AM 体)を使用し、落射蛍光顕微鏡(Olympus, IX70)を用いて、画像解析実験を行った。ガラス製チャンバー内に移した単離心室筋細胞に KB 液中で indo-1AM 体を 5 μM になるように加え、遮光の下 37°C で 30 分間放置することで蛍光プローブの取り込みを行った。Ca<sup>2+</sup>除去 Tyrode 液、Normal Tyrode 液の順でチャンバー内に灌流させ、その後、チャンバー内に設置した白金双電極を用いて、刺激装置(DPS-07、ダイヤモンドイカル)からの刺激(持続時間 3 ms)により標本を 1 Hz で駆動し、細胞内カルシウムイオンの変化を観察した。測定は 36±0.5°C で行った。Indo-1 は 351 nm の光を励起光とし、405±10 nm と 480±10 nm の蛍光を検出し、画像化した。蛍光画像として、2.00 ms 毎に取得し、細胞質領域内の平均蛍光強度比(画素毎)の経時変化(405/480)をグラフ化した(Aquacosmos software Hamamatsu Photonics)。

### 細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度のキャリブレーション法

Ca<sup>2+</sup>濃度は Ca<sup>2+</sup>除去 Tyrode 液に 10 mM EGTA と各種イオノフォア(10 μM イオノマイシン、5 μM FCCP、5 μM ロテノン)を溶かした栄養液を灌流させたときの蛍光強度比を最小蛍光強度比(R<sub>min</sub>)とし、Normal Tyrode 液に各種イオノフォア(10 μM イオノマイシン、5 μM FCCP、5 μM ロテノン)を溶かした栄養液を灌流させたときの蛍光強度比を最大蛍光強度比(R<sub>max</sub>)として検量線を作成することで計算した。

Ca<sup>2+</sup>濃度の計算式

$$[Ca^{2+}] = K_d \beta [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)]$$

$$K_d = 250 \text{ nM}$$

$$\beta = F_{free} / F_{bound}$$

F<sub>free</sub> = Indo-1 + Ca<sup>2+</sup> free の蛍光波長 480 nm に対する蛍光強度

F<sub>bound</sub> = Indo-1 + NT の蛍光波長 480 nm に対する蛍光強度

R<sub>min</sub> = 最小蛍光強度比

R<sub>max</sub> = 最大蛍光強度比

## 第8節 共焦点顕微鏡を用いた細胞内事象の画像化解析

### 細胞形態の観測

調製したマウス単離心室筋細胞を用い、細胞膜蛍光プローブである PKH67-GL を使用し、LSM510 META (Carl Zeiss 社) を用いて、画像化解析実験を行った。ガラス製チャンバー内に移した単離心室筋細胞に KB 液中で PKH67-GL を  $5\ \mu\text{M}$  となるように加え、室温、遮光の下、10 分間放置することで蛍光プローブの取り込みを行った。測定は室温で行った。488 nm で細胞を励起し、505 nm 以上の蛍光を検出し、画像化した。

### SR 量の観測

調製したマウス単離心室筋細胞を用いて、小胞体蛍光プローブである ER-Tracker™ Blue-White DPX を使用し、Mai Tai HP (Spectra-Physics 社) を用いて、画像化解析実験を行った。ガラス製チャンバー内に移した単離心室筋細胞に KB 液中で ER-Tracker™ Blue-White DPX を  $5\ \mu\text{M}$  となるように加え、室温、遮光の下、30 分間放置することで蛍光プローブの取り込みを行った。測定は室温で行った。2-photon レーザーを用い、780 nm で細胞を励起し、685 nm の以下の蛍光を検出し、画像化した。

### Ca<sup>2+</sup> transient の測定

調製したマウス単離心室筋細胞を用い、カルシウムイオン蛍光プローブである fluo-4 のアセトキシメチル体 (AM 体) を使用し、LSM510 META (Carl Zeiss 社) を用いて、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動態を画像化した。ガラス製チャンバー内に移した単離心室筋細胞に KB 液中で fluo-4 AM 体を  $5\ \mu\text{M}$  となるように加え、室温、遮光の下、30 分間放置することで蛍光プローブの取り込みを行った。Ca<sup>2+</sup> 除去 Tyrode 液、Normal Tyrode 液の順でチャンバー内に灌流させ、その後、チャンバー内に設置した白金双電極を用いて、刺激装置 (DPS-07、ダイヤモンドカル) からの刺激 (持続時間 3 ms) により標本を 3 Hz で駆動し、細胞内カルシウムイオンの変化を観察した。測定は  $36 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で行った。488nm で細胞を励起し、505nm 以上の蛍光を検出し、画像化した。768  $\mu\text{sec}/\text{line}$  で line scan することで Ca<sup>2+</sup> transient を測定した。蛍光画像を取得し、長さ  $2\ \mu\text{m}$  の領域を設定して蛍光強度の経時変化を解析した。

## 第9節 膜電位固定法による電流測定

調整したマウス単離心室筋細胞を用いて、whole cell voltage clamp 法により膜電流を測定した。測定には AXOPATCH-200B (Axon Instruments Inc. USA) を使用し、cut-off frequency (-3dB) を 5KHz とした。Patch clamp 電極は Pyrex glass (Drummond Scientific Co.) から、P87 (Sutter Instrument Co.) を用いて電極内液を充填した状態で電極抵抗が 2~5 M $\Omega$  になるように作成した。膜容量は保持電位 0 mV から 5 ms 幅の 5 mV の過分極ランプパルスによって測定した。データは DMA interface (Axon digidata, USA) によりデジタル変換後、Compaq Deskpro 386s personal computer を用い、Pclamp software (Axon Instruments Inc., USA) で記録、解析した。詳しい pulse protocol は各章に記す。

## 第10節 栄養液の組成

### Krebs-Henseleit (mM)

NaCl:118.4, KCl:4.7, MgSO<sub>4</sub>:1.2, CaCl<sub>2</sub>:2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:1.2, NaHCO<sub>3</sub>:24.9, glucose:11.1

### Normal Tyrode 液 (mM)

NaCl:143.0, KCl:5.4, MgCl<sub>2</sub>:1.0, CaCl<sub>2</sub>:1.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:0.33, HEPES:5.0, glucose:5.5, pH7.4 with NaOH

### Ca<sup>2+</sup>除去 Tyrode 液 (mM)

NaCl:143.0, KCl:5.4, MgCl<sub>2</sub>:1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:0.33, HEPES:5.0, glucose:5.5, pH7.4 with NaOH

### KB 液 (mM)

Glutamic acid:70.0, taurine:15.0, KCl:30.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:10.0, MgCl<sub>2</sub>:0.5, HEPES:10.0  
Glucose:11.0, EGTA:0.5, pH7.4 with KOH

### 電流測定細胞外液 (mM)

#### K<sup>+</sup>電流;

NaCl:143.0, KCl:5.4, MgCl<sub>2</sub>:1.0, CaCl<sub>2</sub>:1.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:0.33, HEPES:5.0, glucose:5.5, CdCl<sub>2</sub>:0.3,  
pH7.4 with NaOH

#### L 型 Ca<sup>2+</sup>電流;

NaCl:143.0, CsCl:5.4, CaCl<sub>2</sub>:1.8, MgCl<sub>2</sub>:1.0, HEPES:5.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:0.33, glucose:5.5  
pH7.4 with CsOH

### 電流測定電極内液 (mM)

#### K<sup>+</sup>電流;

KCl:130, MgCl<sub>2</sub>:1.0, HEPES:10.0, EGTA:10.0, ATP-Mg:5.0,  
Na<sub>2</sub>-creatine-phosphate:5.0

pH7.2 with KOH pH 調整後、0.2 μm のフィルターをかけて使用した。

#### L 型 Ca<sup>2+</sup>電流;

Aspartic acid:70.0, CsCl:40.0, CsOH:100.0, EGTA:10.0, HEPES:10.0, ATP-Mg:5.0,  
GTP (Tris):0.3, Na<sub>2</sub>-creatine-phosphate:5.0

pH7.2 with CsOH pH 調整後、0.2 μm のフィルターをかけて使用した。

## 第11節 統計処理

数値は平均値±標準誤差で表わした。また有意差検定は Paired t-test, Student's t-test, Unpaired t-test with Welch's correction、Tukey または Dunnett の多群検定を行った。

## 第12節 使用薬物

4-aminopyridine : 4-AP (SIGMA)

Cyclopiazonic acid : CPA (SIGMA)

Fluo-4 acetoxymethyl ester (同仁化学研究所)

Indo-1 acetoxymethyl ester (同仁化学研究所)

Nifedipine (SIGMA)

5-(N,N-dimethyl)amiloride hydrochloride : DMA (SIGMA)

*l*-phenylephrine hydrochloride : PE (和光純薬)

*dl*-propranolol hydrochloride (SIGMA)

SEA0400 (大正製薬)

Phorbol 12-myristate 13-acetate : PMA (SIGMA)

## 第3章 マウス心室筋の興奮収縮機構の発達変化

マウスは実験動物の中でも高い心拍数を有し、その心筋は特徴的な電気生理学的性質と興奮収縮機構を持っている(Tanaka et al., 2009;Sato, 2008)。成体マウス心室筋の活動電位は、他の動物種に比べて、活動電位持続時間が非常に短く、プラトー相を欠く波形をしている(Tanaka et al., 1998)。さらに成体マウス心室筋の収縮は、SR から放出される  $\text{Ca}^{2+}$ により強く依存していることも報告されている(Tanaka et al., 2009)。一方、一般的に幼若心筋は、成体心筋とは異なる電気生理学的性質と興奮収縮機構を持つことが知られている(Tanaka et al., 2009;Tohse et al., 2004;Kuwahara et al., 2012)。マウスの心臓の場合、その心拍数は発達に伴い増大していき、胎生期では毎分 200 回であるが、生後 2 週齢ほどで毎分 700 回に達する(Adachi et al., 2013)。したがって、発達に伴い高まる心拍数に応じて、素早い収縮弛緩を可能にするために、興奮収縮機構が変化していくことが推測できる。そこで、興奮収縮機構の特徴が反映される以下の点について発達段階ごとに検討した。心筋の収縮弛緩速度、心筋収縮の引き金となる活動電位、心筋収縮を制御している細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 動態、活動電位持続時間を決定づける L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルと  $\text{K}^{+}$ チャネルの性質、心筋細胞の形態学的特徴について詳細に検討した。また、心筋収縮の際、主に  $\text{Ca}^{2+}$ を供給する役割を果たす L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルと SR の機能について薬理的に検討した。

### 第1節 基本的性質

#### 3-1-1 収縮時間、弛緩時間の比較

収縮時間(time to peak tention: TPT)、90%弛緩時間(time to 90% relaxation:  $\text{RT}_{90}$ )ともに胎生期と比較すると、以降の週齢では有意に短縮していた。TPT、 $\text{RT}_{90}$ ともに1週齢以降は有意な変化はみられなかった(Fig. 3-1-1; Table 3-1-1)。

#### 3-1-2 活動電位の比較

胎生期と 4 週齢の活動電位を比較すると、胎生期では持続時間の長いプラトー相を有する波形であるが、4 週齢では持続時間の短いプラトー相を欠いた、急速な再分極相(早期再分極相)とその後の緩やかな再分極相(後期再分極相)を有する 2 相性の波形であった。胎生期から 4 週齢までの発達段階において、活動電位持続時間(action potential duration: APD)を比較すると、20% および 50%再分極までの持続時間( $\text{APD}_{20}$  および  $\text{APD}_{50}$ )は発達とともに短縮していた。一方 90%再分極までの持続時間( $\text{APD}_{90}$ )は 1 週齢までは短縮していたが、2 週齢以降では徐々に延長していた。静止膜電位(resting potential: RP)、over shoot (OS)には有意な違いは認められなかったが、最大立ち上がり速度(maximum rate of rise:  $\dot{V}_{\text{max}}$ )は発達とともに増大していた(Fig. 3-1-2; Table 3-1-2)。

### 3-1-3 Ca<sup>2+</sup> transient の比較

共焦点顕微鏡を用いた line scan 法により、胎生期から 4 週齢において fluo-4 AM 体を取り込ませた心室筋細胞の細胞内 Ca<sup>2+</sup>動態を観測した。この時、細胞膜付近と細胞中心部の 1 μm 幅の領域を選択し、それぞれの領域での蛍光強度変化を比較した。胎生期と比較すると、細胞膜付近、細胞中心部どちらの領域でも、amplitude、立ち上がり速度(rate of rise)は発達に伴い増大しており、半減期(half life: T<sub>1/2</sub>)は発達に伴い短縮していた(Fig. 3-1-3; Table 3-1-3)。新生仔期および 1 週齢では、細胞中心部での amplitude、立ち上がり速度は、細胞膜付近と比べて低く、半減期は長いことが観察された(Fig. 3-1-3; Table 3-1-3)。つまり、line scan 画像で蛍光強度の上昇が V 字型となって現れていた。一方、2 週齢以降ではこのような細胞膜付近と細胞中心部での差は認められなかった(Fig. 3-1-3; Table 3-1-3)。

### 3-1-4 K<sup>+</sup>電流の比較

保持電位を-70 mV として、そこから-40 mV に 30 ms 脱分極させ、その後-40~50 mV の範囲で、10 mV 間隔、1/15 Hz で 500 ms の矩形波を与え、その時に流れる外向きの peak 電流を測定した(Fig. 3-1-4)。Na<sup>+</sup>電流は保持電位後の-40 mV、30 ms の脱分極により不活性化し、Ca<sup>2+</sup>電流は細胞外液に含まれる CdCl<sub>2</sub> (0.3 mM)により抑制した条件下で実験を行った。

新生仔期および 4 週齢において、-30 mV 以上の電位において脱分極直後の非常に速い活性化の後、時間依存性の不活性化を示す一過性外向き K<sup>+</sup>電流(transient outward K<sup>+</sup> current: I<sub>to</sub>)が観察された(Fig. 3-1-4)。新生仔期と 4 週齢の I<sub>to</sub> の電流密度(current density)を比べると 4 週齢のほうが約 2 倍大きかった(Fig. 3-1-4)。この時の 50 mV に脱分極させたときのそれぞれの電流密度は、新生仔期で 16.8±1.7 pA、4 週齢で 31.3±3.8 pA であった(各 n = 5)。また I<sub>to</sub> 阻害薬の 4-AP の処置により新生仔期および 4 週齢の I<sub>to</sub> は抑制された(Fig. 3-1-4)。この時の 50 mV に脱分極させたときのそれぞれの電流密度は、新生仔期で 8.1±0.8 pA、4 週齢で 6.6±0.6 pA であった(各 n = 5)。

### 3-1-5 L 型 Ca<sup>2+</sup>電流の比較

Current の run down を最小限に抑える目的で、電極内液に amphotericin B (200~400 μg/ml)を加え、perforated patch clamp 法を用いて L 型 Ca<sup>2+</sup>電流を測定した。保持電位を-40 mV として、そこから-40~60 mV の範囲で、10 mV 間隔、1/15 Hz で 300 ms の矩形波を与え、その時に流れる内向きの peak 電流を測定した(Fig. 3-1-5)。Na<sup>+</sup>電流は保持電位を-40 mV にすることで不活性化し、K<sup>+</sup>電流は細胞内外の K<sup>+</sup>を K<sup>+</sup>チャネルを透過しない Cs<sup>+</sup>に置換した条件下で実験を行った。

新生仔期と 4 週齢を比較すると、電流-電圧関係(I-V curve)については大きな違いは見られず、どちらの発達段階においても膜電位を 10 mV にしたときに最も大きな内向き電流が流れた。電流密度を比較すると、4 週齢において、新生仔期よりも約 2 倍電流密度が大きかった(Fig. 3-1-5)。この時の 10 mV に脱分極させたときのそれぞれの電流密度は、新生仔期で-6.2±2.0 pA、4 週齢で-13.8±0.8 pA であった(各 n = 3)。

### 3-1-6 細胞構造の比較

単離心室筋細胞の細胞膜を PKH67-GL を用いて染色し、発達に伴う細胞形態の変化を観察した(Fig. 3-1-6A)。単離した心筋細胞のサイズは、短軸方向(short axis)、長軸方向(long axis)ともに発達に伴い大きくなっていた(Fig. 3-1-6A; Table 3-1-4)。胎生期では円形、新生仔期では紡錘形、1 週齢以降ではロッド状の形態が観察された。また T 管構造(t-tubule)を観察すると、胎生期、新生仔期では T 管構造は観察されず、1 週齢では細胞膜付近のみ、2 週齢以降では細胞中心部にまで T 管が陥入してした(Fig. 3-1-6A, C)。

### 3-1-7 筋小胞体の比較

単離心室筋細胞の小胞体を ER-Tracker™ Blue-White DPX を用いて染色し、発達に伴う小胞体量の変化を観察した(Fig. 3-1-6A)。胎生期から 1 週齢までは、核の周辺は染色されているが、細胞膜付近はあまり染色されていなかった。2 週齢以降では、細胞膜付近も染色されており、筋小胞体量は発達に伴い増大していること、そして細胞中心部から細胞膜付近へと順に発達することが観察された(Fig. 3-1-6A, B)。

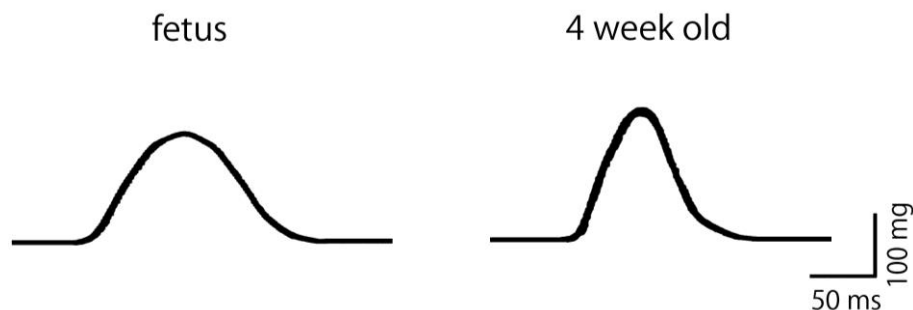


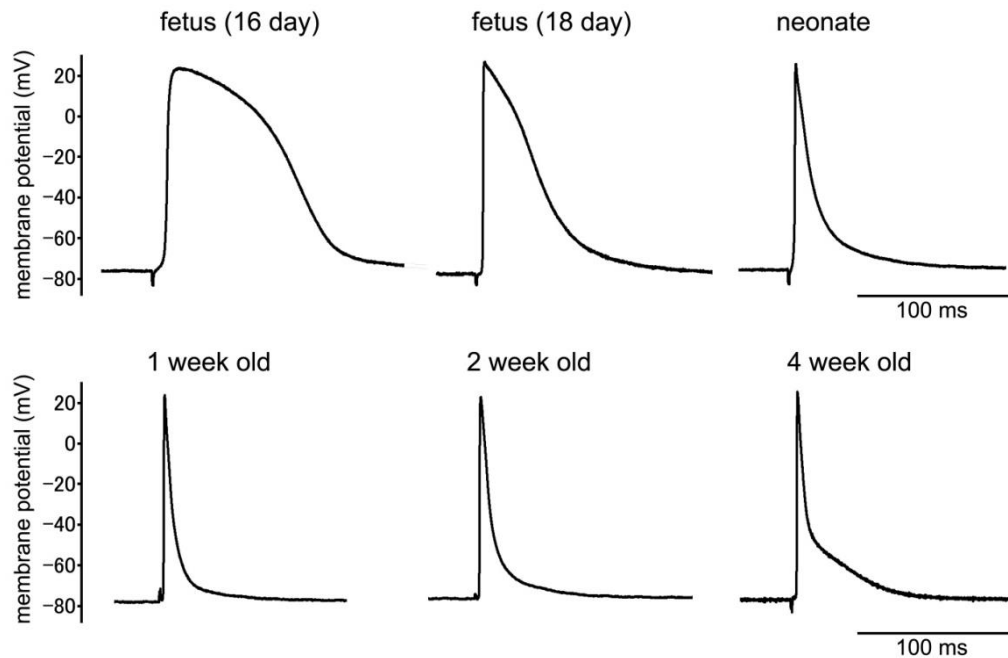
Fig. 3-1-1. Representative contraction and relaxation recorded in ventricular tissue from the fetal and 4-week-old mice.

Table 3-1-1. Developmental changes in contraction and relaxation time.

	fetus (n = 10)	neonate (n = 16)	1 week old (n = 4)	2 week old (n = 6)	4 week old (n = 12)
Time to peak tension (ms)	67.8 ± 1.5*	43.3 ± 1.1*	35.6 ± 2.1	40.3 ± 0.7	38.2 ± 0.8
Time to 90% relaxation (ms)	70.3 ± 2.2*	60.5 ± 1.2*	54.1 ± 1.1	49.9 ± 1.2	52.4 ± 1.2

Values are the mean ± S.E.M. from 4 to 16 ventricular preparations. Asterisks indicate significant difference from corresponding values in 4 week-old mice as evaluated by one-way analysis of variance followed by the Tukey's test for multiple comparisons.



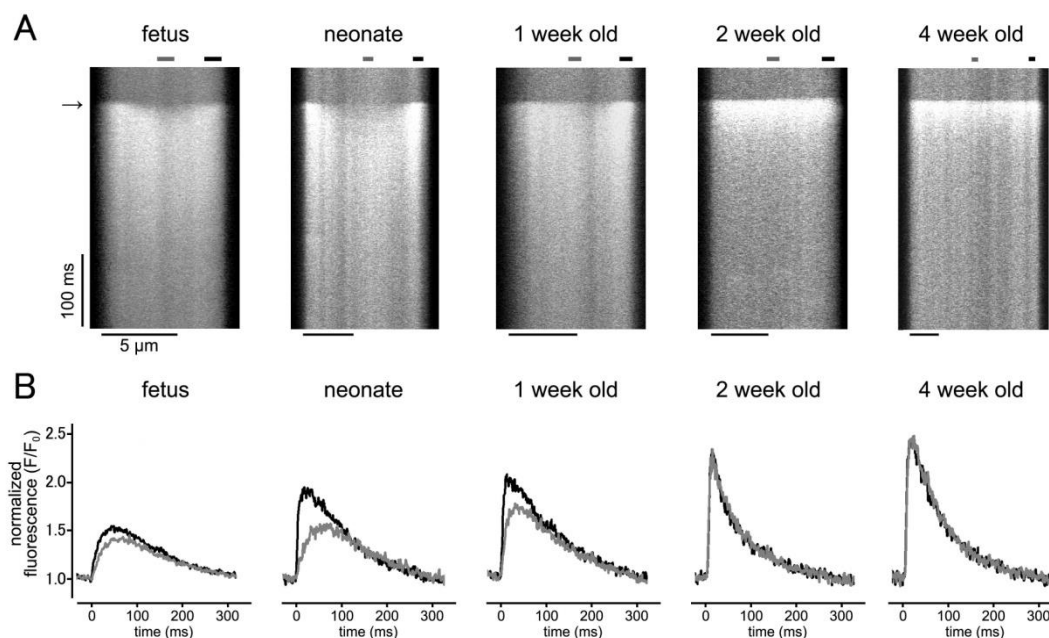


**Fig. 3-1-2. Representative action potentials recorded in ventricular tissue from the 16 and 18 day-old fetus, neonate, and 1, 2 and 4 week-old mice.**

**Table 3-1-2. Developmental changes in action potential parameters.**

	fetus (16 day)	fetus (18 day)	neonate	1 week old	2 week old	4 week old
RP (mV)	-75.1 ± 0.7	-75.1 ± 0.6	-76.8 ± 0.5	-77.4 ± 0.4	-77.2 ± 0.5	-76.6 ± 0.5
OS (mV)	24.3 ± 1.1	24.8 ± 0.8	23.9 ± 0.8	22.2 ± 1.3	22.3 ± 0.8	24.3 ± 1.5
AMP (mV)	99.4 ± 0.9	99.6 ± 1.3	99.1 ± 0.9	99.7 ± 1.3	99.1 ± 0.4	99.6 ± 1.6
APD <sub>20</sub> (ms)	44.9 ± 2.5*	23.5 ± 3.5*	7.5 ± 0.7*	3.0 ± 0.2	2.8 ± 0.2	2.5 ± 0.2
APD <sub>50</sub> (ms)	76.1 ± 3.8*	48.1 ± 4.1*	16.0 ± 1.2*	6.0 ± 0.4	5.5 ± 0.3	5.6 ± 0.3
APD <sub>90</sub> (ms)	110.5 ± 3.3*	86.9 ± 4.1*	44.5 ± 2.6	17.7 ± 0.6*	23.9 ± 1.3*	35.9 ± 2.2
V <sub>max</sub> (V/s)	173.7 ± 12.9*	197.9 ± 15.3*	217.7 ± 7.7*	273.7 ± 11.7	274.2 ± 16.0	298.4 ± 20.3

Action potential parameters of ventricular myocardia from 16 and 18 day-old fetus, neonate and 1, 2 and 4 week-old mice. RP, OS, AMP and V<sub>max</sub> indicate resting potential, overshoot, amplitude and maximum rate of phase 0 depolarization, respectively. APD<sub>20</sub>, APD<sub>50</sub> and APD<sub>90</sub> indicate action potential duration at 20%, 50% and 90% repolarization, respectively. Values are the mean ± S.E.M. from 8 to 15 ventricular preparations. Asterisks indicate significant difference from corresponding values in 4 week-old mice as evaluated by one-way analysis of variance followed by the Tukey's test for multiple comparisons.



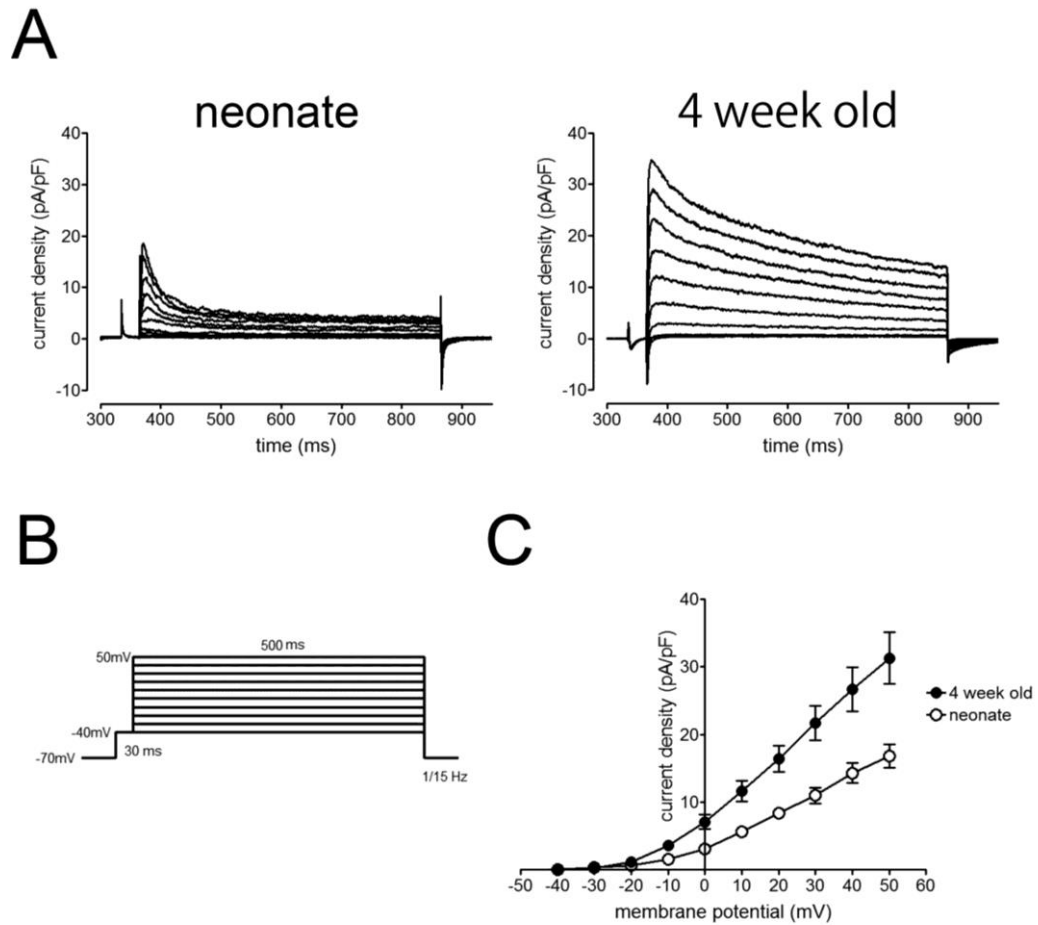
**Fig. 3-1-3. Line-scan analyses of the  $\text{Ca}^{2+}$  transient in fluo 4-loaded myocytes.**

**A:** Typical line-scan images. The arrows on the left indicate field stimulation. Horizontal and vertical bars indicate  $5\ \mu\text{m}$  and  $100\ \text{ms}$ , respectively. The scanning line was placed in right angle to the longitudinal axis of the cell. **B:** Time courses of the rise and fall in  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence at specific sites at the subsarcolemma (black) and cell center (gray). The sites quantified at the subsarcolemma (black) and cell center (gray) were  $1\ \mu\text{m}$  in width, as shown at the top of panels in A. Fluorescence was expressed as normalized values ( $F/F_0$ ) against the fluorescence at time zero ( $F_0$ ) in B, at which the cells were stimulated.

