

東邦大学審査学位論文（博士）

博士論文

Streptozotocin 誘発性糖尿病マウス心筋の
興奮収縮機構およびアドレナリン受容体刺激応答

東邦大学 薬学研究科（博士） 医療薬学専攻

金江 春奈

指導：薬物学教室 田中 光 教授

目次

第 1 章 序論	2
第 2 章 実験方法	5
第 1 節 実験動物	5
第 2 節 Streptozotocin 誘発性糖尿病マウスの作製	5
第 3 節 標本の作製	5
第 4 節 摘出右心室標本の収縮力	6
第 5 節 活動電位測定	7
第 6 節 落射蛍光顕微鏡を用いた細胞内事象の画像解析	8
第 7 節 定常状態 Ca^{2+} 濃度の測定	10
第 8 節 共焦点顕微鏡を用いた細胞内事象の画像解析	10
第 9 節 RNA 抽出、RNA 濃度測定、RT-PCR	11
第 10 節 タンパク抽出、タンパク定量、SDS-PAGE、western blot	12
第 11 節 栄養液の組成	13
第 12 節 統計処理	14
第 13 節 使用薬物	14
第 3 章 糖尿病マウス心筋の興奮収縮機構	15
第 1 節 興奮収縮機構	15
第 2 節 考察	29
第 4 章 β アドレナリン受容体刺激応答	33
第 1 節 弛緩機能に対する薬理的検討	33
第 2 節 考察	39
第 3 節 SERCA 活性化薬探索系構築	41
第 4 節 考察	46
第 5 章 α アドレナリン受容体刺激応答	48
第 1 節 基本的性質	48
第 2 節 薬理的検討	49
第 3 節 考察	58
第 6 章 自動能に対する薬理的検討	60
第 1 節 洞房結節自動能	61
第 2 節 肺静脈心筋の基本的性質および交感神経の影響	61
第 3 節 考察	65
第 4 節 肺静脈心筋自発活動に対する薬理的検討	66
第 5 節 考察	71
第 7 章 総括	73
第 8 章 謝辞	74
第 9 章 参考文献	75

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循環に依存しており、心臓は生体内で最も重要な器官の一つである。地球上の動物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。一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。心筋の性質は動物種だけでなく、発達段階、病気の有無、心臓内での部位などによっても異なっていると考えられる。このような心臓機能の多様性を詳細に記述し、その合目的性を考察することにより心臓に対する理解が深まると考える。また、病態時の変化をイオンチャネルやトランスポーターのレベルで解析することにより、新たな治療ターゲットに到達できる可能性もある。

糖尿病における心筋障害

心筋機能障害をもたらす基礎疾患として高血圧や冠動脈疾患に加え、糖尿病が注目されている。糖尿病は心筋梗塞や狭心症などの虚血性心疾患やその他の大血管障害の危険因子とみなされており、これらを合併することで生命予後不良となることが臨床的にも示されている。さらに、糖尿病患者における死亡の主要な原因が心臓・血管系の障害であるとも言われており、糖尿病性心筋障害(Diabetic cardiomyopathy)は、『冠動脈狭窄や高血圧の基礎疾患がなく、心筋肥大、心筋間質の線維化、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的組織所見を有する』と定義されている。糖尿病性心筋障害の発生機序は明らかではないが、高血糖や酸化ストレスの関与が指摘されている (Kayama *et al.*, 2015)。また、心筋細胞内のカルシウム輸送障害やエネルギー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、様々な糖尿病モデル動物でも心筋の拡張機能障害が報告されている。この拡張機能障害は、明らかな心不全症状が出現する前から存在するとも報告されている (Barry A. Borlaug and David A. Kass., 2006)。

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 (α および β 受容体) に作用して心拍数や収縮力を増大させ、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 β 受容体刺激 (特に β_1 受容体) による細胞内サイクリック AMP (cyclic AMP : cAMP) の上昇、それに続く L 型 Ca^{2+} チャネルや筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum : SR) 機能の活性化により達成され则认为されている。糖尿病ラットの心筋では β_1 、 β_2 受容体のタンパク発現量が減少しており (Dincer *et al.*, 2001)、 β 受容体刺激に対する陽性変時反応および陽性変力反応も減弱していることが報告されている (Dincer *et al.*, 1998、Kamata *et al.*, 2006)。また、 α 受容体刺激によって生じる陽性変力反応

が増大することも報告されている (Kamata *et al.*, 1997、Kamata *et al.*, 2006)。さらに糖尿病心筋では、受容体刺激のシグナル伝達によって影響を受ける L 型 Ca^{2+} チャネル、SR、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger : NCX) 機能にも影響が出ていると報告されている (Jourdon and Feuvray, 1993、Golfman *et al.*, 1998、Zhong *et al.*, 2001)。

これらの要因は、興奮収縮機構に影響を与え、薬物に対して正常時とは異なる反応を引き起こす可能性がある。糖尿病により引き起こされる心筋障害についてより理解を深めるためには、糖尿病モデル心筋の基本的性質を分子レベルで理解することが有効である。

心筋の興奮収縮機構

心臓の興奮収縮機構は洞房結節から生じる活動電位が刺激となり、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、心筋が収縮する。この心筋収縮の引き金となるカルシウムイオン(Ca^{2+})は、細胞膜の脱分極によって開口した電位依存性 L 型 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、細胞膜が細胞中心部に向かって陥入している T 管が存在しており、L 型 Ca^{2+} チャネルが高密度に分布している。この L 型 Ca^{2+} チャネルから流入した Ca^{2+} が引き金となり、筋小胞体(SR)のうち T 管と至近距離で対峙している junctional SR の ryanodine 受容体が開口し、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する。収縮時の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は主としてこの SR からの Ca^{2+} 放出(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release : CICR)により引き起こされている。 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 Ca^{2+} は、主に SR の ATP 依存性 Ca^{2+} ポンプ(sarco(endo)plasmic reticulum 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(NCX)によって細胞外に排出され、その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度が減少し、心筋は弛緩する。このように、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化に直接関与する L 型 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おり、動物種や発達段階や病気の有無によって細胞内 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。

マウスの心筋の特徴

心筋収縮の引き金としての役割を担っている活動電位の波形は、動物種によって異なる特徴が見られ(Binah *et al.*,1987)、また病態によってもその特徴が変化することが知られている。例えばヒトやモルモットなど多くの動物の心筋の活動電位は 200~300 msec 程度の明確なプラトー相を有することが知られているが、成体マウス心筋は活動電位持続時間(action potential duration : APD)が著しく短く、プラトー相を欠く波形が特徴的である。これは活動電位を形成するイオンチャネル、特に K^+ チャネルの種類や発現量が動物種により異なるためであると考えられている。また、糖尿病モデル動物でも活動電位を形成するイオンチャネルに影響が及んでいると考えられており、実際に糖尿病マウスの単離心筋細胞では正常マウスのもものと比べて活動電位持続時間が延長しているという報告もある(Meo *et al.*, 2016)。

マウスは病態モデルや遺伝子改変動物としての汎用性が高く、心重量当たりの筋小胞体 (SR) 量や ATP 依存性 Ca^{2+} ポンプ (SERCA) 活性が他の動物種と比べて高いことが報告されている (Hamilton and Ianuzzo, 1991)。さらにマウス心室筋の収縮は SR から放出される Ca^{2+} に強く依存している (Tanaka *et al.*, 2009)。従って、SR 機能の観点から興奮収縮機構の検討を行うことに適した動物種であると言える。また、当研究室ではこれまでに発達変化の研究を通して、活動電位持続時間 (APD) と心収縮力に対する刺激応答の関連性を明らかとしてきた (Hamaguchi *et al.*, 2013)。このことから、活動電位持続時間 (APD) と心収縮力に対する刺激応答の関連性を病態時心筋においても検討することは大変興味深いと言える。また、マウス心筋は交感神経による支配を強く受けているため、自律神経障害を特に交感神経に焦点を当てて検討することが可能である。このように、マウスの心臓は必ずしもヒトの心臓と類似しているわけではないが、基礎研究を進める上で興味深い様々な特徴を有している。

本研究の目的

本研究では、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、心筋障害の機序や薬物に対する反応性の差を、イオンチャンネルやトランスポーターのレベルで解明することを目的とした。

第 3 章では、基本的な興奮収縮機構の変化を明らかにするため、活動電位波形、 Ca^{2+} transient、収縮・弛緩を定量的に比較した。

第 4 章では、交感神経による心機能制御の主役である β アドレナリン受容体刺激に対する応答性を検討するとともに、心筋の拡張機能を改善する薬物の効果を検討した。

第 5 章では、マウスに特徴的な α アドレナリン受容体刺激に対する陰性変力反応に注目し、活動電位波形と変力反応の関係性について検討した。

第 6 章では、心房細動発症と関係が深い肺静脈心筋自動能に注目し、電氣的自発活動の発生に関与するイオンチャンネルやトランスポーターについて検討した。

第2章 実験方法

第1節 実験動物

ddY 系雄性マウスを三協ラボサービスより、C57BL/6J 系雄性マウスを日本クレアより購入し、東邦大学薬学部実験動物センターにて飼育（6～8 週間）した後、使用した。

全ての実験は、“東邦大学動物実験等の実施に関する基本指針”および日本薬理学会の定める“Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals”に従って行った。

第2節 STZ 誘発性糖尿病マウスの作製

ddY 系マウス（4 週齢）、C57BL/6J 系マウス（8 週齢）にクエン酸水溶液(pH 5.0、0.1 M)に融解させた streptozotocin(STZ)を腹腔内投与(200 mg/kg)し、東邦大学薬学部実験動物センターで 6～8 週間飼育した。この streptozotocin 投与マウスの尾静脈より採血し、遠心分離（3000 rpm、10 min）をして血清を得た。血糖値測定キットのグルコース C II -テストワコー（和光純薬）を用いて血清を発色させ吸光度を測定した。この吸光度とブドウ糖標準液を用いてあらかじめ作製した検量線より血糖値を求めた。非絶食時の血糖値が 350 mg/dL 以上の streptozotocin 投与マウスを糖尿病マウス (STZ) とし実験に用いた。対照群 (control) として、streptozotocin の代わりにクエン酸水溶液(0.1 M)を投与したのを用い、血糖値が 350 mg/dL 以下のものを用いた。

第3節 標本の作製

1) 右心室筋標本

マウスを頸椎脱臼させ、直ちに開胸、心臓を摘出し予め室温下で 95%O₂-5%CO₂ 混合ガスを飽和させておいた栄養液（Krebs-Henseleit：組成は本章第 6 節に記載）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し、これを実験に用いた。

