

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

【背景・目的】

心筋の興奮収縮機構は主に自律神経によって制御されており、活動電位や細胞内 Ca^{2+} 動態には動物種や病態などにより多様性が認められる。糖尿病では合併症として神経障害や心機能障害が知られており、糖尿病患者の多くに心不全や心房細動がみられる。

本研究では糖尿病モデル動物を用い、糖尿病が心筋の興奮収縮機構とその自律神経刺激応答に与える影響を活動電位と細胞内 Ca^{2+} の観点から検討し、心筋障害や薬物の作用をイオンチャネルやトランスポーターのレベルで解明することを目的とした。

【実験方法】

ddY 系、C57BL/6J 系雄性マウスに膵臓 β 細胞を傷害する streptozotocin (200 mg/kg) を腹腔内注射し、血糖値 350 mg/dL 以上のものを 1 型糖尿病モデルマウスとして実験に用いた (糖尿病マウス:STZ)。対照群として、クエン酸 (0.1 M) を注射したものを用いた (正常マウス:control)。マウスから心臓を摘出し、心室筋標本・心房筋標本・肺静脈標本および単離心室筋細胞を作製した。収縮力測定はマグヌス法、活動電位測定はガラス微小電極法により行った。細胞内 Ca^{2+} 動態は単離心室筋細胞に蛍光プローブを負荷し、落射蛍光顕微鏡を用いて定量した。

【結果・考察・結論】

1 興奮収縮機構

糖尿病マウス摘出心室筋は正常マウスと比較して収縮力が有意に小さく、弛緩に要する時間は有意に長かった (図 1)。活動電位はマウス

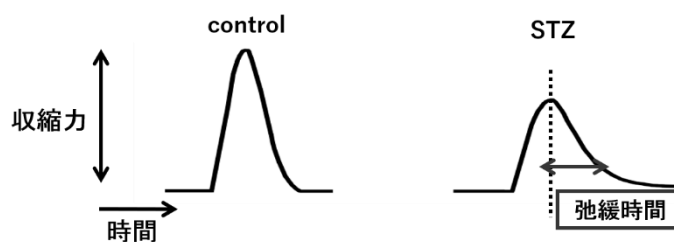


図1 収縮波形

特有の短い持続時間を有していた。糖尿病マウスでは正常マウスに比べて持続時間が有意に長かったが、興奮伝導と相関する立ち上がり速度や振幅、静止膜電位には有意な違いは見られなかった (図 2)。

単離心室筋細胞の静止状態での Ca^{2+} 濃度は、糖尿病心筋細胞で有意に高値であった。電気刺激で惹起した Ca^{2+} -transient は、糖尿病心筋細胞で amplitude が有意に小さく、減衰時間が延長していた (τ が大きかった) (図 3)。糖尿病心筋細胞の大きさや形状、筋小胞体量、活動電位の刺激を筋小胞体に伝える T 管構造には正常心筋細胞と有意な違いは見られなかった (図 4)。

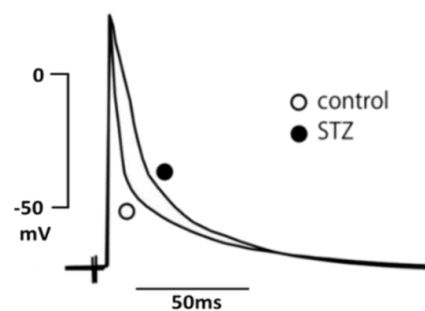


図2 活動電位

結論 1: 本モデルでは心筋収縮機能障害と拡張機能障害の両方が生じていた。主な原因は細胞の形態学的変化ではなく、再分極電流や筋小胞体の機能的変化であると考えられる。