**Table 3-1-3. Developmental changes in  $\text{Ca}^{2+}$  transient parameters.**

	amplitude ( $F/F_0$ )		rate of rise (/sec)		$T_{1/2}$ (ms)	
	subsarcolemma	center	subsarcolemma	center	subsarcolemma	center
fetus	$0.47 \pm 0.05^*$	$0.33 \pm 0.04^*$	$14.6 \pm 3.3^*$	$5.0 \pm 1.5^*$	$97.6 \pm 8.3^*$	$101.5 \pm 5.7^*$
neonate	$0.94 \pm 0.09^*$	$0.53 \pm 0.05^{*\dagger}$	$45.4 \pm 5.7^*$	$17.9 \pm 3.4^{*\dagger}$	$79.1 \pm 8.3^*$	$98.2 \pm 6.2^{*\dagger}$
1 week old	$1.00 \pm 0.09^*$	$0.74 \pm 0.06^{*\dagger}$	$62.6 \pm 10.4^*$	$38.6 \pm 5.8^{*\dagger}$	$68.9 \pm 6.3$	$86.8 \pm 8.8^{*\dagger}$
2 week old	$1.38 \pm 0.11$	$1.37 \pm 0.09$	$97.5 \pm 7.4$	$96.2 \pm 4.8$	$47.6 \pm 2.1$	$47.3 \pm 2.0$
4 week old	$1.38 \pm 0.07$	$1.36 \pm 0.05$	$97.7 \pm 6.6$	$96.4 \pm 6.7$	$47.9 \pm 2.5$	$48.1 \pm 3.4$

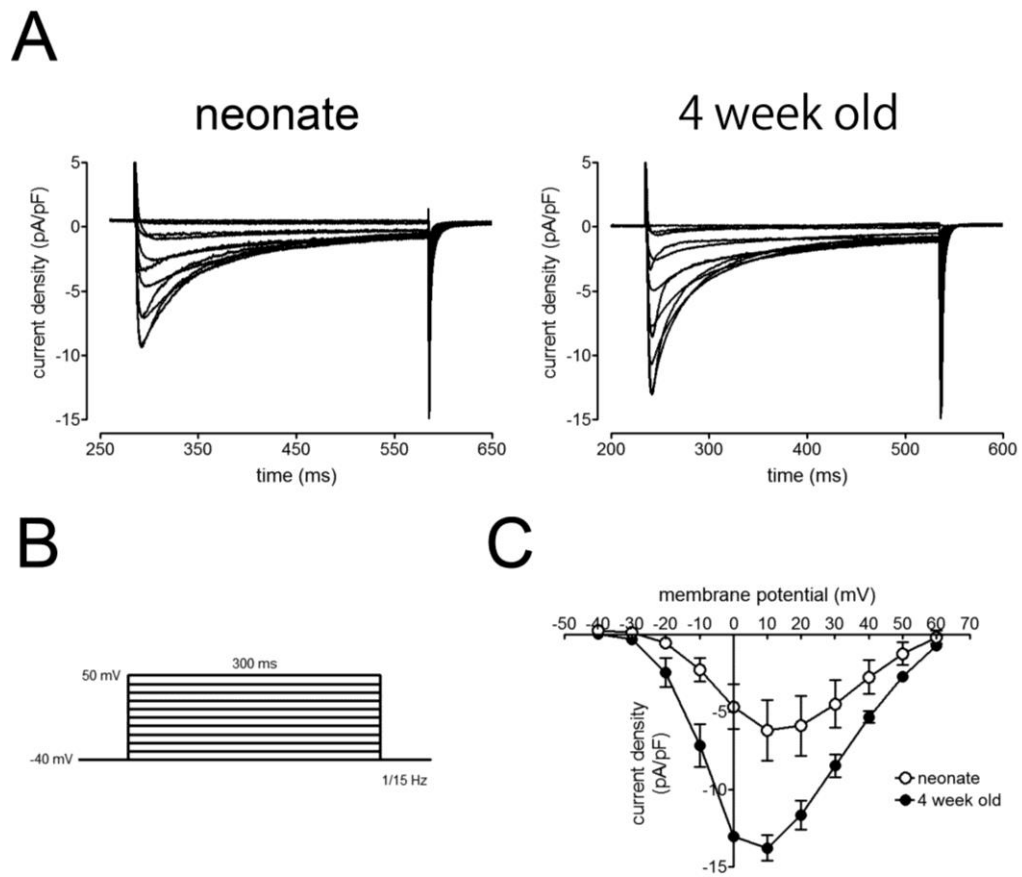
The  $\text{Ca}^{2+}$  transient parameters of isolated ventricular cardiomyocytes from the fetus, neonate, and 1, 2 and 4 week-old mice. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. from 14 cardiomyocytes. Asterisks indicate a significant difference from corresponding values in 4 week-old mice, and daggers indicate a significant difference from corresponding values in the subsarcolemmal region. Statistical significance was evaluated by two-way analysis of variance followed by the Tukey's test for multiple comparisons.



**Fig. 3-1-4. Developmental changes in the transient outward current ( $I_{to}$ ).**

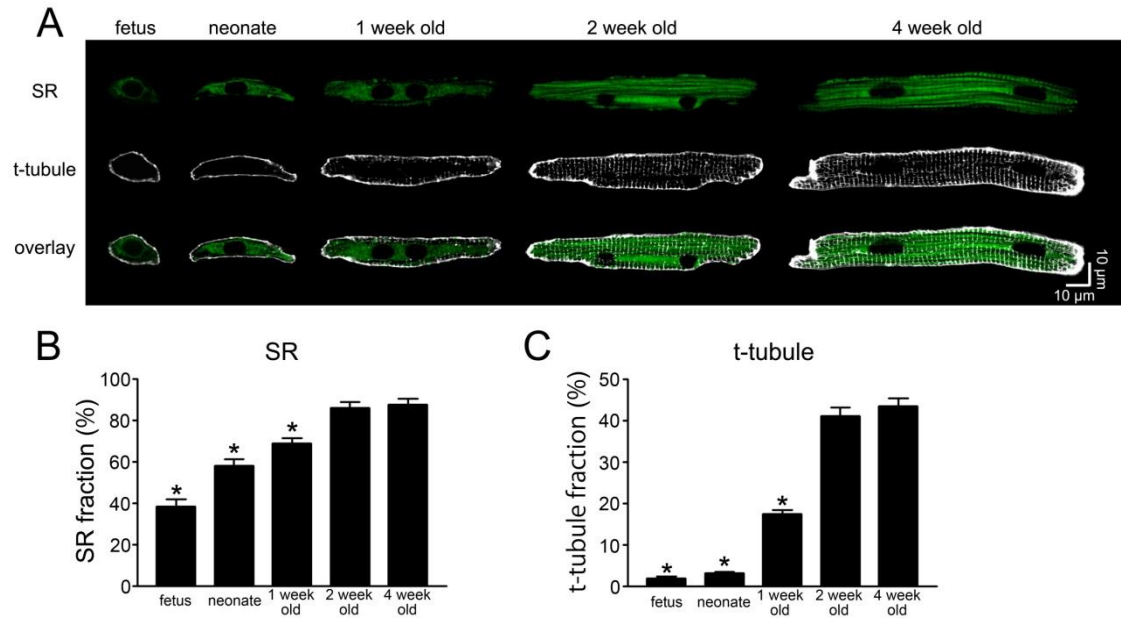
A: Typical  $K^+$  current elicited with depolarizing pulse shown in B in neonatal and 4-week-old mice.

C: Current-voltage relationship of the peak amplitude of  $K^+$  current in the neonatal (open symbols) and 4-week-old (filled symbols) mice. Symbols and bars are the mean  $\pm$  S.E.M. from 5 cardiomyocytes.



**Fig. 3-1-5. Developmental changes in L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current.**

A: Typical L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current elicited with depolarizing pulse shown in B in neonatal and 4-week-old mice. C: Current-voltage relationship of the peak amplitude of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in the neonatal (open symbols) and 4-week-old (filled symbols) mice. Symbols and bars are the mean  $\pm$  S.E.M. from 3 cardiomyocytes.



**Fig. 3-1-6. Confocal imaging of the SR and t-tubules.**

**A:** SR staining (green) with ER-Tracker™ Blue-White DPX, cell membrane and t-tubule staining (white) with PKH67-GL and their overlay obtained in fetal, neonatal, and 1, 2 and 4 week-old myocytes. Scale bars indicate 10  $\mu$ m.

**B and C:** Fraction of the fluorescence positive area for the cytoplasmic SR staining (B) and t-tubule staining (C) in fetal, neonatal, and 1, 2 and 4 week-old myocytes. The area (number of pixels) with fluorescence signals was expressed as a percentage of the total cellular area (number of pixels). Values and bars are the mean  $\pm$  S.E.M. from 20 cardiomyocytes. Asterisks indicate significant difference from corresponding values in 4 week-old mice as evaluated by one-way analysis of variance followed by the Tukey's test for multiple comparisons.

**Table 3-1-4. Developmental changes in cell size.**

	short axis ( $\mu$ m)	long axis ( $\mu$ m)
fetus	12.7 $\pm$ 0.3*	26.0 $\pm$ 1.3*
neonate	11.6 $\pm$ 0.5*	50.4 $\pm$ 2.8*
1 week old	13.8 $\pm$ 0.5*	82.7 $\pm$ 2.2*
2 week old	15.3 $\pm$ 0.8*	101.0 $\pm$ 3.6*
4 week old	21.7 $\pm$ 1.6	122.9 $\pm$ 3.6

Values are the mean  $\pm$  S.E.M. from 20 cardiomyocytes. Asterisks indicate significant difference from corresponding values in 4 week-old mice as evaluated by one-way analysis of variance followed by the Tukey's test for multiple comparisons.

## 第2節 薬理的検討

### 3-2-1 興奮収縮機構の L 型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル依存性の発達変化

#### 収縮力に対する nifedipine 感受性の発達変化

L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害薬 nifedipine は、すべての発達段階において濃度依存的に心収縮力を減少させた。その作用は発達に伴い減少していき、特に胎生期から新生仔期、1 週齢から 2 週齢にかけて顕著に変化していた(Fig. 3-2-1A, Ca)。Nifedipine (1  $\mu\text{M}$ )は、胎生期で  $7.3 \pm 1.1\%$ 、新生仔期で  $29.6 \pm 1.8\%$ 、1 週齢で  $35.2 \pm 3.2\%$ 、2 週齢で  $48.3 \pm 3.0\%$ 、4 週齢で  $52.5 \pm 2.0\%$ まで心収縮力を減弱させた( $n = 5\sim 8$ )。

#### $\text{Ca}^{2+}$ transient に対する nifedipine 感受性の発達変化

Nifedipine (1  $\mu\text{M}$ )は細胞膜付近、細胞中心部のどちらの領域でも、すべての発達段階において、 $\text{Ca}^{2+}$ transient の amplitude を減少させた。その作用は発達に伴い減少していき、特に胎生期から新生仔期、1 週齢から 2 週齢にかけて顕著に変化していた(Fig. 3-2-2; Table 3-2-1)。細胞膜付近と細胞中心部での作用の違いはすべての発達段階において認められなかった(Fig. 3-2-2; Table 3-2-1)。

### 3-2-2 興奮収縮機構の筋小胞体依存性の発達変化

#### 収縮力に対する ryanodine、cyclopiazonic acid、xestospongine C 感受性の発達変化

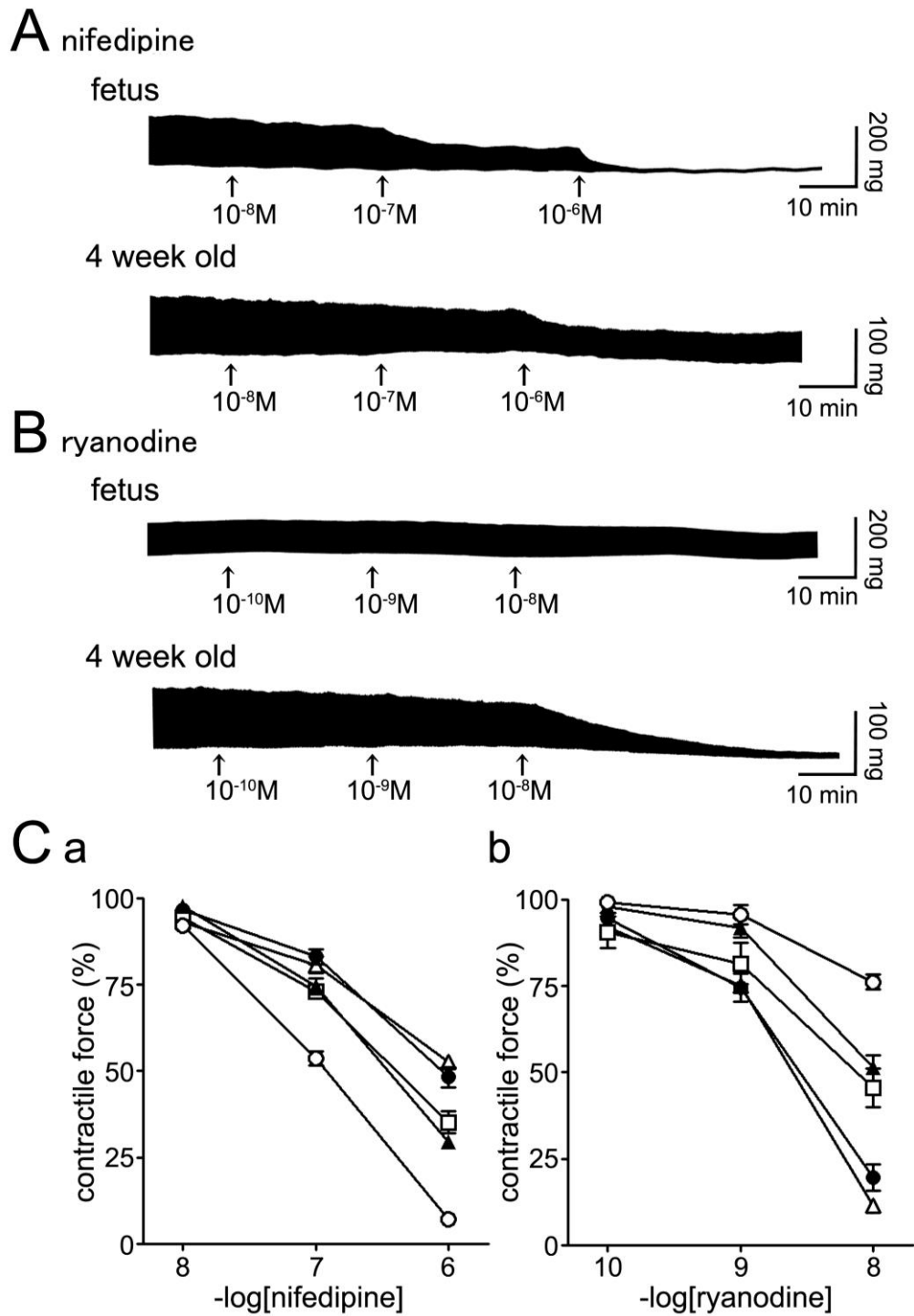
リアノジン受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出阻害薬 ryanodine は、すべての発達段階において濃度依存的に心収縮力を減少させた。その作用は発達に伴い増大していき、特に胎生期から新生仔期、1 週齢から 2 週齢にかけて顕著に変化していた(Fig. 3-2-1B, Cb)。Ryanodine (10 nM)は、胎生期で  $76.2 \pm 2.1\%$ 、新生仔期で  $51.3 \pm 3.6\%$ 、1 週齢で  $45.6 \pm 5.6\%$ 、2 週齢で  $19.6 \pm 3.8\%$ 、4 週齢で  $11.6 \pm 1.1\%$ まで心収縮力を減少させた。

SR 膜上に存在する SERCA 阻害薬 cyclopiazonic acid (CPA)は、新生仔期および 4 週齢において、濃度依存的に心収縮力を減少させた。その作用は 4 週齢のほうが顕著であり、CPA(10  $\mu\text{M}$ )は、新生仔期で  $52.0 \pm 3.9\%$ 、4 週齢で  $37.7 \pm 1.7\%$ まで心収縮力を減少させた(各  $n = 6$ )。

$\text{IP}_3$  受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出阻害薬 xestospongine C は、すべての発達段階においてわずかに心収縮力を減少させた。その作用は発達段階では違いは見られなかった。Xestospongine C (3  $\mu\text{M}$ )は、胎生期で  $95.1 \pm 3.0\%$ 、新生仔期で  $98.5 \pm 2.2\%$ 、1 週齢で  $96.6 \pm 2.8\%$ 、2 週齢で  $96.3 \pm 0.7\%$ 、4 週齢で  $94.2 \pm 1.1\%$ まで心収縮力を減少させた(各  $n = 4$ )。

#### $\text{Ca}^{2+}$ transient に対する ryanodine 感受性の発達変化

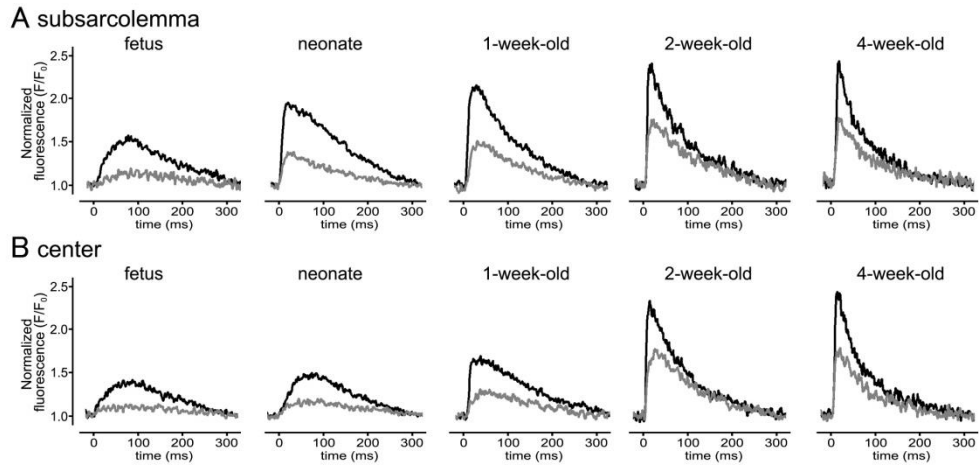
Ryanodine (1  $\mu\text{M}$ )は細胞膜付近、細胞中心部のどちらの領域でも、すべての発達段階において、 $\text{Ca}^{2+}$ transient の amplitude を減少させた。その作用は発達に伴い増大していき、特に胎生期から新生仔期、1 週齢から 2 週齢にかけて顕著に変化していた(Fig. 3-2-3; Table 3-2-1)。細胞膜付近と細胞中心部での作用の違いはすべての発達段階において認められなかった(Fig. 3-2-3; Table 3-2-1)。



**Fig. 3-2-1. Negative inotropic effects of nifedipine and ryanodine on isolated ventricular tissue.**

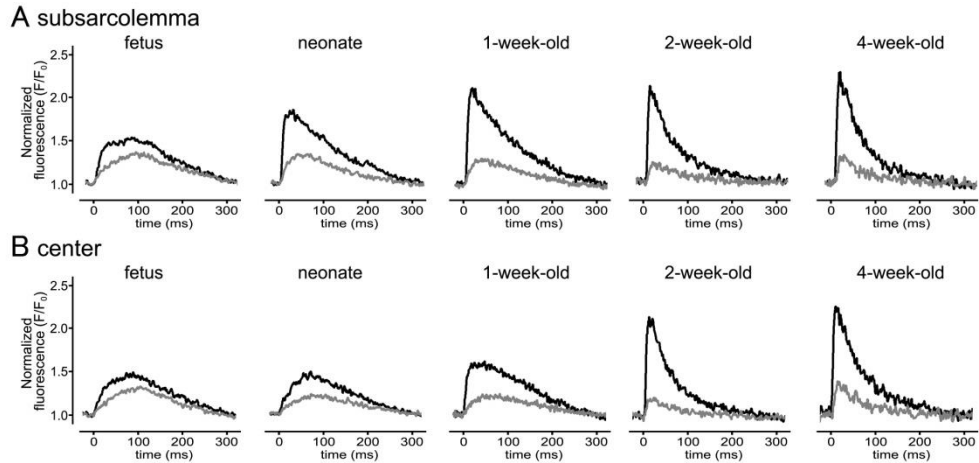
**A** and **B**: Typical traces for the negative inotropy produced by nifedipine (**A**) and ryanodine (**B**).

**C**: Summarized results for the negative inotropy produced by nifedipine (**a**) and ryanodine (**b**) in the fetal (open circle), neonatal (closed triangle), 1-week-old (open square), 2-week-old (closed circle) and 4-week-old (open triangle) mice. Symbols and bars are the mean  $\pm$  S.E.M. from 5 to 8 ventricular preparations.



**Fig. 3-2-2. Effect of nifedipine on the  $\text{Ca}^{2+}$  transient.**

Changes in  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence intensity at subsarcolemmal (A) and central (B) regions of the cells before (black line) and after (gray line) the application of  $1 \mu\text{M}$  nifedipine was shown. Fluorescence was expressed as normalized values ( $F/F_0$ ) against the fluorescence at time zero ( $F_0$ ), at which the cells were stimulated.



**Fig. 3-2-3. Effect of ryanodine on the  $\text{Ca}^{2+}$  transient.**

Changes in  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence intensity at subsarcolemmal (A) and central (B) regions of the cells before (black line) and after (gray line) the application of  $1 \mu\text{M}$  ryanodine was shown. Fluorescence was expressed as normalized values ( $F/F_0$ ) against the fluorescence at time zero ( $F_0$ ), at which the cells were stimulated.

**Table 3-2-1. Developmental changes in the effects of nifedipine and ryanodine on the  $\text{Ca}^{2+}$  transient.**

	nifedipine-sensitive component (%)		ryanodine-sensitive component (%)	
	subsarcolemma	center	subsarcolemma	center
fetus	$76.9 \pm 2.2^*$	$77.7 \pm 2.2^*$	$43.9 \pm 4.8^*$	$41.6 \pm 5.0^*$
neonate	$61.7 \pm 2.8^*$	$61.0 \pm 2.8^*$	$52.2 \pm 5.8^*$	$53.6 \pm 6.9^*$
1 week old	$59.2 \pm 2.4^*$	$57.8 \pm 2.6^*$	$61.7 \pm 3.5$	$60.8 \pm 4.2^*$
2 week old	$47.1 \pm 2.5$	$46.9 \pm 1.9$	$76.9 \pm 7.4$	$78.9 \pm 6.6$
4 week old	$43.2 \pm 2.6$	$43.3 \pm 2.7$	$81.3 \pm 2.4$	$83.5 \pm 4.7$

The effects of nifedipine ( $1 \mu\text{M}$ ) and ryanodine ( $1 \mu\text{M}$ ) on  $\text{Ca}^{2+}$  transient of isolated ventricular cardiomyocytes from the fetus, neonate, and 1, 2 and 4 week-old mice. The amplitude of the nifedipine-sensitive and ryanodine-sensitive component of the  $\text{Ca}^{2+}$  transient was expressed as a percentage of the amplitude in the absence of nifedipine and ryanodine, respectively. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. from 8 cardiomyocytes. Asterisks indicate significant difference from corresponding values in 4-week-old mice. Statistical significance was evaluated by two-way analysis of variance followed by the Tukey's test for multiple comparisons.



### 第3節 考察

生理的な状態において心筋細胞は細胞膜の電氣的興奮に引き続いて収縮弛緩を行う。心筋収縮の引き金となるのはカルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )であり、心筋細胞の静止時  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は 100 nM 程度に維持されている。電氣的興奮により L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルが活性化し、細胞外から流入した  $\text{Ca}^{2+}$ により筋小胞体(sarcoplasmic reticulum: SR)膜上の  $\text{Ca}^{2+}$ 放出チャネル(ryanodine 受容体)が開口し、SR から  $\text{Ca}^{2+}$ が放出される( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release: CICR)と、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は 1  $\mu\text{M}$  程度にまで上昇し、収縮タンパクと相互作用を起こし収縮が惹起される。その後、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ は筋小胞体の ATP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプ(Sarco(endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: SERCA)や  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger: NCX)、細胞膜上にある  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプ、ミトコンドリアにより除去され、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が減少し、心筋が弛緩するという一過性の挙動を示す。この一過性の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ の上昇・下降( $\text{Ca}^{2+}$  transient)の形成において中心的な役割を担っているのが L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルと SR であり、動物種、発達段階、病態などによりそれぞれの興奮収縮機構への寄与が異なることが報告されている。そこで、マウス心室筋の L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルと SR の機能の発達変化について、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル遮断薬 nifedipine と筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出チャネル阻害薬 ryanodine を用いて薬理的に検討した。マウス心室筋の収縮力および  $\text{Ca}^{2+}$  transient の nifedipine 感受性が発達とともに減少していくことは(Fig. 3-2-1A, Ca, 3-8; Table 3-2-1)、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルからの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入の収縮に対する役割が発達に伴い減少していくことを示唆している。一方、ryanodine 感受性は収縮力、 $\text{Ca}^{2+}$  transient 共に発達に伴い増大しており(Fig. 3-2-1B, Cb, 3-2-3; Table 3-2-1)、SR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出の機能的役割が発達とともに増大していくことが示唆された。つまり、マウス心室筋は発達に伴い興奮収縮機構における  $\text{Ca}^{2+}$ 動員機構が L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル依存型から SR 依存型へと変化していくと考えられる。このような発達に伴う興奮収縮機構における  $\text{Ca}^{2+}$ 動員機構が L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル依存型から SR 依存型に変化していく現象はラット(Cohen and Lederer, 1988; Tanaka and Shigenobu, 1989; Kilborn and Fedida, 1990)、ウサギ(Okuda et al., 1987; Nakanishi et al., 1987; Osaka and Joyner, 1991; Huynh et al., 1992)においても存在することが直接的・間接的に示唆されており、多くの動物に共通であると考えられる。また、マウスの心室筋の nifedipine と ryanodine の感受性は、胎生期から新生仔期、1 週齢から 2 週齢にかけて大きく変化しており(Fig. 3-2-1)、この期間に興奮収縮機構を形成する各種イオンチャネル、トランスポーターなどに重要な変化が起きていることが示唆される。

マウス心室筋の L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの電流密度が発達とともに増大していくことや、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルのタンパク量、mRNA 量ともに増大していくことが報告されており(Liu et al., 2002; Erman et al., 1983)、本研究でも、4 週齢の L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの電流密度が新生仔期に比べて高いことが観察された(Fig. 3-1-5)。したがって、興奮収縮機構の L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル依存性が発達とともに減少することに対して、機能的な L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル発現量の減少からは説明することができず、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル自身以外の要因が関与していることが考えられる。

その要因として考えられることが 2 つあり、その 1 つは本研究でも観察された、活動電位持続時間(action potential duration: APD)の短縮である(Fig. 3-1-2; Table 3-1-2)。L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルは電位

依存性であり、その最大活性化電位は、実験条件にも左右されるが、0~10 mV であることが知られている。したがって、発達に伴う APD の短縮 (特に 0~10 mV に相当する APD<sub>20</sub> の短縮) により、チャネルの開口時間が短くなり、Ca<sup>2+</sup>流入が減少していくと考えられる。この APD の短縮は活動電位の再分極を担う K<sup>+</sup>電流の種類、発現量の違いにより説明できる。胎生期マウス心室筋の再分極を担う K<sup>+</sup>電流は活性化に数百ミリ秒かかるとされる遅延整流性 K<sup>+</sup>電流であるが(Wang et al., 1996; Nerbonne, 1998)、発達とともに数ミリ秒で活性化する一過性外向き電流(transient outward current: I<sub>to</sub>)に変化していくことが報告されている(Nishimaru et al., 2001; Nerbonne, 1998; Benndorf and Nilius, 1988; Wang and Duff, 1997)。また、成体期マウス心房筋においても主要な再分極成分は I<sub>to</sub> であることが報告されている(Nishimaru et al., 2001; Tanaka et al., 2010)。実際に本研究でも、4 週齢の I<sub>to</sub> の電流密度は新生仔期に比べて高いことを確認しており(Fig. 3-1-4)、活性化の速い I<sub>to</sub> が発達に伴い増大していくことにより、活動電位の再分極が促進され、発達に伴い APD が短縮していくのだと考えられる。マウス心室筋での APD 短縮は、特に胎生期から新生仔期の間で顕著であったことから(Fig. 3-1-2; Table 3-1-2)、胎生期から新生仔期の間での興奮収縮機構の変化に APD 短縮が大きく寄与していることが示唆される。

興奮収縮機構の L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル依存性が発達とともに減少していくことのもう一つの要因として SR 機能の増大があげられる。SR を ER-Tracker で染色し共焦点顕微鏡で観察したところ、その存在量が発達とともに増大することが観察された(Fig. 3-1-6A, B)。また、ryanodine 受容体、SERCA および SERCA を抑制的に制御している phospholamban のタンパク量、mRNA 量が発達に伴い増大していくことも報告されている(Liu et al., 2002; Harrer et al., 1997)。このような SR の形態的、分子的变化が、発達に伴う ryanodine 感受性の増大をもたらしていると考えられる。一方、SR に存在するもう一つの Ca<sup>2+</sup>放出チャネルである IP<sub>3</sub> 受容体の発現量は、発達とともに増大していくことが報告されているが(Harrell et al., 2007)、本研究では、IP<sub>3</sub> 受容体阻害薬 xestospongine C が心収縮力をわずかに減少させるのみであったこと、そして発達段階間でその作用には違いが認められなかったことから、IP<sub>3</sub> 受容体からの Ca<sup>2+</sup>放出は、マウス心室筋の心収縮力、そして興奮収縮機構の発達変化にはあまり寄与していないと考えられる。

SR 自身の発現量に加え、T 管構造の発達も重要な要因の一つであり、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇の時空間的パターンに大きな影響を与えている。T 管は筋線維の方向とほぼ直角に走り、細胞膜が細く陥入したもので、その内腔は細胞外液とつながっている。T 管は細胞膜で起こった活動電位をすばやく細胞内部へと伝える機能を果たしており、T 管の存在により細胞質の全領域で同時に Ca<sup>2+</sup>transient を起こすことが可能になる。T 管の存在は、多くの哺乳動物の心室筋で確認されている。一方、T 管が存在しない心房筋では、SR 局所で発生した Ca<sup>2+</sup>放出が隣接する SR から CICR を引き起こしそれが次々と伝搬する、所謂 Ca<sup>2+</sup> wave により心房筋細胞中心部へと Ca<sup>2+</sup>が伝搬されるため、細胞膜直下で最も早く Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し、約 100 μm/s と遅い伝搬速度を有する Ca<sup>2+</sup> wave により徐々に細胞中心部へと伝わっていくことが確認されている(Tanaka et al., 2001)。胎生期の Ca<sup>2+</sup> transient の amplitude は小さく、ゆっくりとした立ち上がりをしているが(Fig. 3-1-3; Table 3-1-3)、これは未熟な SR 機能と L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル機能から説明できる。胎生期の細胞中心

部の  $\text{Ca}^{2+}$  transient が nifedipine、ryanodine のどちらでも抑制がみられることから(Fig. 3-2-2, 3-2-3)、T 管が存在しない胎生期の  $\text{Ca}^{2+}$  動態としては、2 通りが考えられる(Fig. 3-3-1)。一つは L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介して細胞内に流入した  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞中心部にまで拡散すること、もう一つは T 管が存在しない心房筋のように、SR から SR へ CICR が wave 状に伝播していくことである(Tanaka et al., 2001; Huser et al., 1996)。したがって、胎生期の  $\text{Ca}^{2+}$  transient の amplitude は 4 週齢に比べ低く、立ち上がりも遅いのだと考えられる。新生仔期、1 週齢では SR 量は胎生期に比べると増大しており(Fig. 3-1-6A, B)、また 1 週齢では細胞膜付近にのみ T 管の陥入が確認できる(Fig. 3-1-6A, C)。この場合、細胞膜付近では  $\text{Ca}^{2+}$  transient の amplitude は大きく、立ち上がりも早いですが、細胞中心部では、小さく、遅い  $\text{Ca}^{2+}$  transient になるのだと考えられる(Fig. 3-1-3; Table 3-1-3)。T 管の陥入は 1 週齢から 2 週齢にかけて顕著に起こり、2 週齢以降では細胞中心部にまで T 管が陥入していた(Fig. 3-1-6A, Cb)。T 管上には L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが高密度に存在しており、T 管が陥入することで、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルと RyR がカップリングし、細胞中心部においても CICR が引き起こされる(Fig. 3-3-1)。このため 2 週齢以降では、細胞質の全領域で素早く大きな  $\text{Ca}^{2+}$  transient が発生すると考えられる(Fig. 3-1-3; Table 3-1-3)。この 1 週齢から 2 週齢にかけての T 管-SR 連関の発達が、興奮収縮機構の SR 依存性増大をもたらし、相対的に L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル依存性を低下させていると考えられる。言い換えると、発達に伴い L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの役割が、直接  $\text{Ca}^{2+}$  を供給することから、CICR をトリガーすることに変化していくのだと考えられる(Fig. 3-3-1)。