2) 心房筋標本

上記と同様に、開胸後、心室と心房を分離し、血管などの組織を取り除いたのち左右の心房を分離したものと、分離しなかったもの、それぞれを用いた。

3) 肺静脈心筋標本

上記と同様に、開胸後、心肺を摘出。あらかじめ 95%O₂-5%CO₂ 混合ガスを十分に通気した栄養液中で心室と心房、肺静脈とに分離した。マウスの肺は左肺に一葉、右肺は四葉に分かれているが、右肺を右上(RS)と右下(RI)、左肺を左(L)に分け、実体顕微鏡下で肺組織と肺静脈組織とを丁寧に分離して計 3 本の肺静脈標本を作製した。

4) 単離心室筋細胞

冠動脈より collagenase(ヤクルト)を灌流させることにより単離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)を満たしたカニユーレを挿入し、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。

Ca²⁺除去 Tyrode 液(約 20分)

Collagenase(0.2 mg/ml)添加 Ca²⁺除去 Tyrode 液(約 30分)

Ca²⁺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 μm 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% O₂ で十分に通気しておき、36 ± 0.5°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。

第 4 節 摘出右心室筋標本の収縮力測定

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、ダイヤメデイカル) 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 msec、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、等尺性に収縮力を測定した。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。Organ bath 内の液温は 36 ± 0.5°C に保った。得られた張力はアイソメトリック・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、Power Lab (AD Instruments) からの電気信号をパーソナルコンピュータに取り込み、Lab Chart v7.1 (AD Instruments) により記録、解析を行った。

第5節 活動電位測定

1) 摘出右心室標本の活動電位

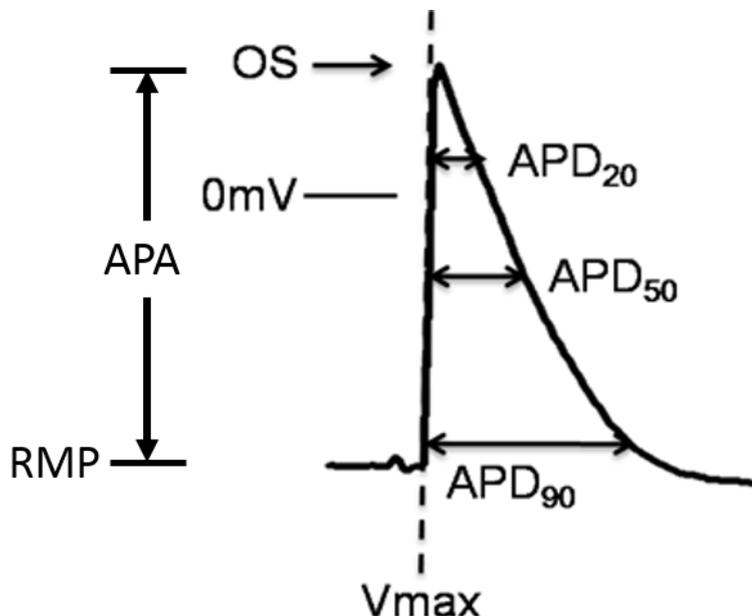
心室筋組織標本の一端を 20 ml の栄養液を満たした organ bath 内のシリコンブロック上に虫ピンで固定し、他方を刺激装置と接続した白金双極電極で水平に保持した後、持続時間 1 msec、閾値の 1.5 倍の矩形波により 1 Hz の定頻度刺激を与えた。Organ bath 内の温度を $36 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に保ち、30 分から 60 分の incubation 後に活動電位の記録を開始した。細胞内活動電位は 3 M KCl 溶液を充填したガラス微小電極 (CD-2、KEN ENTERPRIZE) を細胞内に刺入し、電極内のプローブから得た電気信号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-5135、KENWOOD) でモニターしつつ、微小電極用アンプ (MEZ-8201、日本光電) を介して、パーソナルコンピュータ (富士通) に取り込んだ。活動電位波形は Power Lab (AD Instruments) からの電気信号をパーソナルコンピュータに取り込み、Lab Chart v7.1 (AD Instruments) により記録、解析を行った。

2) 肺静脈心筋の活動電位

20 mL の栄養液を満たした organ bath 底にシリコンブロックを設置し、標本をステンレス製ピンで水平に固定した。栄養液中の温度は $36 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に保った。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を肺静脈心筋では内腔側から刺入し、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、Power Lab (AD Instruments) からの電気信号をパーソナルコンピュータに取り込み、Lab Chart v7.1 (AD Instruments) により記録、解析を行った。自発活動を示さない肺静脈標本に対しては、stimulator (SEN-3201、日本光電) で frequency 1 Hz、duration 3 msec の刺激を発生させ、白金双極電極から標本に閾値の 1.5 倍の強度の電圧で刺激した。

3) 活動電位波形における各パラメーター

1Hz 刺激下の活動電位パラメーターを以下のように定義した。



OS : overshoot (mV)

APA : action potential amplitude (mV)

APD₂₀ : action potential duration at 20% repolarization (msec)

APD₅₀ : action potential duration at 50% repolarization (msec)

APD₉₀ : action potential duration at 90% repolarization (msec)

Vmax : maximum rate of rise (V/sec)

RMP : resting membrane potential (mV)

第6節 落射蛍光顕微鏡を用いた細胞内事象の画像化解析

1) Ca²⁺ transientの測定

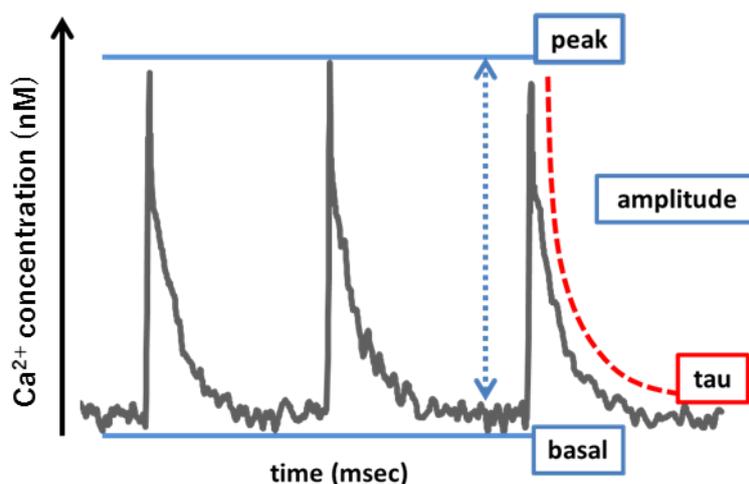
調製したマウス単離心室筋細胞を用い、カルシウムイオン蛍光プローブである Indo-1 のアセトキシメチル体(AM 体)を使用し、落射蛍光顕微鏡(Olympus、IX70)を用いて、画像化解析実験を行った。ガラス製チャンバー内に移した単離心室筋細胞に KB 液中で indo-1AM 体を 5 μ M になるように加え、遮光の下 37°C で 30 分間放置することで蛍光プローブの取り込みを行った。Ca²⁺除去 Tyrode 液、Normal Tyrode 液の順でチャンバー内に灌流させ、その後、チャンバー内に設置した白金双電極を用いて、刺激装置(DPS-07、ダイヤモンドカル)からの刺激(持続時間 3 ms)により標本を 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 \pm 0.5°C で行った。Indo-1 は 351 nm の光を励起光とし、405 \pm 10 nm と 480 \pm

10 nm の蛍光を検出し、画像化した。蛍光画像は高速冷却 CCD カメラ(HiSCA CCD CAMERA C6790、浜松ホトニクス)を用いて、1.95 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)を解析ソフトウェア(アクアコスモス Ver.2.5、浜松ホトニクス)を用いてグラフ化した。

2) 平均蛍光強度比の経時変化グラフの解析法

経時変化グラフより平均蛍光強度比を解析し、basal (nM)、peak (nM)、amplitude (nM)、減衰時間 tau (msec) を以下のように定義した。

Ca²⁺ transient



3) 細胞内 Ca²⁺濃度のキャリブレーション法

Ca²⁺濃度は Ca²⁺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_{min})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_{max})として検量線を作成することで計算した(Tanaka *et al.*, 1996)。

Ca²⁺濃度の計算式

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

K_d = 250 nM

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

F_{free} = Indo-1 + Ca²⁺ free の蛍光波長 480 nm に対する蛍光強度

F_{bound} = Indo-1 + NT の蛍光波長 480 nm に対する蛍光強度

R_{min} = 最小蛍光強度比

R_{max} = 最大蛍光強度比

第7節 定常状態 Ca^{2+} 濃度の測定

調製したマウス心室筋細胞をガラス製チャンバーに移し Fura-2AM 体を KB 液で最終濃度が 10^{-5} M になるように加え、 37°C 、遮光の下、30~60 分間放置することで取り込ませた。 Ca^{2+} -free HEPES Tyrode 液、HEPES 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 1 Hz で駆動した。正常な収縮が起こっている事を確認したのち刺激を切り、少なくとも 10 分間、蛍光強度比が安定している細胞を用いた。 340 ± 20 nm および 380 ± 20 nm の光を励起光とし、ダイクロイックミラーを用いて、510 nm 以上の蛍光を検出、画像化した。蛍光画像は高速冷却 CCD カメラ (HiSCA CCD CAMERA C6790、浜松ホトニクス) を用いて、5 sec 毎に取得し、10~15 分間測定し、細胞質領域内の平均蛍光強度比 (画素毎) の経時変化 (F340/F380) を解析ソフトウェア (アクアコスモス Ver.2.5、浜松ホトニクス) を用いてグラフ化した。測定は $36 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で行った。

第8節 共焦点顕微鏡を用いた細胞内事象の画像解析

1) 細胞形態の観察

調製したマウス単離心室筋細胞を用いて、細胞膜蛍光プローブである PKH67-GL を使用し、共焦点レーザー顕微鏡システム A1R (Nikon 社) 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 PKH67-GL を $5 \mu\text{M}$ となるように加え、室温、遮光のもと、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。測定は室温で行い、レーザーユニット LU-N4 (Nikon 社) を用いて、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。

2) 筋小胞体 (SR) 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-TrackerTMBlue-White DPX を使用し、共焦点レーザー顕微鏡システム A1R (Nikon 社) を用いて、画像解析を行った。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-TrackerTMBlue-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。測定は室温で行い、レーザーユニット LU-N4 (Nikon 社) を用いて、405 nm で細胞を励起し、 450 ± 25 nm の蛍光を検出し、画像化した。

第9節 RNA抽出、RNA濃度測定、RT-PCR

単離したコントロールおよび糖尿病モデルマウスの心室筋組織から RNA の抽出を行った。RNA の抽出には mirVana™ miRNA Isolation Kit (Life Technologies) を用いた。