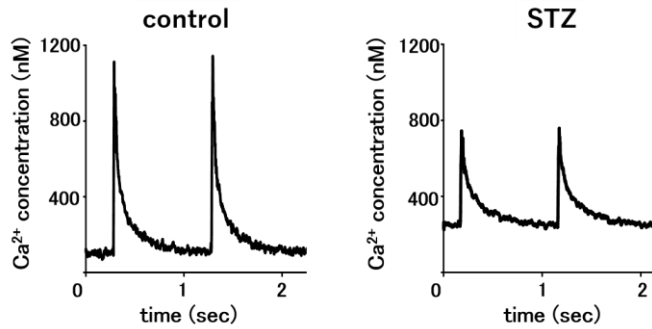


図3 Ca²⁺ transient

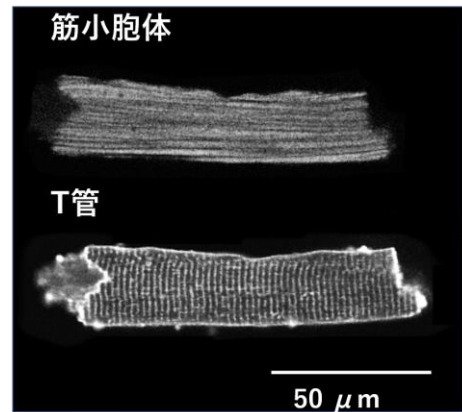


図4 糖尿病マウス心室筋細胞の形態

2 βアドレナリン受容体刺激応答

βアドレナリン受容体刺激により正常マウス・糖尿病マウスともに陽性変力反応（収縮力増大）が見られた。β作動薬 isoprenaline は濃度依存的に収縮力を増大させた。最大反応は糖尿病心筋でわずかに大きく、高濃度においては糖尿病心筋と正常心筋の収縮力差は消失した(図5)。有効濃度域や pD₂ 値(control:7.05、STZ:7.08) には差はみられなかった。Isoprenaline により濃度依存的な弛緩時間の短縮がみられ、糖尿病心筋と正常心筋の弛緩時間の差が消失した(図6)。

筋小胞体に Ca²⁺を取り込む Ca²⁺ポンプ (SERCA) を抑制する cyclopiazonic acid により、糖尿病心筋、正常心筋ともに弛緩時間は著明に延長し、弛緩速度を決定する要因が SERCA 活性であることが判明した。SERCA の活性は制御タンパク質 phospholamban により抑制されているが、この抑制は phospholamban のリン酸化により解除される。糖尿病心筋と正常心筋で SERCA の発現量に差はみられなかったが、リン酸化 phospholamban の量は糖尿病心筋で有意に低下していた。

結論 2-1：糖尿病心筋の拡張機能低下は SERCA の制御異常が原因であった。このことは薬物により糖尿病心筋の弛緩機能を回復させる余地があることを示唆する。

果実に含まれるポリフェノールの一種である ellagic acid は、isoprenaline と同様に単離心室筋細胞の細胞質内 Ca²⁺濃度を低下させた。これらの低下はいずれも cyclopiazonic acid により完全に抑制されたが、細胞膜の Na⁺/Ca²⁺交換機構 (NCX)を阻害する SEA0400 によっては抑制されなかった。Isoprenaline による Ca²⁺濃度低下は propranolol により抑制されたが、ellagic acid による低下は影響を受けなかった。これらの結果から、ellagic acid は isoprenaline と異なり、β受容体を介さずに SERCA を活性化することが明らかになった。Ellagic acid は糖尿病心筋の弛緩時間を有意に短縮した。Ellagic acid は心拍数や心収縮力には影響しないという点で、isoprenaline と大きく異なっていた。