このような発達に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  transient 立ち上がり速度、減衰速度の上昇に関連して、心筋の収縮速度、弛緩速度が速くなることも観察された(Fig. 3-1-1; Table 3-1-1)。これは興奮収縮機構の変化に伴い、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化が素早く行われるためであり、発達に伴って高まる心拍数に応じた収縮弛緩を可能にしている。また、このような  $\text{Ca}^{2+}$  動態の変化だけでなく、収縮タンパク質の変化も早い収縮弛緩を可能にしていると考えられる。収縮タンパクには 3 つのアイソフォームが知られており、収縮速度の速い  $V_1$ 、中間の速度の  $V_2$ 、収縮速度の遅い  $V_3$  があり、一般に心拍数の低いウサギ、モルモットなどでは  $V_3$  で構成されており、心拍数の高いラット、マウスなどでは  $V_1$  で構成されていることが報告されている。さらにこの収縮タンパクのアイソフォームは発達に伴い変化するとされており、ラットでは胎生期では  $V_3$  であるのに対し、成体期では  $V_1$  に変化することが報告されている(Hamilton and Ianuzzo, 1991; 石塚尚子, 1987)。現在マウスについての報告はないが、ラットと同様に、発達に伴い収縮速度の遅いアイソフォームから速いアイソフォームへと変化する可能性は十分に考えられる。

また、 $\text{Ca}^{2+}$  動態に直接関係した興奮収縮連関上の特性のほかに、活動電位の最大立ち上がり速度(maximum rate of phase 0 depolarization:  $V_{\max}$ )が発達とともに増大していくことが観察された(Table 3-1-2)。心筋細胞間の伝導速度は活動電位が脱分極する速さ( $V_{\max}$ )とほぼ相関することから、 $V_{\max}$  が発達とともに増大していくにしたがって、伝導速度も速くなっていくと考えられる。心筋組織は小さな細胞の集合体であるにも関わらず、さも一つの細胞であるかのように同期して収縮するが、心筋細胞間の伝導速度が速いことは、その“機能的合包体”としてふるまう能力が高いことを示唆する。収縮弛緩を速くするためには、収縮タンパク質の性質だけでなく、それを可能

にする速い細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化が必要であり、極めて短い APD および機能的によく発達した SR と合わせて、これらの性質は生理的な心拍数が高い動物種であるマウスの心臓が安定したポンプ機能を営むための合目的な性質であると考えられる。

**結論 1:** マウス心室筋は発達に伴い興奮収縮機構における  $\text{Ca}^{2+}$  動員機構が、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル依存型から SR 依存型へと変化する。特に胎生期から新生仔期、1 週齢から 2 週齢にかけて顕著に変化しており、これには、活動電位持続時間の短縮と、T 管-SR 連関の発達が起因する。

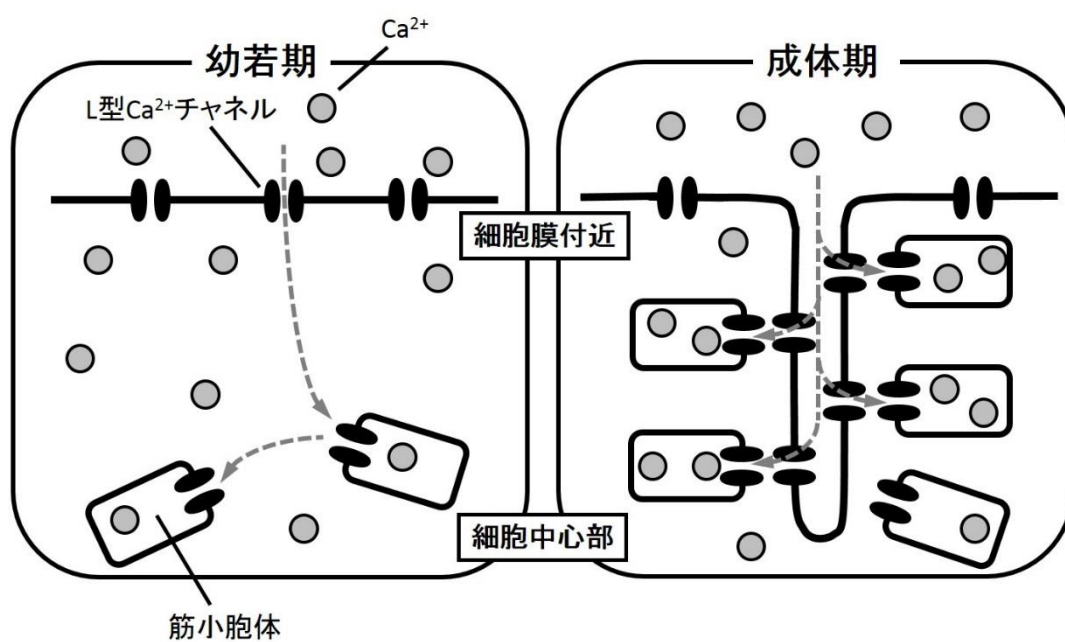


Table 3-3-1. T管-SR連関の発達変化.

## 第4章 $\alpha$ 受容体刺激に対する陽性変力反応の機序

マウスの心室筋では、新生仔期では他の動物種同様に $\alpha$ 受容体刺激に対して陽性変力反応を示すが、生後2週齢前後を境に陰性変力反応に反転することが当研究室の間仁田によって見出された(Tanaka et al., 1995a)。また、成体マウス心筋で観察される陰性変力反応には $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger: NCX)が関与することを示唆する知見が得られている(Nishimaru et al., 2001)。しかし、現在のところ幼若マウス心筋において観察される $\alpha$ 受容体刺激に対する陽性変力反応が引き起こされる機序は明らかにされていない。そこで本章では、 $\alpha$ 受容体刺激応答に対する陽性変力反応の機序の解明を目指し、心筋収縮を制御している細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態に影響を与えらる活動電位やL型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル、 $\text{K}^+$ チャネルに対する $\alpha$ 受容体刺激の影響を検討した。

### 第1節 $\alpha$ 受容体刺激応答の発達変化

アドレナリン $\alpha$ 受容体刺激薬 phenylephrine (10  $\mu\text{M}$ )は、胎生期から1週齢までは心収縮力を増大させ、2週齢では心収縮力の減弱、増大という2相性の反応を引き起こし、4週齢では心収縮力を減少させた(Fig. 4-1)。Phenylephrine (10  $\mu\text{M}$ )は、胎生期で $52.5 \pm 4.4\%$  ( $n = 5$ )、新生仔期で $58.2 \pm 2.1\%$  ( $n = 7$ )、1週齢で $35.1 \pm 2.5\%$  ( $n = 5$ )、2週齢で $11.3 \pm 3.4\%$  ( $n = 7$ )、4週齢で $-50.7 \pm 4.4\%$  ( $n = 6$ )まで心収縮力を変化させた。

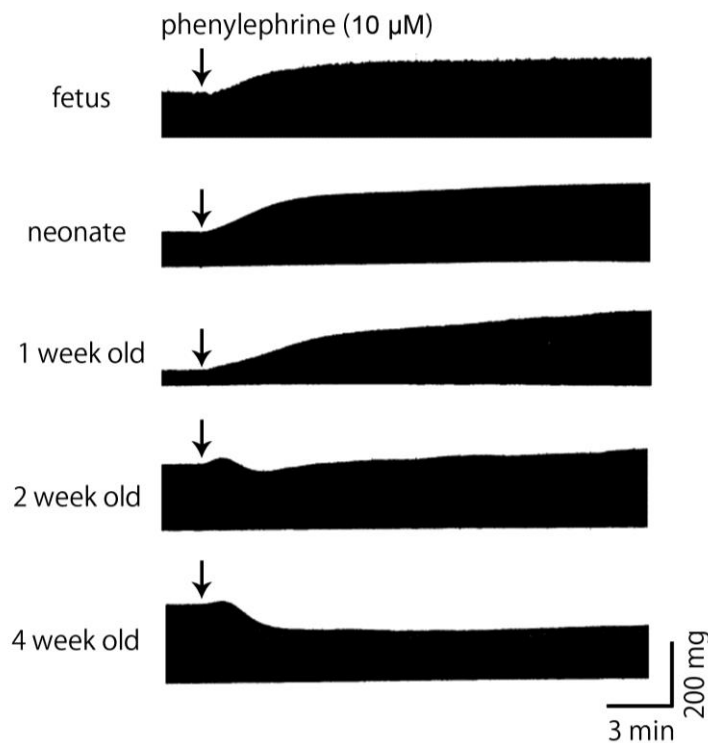


Fig. 4-1-1. Developmental changes in inotropic effects of phenylephrine on ventricular tissue from fetus, neonate, and 1, 2 and 4 week-old mice.

## 第2節 陽性変力反応の機序

### 4-2-1 収縮力に対する $\alpha$ 受容体刺激の影響

新生仔期で観察される $\alpha$ 受容体刺激に対する陽性変力反応は、NCX阻害薬 SEA0400(10  $\mu$ M)では抑制されなかったが、非選択的アドレナリン $\alpha$ 受容体阻害薬 prazosin (1  $\mu$ M)、選択的 $\alpha_{1A}$ 受容体阻害薬 WB4101 (1  $\mu$ M)、L型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害薬 nifedipine (0.1, 1  $\mu$ M)、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換機構阻害薬 5-(N,N-dimethyl)amiloride hydrochloride (DMA; 30  $\mu$ M)、 $\text{IP}_3$ 受容体阻害薬 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB, 10 $\mu$ M)および xestospongine C (3  $\mu$ M)により陽性変力反応は抑制された(Fig. 4-2-1A)。

4週齢で観察される $\alpha$ 受容体刺激に対する陰性変力反応は、prazosin (1  $\mu$ M)、WB4101 (1  $\mu$ M)、SEA0400(10  $\mu$ M)により抑制されたが、nifedipine (1  $\mu$ M)および DMA (30  $\mu$ M)では抑制されなかった(Fig. 4-2-1B)。

### 4-2-2 活動電位に対する $\alpha$ 受容体刺激の影響

新生仔期の活動電位に対して、phenylephrine (10  $\mu$ M)は $\text{APD}_{20}$ 、 $\text{APD}_{50}$ 、 $\text{APD}_{90}$ を延長させたが、RP、OS、AMP、 $\dot{V}_{\text{max}}$ には影響を与えなかった(Fig. 4-2-2; Table 4-2-1)。

4週齢の活動電位に対して、phenylephrine (10  $\mu$ M)は新生仔期と同様に $\text{APD}_{20}$ 、 $\text{APD}_{50}$ 、 $\text{APD}_{90}$ を延長させたが、新生仔期と比べるとAPD延長作用は軽微であった。RP、OS、AMP、 $\dot{V}_{\text{max}}$ には影響を与えなかった(Fig. 4-2-2; Table 4-2-1)。

### 4-2-3 $\text{Ca}^{2+}$ transient に対する $\alpha$ 受容体刺激の影響

新生仔期の $\text{Ca}^{2+}$  transient に対して、phenylephrine (10  $\mu$ M)は、basal、peak、amplitude、basal から peak までの立ち上がり時間(time to peak)を増加させ、半減期(half life:  $T_{1/2}$ )、減衰の時定数( $\tau$  for decay)は減少させた(Fig. 4-2-3; Table 4-2-2)。

4週齢の $\text{Ca}^{2+}$  transient に対して、phenylephrine (10  $\mu$ M)は、basal、peak、amplitude を減少させ、 $T_{1/2}$ 、 $\tau$  for decay を増加させたが、time to peak に影響を与えなかった(Fig. 4-2-3; Table 4-2-2)。

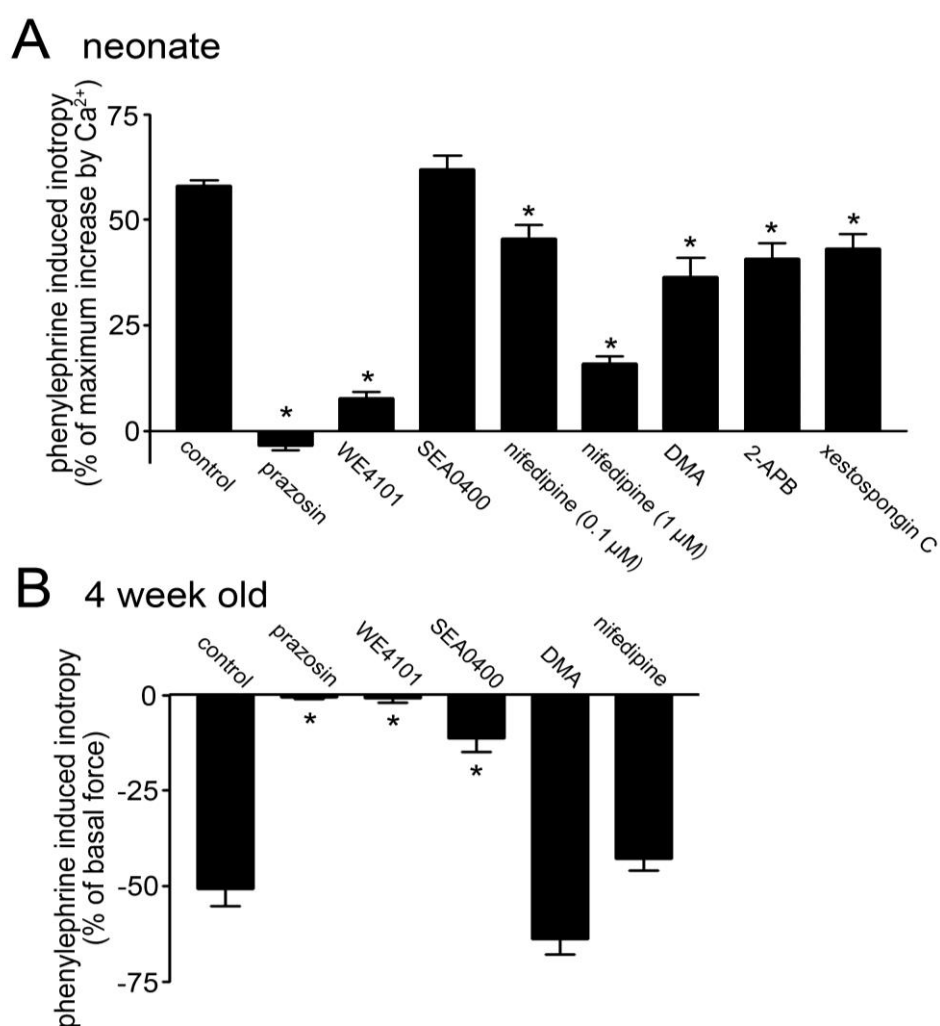
### 4-2-4 L型 $\text{Ca}^{2+}$ 電流に対する $\alpha$ 受容体刺激の影響

新生仔期の単離心室筋細胞では、-40~-50 mV の範囲で 300 ms の矩形波を与えることによりL型 $\text{Ca}^{2+}$ 電流を観察した。L型 $\text{Ca}^{2+}$ 電流に対して phenylephrine (10  $\mu$ M)は電流密度を増大させ、その反応は prazosin (1  $\mu$ M)により完全に抑制された(Fig. 4-2-4)。10 mV に脱分極させたときのそれぞれの電流密度は、control で  $-9.8 \pm 1.4$  pA、phenylephrine で  $-14.6 \pm 1.3$  pA、prazosin+phenylephrine で  $-10.2 \pm 1.3$  pA であった。

#### 4-2-5 K<sup>+</sup>電流に対する $\alpha$ 受容体刺激の影響

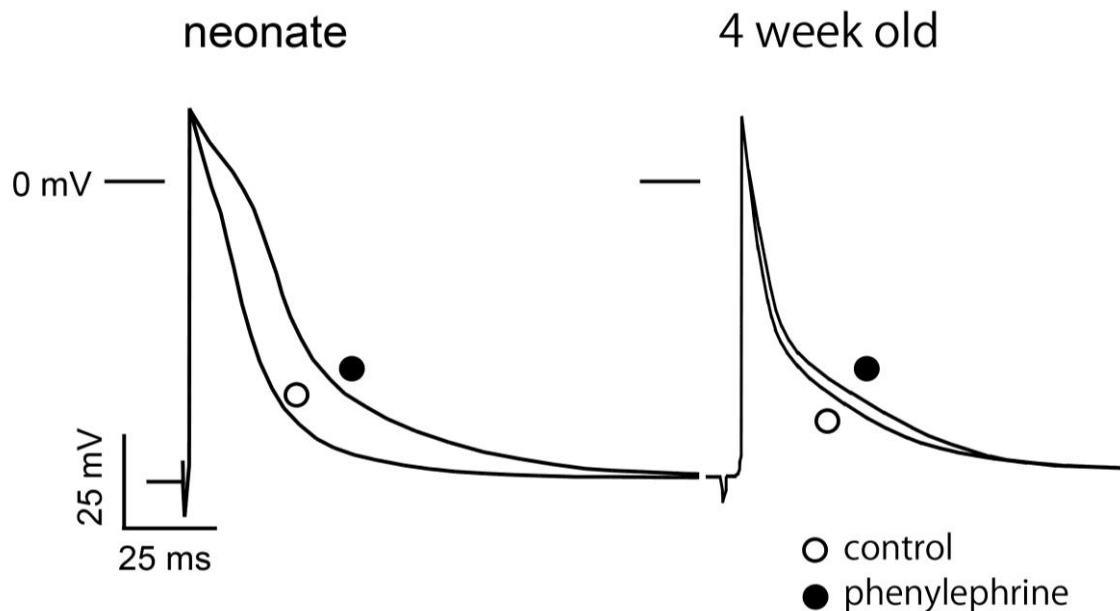
新生仔期マウス心室筋細胞では、-40~50 mV の範囲で 500 ms の矩形波を与えることにより観察される  $I_{to}$  に対して、phenylephrine (10  $\mu$ M) は影響を与えなかった (Fig. 4-2-5)。50 mV に脱分極させたときのそれぞれの電流密度は、control で  $16.8 \pm 1.7$  pA、phenylephrine で  $16.1 \pm 1.4$  pA であった。

4 週齢マウス心室筋細胞では、-40~50 mV の範囲で 500 ms の矩形波を与えることにより観察される  $I_{to}$  に対して、phenylephrine (10  $\mu$ M) は影響を与えなかった (Fig. 4-2-6)。



**Fig. 4-2-1. Effects of pharmacological interventions on the inotropic effects of phenylephrine.**

**A** and **B**: Summarized results for the effects of pharmacological interventions on the positive and negative inotropy produced by 10  $\mu$ M phenylephrine in the neonatal (**A**) and 4-week-old mice (**B**). Columns and vertical bars indicate the mean  $\pm$  S.E.M. from 5 to 7 ventricular preparations, and asterisks indicated significant difference from corresponding values in the control as evaluated by one-way analysis of variance followed by the Tukey's test for multiple comparisons.



**Fig. 4-2-2. Effects of phenylephrine on the action potential.**

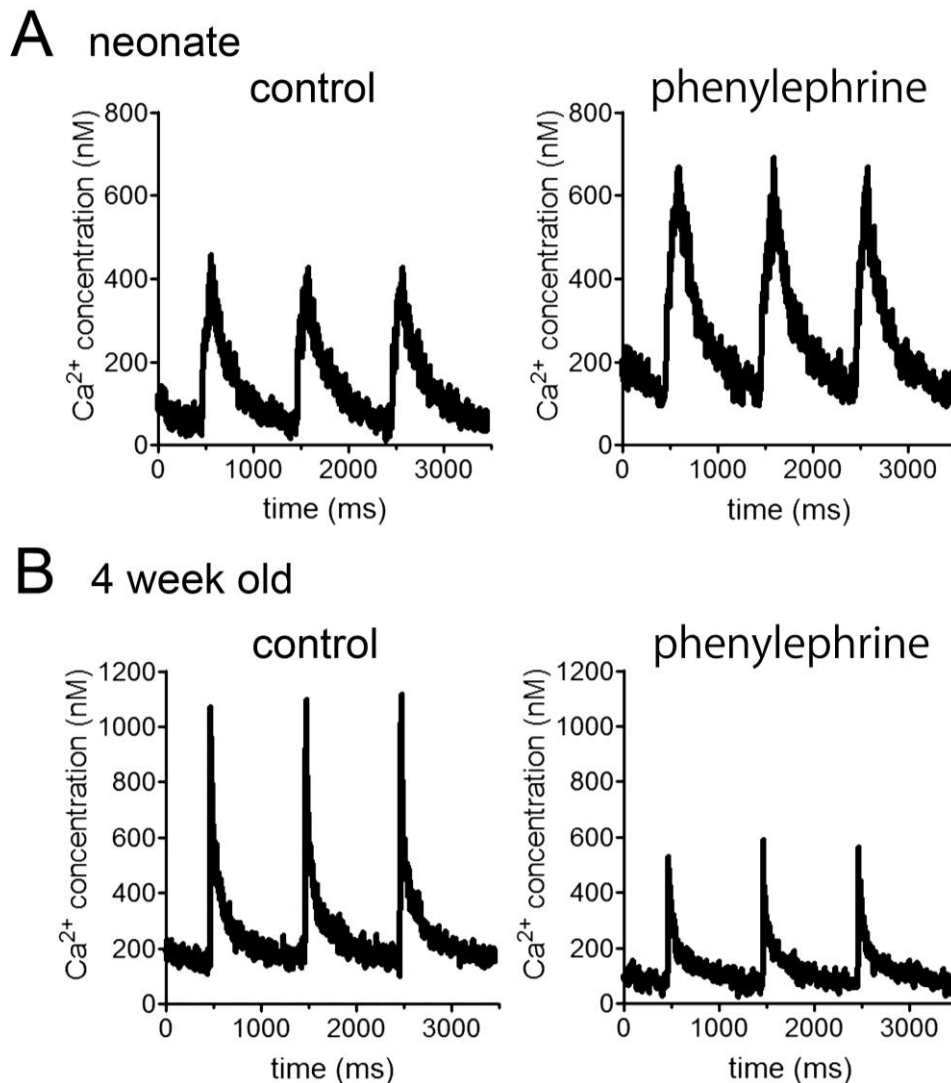
Typical action potential records from neonatal and 4-week-old ventricular myocardia in the absence (open circle) and presence (closed circle) of 10  $\mu$ M phenylephrine.

**Table 4-2-1. Changes in action potential parameters induced by phenylephrine.**

	neonate		4 week old	
	control	phenylephrine	control	Phenylephrine
RP (mV)	-77.2 $\pm$ 0.6	-76.8 $\pm$ 1.0	-76.9 $\pm$ 0.6	-77.0 $\pm$ 0.6
OS (mV)	29.8 $\pm$ 2.0	30.5 $\pm$ 2.4	27.8 $\pm$ 1.9	29.6 $\pm$ 1.7*
AMP (mV)	107.0 $\pm$ 2.1	107.3 $\pm$ 2.4	104.6 $\pm$ 1.7	106.6 $\pm$ 1.5*
APD <sub>20</sub> (ms)	6.1 $\pm$ 0.4	11.9 $\pm$ 0.9*	1.9 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.4*
APD <sub>50</sub> (ms)	13.2 $\pm$ 0.6	22.1 $\pm$ 1.5*	5.1 $\pm$ 0.4	6.5 $\pm$ 0.6*
APD <sub>90</sub> (ms)	35.4 $\pm$ 2.1	64.0 $\pm$ 4.3*	36.0 $\pm$ 3.3	40.1 $\pm$ 3.7*
V <sub>max</sub> (V/s)	268.0 $\pm$ 24.8	255.3 $\pm$ 24.3*	370.8 $\pm$ 6.0	376.9 $\pm$ 12.4

Action potential parameters of ventricular myocardia from neonate and 4 week-old mice in the absence and presence of 10  $\mu$ M phenylephrine. RP, OS, AMP and V<sub>max</sub> indicate resting potential, overshoot, amplitude and maximum rate of phase 0 depolarization, respectively. APD<sub>20</sub>, APD<sub>50</sub> and APD<sub>90</sub> indicate action potential duration at 20%, 50% and 90% repolarization, respectively. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. from 6 ventricular preparations. Asterisks indicate significant difference from corresponding values in the control as evaluated by the paired t-tests.





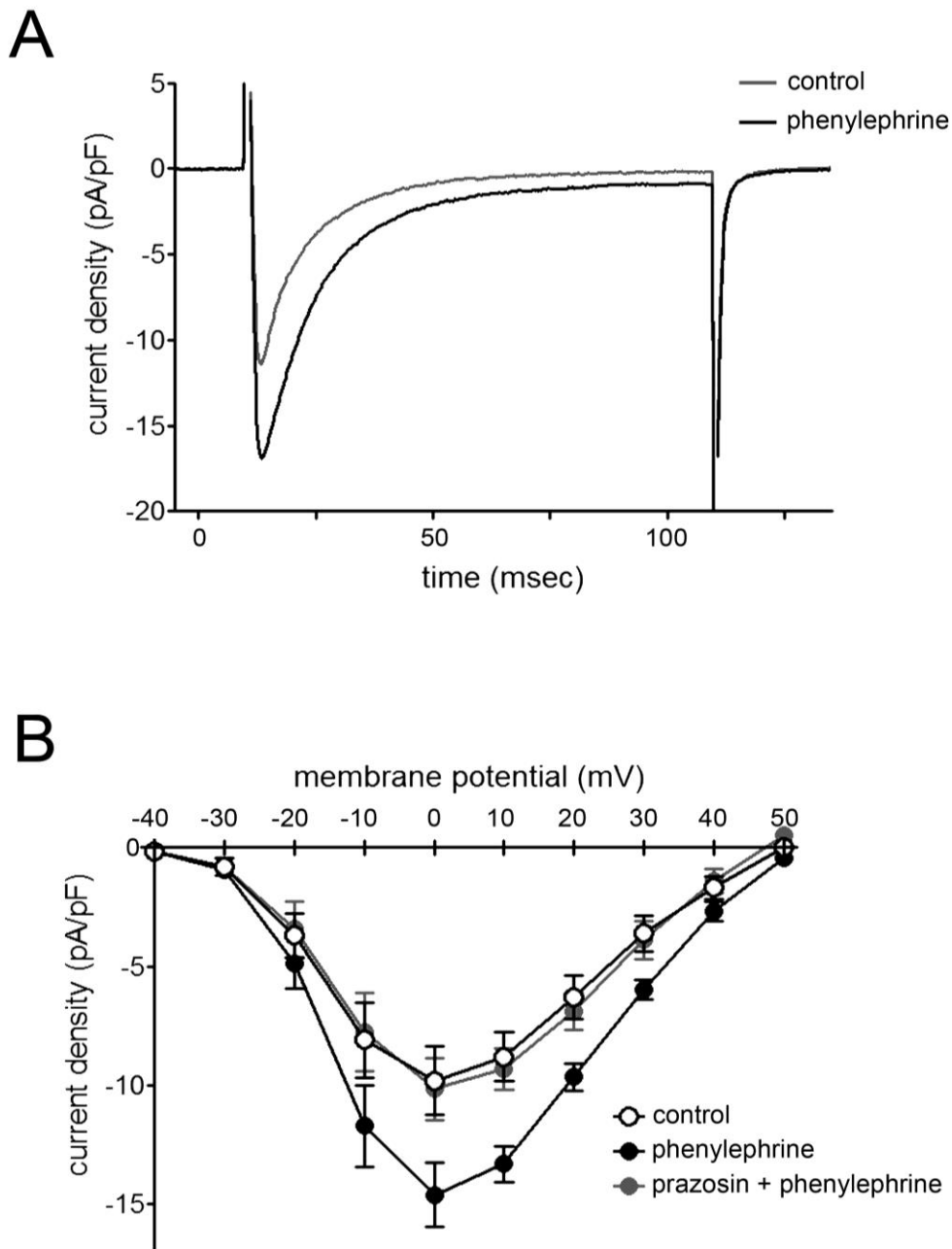
**Fig. 4-2-3. Effects of phenylephrine on the Ca<sup>2+</sup> transient.**

Typical Ca<sup>2+</sup> transient records from neonatal (A) and 4-week-old (B) ventricular myocytes loaded with indo-1 in the absence and presence of 10  $\mu$ M phenylephrine.