凍結したサンプルを二重にしたラップの上から、ハンマーで粉砕した。粉砕したサンプルをチューブに入れ、そこに Lysis/Binding Buffer を加えホモジナイズした。ホモジナイズ後、RNA Homogenate Addition 1/10 量加え、軽く転倒混和した。氷上で 10 分静置後、Acid Phenol CHCl₃ を Buffer と等量加えた。新しいチューブに全量移し、ボルテックスした。5 分、15000rpm で遠心後、上層を新しいチューブに移した。そこに 1.25 倍量の ethanol を加え、転倒混和した。Collection tube にフィルターを付け、全量移し 15 秒、15000 rpm で遠心した。通過液を捨て、mRNA Wash Solution 700 μl を加え、先程と同様に遠心した。通過液を捨て、Wash Solution 2/3 500 μl を加え同様に遠心した。もう 1 度 Wash Solution 2/3 500 μl を加え遠心した。通過液を捨て、空のまま 1 分、15000 rpm で遠心後、新しい collection tube にフィルターを移し、95°C に温めた elution Solution 100 μl を加え、1 分、15000 rpm で遠心した。通過液をサンプルとし、-80°C で保存した。抽出した RNA 濃度を NANO DROP LITE (Thermo Scientific) を用いて測定した。測定した濃度を参考に、合成した cDNA を qRT-PCR で定量した。cDNA は、KOD SYBR[®] qPCR Mix (Toyobo) で調製し、7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で解析を行なった。

qRT-PCR 反応液の調製(total RNA)

	1 反応あたり
KOD SYBR [®] qPCR Mix	5.00 μl
Forward Primer	0.20 μl
Reverse Primer	0.20 μl
50 × ROX reference dye	0.02 μl
DNA Sample	0.10 μl
Nuclease free water	4.48 μl
Total	10.00 μl

反応時間

98°C	2 分	} 40 cycles
98°C	10 秒	
60°C	10 秒	
68°C	30 秒	

qRT-PCR に用いたプライマー情報

Primer	配列 (5'-3')
NCX (F)	TGACAAGCAGCCACTGACCAGCAAAG
(R)	AACTGCTCTCTCCAGCTGTTGGTCCC
HPRT (F)	GATGATGAACCAGGTTATGACCTAG
(R)	GCTTTAATGTAATCCAGCAGGTCAG

F: Forward primer, R: Reverse primer.

第 10 節 タンパク質抽出、タンパク質定量、SDS-PAGE、western blot

単離したコントロールおよび糖尿病モデルマウスの心房、心室、肺静脈からタンパク質の抽出を行なった。

凍結した組織標本のサンプルを二重にしたラップの上から、ハンマーで粉碎した。粉碎したサンプルをあらかじめ homogenize buffer(10 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, pepstatine A, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor Cocktail, pH 7.4) を分注しておいたチューブに入れ、ホモジナイズした。ホモジナイズ後、4°C、10 分、1500 rpm で遠心後、上清を新しいチューブに移し、蛋白定量した。

1.5 ml チューブに Quick Start™ Bradford Dye Reagent (Bio-Rad) 500 µl を分注し、Pre-Diluted Protein Assay Standards: Bovine Serum Albumin (BSA) Set (Thermo Scientific) を用いて 125~1000 µg/ml のスタンダード溶液を調製した。サンプルは 250~500 µg/ml の間になるよう調製した。調製した溶液の吸光度を Tristar LB 941 (Berthold Technologies) で測定した。測定した吸光度を用いて濃度を算出した。

抽出した蛋白 50 µl、6× Sample Buffer 7 µl、1M DTT 3 µl を混合し、95°C、5 分ボイルした。ボイル後、すぐに氷上に置き、4°C、2 分、15000 rpm で遠心した。50 µg/レーンになるように上部からサンプル溶液を取り、4~20% gradient gel にアプライした。アプライ後、20 mA で SDS-PAGE を行なった。

SDS-PAGE をしたゲルを PVDF membrane に乗せ、2 時間 40 分、45 mA で膜転写を行なった。転写後、5 % skim milk でブロッキングし、一晩、一次抗体につけた。翌日、TBS-T 30 ml で 5 分×3 回 wash し、二次抗体に 1 時間つけた。TBS-T 30 ml で 5 分×3 回 wash し、enhanced chemiluminescence(ECL)で検出し、Amersham Imager 600 (GE ヘルスケア・ジャパン)で解析した。検出後、membrane を Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific)に 1 時間つけた。TBS-T 30 ml で 5 分×3 回 wash し、一次抗体に一晩つけた。データ解析は ImageJ を使用し、バンドの濃淡を数値化した。数値化したデータを GAPDH で標準化し、グラフ化した。

Western blot で使用した抗体

A. 一次抗体の名前・濃度・会社名

抗体名	濃度	会社名
SERCA2 (2A7-A1)	1/1000	Thermo Scientific
β 1-AR (sc-568) ¹⁷⁾	1/2000	Santa Cruz Biotechnology
β 2-AR (AAR-016)	1/2000	alomone labs
PLB Phospho Ser ¹⁶ (A010-12AP)	1/10000	Badrilla
PLB A1 (A010-14)	1/10000	Badrilla
GAPDH (MAB374)	1/5000	Millipore

B. 二次抗体の名前・濃度・会社名

抗体名	濃度	会社名
Anti-mouse IgG (NA9310V)	1/20000	GE Healthcare
Anti-rabbit IgG (NA934V)	1/20000	GE Healthcare

第 11 節 栄養液の組成

Krebs-Henseleit (mM)

NaCl:118.4, KCl:4.7, MgSO₄:1.2, CaCl₂:2.5, KH₂PO₄:1.2, NaHCO₃:24.9, glucose:11.1

Normal Tyrode液 (mM)

NaCl:143.0, KCl:5.4, MgCl₂:1.0, CaCl₂:1.8, KH₂PO₄:0.33, HEPES:5.0, glucose:5.5, pH7.4 with NaOH

Ca²⁺除去Tyrode液 (mM)

NaCl:143.0, KCl:5.4, MgCl₂:1.0, KH₂PO₄:0.33, HEPES:5.0, glucose:5.5, pH7.4 with NaOH

KB液 (mM)

Glutamic acid:70.0, taurine:15.0, KCl:30.0, KH₂PO₄:10.0, MgCl₂:0.5, HEPES:10.0

Glucose:11.0, EGTA:0.5, pH7.4 with KOH

第12節 統計処理

数値は平均値±標準誤差で示した。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。肺静脈の自発活動発生率の比較には、 χ^2 検定を行った。いずれの場合も $p < 0.05$ を統計的に有意とみなした。

第13節 使用薬物

4-aminopyridine : 4-AP (東京化成工業株式会社)

Atropine (Wako)

Cyclopiazonic acid : CPA (和光純薬、SIGMA)

Dimethyl sulfoxide : DMSO (和光純薬)

Fura-2acetoxymethyl ester (同仁化学研究所)

GS-458967

Indo-1 acetoxymethyl ester (同仁化学研究所)

Isoproterenol (SIGMA)

Nifedipine (SIGMA)

Noradrenaline (Wako)

Phenylephrine : PE (SIGMA)

Prazosin (SIGMA)

Propranolol (SIGMA)

Ryanodine (SIGMA)

Ryanodine (Wako)

SEA0400

Streptozotocin(SIGMA)

Xestspingin C (Wako)

クエン酸一水和物 (和光純薬)

Ellagic acid (SIGMA)

Cromakalim (SIGMA)

第3章 糖尿病マウス心筋の興奮収縮機構

心筋の収縮・弛緩においては、活動電位に伴うL型Ca²⁺チャネルの開口によるCa²⁺流入や筋小胞体(SR)のCa²⁺放出と取り込み、NCXを介した細胞外へのCa²⁺汲み出しが重要な役割を担う。これらの機能タンパク質の働きで生じるCa²⁺濃度の上昇と下降(Ca²⁺ transient)は収縮・弛緩の強さと時間経過を決定する。マウスは他の動物種と比較して活動電位持続時間が短くプラトー相を欠く波形を有しており(Tanaka *et al.*, 1998)、心重量あたりの筋小胞体(SR)量やATP依存性Ca²⁺ポンプ(SERCA)活性が他の動物種に比べて高いという特徴を有する(Hamilton and Ianuzzo., 1991)。糖尿病心筋では、エネルギー代謝異常により様々なイオンチャネルの変化やCa²⁺輸送障害が生じることが知られているが、特徴的な興奮収縮機構を有するマウスにおいては、糖尿病により特徴的な変化が見られるはずである。

本章では、心筋の興奮収縮機構に対する糖尿病の影響を明らかにすることを目的とし、正常マウス・糖尿病マウス間で摘出心筋の活動電位波形、Ca²⁺ transient、収縮・弛緩を比較・検討した。

第1節 興奮収縮機構

1) 1 Hz 電気刺激下の活動電位の比較

1) -1 右心室筋

正常マウス(n=6)・糖尿病マウス(n=6)心室筋ともに、1 Hz 刺激に応じて活動電位が発生した。両群を比較すると、活動電位波形の静止膜電位(resting membrane potential: RMP)、OS (overshoot)、APA (action potential amplitude) に差は見られなかった。活動電位持続時間(APD)については、APD₂₀ (action potential duration at 20% repolarization)、APD₅₀ (action potential duration at 50% repolarization) が糖尿病マウスで延長していた。 \dot{V}_{max} (maximum rate of rise) は糖尿病マウスで低下していた。(図 3-1、表 3-1)

1) -2 左心房筋

正常マウス(n=6)・糖尿病マウス(n=8)左心房筋ともに、1 Hz 刺激に応じて活動電位が発生した。両群を比較すると、活動電位波形のRMP、OS、AMP に差は見られなかった。APD₂₀、APD₅₀ が糖尿病マウスで延長しており、 \dot{V}_{max} は糖尿病マウスで低下していた。(図 3-2、表 3-2)

1) -3 肺静脈心筋

自発活動を有していない肺静脈心筋に 1 Hz 刺激を与えると、正常マウス (n=17)・糖尿病マウス (n=13) とともに活動電位が発生した。両群を比較すると、活動電位波形の RMP、OS、AMP に差は見られなかった。APD₂₀、APD₅₀ が糖尿病マウスで延長しており APD₉₀ は糖尿病マウスで短縮していた。 \dot{V}_{max} は糖尿病マウスで低下していた。(図 3-3、表 3-3)

1) -4 肺静脈心筋 1 Hz 活動電位に対する薬理的検討

自発活動を有していない肺静脈標本に 1 Hz 刺激を与え、一過性外向き電流 I_{to} 阻害薬 4-aminopyridine (4-AP: 3 mM) を処置したところ、正常マウス (n=4)・糖尿病マウス (n=2) とともに APD₂₀、APD₅₀ の延長が見られたが、その延長は正常マウスで大きかった (図 3-4、表 3-4)。