結論 2-2：SERCA 活性化薬が心筋拡張機能不全の改善に有用である可能性が示唆された。

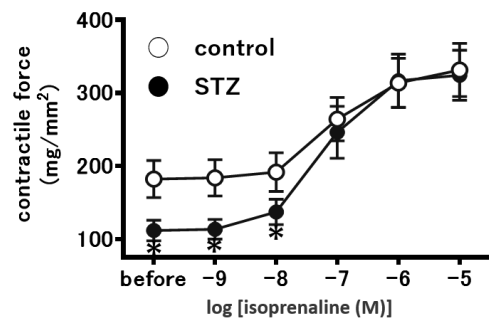


図5 収縮力に対する isoprenaline の作用

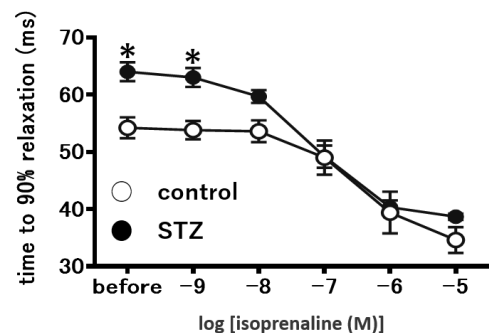


図6 弛緩時間に対する isoprenaline の作用

3 αアドレナリン受容体刺激応答

αアドレナリン受容体刺激では正常マウス・糖尿病マウスともに陰性変力反応（収縮力低下）が見られた。Phenylephrine (propranolol 存在下) による収縮力減少の程度は糖尿病マウスで有意に減弱していた(図7)。有効濃度域や pD₂ 値 (control:5.51、STZ:5.59) には差が見られなかったことから、受容体の数や性質の違いに起因する可能性は低いと考えられた。α受容体刺激による反応は正常マウス・糖尿病マウスともに SEA0400 により抑制されたことから、Na⁺/Ca²⁺交換機構の働きを介していることが判明した。Na⁺/Ca²⁺交換機構の発現量は正常マウスと比較して糖尿病マウスで増加しており、発現量以外の要因によりその活性が影響されていることが示唆された。

そこで、活動電位持続時間（action potential duration: APD）との関連性に注目した。Na⁺/Ca²⁺交換機構による細胞外への Ca²⁺排出は膜電位依存的であるため、糖尿病マウスで生じている活動電位持続時間の延長が Ca²⁺を排出しにくくしていると考えられる。陰性変力反応との因果関係を明らかにするため、活動電位持続時間を薬理的に変化させる処置を行った。正常マウスの活動電位持続時間を 4-aminopyridine (4-AP; K⁺チャンネル遮断薬)により延長させると、α受容体刺激に対する陰性変力反応が減弱した。逆に、糖尿病マウスの活動電位持続時間を cromakalim(K⁺チャンネル開口薬)により短縮させると、α受容体刺激に対する陰性変力反応は増強された。すなわち、活動電位持続時間と陰性変力反応が逆相関した(図8)。糖尿病時にみられる活動電位持続時間の延長は、低下傾向にある心筋収縮力を維持するための仕組みとして機能している可能性が考えられる。

結論3：糖尿病マウスでみられるα受容体刺激による

陰性変力反応の減弱の原因のひとつが、活動電位持続時間の延長である。

4 自動能

心筋の自動能には洞房結節における正所性自動能と、それ以外の心筋から生じる異所性自動能がある。糖尿病マウスの洞房結節自動能（摘出右心房の拍動数）は正常マウスと比較してわずかに低下していた。正常マウス・糖尿病マウスともにβ受容体刺激(prazosin 存在下の noradrenaline)により著明な陽性変時作用（拍動数増大）がみられ、高濃度 noradrenaline 存在下では糖尿病マウスと正常マウスの拍動数の差が消失した。α受容体刺激によっては弱い陽性変時作用が見られた。