**Table 4-2-2. Changes in Ca<sup>2+</sup> transient parameters induced by phenylephrine.**

	neonate		4 week old	
	control	phenylephrine	control	phenylephrine
basal (nM)	99.5 $\pm$ 15.9	174.3 $\pm$ 17.1*	147.3 $\pm$ 19.5	47.0 $\pm$ 10.7 *
peak (nM)	444.7 $\pm$ 27.6	658.1 $\pm$ 51.4*	1119.4 $\pm$ 48.2	524.1 $\pm$ 30.4 *
amplitude (nM)	345.2 $\pm$ 18.8	483.3 $\pm$ 38.1*	972.1 $\pm$ 64.9	477.1 $\pm$ 31.4 *
$\tau$ for decay (ms)	270.4 $\pm$ 23.0	235.8 $\pm$ 13.7*	81.2 $\pm$ 8.6	120.7 $\pm$ 4.7 *
T <sub>1/2</sub> (ms)	187.5 $\pm$ 15.9	163.4 $\pm$ 9.5*	56.3 $\pm$ 5.9	83.6 $\pm$ 3.3 *
time to peak (ms)	93.4 $\pm$ 5.7	125.8 $\pm$ 7.7*	13.3 $\pm$ 0.4	13.9 $\pm$ 2.4

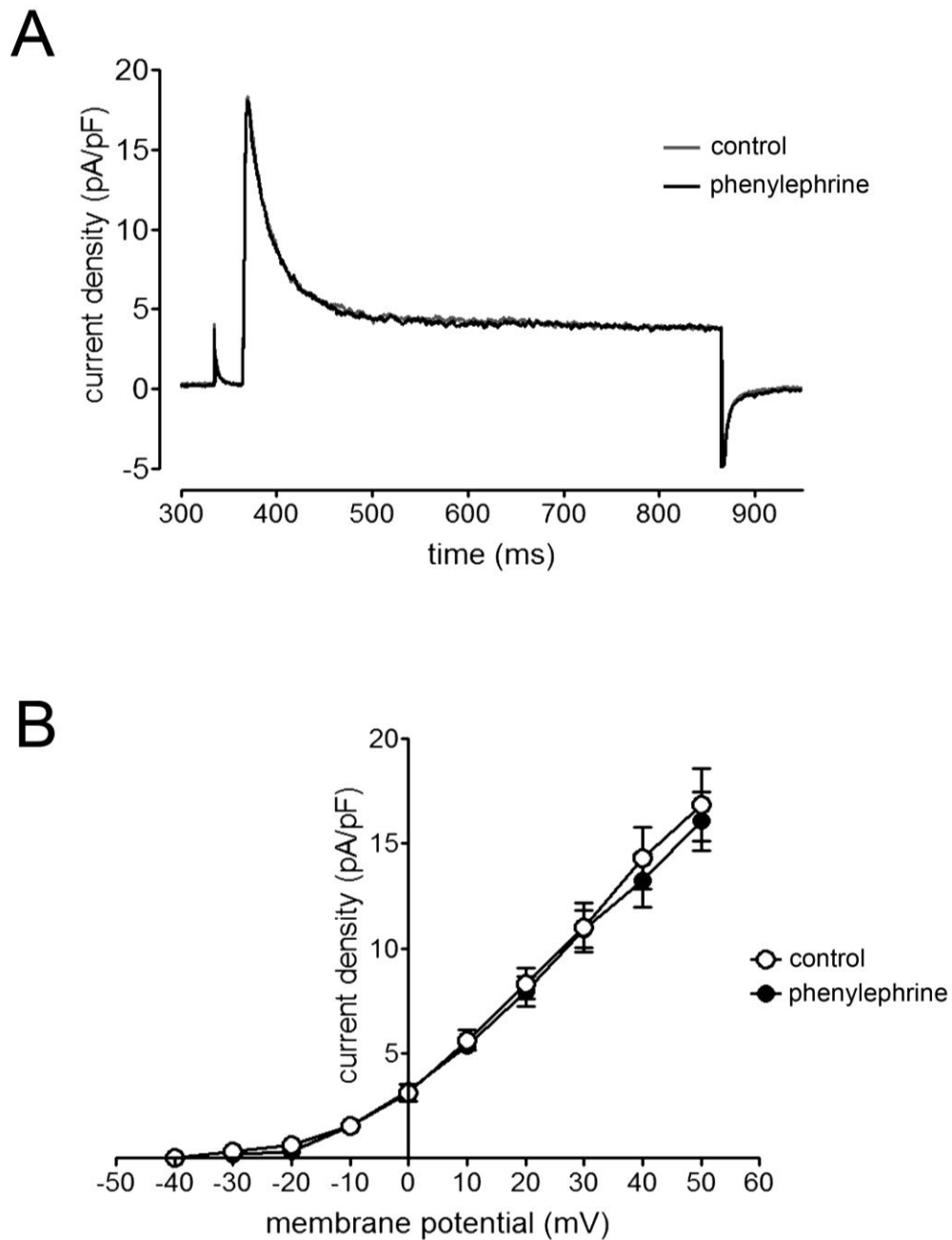
The Ca<sup>2+</sup> transient parameters of isolated ventricular cardiomyocytes from the neonatal and 4 week-old mice in absence and presence of 10  $\mu$ M phenylephrine. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. from 6 to 7 cardiomyocytes. Asterisks indicate significant difference from corresponding values in the control as evaluated by the paired t-test.



**Fig. 4-2-4. Effects of phenylephrine on the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in the neonatal ventricular myocytes.**

**A:** Typical L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current elicited with depolarizing pulse (100 ms) to 0 mV from a holding potential of -40 mV in absence (gray) and presence (black) of 10  $\mu\text{M}$  phenylephrine.

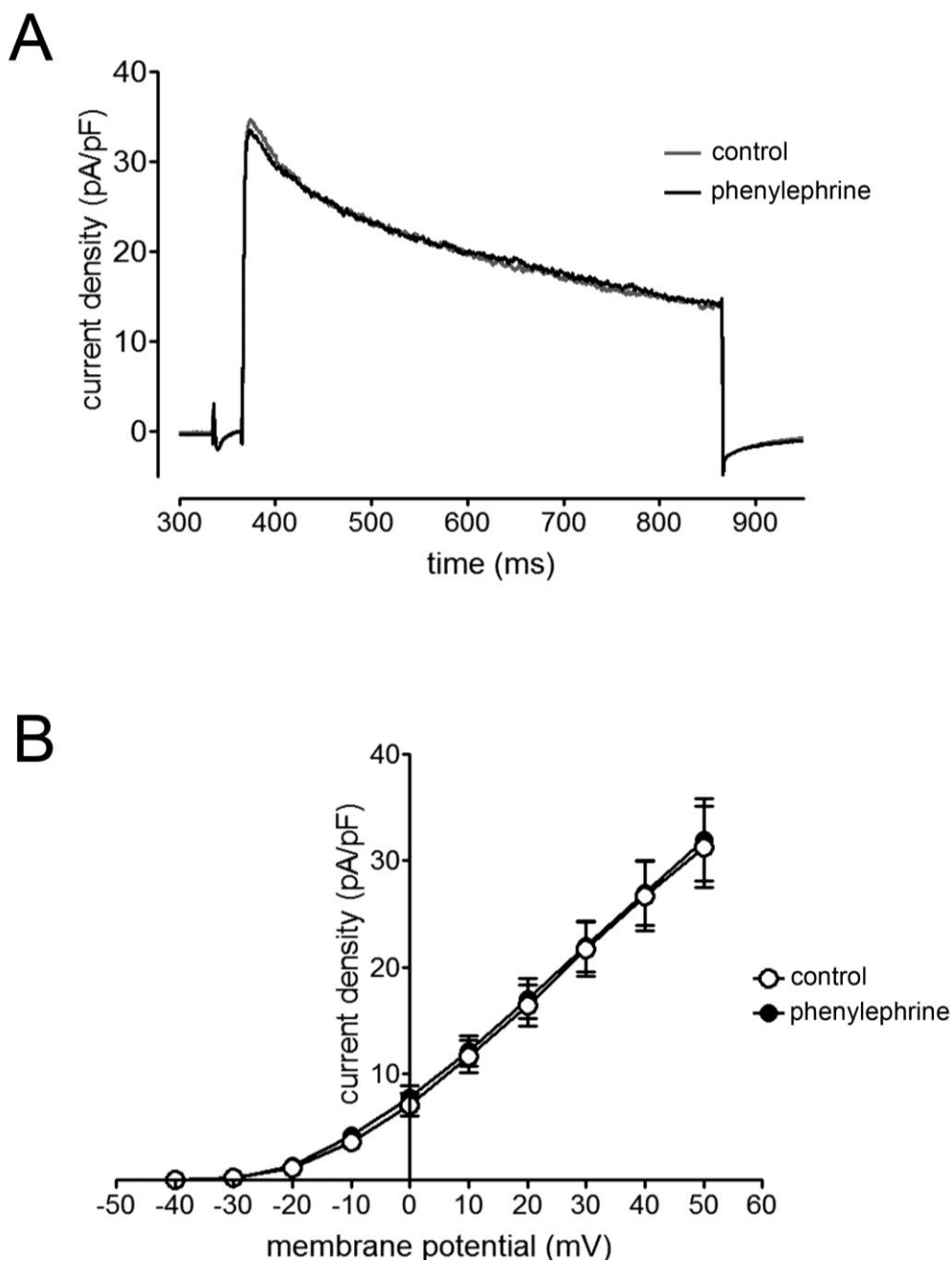
**B:** Current-voltage relationship of the peak amplitude of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in the absence (open symbols) and presence (filled symbols) of 10  $\mu\text{M}$  phenylephrine, and in the presence of 10  $\mu\text{M}$  phenylephrine and 1  $\mu\text{M}$  prazosin (gray symbols). The currents elicited with depolarizing pulse (100 ms) in the voltage range between -40 and +50 mV from a holding potential of -40 mV. Symbols and bars are the mean  $\pm$  S.E.M. from 5 cardiomyocytes.



**Fig. 4-2-5. Effects of phenylephrine on the transient outward  $K^+$  current in the neonatal ventricular myocytes.**

**A:** Typical  $K^+$  current elicited with a prepulse (30 ms) to -40 mV to inactivate  $Na^+$  current, followed by depolarizing pulse (500 ms) to +50 mV from a holding potential of -70 mV in absence (gray) and presence (black) of 10  $\mu$ M phenylephrine.

**B:** Current-voltage relationship of the peak amplitude of  $K^+$  current in the absence (open symbols) and presence (filled symbols) of 10  $\mu$ M phenylephrine. The currents elicited with a prepulse (30 ms) to -40 mV to inactivate  $Na^+$  current, followed by depolarizing pulse (500 ms) in the voltage range between -40 and +50 mV from a holding potential of -70 mV. Symbols and bars are the mean  $\pm$  S.E.M. from 5 cardiomyocytes.



**Fig. 4-2-6. Effects of  $\alpha$ -adrenoceptor stimulation on the transient outward  $K^+$  current in the 4-week-old ventricular myocytes.**

**A:** Typical  $K^+$  current elicited with a prepulse (30 ms) to  $-40$  mV to inactivate  $Na^+$  current, followed by depolarizing pulse (500 ms) to  $+50$  mV from a holding potential of  $-70$  mV in absence (gray) and presence (black) of  $10 \mu M$  phenylephrine.

**B:** Current-voltage relationship of the peak amplitude of  $K^+$  current in the absence (open symbols) and presence (filled symbols) of  $10 \mu M$  phenylephrine. The currents elicited with a prepulse (30 ms) to  $-40$  mV to inactivate  $Na^+$  current, followed by depolarizing pulse (500 ms) in the voltage range between  $-40$  and  $+50$  mV from a holding potential of  $-70$  mV. Symbols and bars are the mean  $\pm$  S.E.M. from 5 cardiomyocytes.

### 第3節 考察

心筋における  $\alpha$  受容体を介する制御機構の存在についてはすでに確立した感があるものの (Puceat et al., 1992; Terzic et al., 1993)、動物種および実験条件により結果が異なる場合もあり、その生理的意義はいまだ明確ではない。一般的に心室筋では、 $\alpha$  受容体刺激に対して収縮力増大反応(陽性変力反応)を引き起こすとされ、現在までにヒト(Bruckner et al., 1984)、ウサギ(Endoh and Schumann, 1975)、ウシ(Bruckner and Scholz, 1984)、ネコ(Hartmann et al., 1988)、ブタ(Meyer et al., 1993)等の種における  $\alpha$  受容体を介した陽性変力反応が報告されているが、イヌのように細胞膜上に相当数の  $\alpha$  受容体が存在するにもかかわらず変力反応が全く観察されない種も存在し (Endoh et al., 1991)、ラットにおいては 3 相性の変力反応が観察されるという (Skomedal and Osnes, 1983; Tohse et al., 1987)。

マウスの心室筋の場合、新生仔期では他の動物種同様に  $\alpha$  受容体刺激に対して陽性変力反応を示すが、生後 2 週齢前後を境に陰性変力反応に反転することが当研究室の間仁田によって見出されており (Tanaka et al., 1995a)、本研究においても同様の結果が得られた (Fig. 4-1-1)。また、成体マウス心筋で観察される陰性変力反応には  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換機構 ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger: NCX) が関与することを示唆する知見が得られている (Nishimaru et al., 2001)。しかし、現在のところ幼若マウス心筋において観察される  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応の機序は明らかにされていない。そこで本章では、 $\alpha$  受容体刺激応答に対する陽性変力反応の機序解明を目指した。

新生仔期マウス心室筋では  $\alpha$  受容体刺激に対して陽性変力反応を示し (Fig. 4-1-1)、 $\text{Ca}^{2+}$  transient の amplitude が増大した (Fig. 4-2-3; Table 4-2-2)。この結果は、陽性変力反応が細胞質に供給される  $\text{Ca}^{2+}$  が増大することにより引き起こされていることを示唆している。 $\text{Ca}^{2+}$  供給増大の要因として、 $\alpha$  受容体刺激により APD 延長が観察されたことから (Fig. 4-2-2; Table 4-2-1)、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルからの  $\text{Ca}^{2+}$  流入量が増大していることが考えられる。前章でも述べたが、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルは電位依存性であるため、APD と L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルからの  $\text{Ca}^{2+}$  流入量はある程度相関していることが理由である。この APD 延長の要因として、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの活性化もしくは、 $\text{K}^+$  チャネルの抑制が考えられる。 $\alpha$  受容体刺激に対して陽性変力反応を示す他の動物種と同様に (Liu et al., 1994; Liu and Kennedy, 1998; Zhang et al., 1998)、新生仔期マウス心室筋でも  $\alpha$  受容体刺激により L 型  $\text{Ca}^{2+}$  電流が増大し、さらにその反応が prazosin により抑制された (Fig. 4-2-4)。また、 $\alpha$  受容体刺激に対して陽性変力反応を示すラットやウサギの心室筋において  $\text{K}^+$  チャネルの一つである一過性外向き電流 (transient outward current:  $I_{to}$ ) が  $\alpha$  受容体刺激により抑制されることが報告されている (Fedida et al., 1990; Tohse et al., 1990)。しかし新生仔期マウス心室筋では、 $\alpha$  受容体刺激により APD は延長しているにもかかわらず、 $I_{to}$  には影響がみられなかった (Fig. 4-2-5)。これらの結果から、 $\alpha$  受容体刺激による APD の延長は、 $\text{K}^+$  チャネルの抑制ではなく、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル活性化により引き起こされていることが示唆された。したがって、新生仔期マウス心室筋において、 $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応は、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル活性化による直接的な、さらに APD 延長による間接的な L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルからの  $\text{Ca}^{2+}$  流入増大により引き起こされていることが明らかとなった。

$\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応の機序に L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル活性化が関与していることは、新生仔期心筋の陽性変力反応が L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル遮断薬 nifedipine により抑制されたことから支持される(Fig. 4-2-1A)。しかし、この nifedipine による抑制が完全なものでなかったことから、他の要因も関与していることが考えられる。新生仔期マウスにおいて、 $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ 交換機構( $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchanger: NHE)阻害薬 5-(N,N-dimethyl)amiloride hydrochloride(DMA)により  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応が抑制されたことから(Fig. 4-2-1A)、NHE 活性化の関与が示唆される。またラット心筋の  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応にも NHE が関与するという報告がある(Kusakari et al., 2002)。心臓において、細胞膜上の NHE は  $\text{Na}^+$ と  $\text{H}^+$ を 1 : 1 交換し、細胞内 pH を調節しているトランスポーターであり、通常細胞内  $\text{H}^+$ を細胞外へ排出する方向に働いている(Karmazyn and Moffat, 1993)。今日、様々な実験系の結果から細胞内が酸性になると心臓の収縮力が低下し、反対にアルカリ性になると収縮力が増加することが知られている(Orchard and Kentish, 1990)。これは  $\text{H}^+$ と  $\text{Ca}^{2+}$ が収縮タンパクであるトロポニン C の  $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位に対して競合的に結合するためである(Orchard and Kentish, 1990;Morimoto et al., 2001)。そのため、 $\alpha$  受容体刺激による NHE 活性化を介して細胞内 pH が上昇し(Schluter et al., 1998)、収縮タンパク質の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性が増加することが(Kusakari et al., 2002;Tanaka et al., 2005)、陽性変力反応に至る機序の一つであると考えられている(Terzic et al., 1992;Iwakura et al., 1990)。新生仔期マウスに関しては、 $\alpha$  受容体刺激により細胞内 pH の上昇や収縮タンパクの  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の増加が実際に起こっているのかどうかは今後検討する必要がある。

また、 $\text{IP}_3$  受容体阻害薬 2-APB、xestospongine C によっても陽性変力反応が抑制された(Fig. 4-2-1A)。 $\text{IP}_3$  受容体は SR の  $\text{Ca}^{2+}$ 放出チャネルの一つであり、ryanodine 受容体が  $\text{Ca}^{2+}$ により活性化されるのに対して、 $\text{IP}_3$  受容体は  $\text{IP}_3$  により活性化する。 $\text{IP}_3$  受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出は、平滑筋の収縮では重要な役割を果たしていることが知られているが、本研究において  $\text{IP}_3$  受容体阻害薬 xestospongine C がマウス心室筋の収縮力にほとんど影響を与えなかったことも含めて(第 3 章)、心筋における  $\text{IP}_3$  受容体の役割はあまり重要視されていない。しかし、 $\alpha$  受容体刺激応答に対しては xestospongine C が抑制効果を示しており、心筋においても  $\text{IP}_3$  受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出による収縮制御が行われていることを示唆している。また、モルモットにおいても  $\alpha$  受容体刺激応答への  $\text{IP}_3$  受容体の関与が報告されている(Miyamoto et al., 2000)。 $\text{NHE}$  や  $\text{IP}_3$  受容体以外にも、様々な実験動物において、 $\alpha$  受容体刺激が細胞内  $\text{Na}^+$ 濃度や  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ポンプ(Shah et al., 1988;Williamson et al., 1993;Wang et al., 1998)に影響を与えることが報告されており、 $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応の機序をすべて解明するためには、更なる検討が必要である。

交感神経による心筋の収縮制御は、主に  $\beta$  受容体を介して行われると考えられているが、交感神経の伝達物質である noradrenaline の濃度反応曲線が  $\alpha$  受容体拮抗薬によりシフトすることから(Tanaka et al., 1995a)、心筋収縮制御には、 $\alpha$  受容体も関与していると考えられる。しかし、 $\alpha$  受容体を介する心臓制御の生理学的意義、特にマウス心室筋で観察される  $\alpha$  受容体刺激応答が陽性から陰性へと変化するものの生理学的意義は未だ明らかでない。そこで、これまで得られている知見と本研究で得られた結果から考察した。薬理的に自律神経(交感神経および副交感神経)

の影響を遮断した場合、イヌやヒトなどの体の大きな動物では心拍数が増加するのに対して、マウスでは心拍数が減少することから、マウスの心筋、特に洞房結節は他の動物種と比べ、交感神経支配を強く受けていることが報告されている(Ishii et al., 1996)。また交感神経支配を強く受けているマウスにおいて、幼若マウス洞房結節が成体心筋に比べて交感神経の影響を強く受けていること(Adachi et al., 2013)、幼若マウス心室筋の noradrenaline の感受性が成体心筋に比べて高く、より低濃度から陽性変力反応が現れることも報告されている(Tanaka et al., 1994)。したがって、幼若心筋では、低い心機能を補うために、 $\beta$  受容体と共に  $\alpha$  受容体も心機能を高めるように働いているのではないかと考えられる。一方、成体心筋では、興奮収縮機構に関連するイオンチャネルやトランスポーター、収縮タンパクの発達により、交感神経を介した補助がなくても素早く収縮弛緩することが可能になるため、 $\beta$ 受容体を介した心機能増大作用が強くなりすぎないように、ブレーキの役目として  $\alpha$  受容体を介した応答が陰性になっていると考えられる。

また、 $\alpha$  受容体刺激応答の発達変化と同様に、エンドセリン-1 やアンジオテンシン II に対する応答も、発達に伴い陽性変力反応から陰性変力反応へと変化していくことが報告されている(Sekine et al., 1999; Namekata et al., 2008b)。エンドセリン-1 やアンジオテンシン II は心肥大などの病態に関与することが報告されており、病態時においても刺激応答性が変化している可能性がある。 $\alpha$  受容体刺激応答性と病態との関連については後述する 6 章で検討した。

**結論 2:**  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応は L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを介した細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入増大により引き起こされる。

## 第5章 $\alpha$ 受容体刺激応答の発達変化

前章の結果から、 $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応、陰性変力反応は、それぞれ L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル、NCX を介して引き起こされていることが明らかになった。したがって、 $\alpha$  受容体刺激応答には、陽性成分と陰性成分が存在し、発達に伴い各成分を担う L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルと NCX の働きのバランスが変化することで、 $\alpha$  受容体刺激応答が陽性から陰性へと変化すると考えられる。そこで本章では、各成分の発達変化について薬理的に検討し、 $\alpha$  受容体刺激応答が発達に伴い変化していく要因の解明を目指した。

### 第1節 陽性変力反応の発達変化

#### 5-1-1 L 型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル機能の発達変化

L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル機能の発達変化については 3 章で記したように、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル遮断薬 nifedipine が、すべての発達段階において、心収縮力および  $\text{Ca}^{2+}$  transient の amplitude を減少させ、その作用は発達に伴い減少していた(Fig. 3-2-1A, Ca, 3-2-2; Table 3-2-1)。

#### 5-1-2 L 型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル機能と活動電位持続時間の関連性

L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルは電位依存性であるため、活動電位持続時間の影響を受け、その働きが変化する。そこで、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルと活動電位持続時間の関連性について、ATP 感受性  $\text{K}^{+}$  チャネル開口薬 cromakalim を用いて、新生仔心筋の APD を短縮させ、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル機能および  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応にどのような影響が出るのか検討した。

#### Cromakalim の収縮力、活動電位への影響

新生仔期の活動電位に対して、cromakalim (30  $\mu\text{M}$ ) は APD<sub>20</sub>、APD<sub>50</sub>、APD<sub>90</sub> を短縮させた(Fig. 5-1-1; Table 5-1-1)。しかし RP、OS、AMP、 $\dot{V}_{\text{max}}$  には影響を与えなかった(Fig. 5-1-1; Table 5-1-1)。

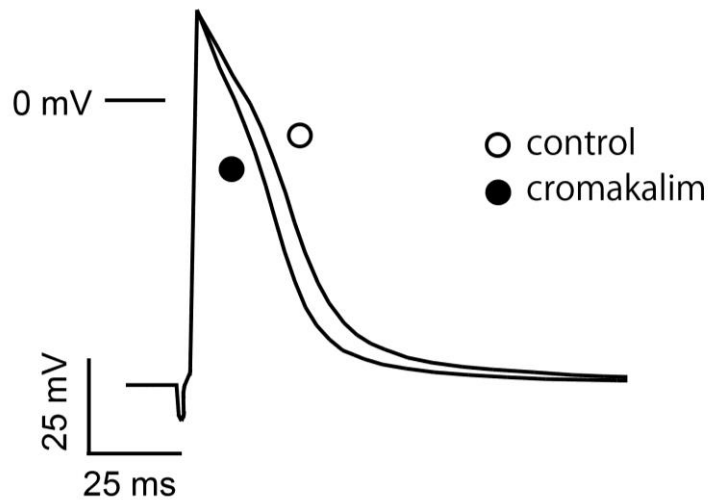
#### Cromakalim 存在下での $\alpha$ 受容体刺激の影響

Cromakalim (30  $\mu\text{M}$ ) 存在下では、新生仔期マウス心室筋での  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応が減弱していた(Fig. 5-1-2)。Phenylephrine (10  $\mu\text{M}$ ) による収縮力増大率は、cromakalim 非存在下 55.7 $\pm$ 4.7%、存在下 38.9 $\pm$ 4.8% であった。

#### Cromakalim 存在下での nifedipine 感受性

Cromakalim (30  $\mu\text{M}$ ) 存在下では、nifedipine (1  $\mu\text{M}$ ) による心収縮力抑制作用が減弱していた(Fig. 5-1-3)。Nifedipine (1  $\mu\text{M}$ ) による心収縮力減少率は、cromakalim 非存在下では -61.3 $\pm$ 3.6% (n = 5)、存在下では -47.2 $\pm$ 4.3% (n = 9) であった。



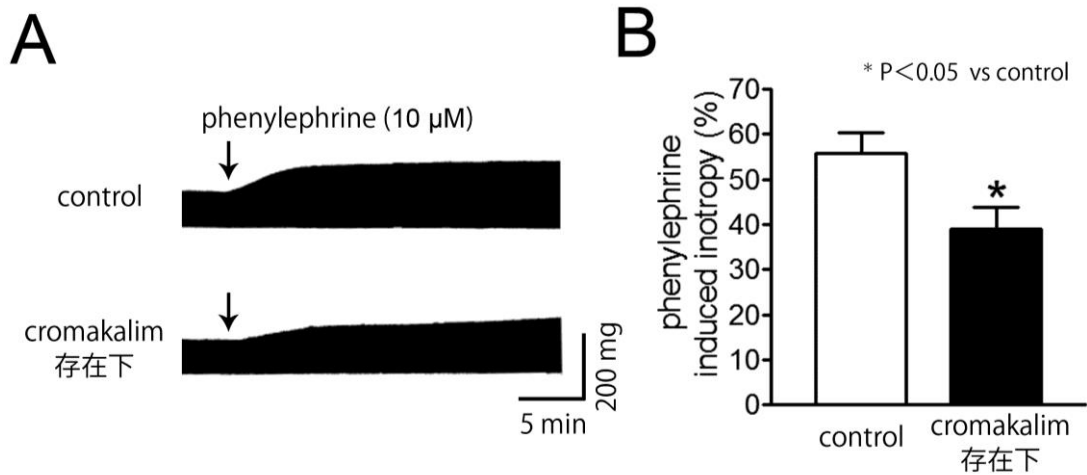


**Fig. 5-1-1. Effects of cromakalim on the action potential in the neonatal ventricular preparation.**  
 Typical action potential records from neonatal ventricular tissue preparations in the absence (open circle) and presence (closed circle) of 30  $\mu$ M cromakalim.

**Table 5-1-1. Changes in action potential parameters induced by cromakalim.**

	control	cromakalim
RP (mV)	-76.4 $\pm$ 2.0	-75.3 $\pm$ 1.8
OS (mV)	25.5 $\pm$ 2.7	25.3 $\pm$ 2.6
AMP (mV)	101.8 $\pm$ 1.8	100.6 $\pm$ 2.3
APD <sub>20</sub> (ms)	9.7 $\pm$ 1.2	7.5 $\pm$ 0.8*
APD <sub>50</sub> (ms)	17.5 $\pm$ 1.8	13.8 $\pm$ 1.2*
APD <sub>90</sub> (ms)	36.3 $\pm$ 3.4	28.2 $\pm$ 2.0*
$\dot{V}_{max}$ (V/s)	188.8 $\pm$ 14.6	200.8 $\pm$ 23.3

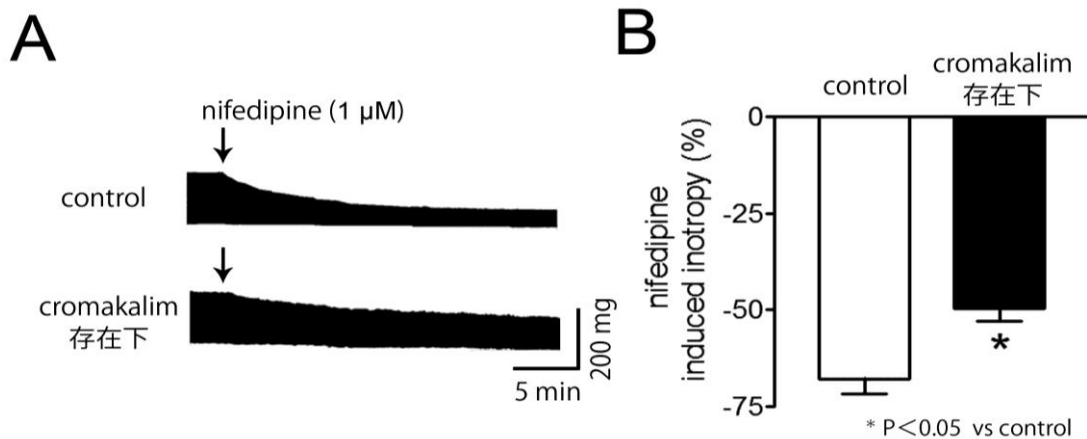
Action potential parameters of ventricular myocardia from neonatal mice in the absence and presence of 30  $\mu$ M cromakalim. RP, OS, AMP and  $\dot{V}_{max}$  indicate resting potential, overshoot, amplitude and maximum rate of phase 0 depolarization, respectively. APD<sub>20</sub>, APD<sub>50</sub> and APD<sub>90</sub> indicate action potential duration at 20%, 50% and 90% repolarization, respectively. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. from 5 ventricular preparations. Asterisks indicate significant difference from corresponding values in the control as evaluated by the paired t-test.



**Fig. 5-1-2. Effects of cromakalim on the positive inotropy induced by phenylephrine.**

**A:** Typical traces for the negative inotropy produced by 10  $\mu$ M phenylephrine.

**B:** Summarized results for the negative inotropy produced by 10  $\mu$ M phenylephrine in the absence (open column) and presence (closed column) 30  $\mu$ M cromakalim. Columns and vertical bars indicate the mean  $\pm$  S.E.M. from 4 ventricular preparations. Asterisks indicate significant difference from corresponding values in the control as evaluated by the student's t-test.



**Fig. 5-1-3. Effects of cromakalim on the negative inotropy induced by nifedipine.**

**A:** Typical traces for the negative inotropy produced by 1  $\mu$ M nifedipine.

**B:** Summarized results for the negative inotropy produced by 1  $\mu$ M nifedipine in the absence (open column) and presence (closed column) 30  $\mu$ M cromakalim. Columns and vertical bars indicate the mean  $\pm$  S.E.M. from 5 to 9 ventricular preparations. Asterisks indicated significant difference from corresponding values in the control as evaluated by the student's t-test.