2) Ca²⁺ transient の比較

落射蛍光顕微鏡を用いて、単離心室筋細胞に Ca²⁺ 蛍光プローブである Indo-1 を取り込ませ、画像解析を行った。正常マウス (n=13)・糖尿病マウス (n=9) とともに刺激に応じて Ca²⁺ transient が発生した。正常マウスと比較して、糖尿病マウスでは Ca²⁺ transient の peak 値の低下、basal 値の上昇、amplitude の減少、減衰時間 tau の延長が起きていた。(図 3-5、表 3-5)

3) 収縮力

3) -1 収縮力の比較

正常マウス (n=23)・糖尿病マウス (n=18) 右心室筋標本を 1 Hz 電気刺激で駆動し、収縮力を測定したところ、糖尿病マウスの心収縮力は正常マウスと比較して、低下していた。収縮時間 (time to peak tension: TTP) は差が見られず、90% 弛緩時間 (time to 90% relaxation: TR₉₀) は正常マウスと比較して、延長していた。(図 3-6、表 3-6)

3) -2 L 型 Ca²⁺ チャンネルに関する検討

正常マウス (n=10) と糖尿病マウス (n=7) に nifedipine (10⁻⁶ M) を処置したところ、両群ともに陰性変力反応を示した。その作用に両群間で差は見られなかった (図 3-7、3-8)。

3) -3 Ryanodine 受容体に関する検討

正常マウス (n=6) と糖尿病マウス (n=3) に ryanodine (10⁻⁸ M) を処置したところ、両群ともに陰性変力反応を示した。その作用に両群間で差は見られなかった (図 3-9、3-10)。

3) -4 ATP 依存性 Ca^{2+} ポンプ (SERCA) に関する検討

収縮力測定において、正常マウス (n=7)・糖尿病マウス (n=7) とともに SERCA 阻害薬である cyclopiazonic acid (CPA ; 10^{-5} M) 処置により、収縮力は減少し、弛緩時間は延長した (図 3-11、3-12、表 3-7)。 Ca^{2+} transient の減衰時間 τ は正常マウス・糖尿病マウスともに延長した。その反応性は糖尿病マウス < 正常マウスであった (図 3-13、表 3-8)。

4) 細胞形態の観察

筋小胞体 (SR) は細胞質全体に分布していた。筋小胞体を染める ER-Tracker™ Blue-White DPX の蛍光は、収縮タンパク質に排除されるように心室筋細胞の長軸方向に平行な縞模様を形成していた。一方、細胞膜を染める PKH67-GL は、細胞の全周に加え、細胞の長軸に垂直な方向に約 2 ミクロン間隔で存在する T 管構造を染め出した。筋小胞体、T 管、いずれの構造にも、正常マウス、糖尿病マウス間での差は見られなかった (図 3-14)。

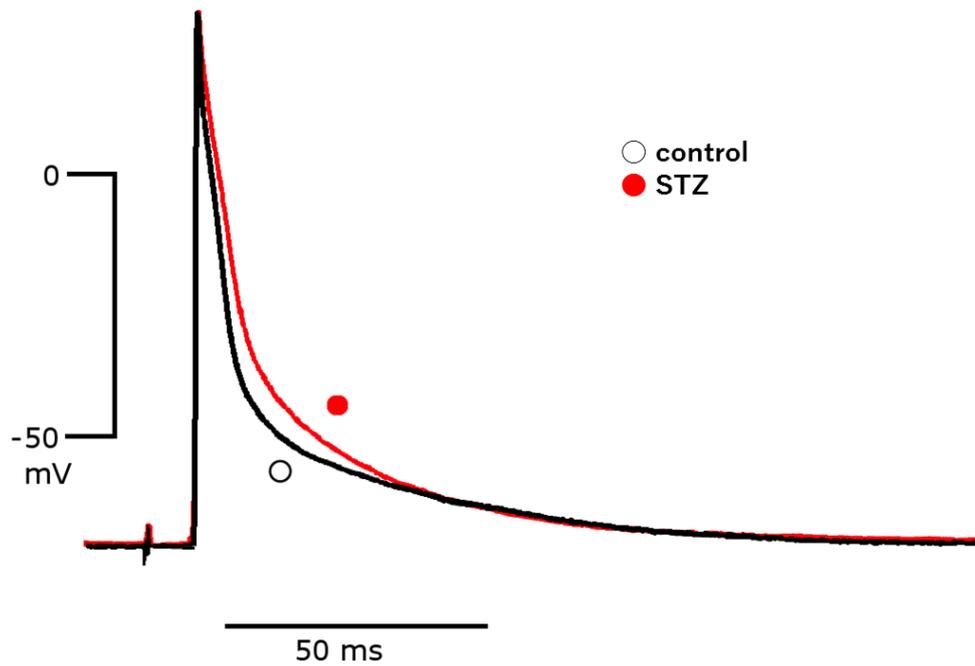


図 3-1 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋の活動電位波形

	control (n=6)	STZ (n=6)
RMP (mV)	-72.0 ± 0.3	-71.0 ± 0.6
APA (mV)	96.9 ± 2.2	93.3 ± 2.2
OS (mV)	24.9 ± 2.2	21.6 ± 2.5
APD ₂₀ (msec)	2.5 ± 0.1	4.3 ± 0.6*
APD ₅₀ (msec)	5.8 ± 0.3	8.7 ± 1.0*
APD ₉₀ (msec)	45.1 ± 3.8	44.3 ± 4.9
\dot{V}_{max} (V/sec)	308.3 ± 11.4	219.5 ± 30.5*

*p<0.05 v.s. control

表 3-1 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋の活動電位パラメーター

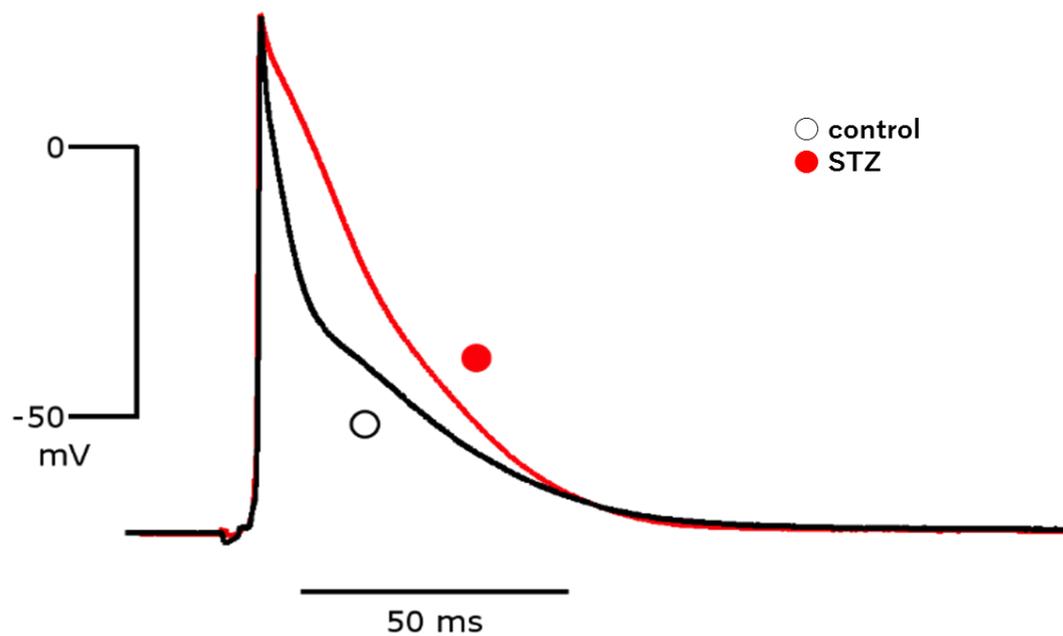


図 3-2 正常マウスおよび糖尿病マウス左心房筋の活動電位波形

	control (n=6)	STZ (n=8)
RMP (mV)	-75.5 ± 1.0	-75.0 ± 1.2
APA (mV)	95.0 ± 2.5	95.4 ± 1.2
OS (mV)	19.5 ± 1.9	20.4 ± 1.1
APD ₂₀ (msec)	4.1 ± 0.5	8.6 ± 1.0 **
APD ₅₀ (msec)	10.0 ± 1.1	17.5 ± 1.4 **
APD ₉₀ (msec)	52.3 ± 4.1	48.5 ± 2.9
\dot{V}_{max} (V/sec)	210.7 ± 21.7	146.2 ± 13.9 *

*p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.001 v.s. control

表 3-2 正常マウスおよび糖尿病マウス心房筋の活動電位パラメーター

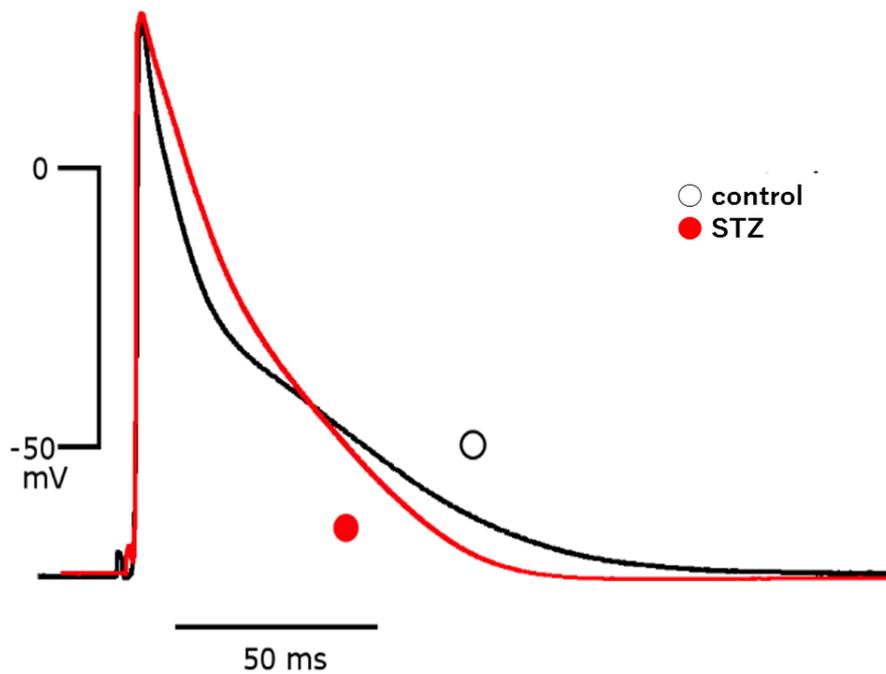


図 3-3 正常マウスおよび糖尿病マウス肺静脈心筋に対する 1 Hz 電気刺激下活動電位波形

	control (n=17)	STZ (n=13)
RMP (mV)	-72.0 ± 0.9 [#]	-71.0 ± 0.6 ^{##}
APA (mV)	96.6 ± 1.6	93.7 ± 1.8
OS (mV)	24.6 ± 1.3 [#]	22.7 ± 1.5
APD ₂₀ (msec)	4.12 ± 0.2	7.3 ± 0.8 ****
APD ₅₀ (msec)	11.5 ± 0.5	17.4 ± 1.6 ***
APD ₉₀ (msec)	83.5 ± 8.2 [#]	61.2 ± 1.7 *###
\dot{V}_{max} (V/sec)	231.4 ± 14.6	189.9 ± 11.4 *#