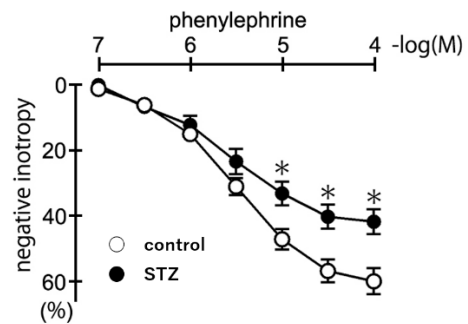


図7 収縮力に対する phenylephrineの作用

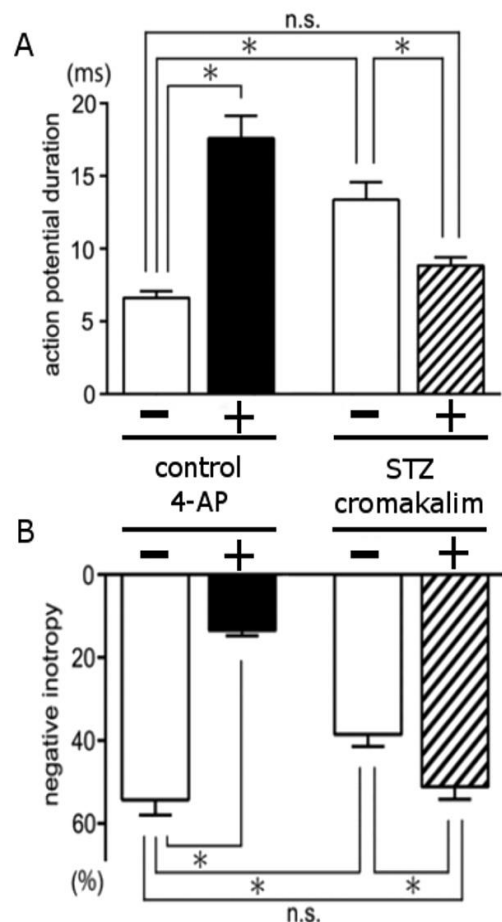


図8 活動電位持続時間 (A) と陰性変力反応 (B) の関係

一方で、心房細動発症の原因と考えられている肺静脈心筋の自動能は糖尿病マウスで亢進していた(図9)。摘出肺静脈組織標本の心筋層では一部の標本で電氣的自発活動が生じているが、自発活動が見られる標本の割合は糖尿病マウスで有意に高値であった。自発活動を示していない標本はnoradrenalineにより自発活動が誘発された。肺静脈心筋の自発活動は、糖尿病マウス、正常マウスともにCa²⁺チャンネル遮断薬であるnifedipine、筋

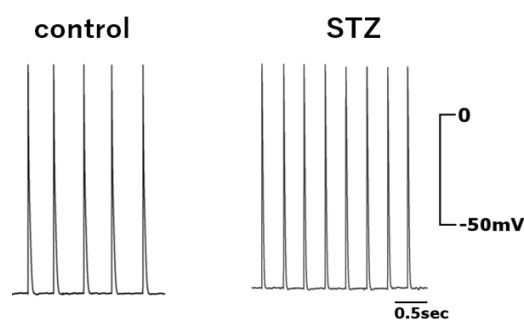


図9 肺静脈心筋自発活動

小胞体からのCa²⁺放出を抑制するryanodineおよびxestospongine Cにより発火頻度の減少が見られた。また、細胞膜のCl⁻チャンネルを遮断するniflumic acidにより発火頻度の減少が見られた。これらの薬物の効力に糖尿病マウス、正常マウス間で差は見られなかった。SEA0400により発火頻度の低下が見られ、その効果は糖尿病マウスに比べて正常マウスで大きかった。また、持続性Na⁺電流(late I_{Na})阻害薬GS-458967により発火頻度の低下が見られたが、その効果は正常マウスに比べて糖尿病マウスで大きかった。

結論4：糖尿病は肺静脈心筋細胞のイオンチャンネルやトランスポーターの機能に影響を与えて異所性自発活動を亢進させていた。Cl⁻チャンネル電流や持続性Na⁺電流など、肺静脈心筋の自動能亢進に寄与する機序が、心房細動に対する薬物治療のターゲットとなる可能性がある。

【総括】

Streptozotocin誘発性糖尿病モデルマウス心筋では、興奮収縮機構とその自律神経伝達物質に対する応答性が変化していた。弛緩不全や肺静脈自動能亢進など、糖尿病患者の心臓と類似した病態もみられ、病態モデルとしての有用性が示された。また、交感神経(noradrenaline)は糖尿病の心筋障害に対して改善効果、増悪効果の両方を示した。さらに、心筋障害や薬物の作用をイオンチャンネルやトランスポーターのレベルで解明し、いくつかの治療ターゲットを提案することが出来た。このような研究を積み重ねることで、糖尿病性心不全や心房細動に対する治療薬の開発につながると期待される。

【対象論文】

Haruna Kanae et al., Pathological prolongation of action potential duration as a cause of the reduced alpha-adrenoceptor-mediated negative inotropy in streptozotocin-induced diabetic mice myocardium. *J Pharmacol Sci.* 2017 Oct 31. pii: S1347-8613(17)30174-3. doi:10.1016/j.jphs.2017.10.005.

【参考論文】

Hikaru Tanaka, Haruna Kanae et al., Evaluation of pathological status and drug effects using isolated pulmonary vein preparations. *Curr. Top. Pharmacol.* 19:51-56. 2015.