## 第2節 陰性変力反応の発達変化

### 5-2-1 NCX 機能の発達変化

#### PMA に対する反応性の発達変化

NCX は Protein kinase C (PKC)を介して活性化することが知られている(Nishimaru et al., 2003)。そこで、受容体を介さずに細胞内の PKC を直接活性化させる Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)を用いて、NCX の機能を検討した。PMA (1  $\mu$ M)は新生仔期および 4 週齢マウス心室筋の心収縮力を減少させた(Fig. 5-2-1)。その作用は 4 週齢マウスのほうが顕著であり、PMA (1  $\mu$ M)による心収縮力減少率は、新生仔期で $-20.6 \pm 3.6\%$  (n = 4)、4 週齢で $-57.1 \pm 3.7\%$  (n = 6)であった。

#### SEA0400 に対する反応性の発達変化

NCX 阻害薬 SEA0400 (10  $\mu$ M)は新生仔期および 4 週齢マウス心室筋の心収縮力を増大させた(Fig. 5-2-2)。その作用は 4 週齢マウスのほうが顕著であり、SEA0400 (10  $\mu$ M)による心収縮力増大率は、新生仔期で $15.4 \pm 1.5\%$  (n = 6)、4 週齢で $33.1 \pm 6.3\%$  (n = 5)であった。

### 5-2-2 NCX 機能と活動電位持続時間の関連性

NCX は膜電位の影響を受け、その回転方向と働く強さが変化する。そこで、NCX 機能と活動電位持続時間の関連性について、一過性外向き電流(transient outward current:  $I_{to}$ )遮断薬 4-aminopyridine (4-AP)を用いて、成体心筋の APD を延長させ、NCX 機能および  $\alpha$  受容体刺激に対する陰性変力反応にどのような影響が出るのか検討した。

#### 4-AP 存在下での $\alpha$ 受容体刺激の影響

4-AP (3 mM)存在下では、4 週齢マウス心室筋での phenylephrine (10  $\mu$ M)による心収縮力減少作用が減弱していた(Fig. 5-2-3)。Phenylephrine (10  $\mu$ M)による心収縮力減少率は、4-AP 非存在下では $-37.4 \pm 6.1\%$ 、存在下では $-15.8 \pm 3.0\%$ であった(各 n = 5)。

#### 4-AP 存在下での PMA の影響

4-AP (3 mM)存在下では、4 週齢マウス心室筋での PMA (1  $\mu$ M)による心収縮力抑制作用が減弱していた。PMA (1  $\mu$ M)による心収縮力減少率は、4-AP 非存在下では $-57.1 \pm 3.7\%$ 、存在下では $-35.2 \pm 2.8\%$ であった(各 n = 6)。

### 5-2-3 NCX と SR の機能的連関

3 章での ryanodine を用いた検討から、発達に伴い SR の  $\text{Ca}^{2+}$  放出機能が高まることが明らかとなった(Fig. 3-2-1B, Cb)。さらに 3 章での蛍光イメージング実験から、T 管と SR が連関していくことも観察された(Fig. 3-1-6)。L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが T 管上に存在しているように、NCX も T 管上に存在することが報告されている(Thomas et al., 2003)。したがって、T 管の陥入により、細胞内部の SR と細胞膜上の NCX が空間的、機能的に連関すると考えられる。

NCX は前述の膜電位だけでなく、細胞内外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度、 $\text{Na}^+$  濃度の影響も受け、その回転方向と働く強さが変化する。したがって、NCX と SR が機能的に連関しているとすれば、SR から放出される  $\text{Ca}^{2+}$  により、局所的に  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が高い領域が形成されることで、NCX の  $\text{Ca}^{2+}$  排出機能が高まるのではないかと考えた。つまり SR の  $\text{Ca}^{2+}$  放出機能が高まるほど、NCX の  $\text{Ca}^{2+}$  排出機能が高まるはずである。そこで、NCX と SR の機能的連関について、活動電位の後期再分極相に対する SEA0400 と ryanodine の作用、そして SR の  $\text{Ca}^{2+}$  蓄積量の指標となる caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transient に対する  $\alpha$  受容体刺激の影響から検討した。

#### 活動電位に対する SEA0400 の影響

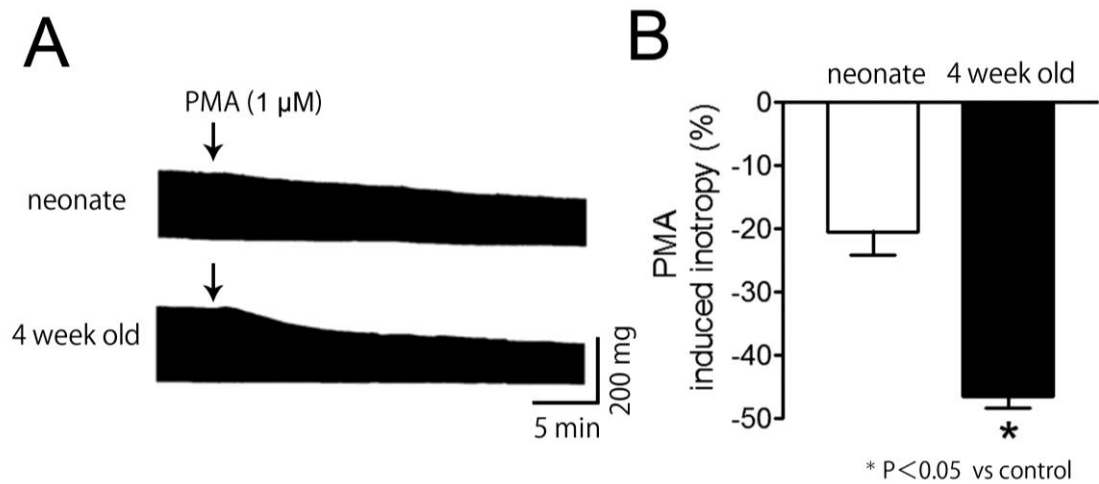
1 週齢の活動電位に対して、SEA0400 (10  $\mu\text{M}$ ) は影響を与えなかった(Fig. 5-2-4; Table 5-2-1)。一方、2 週齢、4 週齢の活動電位に対して、SEA0400 (10  $\mu\text{M}$ ) は  $\text{APD}_{90}$  を短縮させ、RP、OS、AMP、 $\text{APD}_{20}$ 、 $\text{APD}_{50}$ 、 $\dot{V}_{\text{max}}$  には影響を与えなかった(Fig. 5-2-4; Table 5-2-1)。

#### 活動電位に対する ryanodine の影響

4 週齢の活動電位に対して、ryanodine (0.1  $\mu\text{M}$ ) は  $\text{APD}_{90}$  を短縮させ、RP、OS、AMP、 $\text{APD}_{20}$ 、 $\text{APD}_{50}$ 、 $\dot{V}_{\text{max}}$  には影響を与えなかった(Fig. 5-2-5; Table 5-2-2)。

#### Caffeine-induced $\text{Ca}^{2+}$ transient に対する $\alpha$ 受容体刺激の影響

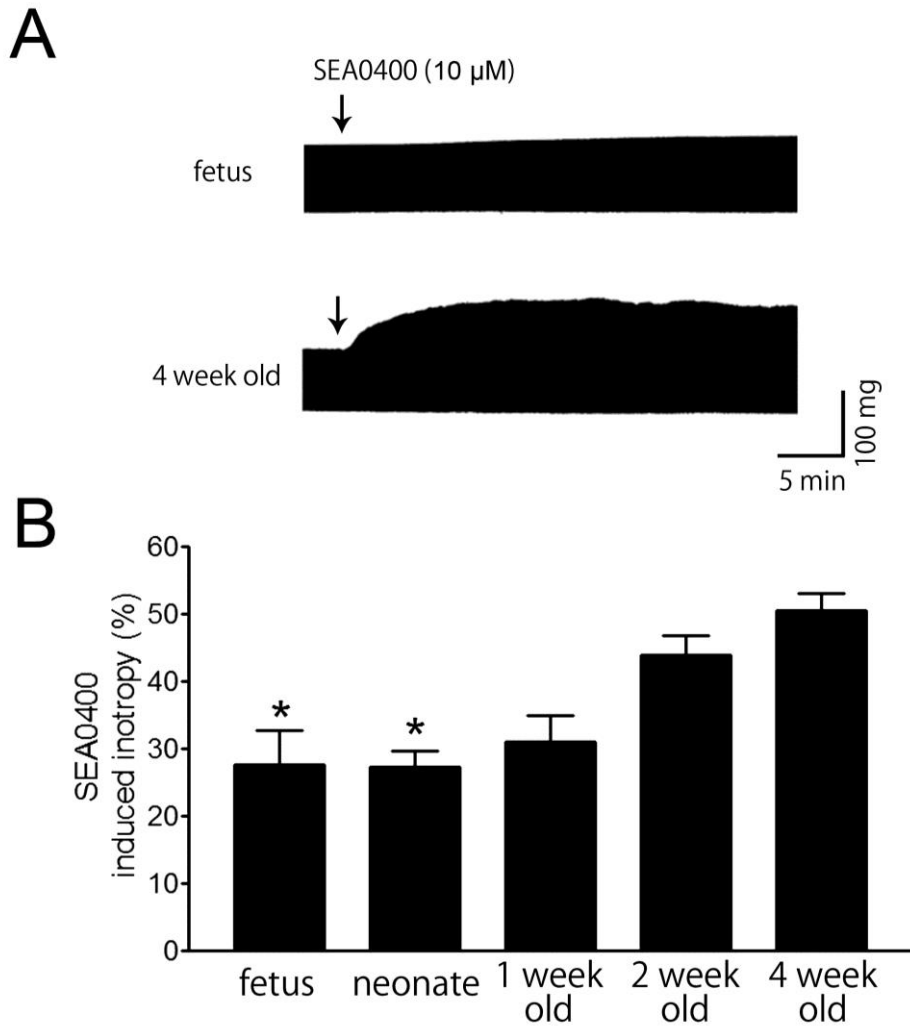
リアノジン受容体刺激薬 caffeine による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇(caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transient) から、筋小胞体内の  $\text{Ca}^{2+}$  含量を推測した。4 週齢マウス心室筋の caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transient に対して、phenylephrine (10  $\mu\text{M}$ ) は amplitude を減少させた(Fig. 5-2-6; Table 5-2-3)。



**Fig. 5-2-1. Negative inotropic effects of PMA on isolated ventricular tissue.**

**A:** Typical traces for the negative inotropy produced by 1  $\mu$ M PMA.

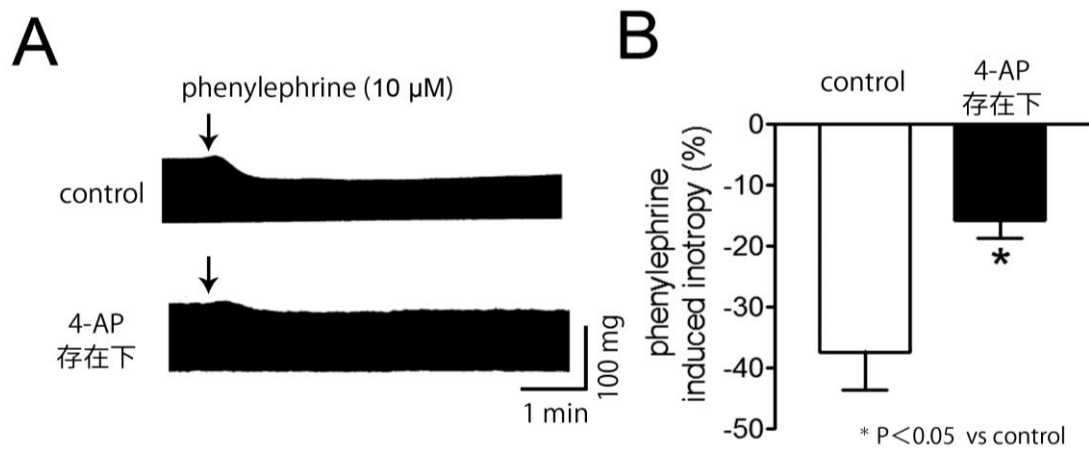
**B:** Summarized results for the negative inotropy produced by 1  $\mu$ M PMA of ventricular myocardia from neonate (open column) and 4-week-old mice (closed column). Columns and vertical bars indicate the mean  $\pm$  S.E.M. from 4 to 6 ventricular preparations. Asterisks indicated significant difference from corresponding values in the control as evaluated by the student's t-test.



**Fig. 5-2-2. Positive inotropic effects of SEA400 on isolated ventricular tissue.**

**A:** Typical traces for the positive inotropy produced by 10  $\mu$ M SEA400.

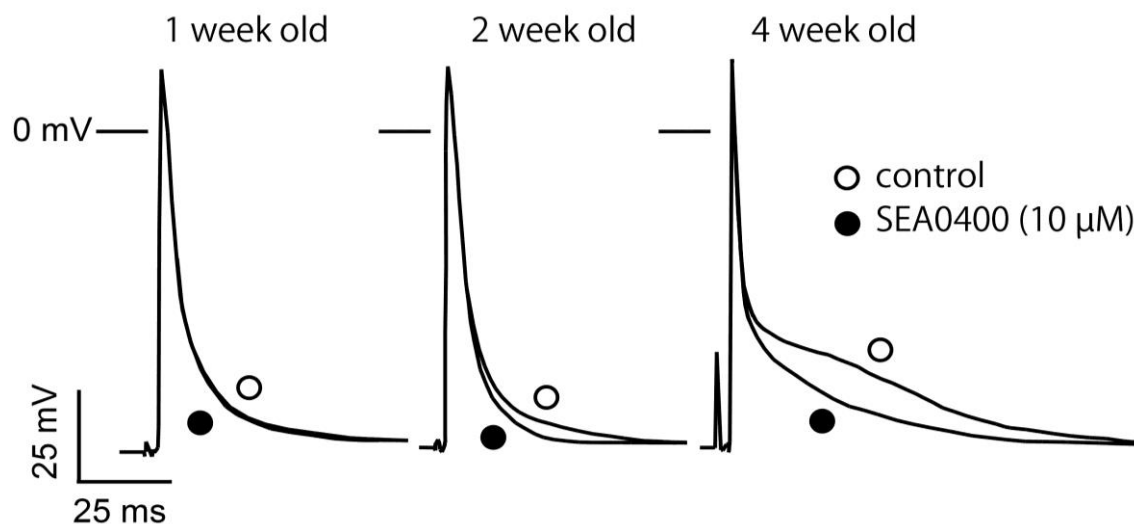
**B:** Summarized results for the negative inotropy produced by 10  $\mu$ M SEA400 in the fetal, neonatal and 1, 2 and 4 week-old mice. Columns and vertical bars are the mean  $\pm$  S.E.M. from 5 to 11 ventricular preparations. Asterisks indicated significant difference from corresponding values in the 4-week-old mice as evaluated by one-way analysis of variance followed by the Tukey's test for multiple comparisons.



**Fig. 5-2-3. Effects of 4-AP on the negative inotropy induced by phenylephrine in 4-week-old mice.**

**A:** Typical traces for the negative inotropy produced by 10  $\mu$ M phenylephrine.

**B:** Summarized results for the negative inotropy produced by 10  $\mu$ M phenylephrine in the absence (open column) and presence (closed column) of 3 mM 4-AP. Columns and vertical bars are the mean  $\pm$  S.E.M. from 5 to 8 ventricular preparations. Asterisks indicated significant difference from corresponding values in the control as evaluated by the student's t-test.



**Fig. 5-2-4. Effects of SEA0400 on the action potential in the 1, 2 and 4 week-old mice.**

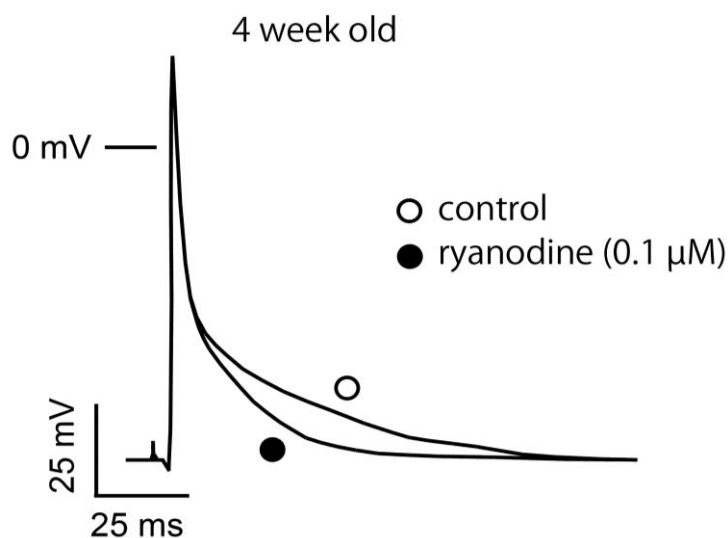
Typical action potential records from 1, 2 and 4 week-old mouse ventricular tissue preparations in the absence (open circle) and presence (closed circle) of 10  $\mu$ M SEA0400.

**Table 5-2-1. Changes in action potential parameters induced by SEA0400.**

	1 week old		2 week old		4 week old	
	control	SEA0400	control	SEA0400	control	SEA0400
RP (mV)	$-78.1 \pm 0.7$	$-76.4 \pm 0.7$	$-77.8 \pm 0.9$	$-76.5 \pm 1.0$	$-79.0 \pm 1.2$	$-78.6 \pm 1.0$
OS (mV)	$25.0 \pm 1.4$	$26.2 \pm 1.8$	$20.5 \pm 1.4$	$21.5 \pm 1.3$	$18.9 \pm 1.8$	$18.2 \pm 1.5$
AMP (mV)	$103.1 \pm 1.8$	$102.6 \pm 1.9$	$98.3 \pm 0.8$	$98.0 \pm 0.8$	$97.9 \pm 2.2$	$96.8 \pm 1.8$
APD <sub>20</sub> (ms)	$3.1 \pm 0.3$	$2.9 \pm 0.3$	$2.8 \pm 0.3$	$2.6 \pm 0.3$	$1.1 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.1$
APD <sub>50</sub> (ms)	$6.4 \pm 0.6$	$6.0 \pm 0.6$	$5.3 \pm 0.6$	$5.0 \pm 0.6^*$	$3.2 \pm 0.3$	$2.9 \pm 0.2$
APD <sub>90</sub> (ms)	$20.5 \pm 1.9$	$19.1 \pm 1.5$	$23.5 \pm 1.1$	$20.2 \pm 0.8^*$	$54.7 \pm 2.3$	$36.1 \pm 1.6^*$
$\dot{V}_{max}$ (V/s)	$311.9 \pm 15.5$	$329.8 \pm 18.2$	$282.9 \pm 26.0$	$295.5 \pm 24.5$	$260.6 \pm 11.7$	$276.9 \pm 11.4$

Action potential parameters of ventricular myocardia from 1, 2 and 4 week-old mice in the absence and presence of 10  $\mu$ M SEA0400. RP, OS, AMP and  $V_{max}$  indicate resting potential, overshoot, amplitude and maximum rate of phase 0 depolarization, respectively. APD<sub>20</sub>, APD<sub>50</sub> and APD<sub>90</sub> indicate action potential duration at 20%, 50% and 90% repolarization, respectively. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. from 6 to 7 ventricular preparations. Asterisks indicate significant difference from corresponding values in the control as evaluated by the student's t-test.





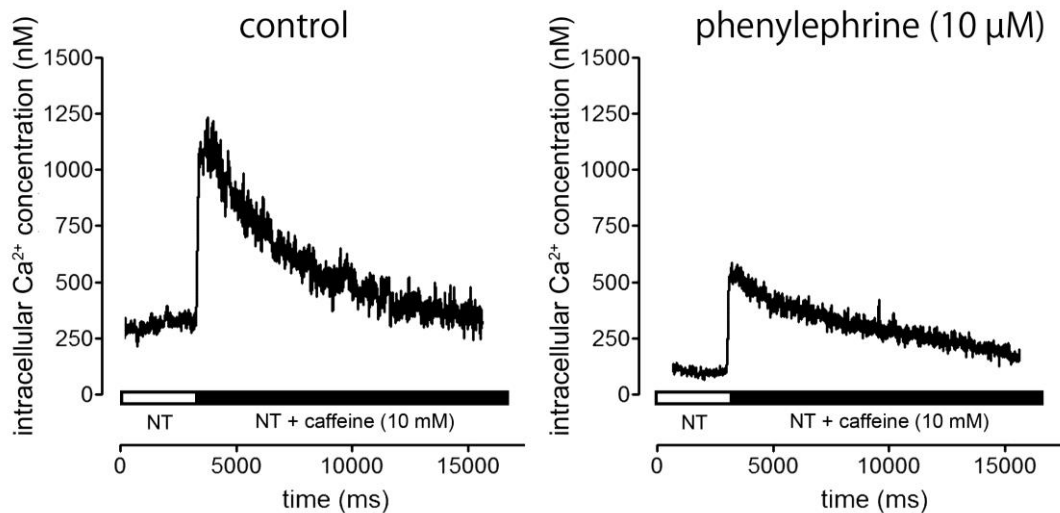
**Fig. 5-2-5. Effects of ryanodine on the action potential in the 4-week-old mice.**

Typical action potential records from 4-week-old mice ventricular tissue preparations in the absence (open circle) and presence (closed circle) of 0.1  $\mu\text{M}$  ryanodine.

**Table 5-2-2. Changes in action potential parameters induced by ryanodine.**

	4 week old	
	control	ryanodine
RP (mV)	$-77.5 \pm 0.6$	$-77.4 \pm 0.6$
OS (mV)	$27.7 \pm 1.9$	$26.9 \pm 2.3$
AMP (mV)	$105.2 \pm 2.1$	$104.2 \pm 2.5$
APD <sub>20</sub> (ms)	$1.6 \pm 0.2$	$1.6 \pm 0.2$
APD <sub>50</sub> (ms)	$4.6 \pm 0.6$	$4.6 \pm 0.6$
APD <sub>90</sub> (ms)	$37.4 \pm 5.2$	$22.5 \pm 1.6^*$
$\dot{V}_{\text{max}}$ (V/s)	$327.1 \pm 27.0$	$310.8 \pm 25.2$

Action potential parameters of ventricular myocardia from 4-week-old mice in the absence and presence of 0.1  $\mu\text{M}$  ryanodine. RP, OS, AMP and  $\dot{V}_{\text{max}}$  indicate resting potential, overshoot, amplitude and maximum rate of phase 0 depolarization, respectively. APD<sub>20</sub>, APD<sub>50</sub> and APD<sub>90</sub> indicate action potential duration at 20%, 50% and 90% repolarization, respectively. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. from 6 ventricular preparations. Asterisks indicate significant difference from corresponding values in the control as evaluated by the student's t-test.



**Fig. 5-2-6. Effects of phenylephrine on the caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transient.**

Typical caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transient from in isolated ventricular myocytes loaded with indo-1 in the absence and presence 10  $\mu\text{M}$  phenylephrine. The  $\text{Ca}^{2+}$  transient was induced by superfusion of 10 mM caffeine dissolved in normal tyrode solution (NT).

**Table 5-2-3. Changes in caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transient parameters induced by phenylephrine.**

	control	phenylephrine
basal (nM)	304.4 $\pm$ 26.0	151.1 $\pm$ 17.8*
peak (nM)	1041.7 $\pm$ 56.6	697.8 $\pm$ 82.7*
amplitude (nM)	737.2 $\pm$ 38.4	546.7 $\pm$ 73.2*

The caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transient parameters of isolated ventricular cardiomyocytes from the 4 week-old mice in absence and presence of 10  $\mu\text{M}$  phenylephrine. Values are the mean  $\pm$  S.E.M. from 5 cardiomyocytes. Asterisks indicate significant difference from corresponding values in the control as evaluated by the student's t-test.

### 第3節 考察

#### 陽性変力反応の発達変化

陽性変力反応の主要機序である L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの活性化は、4 週齢マウスにおいても新生仔期と同様にみられることが報告されているにも関わらず(Nishimaru et al., 2001)、陰性変力反応を NCX 阻害薬 SEA0400 により抑制した条件においても、4 週齢では陽性変力反応がみられることはなかった(Fig. 4-2-1B)。したがって、 $\alpha$  受容体刺激応答の陽性成分を担う L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの機能が発達に伴い低下していくことが考えられる。その要因として、再分極力の増大による活動電位持続時間の短縮と、興奮収縮機構の L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル依存性の減少が考えられる。

新生仔期では  $\alpha$  受容体刺激により、 $\text{APD}_{20}$ 、 $\text{APD}_{50}$  が延長しているが、4 週齢では  $\text{APD}_{20}$ 、 $\text{APD}_{50}$  の延長はほとんど観察されなかった(Fig. 4-2-2; Table 4-2-1)。このことから 4 週齢では、 $\text{APD}$  延長による間接的な細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入の増大が起こらないと推測でき、このことは成体期において陽性変力反応が現れにくいことを支持する。これにはそれぞれが持つ再分極力、すなわち  $I_{\text{to}}$  の電流密度が関与していると考えられる。新生仔期では L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル、 $\text{K}^{+}$ チャネル共に機能が未熟であるため、両者のバランスにより  $\text{APD}$  が決定するが、4 週齢では圧倒的に  $\text{K}^{+}$ チャネルによる再分極力が大きいため、 $\text{K}^{+}$ チャネルの活性のみで  $\text{APD}$  が決まってしまう、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの  $\text{APD}$  への寄与はほとんど無視されていると考えられる。したがって、4 週齢では、 $\alpha$  受容体刺激により L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルは活性化するにもかかわらず、 $\text{APD}$  の延長はほとんど起こらなかったのだと考えられる。この再分極力と L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルからの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入の関係を ATP 感受性  $\text{K}^{+}$ チャネル活性化薬 cromakalim を用いて薬理的に検討した。ATP 感受性  $\text{K}^{+}$ チャネルは細胞内 ATP の減少により活性化することが知られており、心筋細胞では虚血により活性化され、活動電位短縮を起こすと考えられている(Agata et al., 1994a)。新生仔期において、cromakalim 処置により、 $\text{APD}$  が短縮することを確認した(Fig. 5-1-1; Table 5-1-1)。この cromakalim 処置下において、 $\alpha$  受容体刺激、nifedipine の影響について観察したところ、 $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応、nifedipine に対する陰性変力反応が共に減弱していた(Fig. 5-1-2, 5-1-3)。以上の結果から、再分極力が大きいほど、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル活性化がもたらす  $\text{APD}$  延長作用が抑制され、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルからの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入量増大が起こりにくくなることが薬理的に証明された。

また、3 章において、マウス心室筋の興奮収縮機構が、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル依存型から SR 依存型へと変化していくことが明らかになった。発達に伴う L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル依存性の減少によって、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの収縮への影響が減少していくため、 $\alpha$  受容体刺激による L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル活性化の影響も、発達に伴い受けにくくなっていくと考えられる。

**結論 3:** 発達に伴う活動電位持続時間の短縮(再分極力増大)により、心筋収縮への L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの寄与が低下し、 $\alpha$  受容体刺激による活動電位持続時間の延長作用が抑制される。これが原因で  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応が減弱する。

### 陰性変力反応の発達変化

成体マウス心室筋においては  $\alpha$  受容体刺激に対して収縮力減弱反応(陰性変力反応)が観察され(Fig. 4-1-1; Tanaka et al., 1995b)、その機序については、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger: NCX)の促進による  $\text{Ca}^{2+}$ 排出機能の上昇によると考えられている(Nishimaru et al., 2001; Tanaka et al., 2005)。陰性変力反応を示す 4 週齢心室筋において、 $\alpha$  受容体刺激により  $\text{Ca}^{2+}$  transient の amplitude が減少したこと(Fig. 4-2-3; Table 4-2-2)、陰性変力反応が選択的 NCX 阻害薬 SEA0400 により抑制されたこと(Fig. 4-2-1B)からも、この機序は支持される。NCX の  $\text{Ca}^{2+}$ 排出機能の発達変化に関して、プロテインキナーゼ C(protein kinase C: PKC)を介して NCX を活性化させると報告されている phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)と(Nishimaru et al., 2003)、NCX 阻害薬 SEA0400 を用いて薬理的に検討したところ、新生仔期、4 週齢共に、PMA に対して陰性変力反応を示し(Fig. 5-2-1)、SEA0400 に対して陽性変力反応を示した(Fig. 5-2-2)。この結果から、新生仔期、4 週齢共に、NCX は  $\text{Ca}^{2+}$ を排出しており、 $\alpha$  受容体刺激に対して陽性変力反応を示す新生仔期においても陰性変力反応の成分が存在することが示唆される。これは新生仔期において、 $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応が SEA0400 で抑制されず、むしろ若干増強されたことから支持される(Fig. 4-2-1A)。そして PMA、SEA0400 による変力反応の程度は新生仔期と比べると 4 週齢のほうが大きいことから、NCX の  $\text{Ca}^{2+}$ 排出機能が発達に伴い増大していくことが明らかとなった。

しかし、NCX のタンパク量、mRNA 量は発達に伴い減少することが報告されている(Liu et al., 2002)。NCX の発現量が発達に伴い減少していくにもかかわらず、その  $\text{Ca}^{2+}$ 排出機能が増大していくことには、2 つの理由が考えられる。1 つ目は発達に伴う APD の短縮である。NCX は、細胞膜を介する  $\text{Na}^+$ の濃度勾配を利用し  $\text{Ca}^{2+}$ を細胞外へ汲み出す  $\text{Ca}^{2+}$ 排出モード(forward mode)と細胞内に  $\text{Na}^+$ が蓄積する特殊な条件において、 $\text{Ca}^{2+}$ を細胞外から流入させる  $\text{Ca}^{2+}$ 流入モード(reverse mode)が存在する。NCX は膜電位に影響を受け、その回転方向と働く強さが変化するトランスポーターであるため、発現量とその活性は必ずしも相関しない。NCX はその平衡電位を基準に、膜電位が過分極していると  $\text{Ca}^{2+}$ 排出モードとして、脱分極していると  $\text{Ca}^{2+}$ 流入モードとして働く。したがって、APD が短いほど、膜電位が過分極している時間が長くなり、 $\text{Ca}^{2+}$ 排出モードで働きやすくなる。したがって、マウス心室筋は発達に伴い APD が短縮していくために、NCX の  $\text{Ca}^{2+}$ 排出機能が増大していくと考えられる。そこで、NCX と APD の関係について、 $I_{\text{to}}$ 遮断薬 4-aminopyridine(4-AP)を用いて薬理的に検討した。4 週齢マウス心室筋において、4-AP 処置により APD が延長することが確認されている(Fiset et al., 1997)。この 4-AP 処置下において、 $\alpha$  受容体刺激の影響について検討したところ、 $\alpha$  受容体刺激に対する陰性変力反応が減弱していた(Fig. 5-2-3)。また  $\alpha$  受容体刺激の APD への影響の違いも関与していると考えられる。新生仔期では  $\alpha$  受容体刺激により、 $\text{APD}_{20}$ 、 $\text{APD}_{50}$  が延長しているが、4 週齢では  $\text{APD}_{20}$ 、 $\text{APD}_{50}$  の延長はほとんど観察されなかった(Fig. 4-2-2; Table 4-2-1)。したがって、新生仔期では、もともと APD が長いことに加えて、 $\alpha$  受容体刺激により、さらに APD が延長するために、NCX の  $\text{Ca}^{2+}$ 排出機能が低いのだと考えられる。以上の結果から、発達に伴う APD 短縮が NCX の  $\text{Ca}^{2+}$ 排出機能を高める 1 つの要因であることが示唆された。

NCX の発現量が発達に伴い減少していくにもかかわらず、その  $\text{Ca}^{2+}$  排出機能が增大していくこと、2 つ目の理由が NCX と SR の機能的連関である。NCX は前述の膜電位だけでなく、細胞内外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度、 $\text{Na}^+$  濃度の影響も受け、その回転方向と働く強さが変化する。そのため、NCX と SR が近接し、SR から放出される  $\text{Ca}^{2+}$  により、局所的に  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が高い領域が形成されることで、NCX の  $\text{Ca}^{2+}$  排出機能が高まるのではないかと考えた。つまり SR の  $\text{Ca}^{2+}$  放出機能が高まるほど、NCX の  $\text{Ca}^{2+}$  排出機能が高まるはずである。前章での ryanodine を用いた検討から、発達に伴い SR の  $\text{Ca}^{2+}$  放出機能が高まることが明らかとなった (Fig. 3-2-1B, Cb)。さらに前章での蛍光イメージング実験から、T 管と SR が関連していくことも観察された (Fig. 3-1-6)。L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが T 管上に存在しているように、NCX も T 管上に存在することが報告されている (Thomas et al., 2003)。したがって、T 管の陥入により、細胞内部の SR と細胞膜上の NCX が空間的に近接すると考えられる。