*p < 0.05, ***p < 0.005, ****p < 0.001 v.s. control

[#]p < 0.05, ^{##}p < 0.01, ^{###}p < 0.005 v.s. 左心房筋

表 3-3 正常マウスおよび糖尿病マウスの肺静脈心筋の活動電位パラメーター

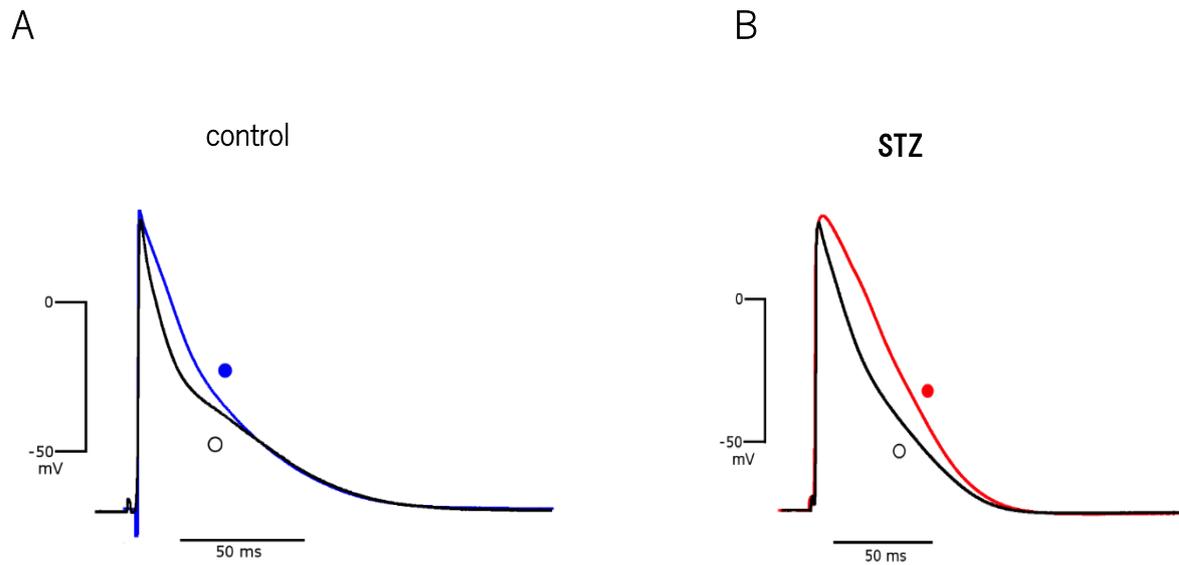


図 3-4 正常マウスおよび糖尿病マウス肺静脈心筋の 4 aminopyridine (4-AP;3 mM)処置による活動電位波形変化

A : 正常マウスの活動電位変化 (○; 4-AP 処置前、●; 4-AP 処置後)

B : 糖尿病マウスの活動電位変化 (○; 4-AP 処置前、●; 4-AP 処置後)

	control (n=4)	control 4-AP 処置	STZ (n=2)	STZ 4-AP 処置
RMP (mV)	-69.88 ± 2.83	-67.3 ± 3.2	-72.9 ± 1.9	-69.0 ± 0.2
APA (mV)	92.85 ± 5.45	89.5 ± 7.7	90.1 ± 0.1	86.8 ± 1.0
OS (mV)	22.97 ± 3.07	22.2 ± 5.0	17.2 ± 1.8	17.8 ± 1.1
APD ₂₀ (msec)	5.05 ± 0.95	14.6 ± 1.9	7.0 ± 1.0	13.9 ± 0.7
APD ₅₀ (msec)	13.5 ± 1.95	28.7 ± 2.3	16.3 ± 3.2	25.7 ± 2.3
APD ₉₀ (msec)	81.9 ± 11.3	85.1 ± 6.2	59.2 ± 4.3	64.6 ± 0.6
\dot{V}_{max} (V/sec)	234.5 ± 74.5	191.7 ± 97.3	195.4 ± 8.6	111.9 ± 55.7

表 3-4 正常マウスおよび糖尿病マウスの 4-AP (3 mM) 処置による活動電位パラメーターの変化

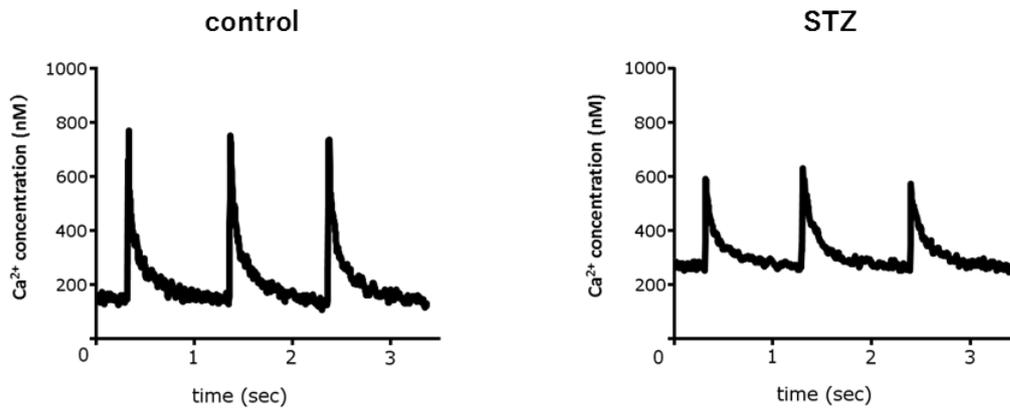


図 3-5 正常マウスおよび糖尿病マウス単離心室筋細胞の Ca^{2+} transient

	control (n=13)	STZ (n=9)
peak (nM)	714.9 ± 35.3	601.6 ± 22.1*
basal (nM)	144.5 ± 13.3	222.7 ± 16.1*
amplitude (nM)	570.4 ± 42.1	378.8 ± 20.5*
tau (ms)	111.4 ± 4.4	151.2 ± 3.9*

*p<0.05 v.s. control

表 3-5 正常マウスおよび糖尿病マウス単離心室筋細胞の Ca^{2+} transient パラメーター

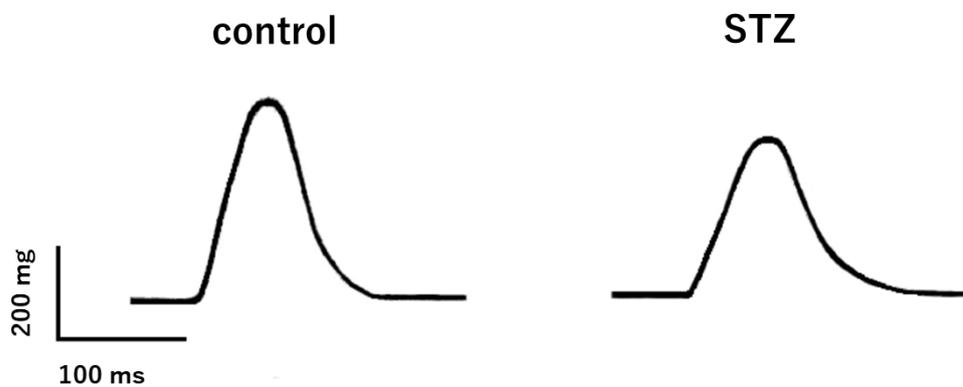


図 3-6 正常マウスおよび糖尿病マウスの単離右心室筋収縮力波形

	control (n=23)	STZ (n=18)
収縮力 (mg/mm ²)	151.4 ± 14.2	103.9 ± 7.8*
静止張力 (mg/mm ²)	154.1 ± 10.3	99.7 ± 11.3*
収縮時間 (ms)	45.7 ± 0.8	44.4 ± 1.1
90%弛緩時間 (ms)	58.4 ± 0.9	65.6 ± 1.3*