心筋の興奮収縮機構は主に自律神経によって制御されており、活動電位や細胞内 Ca^{2+} 動態には動物種や病態などにより多様性が認められる。糖尿病では合併症として神経障害や心機能障害が知られており、糖尿病患者の多くに心不全や心房細動がみられる。金江春奈氏は糖尿病モデル動物を用い、糖尿病が心筋の興奮収縮機構とその自律神経刺激応答に与える影響を活動電位と細胞内 Ca^{2+} の観点から明らかにし、心筋障害や薬物の作用をイオンチャネルやトランスポーターのレベルで解明することを目的とした。マウスに膵臓 β 細胞を傷害する streptozotocin を投与し、I 型糖尿病モデルマウスとして実験に用いた。摘出心室筋標本・心房筋標本・肺静脈組織標本および単離心室筋細胞にマグヌス法、活動電位測定はガラス微小電極法、細胞の細胞内 Ca^{2+} 動態および微小形態は落射蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡を用いて解析した。

糖尿病マウス摘出心室筋は正常マウスと比較して収縮力が有意に小さく、弛緩に要する時間は有意に長かった。糖尿病マウスでは正常マウスに比べて活動電位持続時間が有意に長かった。 Ca^{2+} -transient は、糖尿病心筋細胞で振幅が有意に小さく、減衰時間が延長していた。T 管構造や筋小胞体には構造的変化はみられなかった。

β アドレナリン受容体刺激により正常マウス・糖尿病マウスともに陽性変力反応が見られた。 β 作動薬処置下では糖尿病心筋と正常心筋の収縮力差は消失した。 β 作動薬により濃度依存的な弛緩時間の短縮がみられ、糖尿病心筋と正常心筋の弛緩時間の差が消失した。筋小胞体 Ca^{2+} ポンプ (SERCA) 阻害薬により、糖尿病心筋、正常心筋ともに弛緩時間は著明に延長し、弛緩速度を決定する要因が SERCA 活性であることが判明した。糖尿病心筋と正常心筋で SERCA の発現量に差はみられなかったが、制御タンパク質 phospholamban のリン酸化率は糖尿病心筋で有意に低下していた。糖尿病心筋の拡張機能低下は SERCA の制御異常が原因であることが判明するとともに、薬物により糖尿病心筋の弛緩機能を回復させる余地があることが示唆された。

α アドレナリン受容体刺激では正常マウス・糖尿病マウスともに陰性変力反応が見られたが、その程度は糖尿病マウスで有意に減弱していた。 α 受容体刺激による反応は正常マウス・糖尿病マウスともに SEA0400 により抑制されたことから、 Na^+/Ca^{2+} 交換機構の働きを介していることが判明した。 Na^+/Ca^{2+} 交換機構による細胞外への Ca^{2+} 排出は膜電位依存的であるため、糖尿病マウスで生じている活動電位持続時間の延長が Ca^{2+} を排出を抑制していると考えられる。活動電位持続時間を薬理的に変化させる処置を行ったところ、活動電位持続時間と陰性変力反応が逆相関した。糖尿病マウスでみられる α 受容体刺激による陰性変力反応減弱の原因のひとつが、活動電位持続時間の延長であることが判明した。

心房細動発症の原因と考えられている肺静脈心筋の自動能は糖尿病マウスで亢進していた。肺静脈心筋の自発活動は、 Cl^- チャネルを遮断薬や持続性 Na^+ 電流阻害薬により抑制され、これらの機序が心房細動に対する薬物治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

金江春奈氏の研究により、糖尿病モデルマウスにおいて興奮収縮機構とその自律神経伝達物質に対する応答性の変化、弛緩不全や肺静脈自動能亢進など、糖尿病患者の心臓と類似した病態が見出され、モデル動物としての有用性が示された。また、交感神経系が心筋障害に対して改善効果、増悪効果の両方を有することが明らかになった。さらに、心筋障害や薬物の作用をイオンチャネルやトランスポーターのレベルで解明し、いくつかの治療ターゲットを提案することが出来た。金江氏の研究は薬理学研究に大きく貢献するものであり、博士(薬学)に値すると判断する。

平成 30 年 2 月 21 日

東邦大学薬学部薬物学教室

田中 光