さらに、NCX と SR が機能的に連関していることの証拠を、活動電位波形からも得ることができた。3 章の結果より、4 週齢マウス心室筋の活動電位は、持続時間の短いプラトー相を欠いた、急速な再分極相 (早期再分極相) とその後の緩やかな再分極相 (後期再分極相) を有する 2 相性の波形であることが観察されている (Fig. 3-1-2; Table 3-1-2)。この後期再分極相は NCX の  $\text{Ca}^{2+}$  排出モードが働く際の内向き電流により形成されていることが報告されており (Tanaka et al., 2005)、その証拠に、NCX 阻害薬 SEA0400 により後期再分極相が短縮した (Fig. 5-2-4; Table 5-2-1)。また、後期再分極相に相当する  $\text{APD}_{90}$  は 1 週齢から 4 週齢にかけて徐々に延長しており (Fig. 3-1-2; Table 3-1-2)、この時期は、T 管が陥入していく時期 (Fig. 3-1-6)、NCX 阻害薬 SEA0400 に対する陽性変力反応が増大していく時期 (Fig. 5-2-2)、そして、 $\alpha$  受容体刺激応答が陽性から陰性へと変化していく時期 (Fig. 4-1-1) と一致している。さらに、この後期再分極相は SR の  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャンネル阻害薬 ryanodine によっても同じように短縮した (Fig. 5-2-5; Table 5-2-2)。以上の結果から、SR から放出された  $\text{Ca}^{2+}$  を NCX が受け取り細胞外へと排出している、つまり NCX と SR が機能的に連関していると考えられる。

NCX と SR が機能的に連関しているもう一つの証拠を得るために、SR の  $\text{Ca}^{2+}$  蓄積量の指標となる caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transient に対する  $\alpha$  受容体刺激の影響を検討した。その結果、4 週齢マウス心室筋において、 $\alpha$  受容体刺激により caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transient の amplitude が減少した (Fig. 5-2-6; Table 5-2-3)。この結果から次のように考えることができる。一定の収縮力で収縮弛緩を繰り返している場合、SR から放出される  $\text{Ca}^{2+}$  量、SR に取り込む  $\text{Ca}^{2+}$  量は一定に保たれているはずである。しかし、 $\alpha$  受容体刺激により活性化した NCX が SR から放出された  $\text{Ca}^{2+}$  をより多く細胞外へと排出することで、SR に取り込まれる  $\text{Ca}^{2+}$  量が減少するため、caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transient の amplitude が減少したのだと考えられる。したがって、発達に伴い T 管が陥入することで、細胞内部の SR と細胞膜上の NCX が空間的、機能的に連関していくこと、そして SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出機能が增大していくことにより、NCX の  $\text{Ca}^{2+}$  排出機能が增大していくことが示唆された。

また、 $\alpha$  受容体刺激応答が発達に伴い陽性から陰性へと変化していく要因として、交感神経支配の長期的な影響も考えられる。骨格筋の場合、その筋線維の種類は、収縮速度の遅い赤筋と、

収縮速度の速い白筋の2種類が存在し、それぞれを支配する運動神経により筋線維の収縮特性が影響を受けることが知られている。つまり、赤筋と白筋をそれぞれ支配している運動神経を交叉結合することにより、本来、赤筋であるものが白筋の収縮特性を示し、逆に白筋であるものが赤筋の収縮特性を示すことが報告されている(Close, 1965)。したがって、 $\alpha$  受容体の場合、自律神経支配の影響を受け、その刺激応答性が変化していく可能性がある。しかし、6-ヒドロキシドパミンを用いて、除神経した状態でも、マウス心室筋の  $\alpha$  受容体刺激応答は陽性から陰性へと変化したことから、自律神経支配の長期的影響により、変化しているわけではないことが報告されている(Tanaka et al., 1995b)。したがって、 $\alpha$  受容体刺激応答の発達変化の原因である APD 短縮や SR 機能増大などの興奮収縮機構の変化が、すべてあらかじめ遺伝子的にプログラムされたものなのか、それとも生体内の何らかのきっかけによって引き起こされるものなのかは今後更なる検討を加えるに値する興味深い問題である。

**結論 4:** 発達に伴う活動電位持続時間の短縮と SR 機能の増大により、NCX を介した  $\text{Ca}^{2+}$  排出が増大する。これが原因で  $\alpha$  受容体刺激に対する陰性変力反応が増大する。

本章では、 $\alpha$  受容体刺激応答の発達変化について次の点が明らかとなった。

マウス心室筋収縮のアドレナリン  $\alpha$  受容体刺激応答には陽性、陰性の2つの成分が存在し、そのバランスにより全体の反応の方向性と大きさが決まることが判明した。そして、陽性、陰性各成分を担う L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルおよび  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換機構の機能を規定しているのはこれらの発現量ではなく、活動電位波形と筋小胞体機能という興奮収縮機構の基本的特徴であることが判明した。すなわち、“活動電位持続時間が短く、筋小胞体機能が高い心筋ほど、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルからの  $\text{Ca}^{2+}$  流入の役割は小さく、NCX による  $\text{Ca}^{2+}$  排出の役割は大きい”という法則に基づき、アドレナリン  $\alpha$  受容体刺激応答の発達変化を説明することができた(Fig. 5-3-1)。

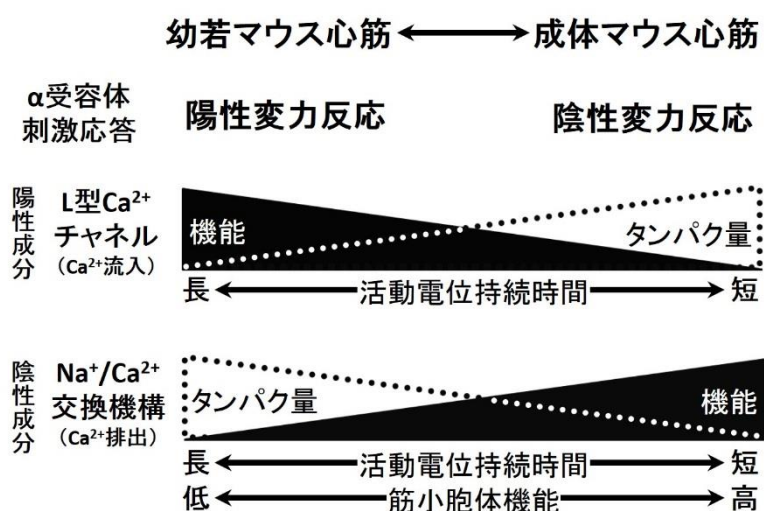


Fig. 5-3-1. 興奮収縮機構と  $\alpha$  受容体刺激応答の関連性の発達変化

## 第6章 糖尿病マウス心室筋の $\alpha$ 受容体刺激応答

前章において、“活動電位持続時間が短く、筋小胞体機能が高い心筋ほど、L型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルからの $\text{Ca}^{2+}$ 流入の役割は小さく、NCXによる $\text{Ca}^{2+}$ 排出の役割は大きい”という法則に基づき、アドレナリン $\alpha$ 受容体刺激応答の発達変化を説明することができた。そこで、この法則が病態時の変化においても成り立つ法則であるか検討するため、streptozotocin (STZ)誘発糖尿病マウス心筋の興奮収縮機構と $\alpha$ 受容体刺激応答について検討した。

また、STZ誘発糖尿病マウス心筋の興奮収縮機構に関して、近年心不全の要因の一つとして注目されている拡張機能障害という観点から、心筋の弛緩を担うSRのATP依存性 $\text{Ca}^{2+}$ ポンプ(SERCA)に注目し、拡張機能障害が引き起こされる機序について検討した。

### 第1節 糖尿病マウス心室筋の興奮収縮機構

#### 6-1-1 血糖値、体重の比較

Streptozotocin (STZ)投与マウスは正常マウスに比べて非絶食時、絶食時ともに有意に血糖値が上昇していた(Table 6-1-1)。以下、STZ投与マウスを糖尿病マウスと呼ぶ。糖尿病マウスの体重や心臓重量は正常マウスに比べて低下していた(Table 6-1-1)。心臓重量/体重の比は糖尿病マウスの方が増大していた(Table 6-1-1)。

#### 6-1-2 収縮力、収縮時間、弛緩時間の比較

糖尿病マウス単離右心室筋の単位断面積あたりの収縮力は正常マウスに比べて減弱していた(Fig. 6-1-1A; Table 6-1-2)。一方、単位断面積あたりの静止張力は糖尿病マウスのほうが大きかった(Table 6-1-2)。糖尿病マウス単離右心室筋の収縮時間(time to peak tension: TPT)、90%弛緩時間(time to 90% relaxation:  $\text{RT}_{90}$ )は正常マウスに比べて延長していた(Fig. 6-1-1A; Table 6-1-2)。

#### 6-1-3 $\text{Ca}^{2+}$ transientの比較

糖尿病マウス単離心室筋細胞の $\text{Ca}^{2+}$ transientは正常マウスに比べてbasalが上昇、peakが低下、減衰時間( $\tau$  for decay)が延長していた(Fig. 6-1-1B; Table 6-1-2)。

#### 6-1-4 活動電位の比較

糖尿病マウスと正常マウスの活動電位を比較すると、糖尿病マウスにおいて $\text{APD}_{20}$ 、 $\text{APD}_{50}$ 、 $\text{APD}_{90}$ が延長していた。また最大立ち上がり速度(maximum rate of rise:  $\dot{V}_{\text{max}}$ )が小さかった。しかしRP、OS、AMPには違いは認められなかった(Fig. 6-1-2; Table 6-1-3)。

### 6-1-5 Nifedipine 感受性の比較

Nifedipine (1  $\mu$ M)は正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋の心収縮力を減少させた。その作用には正常マウス、糖尿病マウス間では違いは認められず、nifedipine (1  $\mu$ M)は、正常マウスで  $73.1 \pm 3.8\%$  (n = 10)、糖尿病マウスで  $69.3 \pm 3.4\%$  (n = 7)まで収縮力を減弱させた。また正常マウスおよび糖尿病マウスの TPT、RT<sub>90</sub>ともに nifedipine(1  $\mu$ M)は影響を与えなかった。

### 6-1-6 Ryanodine 感受性の比較

Ryanodine (10 nM)は正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋の心収縮力を減少させた。その作用には違いは認められず、ryanodine (10 nM)は、正常マウスで  $34.5 \pm 4.8\%$  (n = 6)、糖尿病マウスで  $26.6 \pm 0.8\%$  (n = 3)まで収縮力を減弱させた。また正常マウスおよび糖尿病マウスの TPT、RT<sub>90</sub>ともに ryanodine (10 nM)は影響を与えなかった。

### 6-1-7 CPA 感受性の比較

CPA (10  $\mu$ M)は正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋の心収縮力を減少させ、また RT<sub>90</sub>を延長させた。これらの作用は正常マウスのほうが顕著であった。一方、静止張力、TPT には影響を与えなかった(Fig. 6-1-3, 6-1-4)。

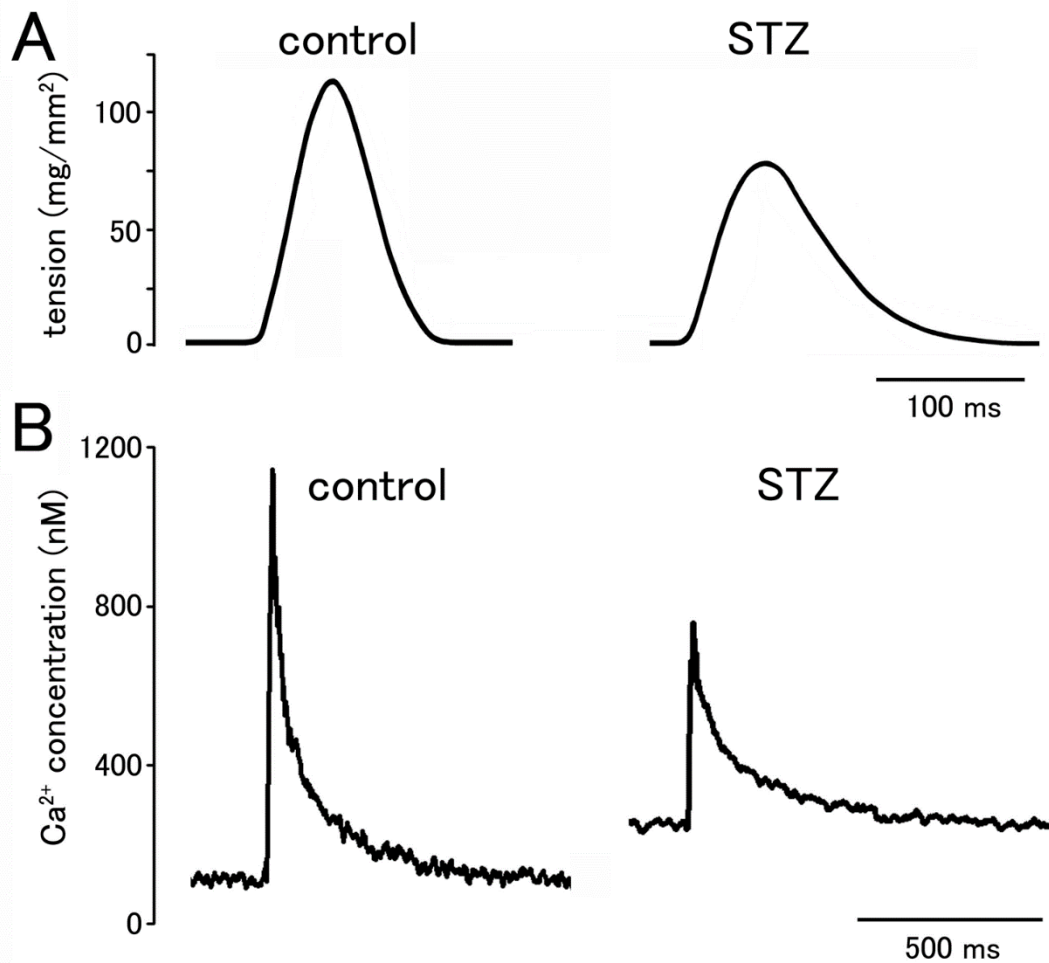
CPA (10  $\mu$ M)は正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋の Ca<sup>2+</sup> transient の basal を上昇させ、peak を低下させ、さらに減衰時間( $\tau$  for decay)を延長させた。これら作用は正常マウスのほうが顕著であった(Fig. 6-1-3, 6-1-4)。

**Table 6-1-1. General effects of streptozotocin treatment.**

	control	Streptozotocin-treated
Serum glucose levels (mg/dl)		
Fasted-condition	105.0 $\pm$ 2.6	387.3 $\pm$ 47.2*
Non-fasted condition	135.4 $\pm$ 8.9	774.5 $\pm$ 14.5*
Body weight (g)	44.2 $\pm$ 0.8	27.9 $\pm$ 1.2*
Heart weight (mg)	189.8 $\pm$ 3.4	151.1 $\pm$ 4.1*
Heart weight /Body weight (mg/g)	4.3 $\pm$ 0.1	5.5 $\pm$ 0.4*

Values are the mean  $\pm$  S.E.M. of 20 animals for each experimental group. Asterisks indicate significant difference from corresponding values in the control mice as evaluated by the student's t-test.





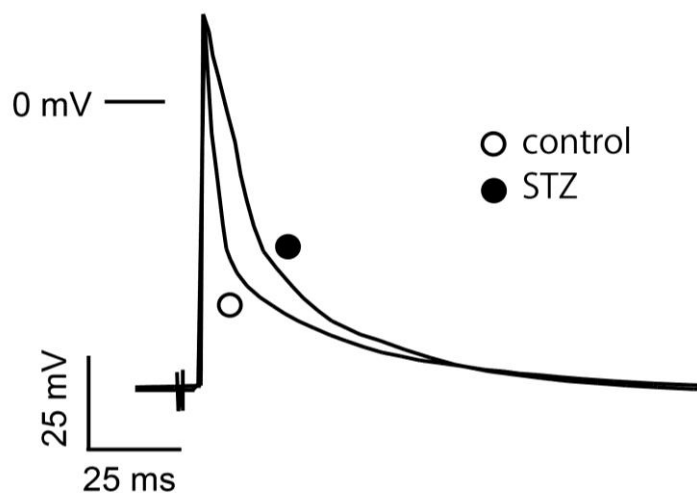
**Fig. 6-1-1. Basal myocardial contraction and Ca<sup>2+</sup> transient.**

Typical traces for the contraction of ventricular tissue preparations (A) and Ca<sup>2+</sup> transient of isolated cardiomyocytes (B) in control mice and streptozotocin-treated mice (STZ).

**Table 6-1-2. Myocardial contractile and Ca<sup>2+</sup> transient parameters.**

		control	streptozotocin-treated
Contractile parameters	Contractile force (mg/mm <sup>2</sup> )	123.0 ± 10.9	83.1 ± 6.3*
	Resting tension (mg/mm <sup>2</sup> )	127.2 ± 8.3	139.1 ± 15.1
	Time to peak tension (ms)	50.6 ± 0.7	56.0 ± 0.8*
	Time to 90% relaxation (ms)	57.4 ± 0.8	77.1 ± 1.1*
Ca <sup>2+</sup> transient parameters	Basal (nM)	139.2 ± 4.3	216.3 ± 4.9*
	Peak (nM)	1134 ± 21.2	775.2 ± 10.4*
	τ for decay (ms)	89.0 ± 3.1	145.8 ± 4.4*

The contractile parameters of ventricular tissue preparations and Ca<sup>2+</sup> transient parameters of isolated ventricular cardiomyocytes were compared between control mice and streptozotocin-treated mice. Values are the mean ± S.E.M. of 20 myocardial preparations or cardiomyocytes for each experimental group. *Asterisks* indicate significant difference from corresponding values in the control mice as evaluated by the student's t-test.



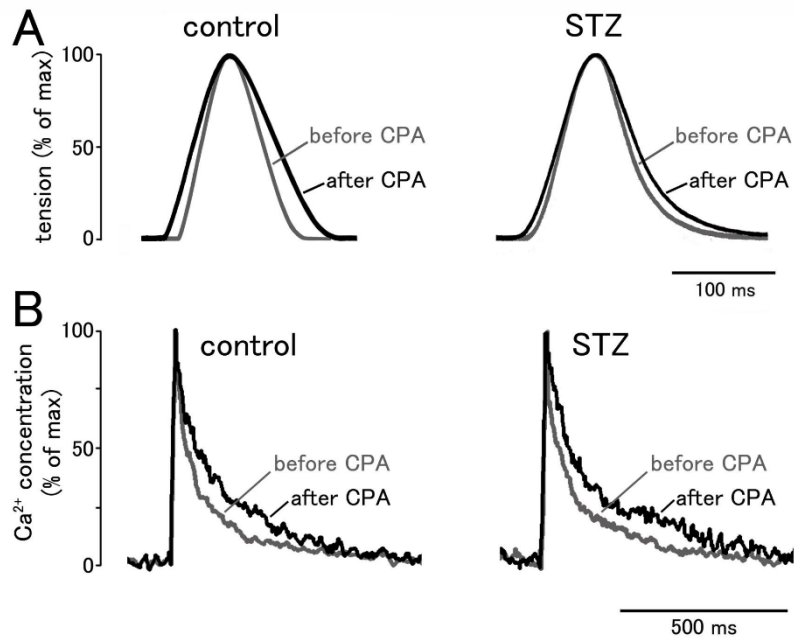
**Fig. 6-1-2. Basal myocardial action potential.**

Typical traces for the action potential of ventricular tissue preparations in control mice (open circle) and streptozotocin-treated mice (STZ; closed circle).

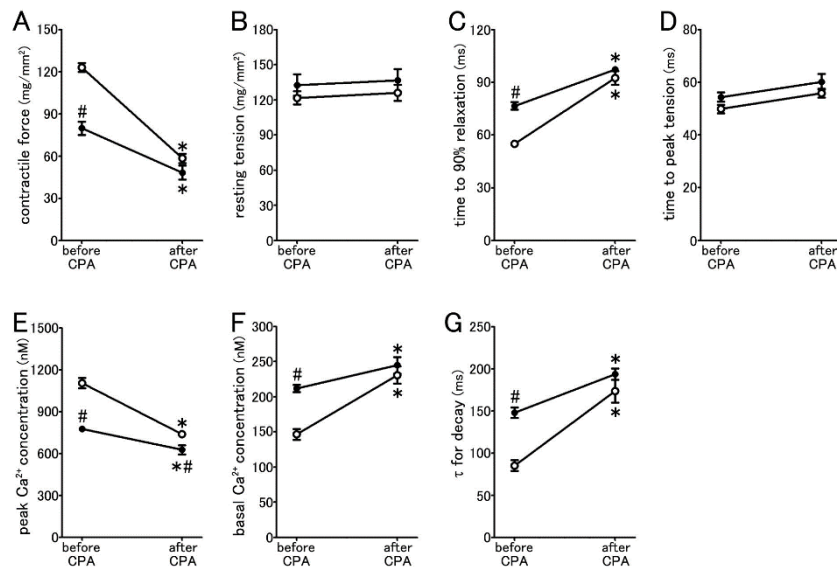
**Table 6-1-3. Myocardial action potential parameters.**

	Control	streptozotocin-treated
RP (mV)	-72.0 ± 0.3	-71.8 ± 0.7
OS (mV)	24.9 ± 2.2	21.6 ± 2.5
AMP (mV)	96.9 ± 2.2	93.3 ± 2.2
APD <sub>20</sub> (ms)	2.5 ± 0.1	4.3 ± 0.6*
APD <sub>50</sub> (ms)	5.8 ± 0.3	8.7 ± 1.0*
APD <sub>90</sub> (ms)	45.1 ± 3.8	44.3 ± 4.9
$\dot{V}_{\max}$ (V/s)	308.3 ± 11.4	219.5 ± 30.5*

Action potential parameters of ventricular myocardia from control and streptozotocin-treated mice. RP, OS, AMP and  $\dot{V}_{\max}$  indicate resting potential, overshoot, amplitude and maximum rate of phase 0 depolarization, respectively. APD<sub>20</sub>, APD<sub>50</sub> and APD<sub>90</sub> indicate action potential duration at 20%, 50% and 90% repolarization, respectively. Values are the mean ± S.E.M. from 6 ventricular preparations. Asterisks indicate significant difference from corresponding values in control mice as evaluated by the student's t-test.



**Fig. 6-1-3. The effects of cyclopiazonic acid (CPA) on the contraction and Ca<sup>2+</sup> transient.** Typical traces for the contraction of ventricular tissue preparations (A) and Ca<sup>2+</sup> transient of isolated cardiomyocytes (B) in control mice and streptozotocin-treated mice (STZ). Gray and black lines indicate typical traces obtained before and after the addition of 10  $\mu$ M cyclopiazonic acid (CPA), respectively. The tension and Ca<sup>2+</sup> concentration were normalized to the peak values in each trace.



**Fig. 6-1-4. Summarized results for the effects of cyclopiazonic acid (CPA) on contractile and Ca<sup>2+</sup> transient parameters.**

The contractile force (A), resting tension (B), time to 90% relaxation (C), time to peak tension (D), peak Ca<sup>2+</sup> concentration (E), basal Ca<sup>2+</sup> concentration (F),  $\tau$  for decay (G) in the control mice (open circles) and streptozotocin-treated mice (closed circles) were obtained before and after the addition of 10  $\mu$ M cyclopiazonic acid. Symbols and vertical bars indicate the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 myocardial preparations or cardiomyocytes for each experimental group. Statistical significance was evaluated by two-way analysis of variance followed by the Tukey's test for multiple comparisons. \* P < 0.05 vs before cyclopiazonic acid application. # P < 0.05 vs control mice.

## 第2節 糖尿病マウス心室筋の $\alpha$ 受容体刺激応答

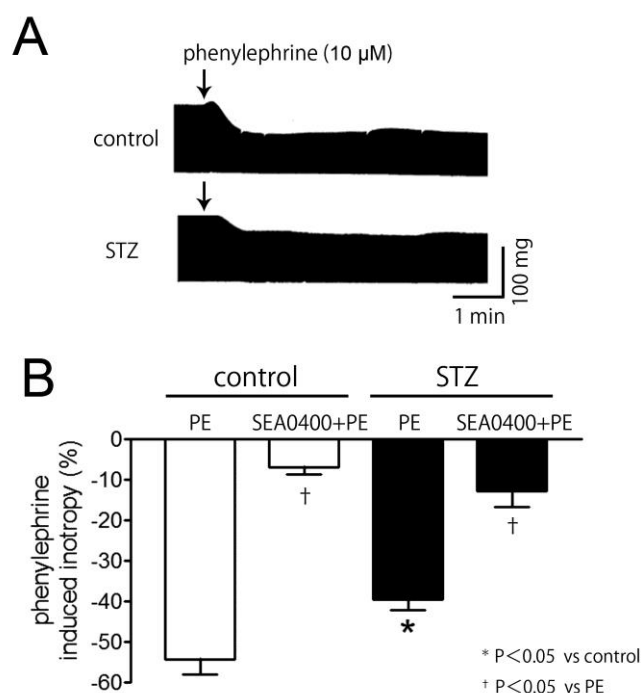
### 6-2-1 収縮力に対する $\alpha$ 受容体刺激の影響

Phenylephrine (10  $\mu$ M)は正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋の収縮力を減少させ、その作用は正常マウスのほうが顕著であった(Fig. 6-2-1)。Phenylephrine (10  $\mu$ M)による心収縮力減少率は、正常マウスで $-54.4 \pm 3.6\%$  (n = 6)、糖尿病マウスで $-37.3 \pm 3.1\%$  (n = 5)であった。

また、Phenylephrine (10  $\mu$ M)による収縮力減弱作用は、正常マウスおよび糖尿病マウスともにSEA0400 (10  $\mu$ M)前処置により抑制された(Fig. 6-2-1)。SEA0400 (10  $\mu$ M)存在下でのphenylephrine (10  $\mu$ M)による心収縮力減少率は、正常マウスで $-6.8 \pm 1.8\%$  (n = 5)、糖尿病マウスで $-12.8 \pm 3.9\%$  (n = 7)であった。

### 6-2-2 収縮力に対する SEA0400 の影響

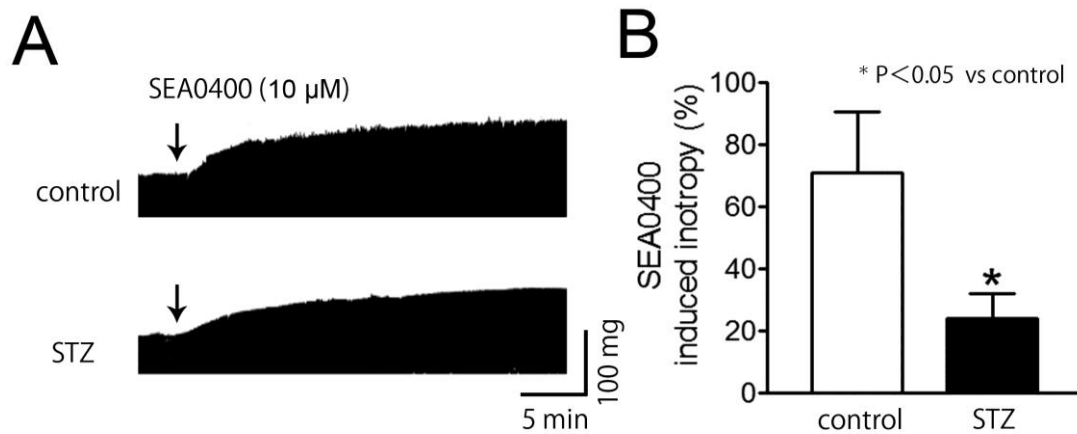
SEA0400 (10  $\mu$ M)は正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋の収縮力を増大させ、その作用は正常マウスのほうが顕著であった(Fig. 6-2-2)。SEA0400 (10  $\mu$ M)による心収縮力増大率は、正常マウスで $71.0 \pm 19.5\%$  (n = 5)、糖尿病マウスで $24.1 \pm 7.8\%$  (n = 5)であった。



**Fig. 6-2-1. Negative inotropy produced by phenylephrine.**

**A:** Typical traces for the negative inotropy produced by 10  $\mu$ M phenylephrine in the control and streptozotocin-treated (STZ) mice.

**B:** Summarized results for the negative inotropy produced by 10  $\mu$ M phenylephrine (PE) in the absence and presence of 10  $\mu$ M SEA0400 in the control mice (open columns) and streptozotocin-treated mice (closed columns). Columns and vertical bars are the mean  $\pm$  S.E.M. from 4 to 6 ventricular preparations. Asterisks and daggers indicated significant difference from corresponding values in the control and in the phenylephrine (PE), respectively, as evaluated by the student's t-test.



**Fig. 6-2-2. Positive inotropy produced by SEA0400.**

**A:** Typical traces for the positive inotropy produced by 10  $\mu$ M SEA0400 in the control and streptozotocin-treated (STZ) mice.

**B:** Summarized results for the positive inotropy produced by 10  $\mu$ M SEA0400 in the control mice (open column) and streptozotocin-treated mice (closed column). Columns and vertical bars are the mean  $\pm$  S.E.M. from 4 to 6 ventricular preparations. Asterisks indicated significant difference from corresponding values in the control mice as evaluated by the student's t-test.