*p<0.05 v.s. control

表 3-6 正常マウスおよび糖尿病マウスの単離右心室筋収縮力パラメーター

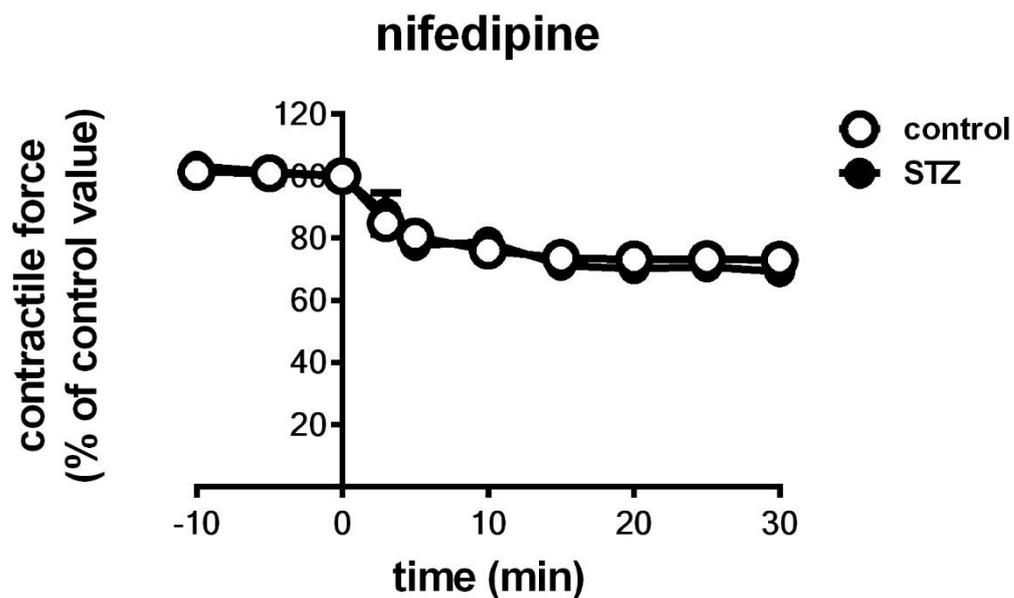


図 3-7 正常マウスおよび糖尿病マウス心筋収縮力に対する nifedipine(10^{-5} M)の作用

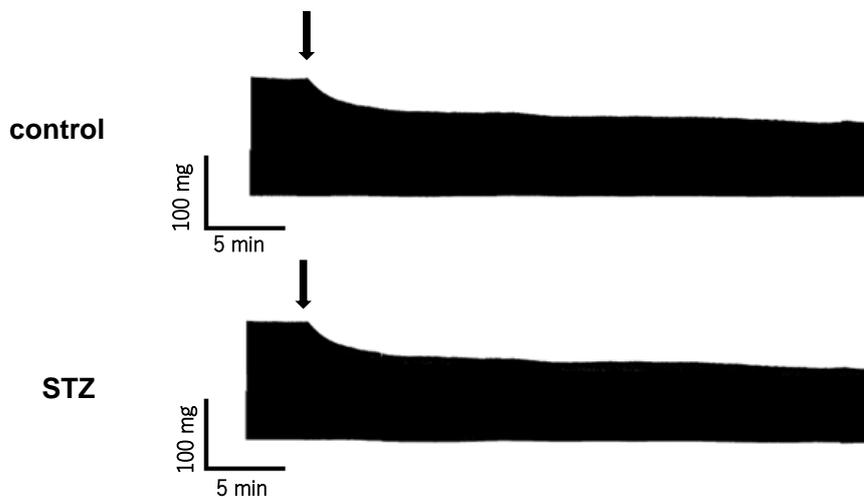


図 3-8 正常マウスおよび糖尿病マウス心筋収縮力に対する nifedipine(10^{-5} M)の作用

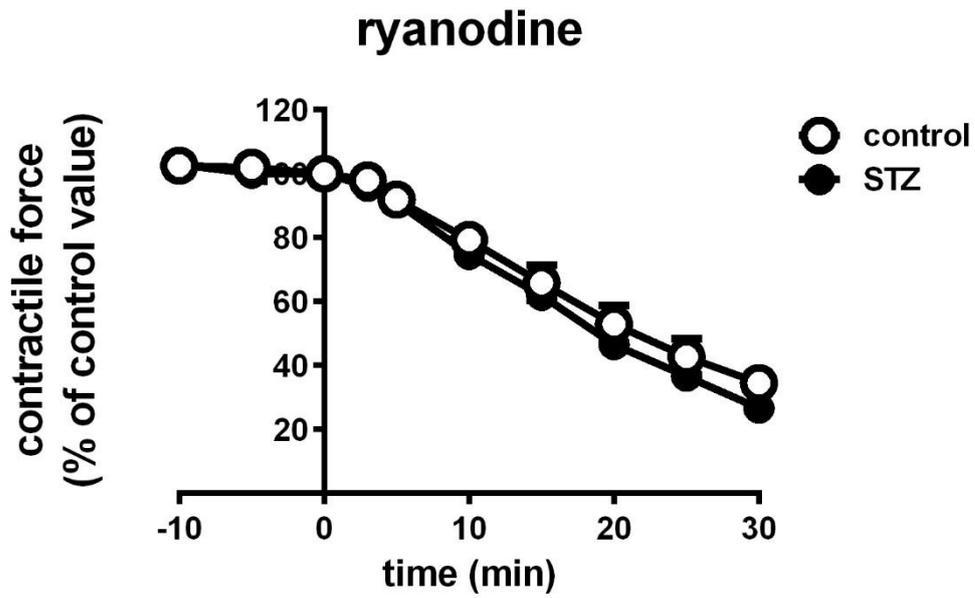


図 3-9 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋収縮力に対する ryanodine(10^{-8} M)の作用

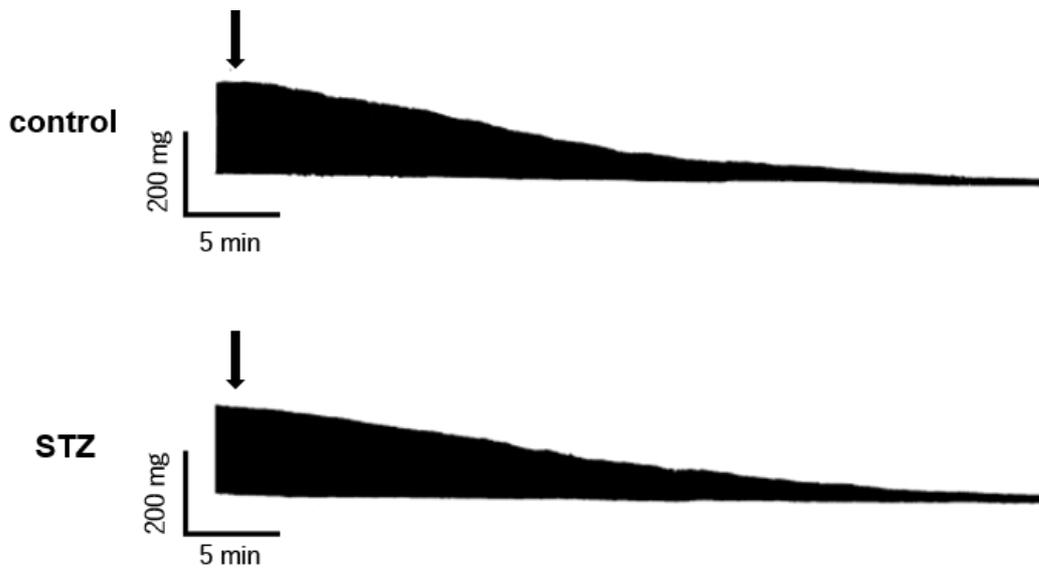


図 3-10 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋収縮力に対する ryanodine(10^{-8} M)の作用

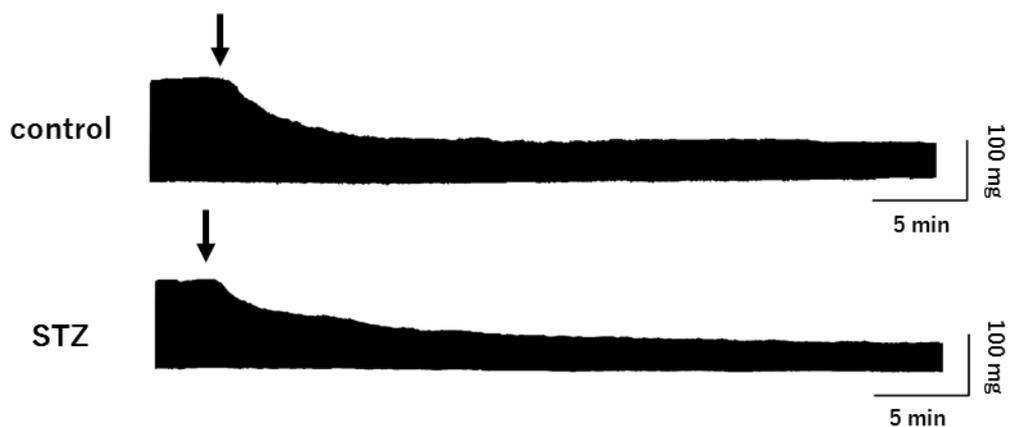


図 3-11 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋収縮力に対する cyclopiazonic acid (CPA:10⁻⁵ M) の作用

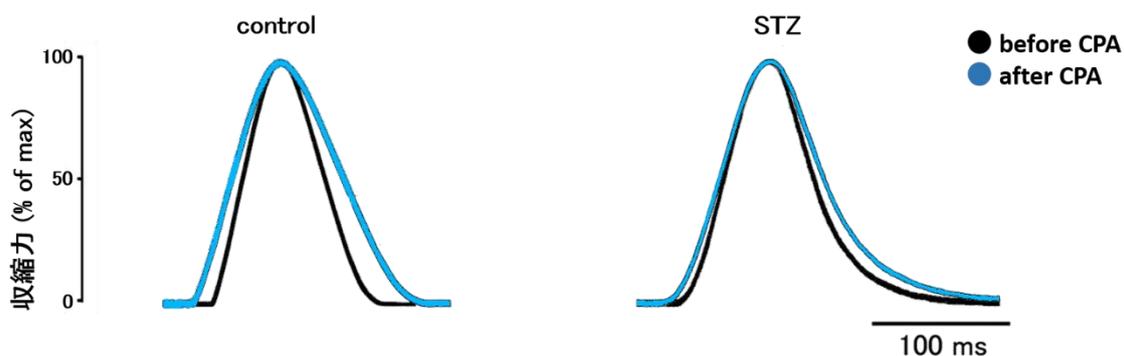


図 3-12 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋収縮力に対する CPA (10⁻⁵ M) の作用

	control (n=7)		STZ (n=7)	
	before	after	before	after
収縮力 (mg/mm ²)	176.1 ± 31.4	67.2 ± 15.6*	114.1 ± 23.1	41.6 ± 13.7*
収縮時間 (ms)	47.7 ± 2.2	57.7 ± 2.4*	45.7 ± 1.0	50.1 ± 0.87*
90%弛緩時間 (ms)	60.3 ± 1.1	114.7 ± 4.7*	65.7 ± 3.3	118.6 ± 7.9*

*p < 0.05 v.s. before

表 3-7 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋の CPA(10⁻⁵ M)処置による収縮力・弛緩時間のパラメーター変化

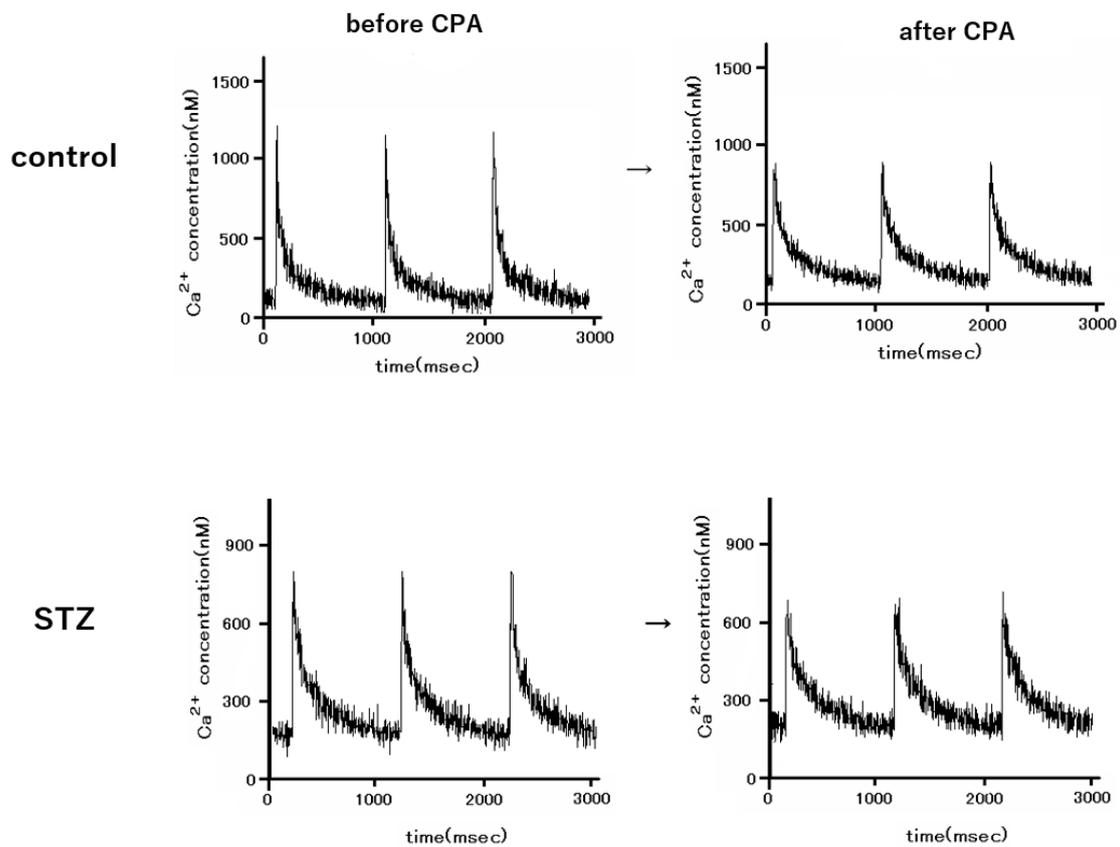


図 3-13 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋単離細胞 Ca^{2+} transient に対する CPA (10^{-5} M) の作用

	control (n=4)		STZ (n=4)	
	before	after	before	after
peak (nM)	1130.0 ± 49.9	781.0 ± 15.2*	776.3 ± 51.6	689.5 ± 47.9
basal (nM)	125.4 ± 8.9	219.8 ± 7.1*	210.4 ± 12.5	253.5 ± 18.9*
amplitude (nM)	1004.6 ± 52.3	561.2 ± 21.5*	565.9 ± 63.1	436.0 ± 56.8
tau (msec)	92.2 ± 7.1	181.0 ± 11.5*	151.1 ± 8.7	203.7 ± 11.5*

*p < 0.05 v.s. before

表 3-8 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋の cyclopiazonic acid (10^{-5} M) 処置による Ca^{2+} transient の変化

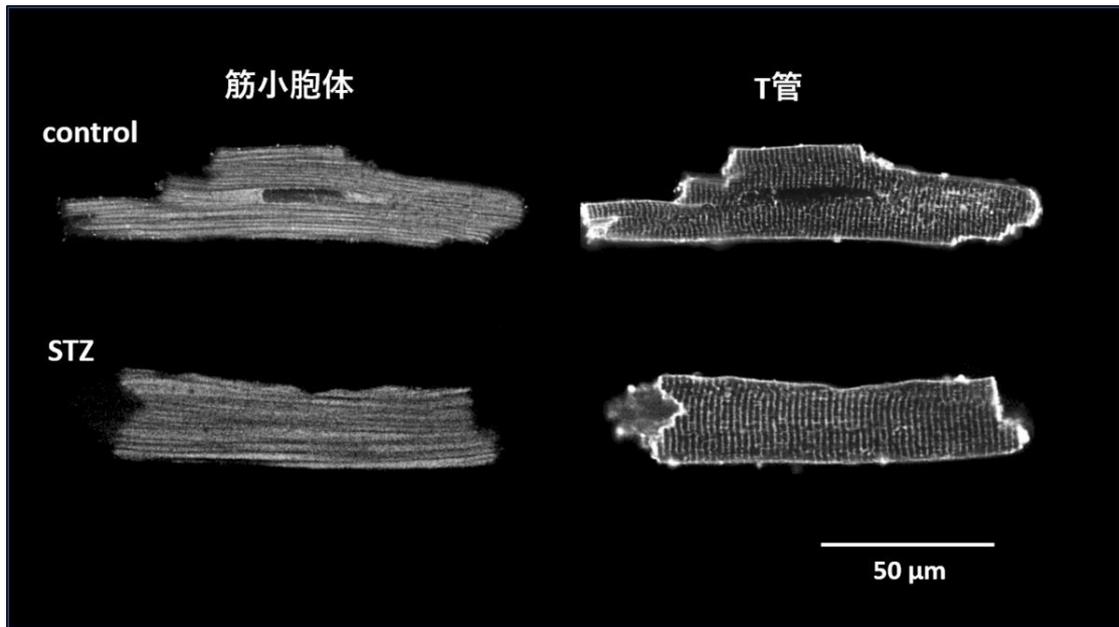


図 3-14 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋細胞形態の観察

第2節 考察

本モデルでは、活動電位波形の変化、細胞内 Ca^{2+} 動態の異常、収縮機能障害、弛緩機能障害が起きていた。心室筋の活動電位波形において、静止膜電位 (RMP) に正常マウスと糖尿病マウスで差は見られなかったが、活動電位持続時間 (APD_{20} 、 APD_{50}) が糖尿病マウスで延長していた (図 3-1、表 3-1)。また、活動電位の最大立ち上がり速度 (V_{max}) が糖尿病マウスで低下していた (表 3-1)。

V_{max} は心筋細胞が脱分極する速さの最大値であり、その値が大きいほど、ある細胞の脱分極が隣接する細胞に強い刺激を与え、興奮を確実にかつ速く伝える、つまり心筋内での興奮伝導が速いということになる。糖尿病マウス心筋で V_{max} が低値であるということは、興奮伝導 (伝導速度) が遅く、不安定であることを示唆する。伝導速度の低下は、心室や心房を構成する細胞の収縮のタイミングにズレを生じさせるのみならず、リエントリー性不整脈が起りやすくなる要因でもある。糖尿病は臨床的にも、伝導速度の低下による洞房ブロック、房室ブロックや脚ブロックなどの不整脈発症の危険因子であることが報告されている (Oka-Manabe S *et al.*, 1999)。

活動電位のプラトー相は主として L 型 Ca^{2+} チャンネルを介する内向き Ca^{2+} 電流と K^{+} チャンネルを介した外向き K^{+} 電流によって形成されている。 Ca^{2+} 電流の減少もしくは K^{+} 電流の増大は APD を短縮させ、逆に Ca^{2+} 電流の増大もしくは K^{+} 電流の減少は APD を延長させる。糖尿病マウスでは正常マウスに比べて再分極が遅く、APD の有意な延長がみられた (図 3-1、表 3-1)。糖尿病マウスでは Ca^{2+} チャンネルの電流量が低下しており、 Ca^{2+} 流入が減少しているとの報告がある (Meo *et al.*, 2016)。したがって、L 型 Ca^{2+} チャンネルによる Ca^{2+} 電流の変化は、糖尿病マウスにおける APD 延長の原因である可能性は低いと考えられる。マウス心室筋は、再分極がきわめて速く、事実上プラトー相を欠く特徴的な活動電位波形を有するが、これはマウスの再分極を担う電流成分が、活性化がミリ秒レベルときわめて速く起きる一過性外向き電流 (I_{to}) であることが原因である。糖尿病マウス心室筋において、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) 活性を介した転写抑制により K^{+} チャンネル (特に I_{to}) が減少していることが報告されている (Torres-Jacome J *et al.*, 2013)。以上のことから、APD の延長の主な原因は、 K^{+} チャンネル、特に I_{to} の電流密度低下であると考えられる。

本モデルにおける APD 延長は、心室筋だけでなく心房筋や肺静脈心筋でも観察することが出来た (図 3-2、3-3、表 3-2、3-3)。心房筋の APD を延長させる要因としては Ca^{2+} 感受性 K^{+} チャンネル (SK チャンネル) の機能低下が報告されている (Skibsbye *et al.*, 2013)。また、肺静脈心筋においては I_{to} 阻害薬の感受性が低下していたことから、心室筋と同様に I_{to} の機能低下が起きていることが示唆された (図 3-4、表 3-4)。さらに、心房筋と肺静脈心筋の活動電位パラメーターを比較すると、正常マウス・糖尿病マウスともに RMP、 APD_{90} に有意な差が見られた。マウス肺静脈心筋については第 6 章で詳述するが、心筋層の存在が確認されており、自発活動が顕在化していることが明らかとなっている (Tsuneoka *et al.*, 2012)。

この肺静脈心筋の自発活動発生は、心房筋に比べて浅い静止膜電位であること、すなわち再分極電流形成を担っている内向き整流性 K⁺電流の減少によるものであると考えられている(恒岡弥生博士論文, 2013)。従って、本研究の心房筋・肺静脈心筋の 1 Hz 刺激下活動電位でみられた後期再分極相の延長は、肺静脈心筋での自発活動顕在化と関連している可能性がある。

正常マウス・糖尿病マウスともに、心室筋の収縮力は nifedipine および ryanodine により著明に減少した(図 3-7~3-10)。この結果から、L 型 Ca²⁺チャネルからの Ca²⁺流入と、ryanodine 受容体を介する筋小胞体 (SR) からの Ca²⁺放出が心筋収縮において中心的役割を担っていることが確認された。L 型 Ca²⁺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、プラトー相の長さ、すなわち APD と L 型 Ca²⁺チャネルからの Ca²⁺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 Ca²⁺チャネルの心筋収縮に対する寄与が大きいと推測される。事実、200 msec 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期マウスの心室筋収縮に L 型 Ca²⁺チャネル阻害薬 nifedipine および筋小胞体 (SR) 上の ryanodine 受容体からの Ca²⁺放出を阻害する ryanodine を処置すると、nifedipine による陰性変力反応はモルモット > 成体期マウスであるが、ryanodine による陰性変力反応はモルモット < マウスである(Agata *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1998、Tanaka *et al.*, 2009)。このことから、マウスの活動電位はプラトー相を欠いた短い APD のために、L 型 Ca²⁺チャネルの寄与が少ないと考えられる。ところが、糖尿病マウス心室筋では、正常マウスに比べて APD が延長しているにもかかわらず、Ca²⁺ transient の amplitude や収縮力は小さかった、つまり、Ca²⁺流入が少なかったと考えられる。糖尿病マウス心筋において、L 型 Ca²⁺チャネルの電流密度が小さいことが報告されており(Meo *et al.*, 2016)、これが Ca²⁺流入の減少につながっていると考えられる。APD 延長による Ca²⁺流入時間の増大によっても代償出来ないほどの電流量の減少が起きていると推測される。この解釈が正しいか否かは単離心室筋細胞に膜電位固定法を適用して電流密度を測定すれば明らかにすることが出来る。今回これを検討できなかったことは残念であるが、今後の検討に期待したい。