### 第3節 糖尿病マウス心室筋に対する SERCA 活性化薬の影響

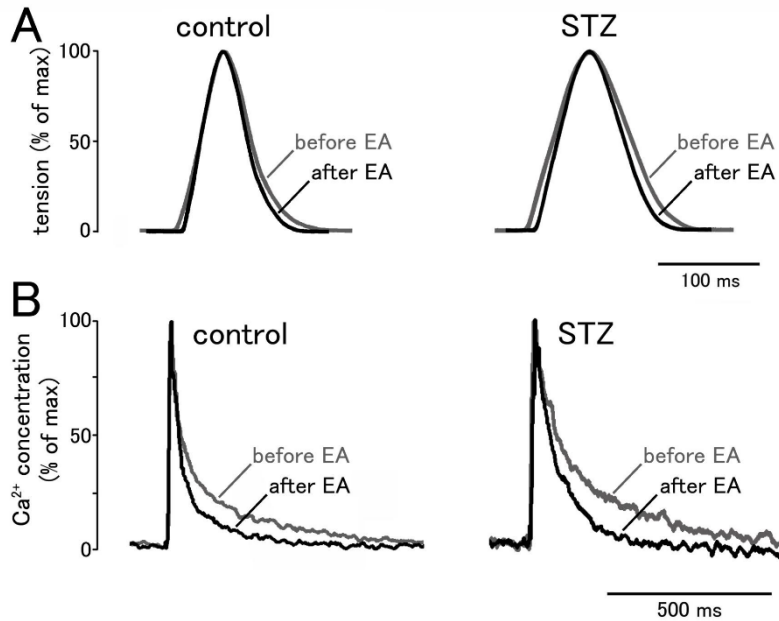
第1節の結果から、STZ 誘発糖尿病マウス心室筋では、SERCA 機能の低下により、拡張機能障害が引き起こされていることが明らかになった。果実に含まれるポリフェノール系成分である ellagic acid や生姜の抽出成分である gingerol は、イヌ心筋の SR ベシクルを用いた検討により SERCA 活性化作用を有することが報告されている(Antipenko et al., 1999)。これらの SERCA 活性化薬は、SERCA 機能と拡張機能障害の関連性を検討するための有用なツールであると同時に、SERCA 活性化薬が拡張機能障害の治療薬候補となるか検討することができる。そこで、STZ 誘発糖尿病マウス心室筋に対する ellagic acid および gingerol の影響について検討した。

#### 6-3-1 収縮力、収縮時間、弛緩時間に対する ellagic acid および gingerol の影響

Ellagic acid (10  $\mu$ M)および gingerol (10  $\mu$ M)は、正常および糖尿病マウス心室筋の RT<sub>90</sub> を有意に短縮させ、その作用は糖尿病マウスで顕著であった。一方、収縮力、静止張力、TPT には影響を与えなかった(Fig. 6-3-1, 6-3-2, 6-3-3, 6-3-4)。また、Ellagic acid (10  $\mu$ M)および gingerol (10  $\mu$ M)による RT<sub>90</sub> の短縮は CPA (10  $\mu$ M)前処置により抑制された(Fig. 6-3-5)。

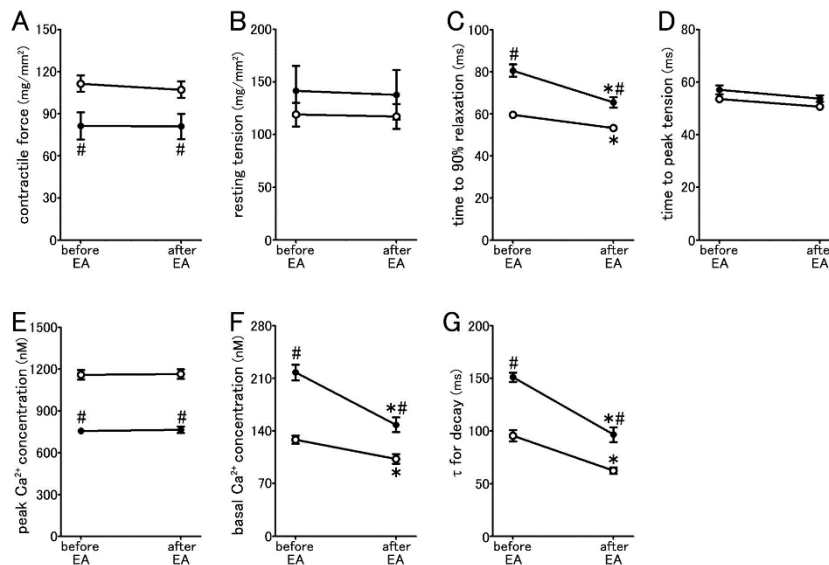
#### 6-3-2 Ca<sup>2+</sup>transient に対する ellagic acid および gingerol の影響

Ellagic acid (10  $\mu$ M)および gingerol (10  $\mu$ M)は、正常および糖尿病マウス単離心室筋細胞の Ca<sup>2+</sup> transient の basal を低下し、減衰時間を短縮させた。その作用は糖尿病マウスで顕著であった。一方、peak には影響を与えなかった(Fig. 6-3-1, 6-3-2, 6-3-3, 6-3-4)。



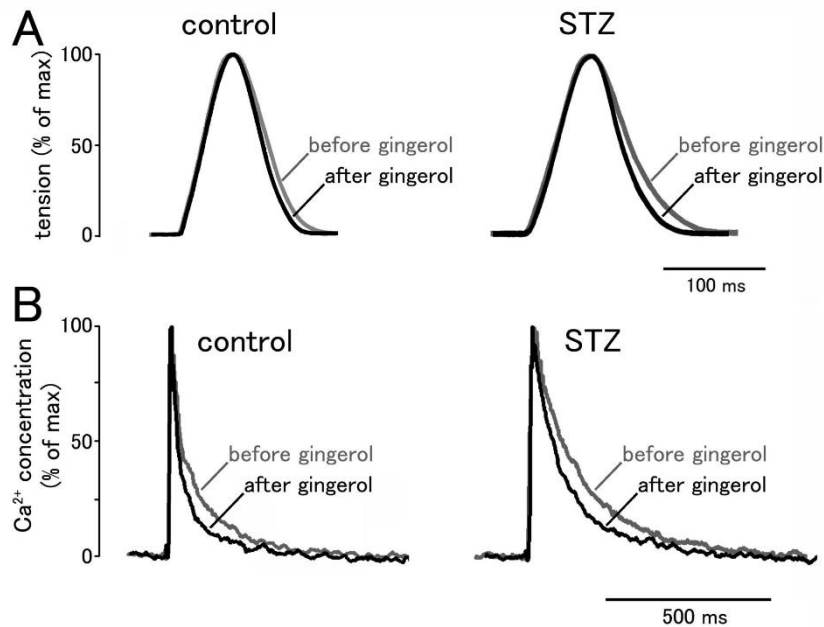
**Fig. 6-3-1. The effects of ellagic acid on the contraction and Ca<sup>2+</sup> transient.**

Typical traces for the contraction of ventricular tissue preparations (A) and Ca<sup>2+</sup> transient of isolated cardiomyocytes (B) in control mice and streptozotocin-treated mice (STZ). Gray and black lines indicate typical traces obtained before and after the addition of 10 μM ellagic acid (EA), respectively. The tension and Ca<sup>2+</sup> concentration were normalized to the peak values in each trace.



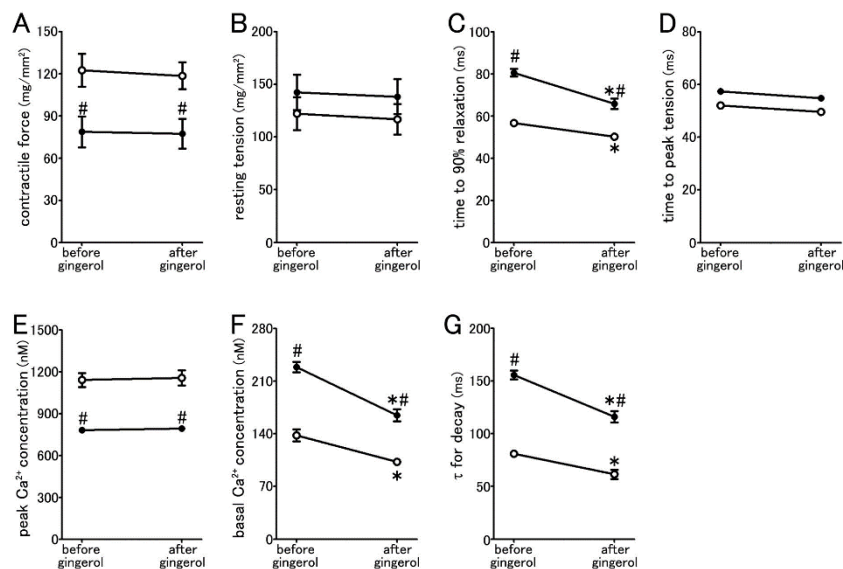
**Fig. 6-3-2. Summarized results for the effects of ellagic acid (EA) on contractile and Ca<sup>2+</sup> transient parameters.**

The contractile force (A), resting tension (B), time to 90% relaxation (C), time to peak tension (D), peak Ca<sup>2+</sup> concentration (E), basal Ca<sup>2+</sup> concentration (F), τ for decay (G) in the control mice (open circles) and streptozotocin-treated mice (closed circles) were obtained before and after the addition of 10 μM ellagic acid. Symbols and vertical bars indicate the mean ± S.E.M. of 6 myocardial preparations or cardiomyocytes for each experimental group. Statistical significance was evaluated by two-way analysis of variance followed by the Tukey's test for multiple comparisons. \* P < 0.05 vs before ellagic acid application. # P < 0.05 vs control mice.



**Fig. 6-3-3. The effects of gingerol on the contraction and Ca<sup>2+</sup> transient.**

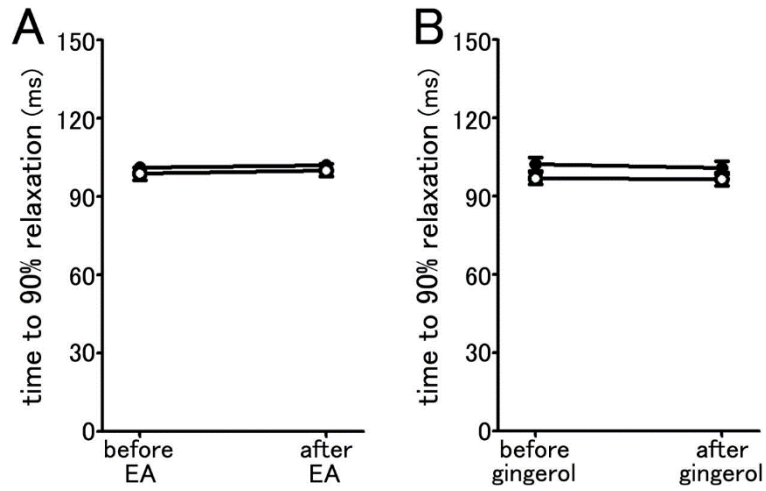
Typical traces for the contraction of ventricular tissue preparations (A) and Ca<sup>2+</sup> transient of isolated cardiomyocytes (B) in control mice and streptozotocin-treated mice (STZ). Gray and black lines indicate typical traces obtained before and after the addition of 10 μM gingerol, respectively. The tension and Ca<sup>2+</sup> concentration were normalized to the peak values in each trace.



**Fig. 6-3-4. Summarized results for the effects of gingerol on contractile and Ca<sup>2+</sup> transient parameters.**

The contractile force (A), resting tension (B), time to 90% relaxation (C), time to peak tension (D), peak Ca<sup>2+</sup> concentration (E), basal Ca<sup>2+</sup> concentration (F), τ for decay (G) in the control mice (open circles) and streptozotocin-treated mice (closed circles) were obtained before and after the addition of 10 μM gingerol. Symbols and vertical bars indicate the mean ± S.E.M. of 6 myocardial preparations or cardiomyocytes for each experimental group. Statistical significance was evaluated by two-way analysis of variance followed by the Tukey's test for multiple comparisons. \* P<0.05 vs before gingerol application. # P<0.05 vs control mice.





**Fig. 6-3-5. Summarized results for the effects of ellagic acid (EA; A) and gingerol (B) on the time to 90% relaxation.**

The time to 90% relaxation in the control mice (open circles) and streptozotocin-treated mice (closed circles) were obtained before and after the addition of 10  $\mu$ M ellagic acid (A) and 10 $\mu$ M gingerol (B). Symbols and vertical bars indicate the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 myocardial preparations or cardiomyocytes for each experimental group. Statistical significance was evaluated by two-way analysis of variance followed by the Tukey's test for multiple comparisons.

## 第4節 考察

### 糖尿病マウス心室筋の興奮収縮機構

Streptozotocin (STZ)はカビの一種である *streptomyces achromogenes* に由来する抗生物質の1つで、膵ランゲルハンス島  $\beta$  細胞のピリジヌクレオチド合成を低下させることにより急速かつ非可逆的に  $\beta$  細胞を破壊する。 $\beta$  細胞が破壊されることによりインスリン分泌能が低下するため、古くから alloxan とともに糖尿病モデル動物の作製に用いられている(Junod et al., 1969; Anderson et al., 1974; Rossini et al., 1977)。今回用いた STZ の腹腔内投与量(200 mg/kg)は 1 week で 9 割の  $\beta$  細胞を破壊する濃度であり、3 week には ddY 系マウスで非絶食時血糖値が 800 mg/dl 前後になるとの報告がある(Hayashi et al., 2006)。正常マウスと STZ 投与マウスの血糖値を比較したところ STZ 投与マウスでは絶食時、非絶食時ともに有意に血糖値が上昇していた(Table 6-1-1)。また、STZ 投与マウスの体重は、正常マウスに比べて有意に軽量であった(Table 6-1-1)。インスリン分泌不全などで高血糖となると、尿糖が増加し、浸透圧性利尿が生じる。浸透圧性利尿が生じると細胞内の水分は血中へ移行し、尿中へと排泄されるため細胞内は脱水状態になる。これが糖尿病マウスの急激なやせの原因と考えられる。STZを投与した ddY 系マウスではエサを食べる量は 2 倍、飲水量は 7~8 倍、尿量は 10~12 倍になるとの報告がある(Hayashi et al., 2006)。糖尿病マウスの心臓重量は正常マウスに比べて軽量であったが、糖尿病マウスの心重量/体重比は正常マウスより上昇していた(Table 6-1-1)。心臓の大きさは体の大きさに比例するため糖尿病マウスの心臓重量が軽いのは体重減少によるものと考えられるが、体重に対する心重量の割合が高かったことから正常マウスよりも心臓が肥大していると考えられる。糖尿病における心肥大のメカニズムについては細小血管障害やレニン・アンジオテンシン系の亢進、インスリンやインスリン様成長因子-1(insulin-like growth factor-1: IGF-1)などの細胞増殖因子が関与していると考えられている。アンジオテンシン II は心筋細胞膜に存在する  $AT_1$  受容体に結合することにより、細胞膜にあるホスホリパーゼ C(phospholipase C: PLC)を活性化し、それによりジアシルグリセロール(diacylglycerol: DAG)の産出亢進が起こり、プロテインキナーゼ C (protein kinase C: PKC)を活性化する。PKC の下流には MAPK ファミリーをはじめとする細胞増殖に重要な細胞内シグナリングカスケードが存在し、それらが次々にリン酸化されることにより、心筋細胞の肥大が誘発される(Tsutsui et al., 2007)。IGF-1 はインスリンに非常に似た構造をもつ増殖因子で、成長ホルモン(growth hormone: GH)により肝臓や他の組織で産出される。IGF-1 はチロシンキナーゼ型 1 型 IGF 受容体に結合することにより心肥大を誘発すると報告されている(Catalucci et al., 2007)。今回得られた結果は STZ 誘発性糖尿病モデルの数多くの報告と合致していた。したがって、作成したモデルは糖尿病性心筋障害を生じている可能性のある STZ 誘発性糖尿病モデルマウスと考えることができる。

糖尿病マウス心筋の興奮収縮機構と  $\alpha$  受容体刺激応答の関連性について検討するため、まず、糖尿病マウス心筋の基本的性質の検討を行った。糖尿病マウスの収縮力、 $Ca^{2+}$  transient の amplitude が正常マウスに比べ低かった(Fig. 6-1-1; Table 6-1-2)。この要因として L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルからの  $Ca^{2+}$  流入の減少、筋小胞体(sarcoplasmic reticulum: SR)からの  $Ca^{2+}$  放出の低下が考え

られる。糖尿病マウスでは L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル、ryanodine 受容体および SERCA のタンパク量の低下、活性低下などが分子生物学的手法により報告されている(Lu et al., 2007; Suarez et al., 2008)。本研究では、それぞれの阻害薬を用いて薬理的に検討した。L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル遮断薬 nifedipine、SR の  $\text{Ca}^{2+}$ 放出チャネル阻害薬 ryanodine、SR の ATP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプ阻害薬 cyclopiazonic acid (CPA)の収縮力に対する感受性を検討したところ、nifedipine、ryanodine の感受性には違いは見られなかったが、CPA の感受性は糖尿病マウスのほうが正常マウスに比べ低かった(Fig. 6-1-3, 6-1-4)。この結果より、糖尿病マウス心筋では、SERCA 機能の低下が示唆された。SERCA は、SR 膜上に多数存在する細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ を能動的に取り込む働きをしているタンパク質で、心筋の正常な収縮弛緩だけでなく、興奮収縮機構の種差や発達変化、病態時の異常と深く関連すると考えられている(Frank et al., 2003)。ヒトやモルモットなどでは心筋の弛緩時におよそ 70%、マウスやラットに至っては 90%もの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ が SERCA により SR 内に取り込まれることや(Su et al., 2003)、個体が成長するにつれて SERCA のタンパク量は増加していき、成体期マウス心筋では新生仔期マウス心筋の 2.5~3 倍もの SERCA タンパクが発現していることが報告されている(Liu et al., 2002)。SERCA 機能低下により、SR に取り込まれる  $\text{Ca}^{2+}$ 量が減少することで、CICR 時に放出できる  $\text{Ca}^{2+}$ 量が減少するため、糖尿病マウス心筋では収縮力が低下しているのだと考えられる。

また、最大収縮を得るために必要な静止張力は、糖尿病マウスのほうがわずかに高くなっていた(Table 6-1-2)。これは、細胞内の basal  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇に付随して起きているのだと考えられる(Fig. 6-1-1B; Table 6-1-2)。これも SERCA による  $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み能低下がもたらしていると考えられるが、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger(NCX)、細胞膜上の  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプの活性やタンパク量の減少、拡張期での SR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 漏れなども、糖尿病心筋の異常な  $\text{Ca}^{2+}$ 動態を引き起こしていると考えられている(Golfman et al., 1998; Suarez et al., 2008; Hattori et al., 2000; Satoh, 2003; Stølen et al., 2009)。

糖尿病心筋ではその駆動に ATP を必要とする機構の機能が低下しており、そのひとつに  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase がある。 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase は ATP を加水分解し、その化学的エネルギーを使って3個の細胞内  $\text{Na}^+$ と2個の細胞外  $\text{K}^+$ を交換する。この機構はジギタリスなどの強心配糖体により特異的に阻害されることが知られている。この  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の機能が低下するため細胞内  $\text{Na}^+$ 濃度が上昇し NCX の  $\text{Ca}^{2+}$ 排出モードの回転が起こりにくくなると言われている。また、 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の機能低下により  $\text{Na}^+, \text{H}^+$ -exchanger (NHE)も影響を受けることになる。NHE は  $\text{Na}^+$ の濃度勾配を利用し、1個の  $\text{Na}^+$ を細胞内へ流入させ、1個の  $\text{H}^+$ を細胞外へ排出する一方向にしか働かないトランスポーターであり、細胞内の代謝により生じた  $\text{H}^+$ を細胞外に汲み出すことで細胞内の pH を制御していると考えられている。 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 機能低下により細胞内  $\text{Na}^+$ が上昇しこの NHE が駆動しにくくなると細胞内 pH が低下し、結果として収縮タンパク質の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性低下をきたす。このような影響も糖尿病マウス心筋の収縮力低下に起因しているのではないかと考えられる。

糖尿病マウスの心室筋組織標本では、90%弛緩時間(time to 90% relaxation:  $\text{RT}_{90}$ )が正常マウスに比べ延長していた(Fig. 6-1-1A; Table 6-1-2)。これは、*in vivo* での左室駆出分画(ejection

fraction)が低下しているという報告とも一致しており、*in vitro* においても糖尿病心筋の拡張機能障害を確認することができた(Yu et al., 2007)。この糖尿病マウス心筋の  $RT_{90}$  の延長は、細胞内  $Ca^{2+}$  動態の変化から説明することができ、糖尿病マウスの  $Ca^{2+}$  transient の減衰時間が正常マウスに比べて延長していることに起因していると考えられる(Fig. 6-1-1B; Table 6-1-2)。この  $Ca^{2+}$  transient の減衰および  $RT_{90}$  が、正常マウス、糖尿病マウスともに、SERCA 阻害薬 cyclopyazonic acid(CPA)により延長したことから(Fig. 6-1-3, 6-1-4)、SERCA 機能がマウス心室筋の弛緩機能に重要な役割を果たしており、また糖尿病マウス心筋の弛緩機能障害が SERCA 機能低下により説明できることが示唆される。一方、SERCA のタンパク発現量の低下は 34%程度であるにもかかわらず、SR への  $Ca^{2+}$  取り込み能が 60~70%低下するという報告もあり(Satoh et al., 2001)、SERCA 自体のタンパク量の低下だけでなく、SERCA の制御機構の変化も弛緩機能低下をもたらすのだと考えられる(Schwinger et al., 1995; Schmidt et al., 1999)。実際に SERCA 機能を抑制的に制御している phospholamban の発現レベルが糖尿病心筋において増大していることが報告されている(Zhong et al., 2001; Wang et al., 2010)。細胞内  $Ca^{2+}$  の除去機構として、SERCA のほかに  $Na^{+}/Ca^{2+}$  交換機構 ( $Na^{+}/Ca^{2+}$  exchanger: NCX)があげられるが、NCX の薬理的な抑制は  $Ca^{2+}$  transient の減衰速度には影響を与えず(Tanaka et al., 2005; Namekata et al., 2008a)、また NCX をノックアウトしたマウスの  $Ca^{2+}$  transient の減衰速度も野生型と比べて違いがみられないことが報告されていることから(Reuter et al., 2002; Reuter et al., 2003)、NCX は正常なマウスの  $Ca^{2+}$  transient の減衰にはほとんど影響を与えていないことが示唆される。

本研究で薬理的に検討したところ、ryanodine 受容体の活性には違いはみられなかったものの、ryanodine 受容体の制御機構に変化がみられることが報告されている(Belke et al., 2004; Yaras et al., 2005)。リアノジン受容体は FKBP12.6 というタンパクにより安定化されており抑制的に制御されている。FKBP12.6 は  $Ca^{2+}$  による活性化感受性を制御することでチャネルの活性を低下させること、チャネルを同時に開閉させて、連結開閉を示すことという重要な機能をもつ。FKBP12.6 がいない場合はチャネルを閉じるのに支障が生じることが予想され、拡張期に心筋を弛緩させることが困難になると考えられている。糖尿病心ではリアノジン受容体の serine2809 が過リン酸化状態になっており、FKBP12.6 を枯渇させている。その結果、 $Ca^{2+}$  感受性が劇的に上昇し、チャネルから  $Ca^{2+}$  が漏れやすくなる。よって、収縮力の減弱や弛緩時間の延長にはリアノジン受容体の機能異常も関与していると考えられる。他にも SR 内の  $Ca^{2+}$  結合部位である calsequestrin(CSQ)や ryanodine 受容体と CSQ の相互作用を制御するタンパクである junctin や triadin の機能異常も関係しているのではないかと考えられている。

他にも糖尿病心の収縮力の低下や収縮弛緩速度の延長には収縮タンパク質の異常が考えられている。一つめはミオシンのアイソフォームの変化である。ミオシン分子は 2 量体からなり、アイソフォームとして  $\alpha$ 、 $\beta$  がある。 $\alpha\alpha$  が  $V_1$  タイプ、 $\beta\beta$  が  $V_3$  タイプで ATPase 活性が異なる。正常心では ATPase 活性の高い  $V_1$  タイプがほとんどであるが、糖尿病心では ATPase 活性の低い  $V_3$  タイプが主に発現しておりアクチン・ミオシンの相互作用(cross-bridge cycling rate)が低く、収縮弛緩延長の要因となることが報告されている。二つめはトロポニンのアイソフォームの変化である。トロポ

ニンには①Ca<sup>2+</sup>が結合するトロポニン C、②トロポミオシンと結合しているトロポニン T、③アクチンとミオシンの相互作用を抑制しているトロポニン I の3つが存在し、糖尿病心ではトロポニン T と I の異常が報告されている。トロポニン T のアイソフォームは T<sub>1</sub> から低分子量の T<sub>2</sub> や T<sub>3</sub> に移行しているとされており、トロポニン I は正常心に比べて過リン酸化されていると報告されている。これらが収縮タンパクの Ca<sup>2+</sup>感受性の低下に関与しており収縮力の減少を引き起こしているのではないかと考えられている。また、糖尿病では心筋細胞そのものが硬くなるとの報告もある。持続的な高血糖によりコラーゲンなどが糖化され蓄積し、組織の硬さ(stiffness)が増大し、筋が弛緩しにくくなるというものである(Malhotra and Sanghi, 1997)。

**結論 5: STZ 誘発糖尿病マウス心室筋では、SERCA 機能低下のため、収縮力、弛緩機能が低下しており、拡張機能障害を引き起こしている。**

### **糖尿病マウス心室筋の $\alpha$ 受容体刺激応答**

糖尿病状態の心筋では、拡張機能障害が引き起こされるだけでなく自律神経支配にも影響を及ぼすことが報告されている。糖尿病ラット心筋では、 $\beta_1$ 、 $\beta_2$  受容体のタンパク発現量の減少や(Dincer et al., 2001)、 $\beta$  受容体刺激に対する陽性変時反応および陽性変力反応の減弱(Dincer et al., 1998; Kamata et al., 1997; Kamata et al., 2006)、また  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応の増大も報告されている(Kamata et al., 1997; Kamata et al., 2006)。したがって、本研究で使用している STZ 誘発性糖尿病マウス心室筋においても  $\alpha$  受容体刺激応答に影響がでている可能性がある。そこで、糖尿病マウス心室筋の  $\alpha$  受容体刺激応答について検討した。 $\alpha$  受容体刺激によって正常心筋、糖尿病心筋ともに陰性変力反応が見られたが、その程度は糖尿病心筋の方が小さかった(Fig. 6-2-1)。陰性変力反応が NCX 活性化を介した Ca<sup>2+</sup>排出促進により引き起こされることから考えると、糖尿病心筋では NCX の Ca<sup>2+</sup>排出機能が低下しているためだと考えられる。そこで、正常および糖尿病心筋の NCX の寄与を調べるため、PKC を介して NCX を活性化させる PMA と NCX 阻害薬 SEA0400 を処置したところ、糖尿病心筋での感受性は正常心筋に比べ低下していた(Fig. 6-2-2)。したがって、糖尿病マウス心筋では NCX の Ca<sup>2+</sup>排出機能が低下していることが示唆され、糖尿病ラット心筋での NCX のタンパク量が減少している報告と矛盾しない結果となった(Hattori et al., 2000)。糖尿病マウス心筋において NCX の Ca<sup>2+</sup>排出機能が低い要因として、報告されている NCX の発現量の低下に加え、活動電位持続時間の延長と、興奮収縮機構の SR 依存性の減少も考えられる。活動電位を比較したところ、糖尿病心筋では、正常心筋に比べ活動電位持続時間が延長していることが観察された(Fig. 6-1-2; Table 6-1-3)。前章でも述べたが、NCX は膜電位の影響を受け、その回転方向とその働く強さが変化し、活動電位持続時間が短いほど NCX の Ca<sup>2+</sup>排出モードが働きやすいことが報告されている(Bers, 2002)。したがって、糖尿病マウス心筋では、活動電位持続時間が延長しているために、NCX の Ca<sup>2+</sup>排出機能が低下し、 $\alpha$  受容体刺激に対する陰性変力反応が減弱していると考えられる。また前述のように、糖尿病マウス心筋では、SERCA 機能低下により、SR の Ca<sup>2+</sup>放出機能が低下している。したがって、活動電位持

続時間の延長に加えて、SR の  $\text{Ca}^{2+}$  放出機能が低下することで、NCX の  $\text{Ca}^{2+}$  排出機能が低下していると考えられる。

**結論 6:** STZ 誘発糖尿病マウス心筋では、活動電位持続時間の延長と SR の  $\text{Ca}^{2+}$  放出機能の低下により NCX を介した細胞外への  $\text{Ca}^{2+}$  排出が減少しており、これが原因で  $\alpha$  受容体刺激に対する陰性変力反応が減弱している。

### **糖尿病マウス心室筋に対する SERCA 活性化薬の影響**

第 1 節の結果から、STZ 誘発糖尿病マウス心筋では、SERCA 機能の低下により、拡張機能障害が引き起こされていることが明らかになった。果実に含まれるフェノール系成分である ellagic acid や生姜の抽出成分である gingerol は、イヌ心筋の SR ベシクルを用いた検討により SERCA 活性化作用を有すること、それぞれの  $\text{EC}_{50}$  が  $4 \mu\text{M}$ 、 $3 \mu\text{M}$  であることが報告されている (Antipenko et al., 1999; Kobayashi et al., 1987; Kobayashi et al., 1988; Berrebi - Bertrand et al., 1997; Coll et al., 1999)。これらの SERCA 活性化薬は、SERCA 機能と拡張機能障害の関連性を検討するための有用なツールであると同時に、SERCA 活性化薬が拡張機能障害の治療薬候補となるか検討することができる。そこで、STZ 誘発糖尿病マウス心筋に対する ellagic acid および gingerol の影響について検討した。Ellagic acid の作用機序は、phospholamban による SERCA 抑制の解除であると示唆されているが (Berrebi - Bertrand et al., 1997)、心筋収縮機能や  $\text{Ca}^{2+}$  動態への急性作用については報告されていない。Gingerol は SERCA タンパクを直接活性化させることが、骨格筋、心筋の検討から確認されている (Kobayashi et al., 1987)。Gingerol はモルモット心房筋 (Kobayashi et al., 1988) やヒト心室筋 (Maier et al., 2000) において、細胞膜上やミオシンの  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase、phosphodiesterase 活性、ミオシン繊維の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性には影響を与えず、収縮力増大作用や弛緩機能促進作用を示すことが報告されている。本研究では、ellagic acid (Fig. 6-3-1A, 6-3-2A, B)、gingerol (Fig. 6-3-3A, 6-3-4A, B) とともにマウス心室筋の収縮力には影響を与えないことを確認した。これはどちらの SERCA 活性化薬も  $\text{Ca}^{2+}$  transient の peak に影響を与えていない結果とも矛盾しない (Fig. 6-3-1B, 6-3-2E, 6-3-3B, 6-3-4E)。

また ellagic acid (Fig. 6-3-1, 6-3-2C, G)、gingerol (Fig. 6-3-3, 6-3-4C, G) とともに心筋の弛緩時間、 $\text{Ca}^{2+}$  transient の減衰時間を短縮させ、その弛緩時間に対する作用は CPA により完全に抑制されたことから、ellagic acid と gingerol は確かに SERCA に作用していることが示唆される (Fig. 6-3-5)。また両者の弛緩時間、 $\text{Ca}^{2+}$  transient の減衰時間の短縮作用は、糖尿病マウスのほうが正常マウスに比べ顕著であることから、STZ 処置による拡張機能障害は薬理的な SERCA 機能活性化により改善できることが示唆される。これは STZ 誘発糖尿病マウスに心筋型 SERCA2a タンパクを遺伝子組み換え技術を用いて増大させることで、心筋の弛緩機能が改善するという報告とも一致する (Suarez et al., 2008; Trost et al., 2002)。SR 機能障害や SERCA レベルの低下は糖尿病性心筋症だけでなく、虚血性心筋症や拡張型心筋症、肥大型心筋症による末期の心不全状態 (Schotten et al., 1999; Haghghi et al., 2004) や、老齡心筋 (Jiao et al., 2012) でも観察される。

## 結論 7: STZ 誘発糖尿病マウス心室筋では、SERCA 活性化薬は弛緩機能を促進し、拡張機能障害を改善する

本章では、STZ 誘発糖尿病マウス心室筋の興奮収縮機構および薬理的性質について次の点が明らかとなった。

糖尿病マウス心室筋では、SERCA 機能低下により、拡張機能障害を引き起こしているが、SERCA 活性化薬により改善できる可能性が示唆された。また、糖尿病マウス心室筋では、 $\alpha$  受容体刺激応答に対する陰性変力反応が減弱しているが、発達段階の検討により見出された“活動電位持続時間が短く、筋小胞体機能が高い心筋ほど、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルからの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入の役割は小さく、NCX による  $\text{Ca}^{2+}$ 排出の役割は大きい”という法則により、アドレナリン  $\alpha$  受容体刺激応答の糖尿病時の変化も説明することができた。この法則から、糖尿病心筋を考察すると、“病気 $\equiv$ 幼若化”と捉えることもできる。実際に、いくつかのタンパク質に関しては病態時に成人型から胎児型の発現パターンに変化することが知られている(Liu et al., 2002; Bers et al., 2006; Cribbs, 2010)。しかし、興奮収縮機構や刺激応答に関して具体的な作業仮説を立て、それを検証している例はほとんど無く、本研究の特徴と言える。“病気 $\equiv$ 幼若化”という捉え方を意識しつつ、様々な病態に関して上記の法則がどこまで当てはまるのか検討していきたい。

## 第 7 章 総括

本研究により、マウス心室筋の興奮収縮機構の発達変化、 $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応の機序、 $\alpha$  受容体刺激応答が陽性から陰性へと転じる要因、そして糖尿病マウス心室筋の  $\alpha$  受容体刺激応答と弛緩機能障害について次の知見が得られた。

**結論 1:** マウス心室筋は発達に伴い興奮収縮機構における  $\text{Ca}^{2+}$  動員機構が、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル依存型から SR 依存型へと変化する。特に胎生期から新生仔期、1 週齢から 2 週齢にかけて顕著に変化しており、これには、活動電位持続時間の短縮と、T 管-SR 連関の発達が起因する。

**結論 2:**  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応は L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介した細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入増大により引き起こされる。

**結論 3:** 発達に伴う活動電位持続時間の短縮(再分極力の増大)により、心筋収縮への L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの寄与が低下し、 $\alpha$  受容体刺激による活動電位持続時間の延長作用が抑制される。これが原因で  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応が減弱する。

**結論 4:** 発達に伴う活動電位持続時間の短縮と SR 機能の増大により、NCX を介した  $\text{Ca}^{2+}$  排出が増大する。これが原因で  $\alpha$  受容体刺激に対する陰性変力反応が増大する。

**結論 5:** STZ 誘発糖尿病マウス心室筋では、SERCA 機能低下のため、収縮力、弛緩機能が低下しており、拡張機能障害を引き起こしている。

**結論 6:** 糖尿病マウス心筋では、活動電位持続時間の延長と SR の  $\text{Ca}^{2+}$  放出機能の低下により NCX を介した細胞外への  $\text{Ca}^{2+}$  排出が減少しており、これが原因で  $\alpha$  受容体刺激に対する陰性変力反応が減弱している。

**結論 7:** STZ 誘発糖尿病マウス心室筋では、SERCA 活性化薬は弛緩機能を促進し、拡張機能障害を改善する



マウス心室筋収縮のアドレナリン  $\alpha$  受容体刺激応答には陽性、陰性の2つの成分が存在し、そのバランスにより全体の反応の方向性と大きさが決まることが判明した。陽性、陰性各成分を担うL型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルおよび  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の機能を規定しているのはこれらの発現量ではなく、活動電位波形と筋小胞体機能という興奮収縮機構の基本的特徴であった。すなわち、“活動電位持続時間が短く、筋小胞体機能が高い心筋ほど、L型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルからの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入の役割は小さく、NCXによる  $\text{Ca}^{2+}$ 排出の役割は大きい”という法則に基づき、アドレナリン  $\alpha$  受容体刺激応答の発達変化と糖尿病時の変化を統一的に説明することができた。このような刺激応答と興奮収縮機構の関連性は動物種間でも見られ、L型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル依存型であるヒト、ウサギ、モルモットなどでは  $\alpha$  受容体刺激に対して陽性変力反応を示すが、SR依存型のラット、マウスではそれぞれ一過性、持続的な陰性変力反応を示すことが報告されており、種差においてもこの法則が成り立つ可能性がある。このように刺激応答と興奮収縮機構の関連性は発達段階、病態や動物種などを超えて見出すことができ、心筋収縮の刺激応答を興奮収縮機構と関連付けて解明することにより多様な心機能を統一的に理解できると考える。

## 第 8 章 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました東邦大学薬学研究科薬物学教室 田中光教授に心からの感謝の意を表すると共に、終始懇切丁寧に御指導頂きました行方衣由紀講師に深く感謝致します。

SEA0400 を提供くださいました、大正製薬株式会社ならびに本学薬化学教室 加藤恵介教授に厚く感謝の意を表します。

また、種々の御助言と激励の言葉を頂きました東邦大学薬物学教室の皆様には深く感謝致します。

平成 26 年 1 月 10 日  
薬物学教室 濱口正悟

## 第 9 章 参考文献

Adachi, T., Shibata, S., Okamoto, Y., Sato, S., Fujisawa, S., Ohba, T., Ono, K., 2013. The mechanism of increased postnatal heart rate and sinoatrial node pacemaker activity in mice. *J. Physiol. Sci.* 63, 133-146.

Agata, N., Kato, Y., Tanaka, H., Shigenobu, K., 1994a. Differential effects of hypoxia on electrical and mechanical activities of isolated ventricular muscles from fetal and adult guinea-pigs. *General Pharmacology: The Vascular System* 25, 15-18.

Agata, N., Tanaka, H., Shigenobu, K., 1994b. Inotropic effects of ryanodine and nifedipine on fetal, neonatal and adult guinea-pig myocardium. *Eur. J. Pharmacol.* 260, 47-55.

Agata, N., Tanaka, H., Shigenobu, K., 1993. Developmental changes in action potential properties of the guinea-pig myocardium. *Acta Physiol. Scand.* 149, 331-337.

Anderson, T., Schein, P.S., McMenamin, M.G., Cooney, D.A., 1974. Streptozotocin diabetes correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Clin. Invest.* 54, 672.

Antipenko, A.Y., Spielman, A.I., Kirchberger, M.A., 1999. Interactions of 6-gingerol and ellagic acid with the cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 227-234.

Belke, D.D., Swanson, E.A., Dillmann, W.H., 2004. Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart. *Diabetes* 53, 3201-3208.

Benndorf, K., Nilius, B., 1988. Properties of an early outward current in single cells of the mouse ventricle. *Gen. Physiol. Biophys.* 7, 449-466.

Berrebi - Bertrand, I., Lahouratate, P., Lahouratate, V., Camelin, J.C., Guibert, J., Bril, A., 1997. Mechanism of Action of Sarcoplasmic Reticulum Calcium-Uptake Activators. *European Journal of Biochemistry* 247, 801-809.

Bers, D.M., Despa, S., Bossuyt, J., 2006. Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  in normal and failing cardiac myocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1080, 165-177.

Bers, D.M., 2002. Cardiac  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchange function in rabbit, mouse and man: what's the difference? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 369-373.

- Borlaug, B.A., Kass, D.A., 2006. Mechanisms of diastolic dysfunction in heart failure. *Trends Cardiovasc. Med.* 16, 273-279.
- Bruckner, R., Meyer, W., Mugge, A., Schmitz, W., Scholz, H., 1984. Alpha-adrenoceptor-mediated positive inotropic effect of phenylephrine in isolated human ventricular myocardium. *Eur. J. Pharmacol.* 99, 345-347.
- Bruckner, R., Scholz, H., 1984. Effects of alpha-adrenoceptor stimulation with phenylephrine in the presence of propranolol on force of contraction, slow inward current and cyclic AMP content in the bovine heart. *Br. J. Pharmacol.* 82, 223-232.
- Catalucci, D., Latronico, M., Ellingsen, O., Condorelli, G., 2007. Physiological myocardial hypertrophy: how and why? *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 13, 312-324.
- Close, R., 1965. Effects of cross-union of motor nerves to fast and slow skeletal muscles.
- Cohen, N.M., Lederer, W.J., 1988. Changes in the calcium current of rat heart ventricular myocytes during development. *J. Physiol.* 406, 115-146.
- Coll, K.E., Johnson, R.G., McKenna, E., 1999. Relationship between phospholamban and nucleotide activation of cardiac sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  adenosinetriphosphatase. *Biochemistry* 38, 2444-2451.
- Cribbs, L., 2010. T-type calcium channel expression and function in the diseased heart. *Channels* 4, 447-452.
- Dincer, U.D., Bidasee, K.R., Guner, S., Tay, A., Ozcelikay, A.T., Altan, V.M., 2001. The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes* 50, 455-461.
- Dincer, U.D., Onay, A., Ari, N., Ozcelikay, A.T., Altan, V.M., 1998. The effects of diabetes on beta-adrenoceptor mediated responsiveness of human and rat atria. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 40, 113-122.
- Dirksen, R.T., Sheu, S.S., 1990. Modulation of ventricular action potential by alpha 1-adrenoreceptors and protein kinase C. *Am. J. Physiol.* 258, H907-11.

- Endoh, M., Hiramoto, T., Ishihata, A., Takanashi, M., Inui, J., 1991. Myocardial alpha 1-adrenoceptors mediate positive inotropic effect and changes in phosphatidylinositol metabolism. Species differences in receptor distribution and the intracellular coupling process in mammalian ventricular myocardium. *Circ. Res.* 68, 1179-1190.
- Endoh, M., Schumann, H.J., 1975. Frequency-dependence of the positive inotropic effect of methoxamine and naphazoline mediated by alpha-Adrenoceptors in the isolated rabbit papillary muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 287, 377-389.
- Erman, R.D., Yamamura, H.I., Roeske, W.R., 1983. The ontogeny of specific binding sites for the calcium channel antagonist, nitrendipine, in mouse heart and brain. *Brain Res.* 278, 327-331.
- Fedida, D., 1993. Modulation of cardiac contractility by alpha 1 adrenoceptors. *Cardiovasc. Res.* 27, 1735-1742.
- Fedida, D., Shimoni, Y., Giles, W.R., 1990. Alpha-adrenergic modulation of the transient outward current in rabbit atrial myocytes. *J. Physiol.* 423, 257-277.
- Fiset, C., Clark, R., Larsen, T., Giles, W., 1997. A rapidly activating sustained  $K^+$  current modulates repolarization and excitation-contraction coupling in adult mouse ventricle. *J. Physiol. (Lond.)* 504, 557-563.
- Frank, K.F., Bölck, B., Erdmann, E., Schwinger, R.H., 2003. Sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovasc. Res.* 57, 20-27.
- Golfman, L., Dixon, I.M., Takeda, N., Lukas, A., Dakshinamurti, K., Dhalla, N.S., 1998. Cardiac sarcolemmal  $Na^+$ - $Ca^{2+}$  exchange and  $Na^+$ - $K^+$  ATPase activities and gene expression in alloxan-induced diabetes in rats, in: Anonymous . Springer, pp. 91-101.
- Haghighi, K., Gregory, K.N., Kranias, E.G., 2004. Sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase-phospholamban interactions and dilated cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1214-1222.
- Hamilton, N., Ianuzzo, C.D., 1991. Contractile and calcium regulating capacities of myocardia of different sized mammals scale with resting heart rate. *Mol. Cell. Biochem.* 106, 133-141.

- Harrell, M.D., Harbi, S., Hoffman, J.F., Zavadil, J., Coetzee, W.A., 2007. Large-scale analysis of ion channel gene expression in the mouse heart during perinatal development. *Physiol. Genomics* 28, 273-283.
- Harrer, J.M., Haghghi, K., Kim, H.W., Ferguson, D.G., Kranias, E.G., 1997. Coordinate regulation of SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase and phospholamban expression in developing murine heart. *Am. J. Physiol.* 272, H57-66.
- Hartmann, H.A., Mazzocca, N.J., Kleiman, R.B., Houser, S.R., 1988. Effects of phenylephrine on calcium current and contractility of feline ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 255, H1173-80.
- Hattori, Y., Matsuda, N., Kimura, J., Ishitani, T., Tamada, A., Gando, S., Kemmotsu, O., Kanno, M., 2000. Diminished function and expression of the cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in diabetic rats: implication in Ca<sup>2+</sup> overload. *J. Physiol. (Lond.)* 527, 85-94.
- Hayashi, K., Kojima, R., Ito, M., 2006. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29, 1110-1119.
- Huser, J., Lipsius, S.L., Blatter, L.A., 1996. Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *J. Physiol.* 494 ( Pt 3), 641-651.
- Huynh, T.V., Chen, F., Wetzel, G.T., Friedman, W.F., Klitzner, T.S., 1992. Developmental changes in membrane Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> currents in fetal, neonatal, and adult rabbit ventricular myocytes. *Circ. Res.* 70, 508-515.
- Ishii, K., Kuwahara, M., Tsubone, H., Sugano, S., 1996. Autonomic nervous function in mice and voles (*Microtus arvalis*): investigation by power spectral analysis of heart rate variability. *Lab. Anim.* 30, 359-364.
- Iwakura, K., Hori, M., Watanabe, Y., Kitabatake, A., Cragoe, E.J., Jr, Yoshida, H., Kamada, T., 1990. Alpha 1-adrenoceptor stimulation increases intracellular pH and Ca<sup>2+</sup> in cardiomyocytes through Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Eur. J. Pharmacol.* 186, 29-40.
- Jiao, Q., Takeshima, H., Ishikawa, Y., Minamisawa, S., 2012. Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity. *Cell Calcium* 51, 31-39.

Jourdon, P., Feuvray, D., 1993. Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *J. Physiol. (Lond.)* 470, 411-429.

Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W., Renold, A.E., 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.* 48, 2129.

Kamata, K., Satoh, T., Tanaka, H., Shigenobu, K., 1997. Changes in electrophysiological and mechanical responses of the rat papillary muscle to  $\alpha$ - and  $\beta$ -agonist in streptozotocin-induced diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 781-788.

Kamata, K., Satoh, T., Matsumoto, T., Noguchi, E., Taguchi, K., Kobayashi, T., Tanaka, H., Shigenobu, K., 2006. Enhancement of methoxamine-induced contractile responses of rat ventricular muscle in streptozotocin-induced diabetes is associated with alpha1A adrenoceptor upregulation. *Acta Physiol. (Oxf)* 188, 173-183.

Karmazyn, M., Moffat, M.P., 1993. Role of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in cardiac physiology and pathophysiology: mediation of myocardial reperfusion injury by the pH paradox. *Cardiovasc. Res.* 27, 915-924.

Kilborn, M.J., Fedida, D., 1990. A study of the developmental changes in outward currents of rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* 430, 37-60.

Kobayashi, M., Ishida, Y., Shoji, N., Ohizumi, Y., 1988. Cardiotonic action of [8]-gingerol, an activator of the  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum, in guinea pig atrial muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246, 667-673.

Kobayashi, M., Shoji, N., Ohizumi, Y., 1987. Gingerol, a novel cardiotonic agent, activates the  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping ATPase in skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 903, 96-102.

Kusakari, Y., Hongo, K., Kawai, M., Konishi, M., Kurihara, S., 2002. The mechanism of increasing  $\text{Ca}^{2+}$  responsiveness by alpha1-adrenoceptor stimulation in rat ventricular myocytes. *Jpn. J. Physiol.* 52, 531-539.

Kuwahara, K., Nishikimi, T., Nakao, K., 2012. Transcriptional regulation of the fetal cardiac gene program. *J. Pharmacol. Sci.* 119, 198-203.

- Liu, Q.Y., Karpinski, E., Pang, P.K., 1994. The L-type calcium channel current is increased by alpha-1 adrenoceptor activation in neonatal rat ventricular cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, 935-943.
- Liu, S.J., Kennedy, R.H., 1998. alpha 1-Adrenergic activation of L-type Ca<sup>2+</sup> current in rat ventricular myocytes: perforated patch-clamp recordings. *Am. J. Physiol.* 274, H2203-7.
- Liu, W., Yasui, K., Opthof, T., Ishiki, R., Lee, J.K., Kamiya, K., Yokota, M., Kodama, I., 2002. Developmental changes of Ca<sup>2+</sup> handling in mouse ventricular cells from early embryo to adulthood. *Life Sci.* 71, 1279-1292.
- Lu, Z., Jiang, Y., Xu, X., Ballou, L.M., Cohen, I.S., Lin, R.Z., 2007. Decreased L-type Ca<sup>2+</sup> current in cardiac myocytes of type 1 diabetic Akita mice due to reduced phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Diabetes* 56, 2780-2789.
- Maier, L.S., Schwan, C., Schillinger, W., Minami, K., Schütt, U., Pieske, B., 2000. Gingerol, isoproterenol and ouabain normalize impaired post-rest behavior but not force–frequency relation in failing human myocardium. *Cardiovasc. Res.* 45, 913-924.
- Malhotra, A., Sanghi, V., 1997. Regulation of contractile proteins in diabetic heart. *Cardiovasc. Res.* 34, 34-40.
- Meyer, W., Bohm, M., Herzig, J.W., Mugge, A., Schmitz, W., Scholz, H., 1993. Effects of the alpha 1-adrenoceptor agonist phenylephrine in pig heart. Study of the direct action on contractile proteins. *Arzneimittelforschung* 43, 432-435.
- Miyamoto, S., Izumi, M., Hori, M., Kobayashi, M., Ozaki, H., Karaki, H., 2000. Xestospongine C, a selective and membrane-permeable inhibitor of IP<sub>3</sub> receptor, attenuates the positive inotropic effect of alpha-adrenergic stimulation in guinea-pig papillary muscle. *Br. J. Pharmacol.* 130, 650-654.
- Morimoto, S., Ohta, M., Goto, T., Ohtsuki, I., 2001. A pH-sensitive interaction of troponin I with troponin C coupled with strongly binding cross-bridges in cardiac myofilament activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 811-815.
- Nakanishi, T., Okuda, H., Kamata, K., Abe, K., Sekiguchi, M., Takao, A., 1987. Development of myocardial contractile system in the fetal rabbit. *Pediatr. Res.* 22, 201-207.



- Namekata, I., Fujiki, S., Kawakami, Y., Moriwaki, R., Takeda, K., Kawanishi, T., Takahara, A., Shigenobu, K., Tanaka, H., 2008a. Intracellular mechanisms and receptor types for endothelin-1-induced positive and negative inotropy in mouse ventricular myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 376, 385-395.
- Namekata, I., Fujiki, S., Kawakami, Y., Moriwaki, R., Takeda, K., Kawanishi, T., Takahara, A., Shigenobu, K., Tanaka, H., 2008b. Intracellular mechanisms and receptor types for endothelin-1-induced positive and negative inotropy in mouse ventricular myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 376, 385-395.
- Nerbonne, J.M., 1998. Regulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channel expression in the developing mammalian myocardium. *J. Neurobiol.* 37, 37-59.
- Nishimaru, K., Makuta, R., Tanaka, Y., Tanaka, H., Shigenobu, K., 2001. Pharmacological properties of excitation-contraction mechanisms in isolated mouse left atria. *Pharmacology* 62, 87-91.
- Nishimaru, K., Tanaka, Y., Tanaka, H., Shigenobu, K., 2003. Pharmacological evidence for involvement of phospholipase D, protein kinase C, and sodium-calcium exchanger in alpha-adrenoceptor-mediated negative inotropy in adult mouse ventricle. *J. Pharmacol. Sci.* 92, 196-202.
- Nishimaru, K., Kobayashi, M., Matsuda, T., Tanaka, Y., Tanaka, H., Shigenobu, K., 2001. alpha-Adrenoceptor stimulation-mediated negative inotropism and enhanced Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in mouse ventricle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H132-41.
- Okuda, H., Nakanishi, T., Makoto, N., Takao, A., 1987. Effect of isoproterenol on myocardial mechanical function and cyclic AMP content in the fetal rabbit. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 19, 151-157.
- Orchard, C.H., Kentish, J.C., 1990. Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* 258, C967-81.
- Osaka, T., Joyner, R.W., 1991. Developmental changes in calcium currents of rabbit ventricular cells. *Circ. Res.* 68, 788-796.
- Puceat, M., Terzic, A., Clement, O., Scamps, F., Vogel, S.M., Vassort, G., 1992. Cardiac alpha 1-adrenoceptors mediate positive inotropy via myofibrillar sensitization. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 263-265.

Reuter, H., Henderson, S.A., Han, T., Mottino, G.A., Frank, J.S., Ross, R.S., Goldhaber, J.I., Philipson, K.D., 2003. Cardiac excitation-contraction coupling in the absence of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange. *Cell Calcium* 34, 19-26.

Reuter, H., Henderson, S.A., Han, T., Matsuda, T., Baba, A., Ross, R.S., Goldhaber, J.I., Philipson, K.D., 2002. Knockout mice for pharmacological screening testing the specificity of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitors. *Circ. Res.* 91, 90-92.

Rossini, A.A., Like, A.A., Chick, W.L., Appel, M.C., Cahill, G.F., 1977. Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 2485-2489.

Sato, S., 2008. Quantitative evaluation of ontogenetic change in heart rate and its autonomic regulation in newborn mice with the use of a noninvasive piezoelectric sensor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H1708-15.

Satoh, N., 2003. Effects of MCC-135 on Ca<sup>2+</sup> uptake by sarcoplasmic reticulum and myofilament sensitivity to Ca<sup>2+</sup> in isolated ventricular muscles of rats with diabetic cardiomyopathy. *Mol. Cell. Biochem.* 249, 45-51.

Satoh, N., Sato, T., Shimada, M., Yamada, K., Kitada, Y., 2001. Lusitropic effect of MCC-135 is associated with improvement of sarcoplasmic reticulum function in ventricular muscles of rats with diabetic cardiomyopathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1161-1166.

Schluter, K.D., Schafer, M., Balsler, C., Taimor, G., Piper, H.M., 1998. Influence of pHi and creatine phosphate on alpha-adrenoceptor-mediated cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 763-771.

Schmidt, U., Hajjar, R.J., Kim, C.S., Lebeche, D., Doye, A.A., Gwathmey, J.K., 1999. Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 277, H474-H480.

Schotten, U., Koenigs, B., Rueppel, M., Schoendube, F., Boknik, P., Schmitz, W., Hanrath, P., 1999. Reduced Myocardial Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase Protein Expression in Compensated Primary and Secondary Human Cardiac Hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 1483-1494.

Schwinger, R.H., Böhm, M., Schmidt, U., Karczewski, P., Bavendiek, U., Flesch, M., Krause, E., Erdmann, E., 1995. Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts. *Circulation* 92, 3220-3228.

Sekine, T., Kusano, H., Nishimaru, K., Tanaka, Y., Tanaka, H., Shigenobu, K., 1999. Developmental conversion of inotropism by endothelin I and angiotensin II from positive to negative in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 374, 411-415.

Shah, A., Cohen, I.S., Rosen, M.R., 1988. Stimulation of cardiac alpha receptors increases  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump current and decreases gK via a pertussis toxin-sensitive pathway. *Biophys. J.* 54, 219-225.

Skomedal, T., Osnes, J.B., 1983. Qualitative differences between the inotropic responses in rat papillary muscles to alpha-adrenoceptor and beta-adrenoceptor stimulation by both noradrenaline and adrenaline. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)* 52, 57-67.

Stølen, T.O., Høydal, M.A., Kemi, O.J., Catalucci, D., Ceci, M., Aasum, E., Larsen, T., Rolim, N., Condorelli, G., Smith, G.L., 2009. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic  $\text{Ca}^{2+}$  control, and SR  $\text{Ca}^{2+}$  release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Circ. Res.* 105, 527-536.

Su, Z., Li, F., Spitzer, K.W., Yao, A., Ritter, M., Barry, W.H., 2003. Comparison of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase function in human, dog, rabbit, and mouse ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 761-767.

Suarez, J., Scott, B., Dillmann, W.H., 2008. Conditional increase in SERCA2a protein is able to reverse contractile dysfunction and abnormal calcium flux in established diabetic cardiomyopathy. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 295, R1439-R1445.

Tanaka, H., Namekata, I., Hamaguchi, S., Kawamura, T., Masuda, H., Tanaka, Y., Iida-Tanaka, N., Takahara, A., 2010. Effect of NIP-142 on Potassium Channel  $\alpha$ -Subunits Kv1. 5, Kv4. 2 and Kv4. 3, and Mouse Atrial Repolarization. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33, 138-141.

Tanaka, H., Namekata, I., Nouchi, H., Shigenobu, K., Kawanishi, T., Takahara, A., 2009. New aspects for the treatment of cardiac diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: diversity in the excitation-contraction mechanisms of the heart. *J. Pharmacol. Sci.* 109, 327-333.

- Tanaka, H., Namekata, I., Takeda, K., Kazama, A., Shimizu, Y., Moriwaki, R., Hirayama, W., Sato, A., Kawanishi, T., Shigenobu, K., 2005. Unique excitation-contraction characteristics of mouse myocardium as revealed by SEA0400, a specific inhibitor of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 371, 526-534.
- Tanaka, H., Masumiya, H., Sekine, T., Kase, J., Kawanishi, T., Hayakawa, T., Miyata, S., Sato, Y., Nakamura, R., Shigenobu, K., 2001. Involvement of Ca<sup>2+</sup> waves in excitation-contraction coupling of rat atrial cardiomyocytes. *Life Sci.* 70, 715-726.
- Tanaka, H., Sekine, T., Nishimaru, K., Shigenobu, K., 1998. Role of sarcoplasmic reticulum in myocardial contraction of neonatal and adult mice. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 120, 431-438.
- Tanaka, H., Manita, S., Matsuda, T., Adachi, M., Shigenobu, K., 1995a. Sustained negative inotropism mediated by alpha-adrenoceptors in adult mouse myocardia: developmental conversion from positive response in the neonate. *Br. J. Pharmacol.* 114, 673-677.
- Tanaka, H., Matsuda, T., Adachi, M., Shigenobu, K., 1995b. Effect of sympathectomy on inotropic responsiveness to alpha-adrenoceptor stimulation in developing mouse myocardia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73, 1285-1288.
- Tanaka, H., Manita, S., Shigenobu, K., 1994. Increased sensitivity of neonatal mouse myocardia to autonomic transmitters. *J. Auton. Pharmacol.* 14, 123-128.
- Tanaka, H., Shigenobu, K., 1989. Effect of ryanodine on neonatal and adult rat heart: developmental increase in sarcoplasmic reticulum function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 21, 1305-1313.
- Terzic, A., Puceat, M., Vassort, G., Vogel, S.M., 1993. Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview. *Pharmacol. Rev.* 45, 147-175.
- Terzic, A., Puceat, M., Clement, O., Scamps, F., Vassort, G., 1992. Alpha 1-adrenergic effects on intracellular pH and calcium and on myofilaments in single rat cardiac cells. *J. Physiol.* 447, 275-292.
- Thomas, M.J., Sjaastad, I., Andersen, K., Helm, P.J., Wasserstrom, J.A., Sejersted, O.M., Ottersen, O.P., 2003. Localization and function of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger in normal and detubulated rat cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 1325-1337.

- Tohse, N., Seki, S., Kobayashi, T., Tsutsuura, M., Nagashima, M., Yamada, Y., 2004. Development of excitation-contraction coupling in cardiomyocytes. *Jpn. J. Physiol.* 54, 1-6.
- Tohse, N., Nakaya, H., Hattori, Y., Endou, M., Kanno, M., 1990. Inhibitory effect mediated by alpha 1-adrenoceptors on transient outward current in isolated rat ventricular cells. *Pflugers Arch.* 415, 575-581.
- Tohse, N., Hattori, Y., Nakaya, H., Kanno, M., 1987. Effects of alpha-adrenoceptor stimulation on electrophysiological properties and mechanics in rat papillary muscle. *Gen. Pharmacol.* 18, 539-546.
- Trost, S.U., Belke, D.D., Bluhm, W.F., Meyer, M., Swanson, E., Dillmann, W.H., 2002. Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 51, 1166-1171.
- Tsutsui, H., Matsushima, S., Kinugawa, S., Ide, T., Inoue, N., Ohta, Y., Yokota, T., Hamaguchi, S., Sunagawa, K., 2007. Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker Attenuates Myocardial Remodeling and Preserves Diastolic Function in Diabetic Heart. *Hypertens. Res.* 30.
- Wang, M., Zhang, W., Zhu, J., Fu, G., Zhou, B., 2010. Breviscapine ameliorates cardiac dysfunction and regulates the myocardial Ca<sup>2+</sup>-cycling proteins in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Diabetol.* 47, 209-218.
- Wang, L., Duff, H.J., 1997. Developmental changes in transient outward current in mouse ventricle. *Circ. Res.* 81, 120-127.
- Wang, L., Feng, Z.P., Kondo, C.S., Sheldon, R.S., Duff, H.J., 1996. Developmental changes in the delayed rectifier K<sup>+</sup> channels in mouse heart. *Circ. Res.* 79, 79-85.
- Wang, Y., Gao, J., Mathias, R.T., Cohen, I.S., Sun, X., Baldo, G.J., 1998. alpha-Adrenergic effects on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump current in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.* 509 ( Pt 1), 117-128.
- Williamson, A.P., Kennedy, R.H., Seifen, E., Lindemann, J.P., Stimers, J.R., 1993. Alpha 1b-adrenoceptor-mediated stimulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump current in adult rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 264, H1315-8.
- Yaras, N., Ugur, M., Ozdemir, S., Gurdal, H., Purali, N., Lacampagne, A., Vassort, G., Turan, B., 2005. Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca release channel (RyR2) and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in rat heart. *Diabetes* 54, 3082-3088.

Yu, X., Tesiram, Y.A., Towner, R.A., Abbott, A., Patterson, E., Huang, S., Garrett, M.W., Chandrasekaran, S., Matsuzaki, S., Szweda, L.I., 2007. Early myocardial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: a study using in vivo magnetic resonance imaging (MRI). *Cardiovascular diabetology* 6, 6.

Zhang, S., Hiraoka, M., Hirano, Y., 1998. Effects of  $\alpha_1$ -adrenergic Stimulation on L-type  $\text{Ca}^{2+}$  Current in Rat Ventricular Myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 1955-1965.

Zhong, Y., Ahmed, S., Grupp, I.L., Matlib, M.A., 2001. Altered SR protein expression associated with contractile dysfunction in diabetic rat hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 281, H1137-H1147.

石塚尚子, 1987. 正常心および病的心におけるヒト心筋ミオシンアイソザ. *東京女子医科大学雑誌* 57, 1557-1566.