糖尿病マウスの心室筋における収縮力、Ca²⁺ transientのamplitudeは正常マウスに比べて低下していた(図3-5、3-6、表3-5、3-6)。これは、糖尿病心筋の収縮機能が低下していることを示しており、臨床での左室駆出分画(ejection fraction)が低下しているという報告(Yu *et al.*, 2007)と合致している。収縮力、Ca²⁺ transientのamplitudeの低下の原因として、上述のL型Ca²⁺チャネルからのCa²⁺流入の減少がまず挙げられる。細胞内で筋小胞体 (SR) が扱えるCa²⁺の供給が減少すれば、必然的にSRから放出されるCa²⁺も減少するからである。それに加えて、SRからのCa²⁺放出を担う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)。また、ryanodine受容体は発現量だけでなく、制御機構に変化がみられることも報告されている(Belke *et al.*, 2004、Yaras *et al.*, 2005)。Ryanodine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Ca²⁺による活性化感受性を制御することでチャンネルの活性を低下させること、チャンネルを同時に開閉させて、連結開閉を示すという重要な機能をもつ。FKBP12.6がない場合はチャンネルを閉じるのに支障が生じることが予想される。糖尿病心筋ではryanodine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、Ca²⁺感受性が劇的に上昇し、チャンネルからCa²⁺が漏れやすくなる。よって、収縮力の減弱にはryanodine受容体の機能異常も関与していると考えられる。さらに、SR内のCa²⁺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 (Gyorke *et al.*, 2004, Cheng *et al.*, 2016)。今回の検討で、糖尿病マウスのbasalのCa²⁺濃度が正常マウスより高値であったことも (図3-5、表3-5)、これらの機能異常によるSRからのCa²⁺の漏れが起因していると考えられる。細胞内Ca²⁺の除去機構として、SERCAのほかにNa⁺/Ca²⁺交換機構(NCX)があげられるが、NCXの薬理的な抑制はCa²⁺ transientの減衰速度には影響を与えず(Tanaka *et al.*, 2005、Namekata *et al.*, 2008)、またNCXをロックアウトしたマウスのCa²⁺ 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Ca²⁺ transientの減衰にはほとんど影響を与えていないと言える。

糖尿病マウスの心室筋では、90%弛緩時間(time to 90% relaxation: RT₉₀)が正常マウスに比べて延長しており (図3-6、表3-6)、Ca²⁺transientの減衰時間 (tau) は高値であった (図3-5、表3-5)。これらはいずれも筋小胞体 (SR) へのCa²⁺取り込みを担うSERCAの機能低下が原因であると考えられる(Golfman *et al.*, 1998、Suarez *et al.*, 2008、Satoh *et al.*, 2003、Stølen *et al.*, 2009)。SERCAは、SR膜上に多数存在する細胞質内のCa²⁺を能動的にSRへ取り込むタンパク質で、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%もの細胞質内Ca²⁺がSERCAによりSR内に取り込まれる(Su *et al.*, 2003)。正常マウス、糖尿病マウス共に、90%弛緩時間 (RT₉₀)やCa²⁺ transientの減衰減衰時間 (tau) はいずれもSERCA阻害薬であるCPAにより延長した (図3-12、3-13、表3-7、3-8)。従って、SERCA機能低下により、SRへのCa²⁺取り込みに時間がかかることで弛緩時間が延長したことが判明した。これが糖尿病マウス心筋でみられた収縮力の低下の一因となっているか否かについては次章で検討する。本実験系において、糖尿病心筋の拡張機能障害を確認し、SERCA活性の低下による細胞内Ca²⁺動態の変化から説明することができた。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Ca²⁺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要因であると言える(Schwinger *et al.*, 1995、Schmidt *et al.*, 1999)。実際にSERCA機能を抑制的に制御しており、リン酸化されることでSERCAを活性化するphospholambanのタンパク発現量は糖尿病心筋において増大しており、そのリン酸化されたphospholamban量は糖尿

病心筋で低下していた（第4章参照）。

その他にも糖尿病心筋の収縮力の低下や収縮弛緩速度の延長の原因になり得る要因がいくつかある。一つめは収縮タンパク質の異常、すなわち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 α 、 β がある。 α がV1タイプ、 β がV3タイプでATPase活性が異なる。正常心ではATPase活性の高いV1タイプがほとんどであるが、糖尿病心筋ではATPase活性の低いV3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(Takeda *et al.*, 1998)。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① Ca^{2+} 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、糖尿病心筋ではトロポニン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T1から低分子量のT2やT3に移行しているとされており(Korte *et al.*, 1985)、トロポニンIは正常心筋に比べて過リン酸化されていると報告されている(Liu *et al.*, 1996)。これらが収縮タンパクの Ca^{2+} 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、糖尿病では心筋組織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(Teupe and Rosak, 2012)。本実験の糖尿病マウスで見られた収縮・弛緩機能の低下にこれらの要因が関与している可能性も排除できない。しかし、次章以降で示すように、 Ca^{2+} チャンネルの機能やSERCA活性を回復させる処置によって、収縮・弛緩機能が回復することから、これらのチャンネルやポンプの働きの寄与が最も大きいと考えられる。

小括：糖尿病マウス心筋では、活動電位持続時間の延長、 Ca^{2+} transient の amplitude 減少・減衰時間延長・basal Ca^{2+} 値の上昇、収縮力減弱、弛緩時間延長が起きていた。糖尿病では心筋に様々な変化が生じており、これらの機能の変化が興奮収縮機構に与える影響を一つの原因に帰着させることは出来ないが、本章の検討事項により、糖尿病心筋障害は主にSR機能の低下に起因していることが明らかとなった。

第4章 β アドレナリン受容体刺激応答

心筋において β 受容体が刺激されると、アデニル酸シクラーゼ（AC）が活性化し細胞内サイクリックAMP（cAMP）濃度が上昇することでプロテインキナーゼA（PKA）が活性化し種々のタンパク質がリン酸化される。収縮力に関しては、 β 受容体刺激により Ca^{2+} チャネルや ryanodine 受容体がリン酸化され、細胞内への Ca^{2+} 流入が増大し、収縮力が増大する。このように、 β 受容体刺激は心臓の働きに対して促進的に作用することが知られている。

第3章より、糖尿病モデルマウスでは収縮力の減弱、弛緩時間の延長が起きていることが明らかとなった。本章では、糖尿病マウス心室筋の β 受容体刺激に対する応答性を収縮と弛緩機能について検討した。さらに、近年、収縮力は正常に保たれているが、弛緩機能の低下が起きている心不全が注目されている。弛緩機能障害（拡張機能障害）では、心筋が拡張する能力が障害されて、心室に十分な血液を貯められず、心拍出量が低下する状態になる。原因疾患として、心肥大や虚血性心疾患などが挙げられるが、糖尿病によっても引き起こされることが明らかとなっている。また、心筋内のカルシウム輸送障害やエネルギー代謝異常により、明らかな心不全の症状を呈するよりも早期から拡張機能障害が認められることも報告されている（Galderisi M, 2006）。

本章では β 受容体刺激の心収縮力や弛緩時間、 Ca^{2+} transient への影響について検討を行った。特に糖尿病マウス心筋の弛緩機能障害に対して、筋小胞体（SR）に Ca^{2+} を再取り込みするATP依存性 Ca^{2+} ポンプ（SERCA）の機能に注目し、薬理的に検討を行った。

第1節 弛緩機能に対する薬理的検討

1) 収縮力に対する β 受容体刺激の影響

収縮力測定において、正常マウス（ $n=8$ ）・糖尿病マウス（ $n=6$ ）ともに isoprenaline 累積処置（ $10^{-8}\sim 10^{-5}$ M）により、濃度依存的に陽性変力反応（収縮力増大）を示し、高濃度域では両群の差が消失した。濃度反応域、 pD_2 値（正常マウス：7.05、糖尿病マウス：7.08）に差は見られなかった。（図4-1、4-2）

2) 弛緩時間に対する β 受容体刺激の影響

収縮力測定において、正常マウス（ $n=5$ ）・糖尿病マウス（ $n=6$ ）ともに isoprenaline 累積処置（ $10^{-8}\sim 10^{-5}$ M）により、濃度依存的に弛緩時間は短縮し、高濃度域では両群の差が消失した（図4-3、4-4、表4-1）。

3) Ca^{2+} transient に対する isoprenaline(10^{-6} M)の作用

単離心室筋細胞に対して isoprenaline を処置すると、正常マウス (n=5)・糖尿病マウス (n=5) とともに Ca^{2+} transient の peak 値の上昇、basal Ca^{2+} 値の低下、amplitude の増大、減衰速度 (τ) の短縮が見られた (図 4-5、表 4-2)。

4) SERCA のタンパク発現量

ウエスタンブロット法で心室筋の SERCA のタンパク発現量を計測すると、正常マウス・糖尿病マウスともに SERCA の発現が確認され、その発現量は糖尿病マウスでわずかに多かった (図 4-6、4-7)。(各 n=10)

5) phospholamban のタンパク発現量

ウエスタンブロット法で phospholamban のタンパク発現量と、リン酸化された phospholamban のタンパク量を測定したところ、phospholamban のタンパク量は糖尿病マウスで増加していた。また、リン酸化された phospholamban のタンパク量は糖尿病マウスで減少していた (図 4-6、4-7)。(各 n=10)

6) 心拍動数に対する β 受容体刺激の作用

心拍動数測定に対して、noradrenaline ($10^{-9}\sim 10^{-5}$ M、phentolamine: α 受容体遮断薬存在下) 処置で正常マウス (n=5)・糖尿病マウス (n=5) とともに濃度依存的に心拍動数は増加した (図 4-8)。

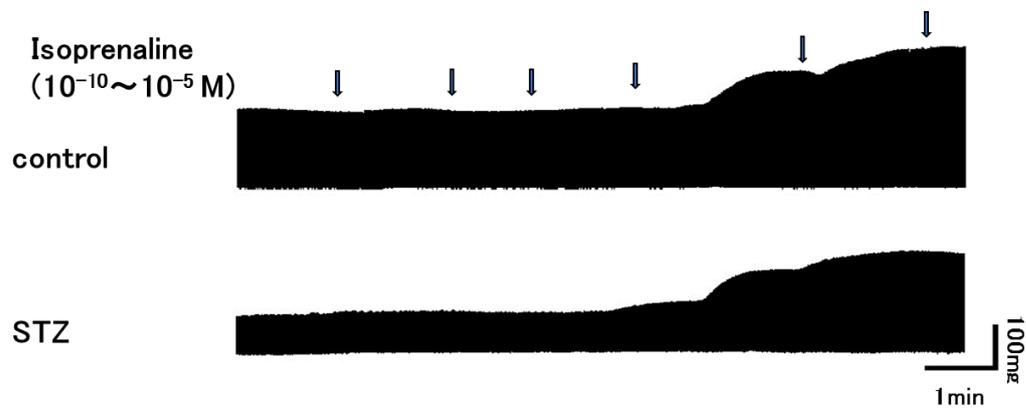


図 4-1 正常マウスおよび糖尿病マウス右心室筋収縮力に対する isoprenaline ($10^{-10} \sim 10^{-5} \text{ M}$) の作用

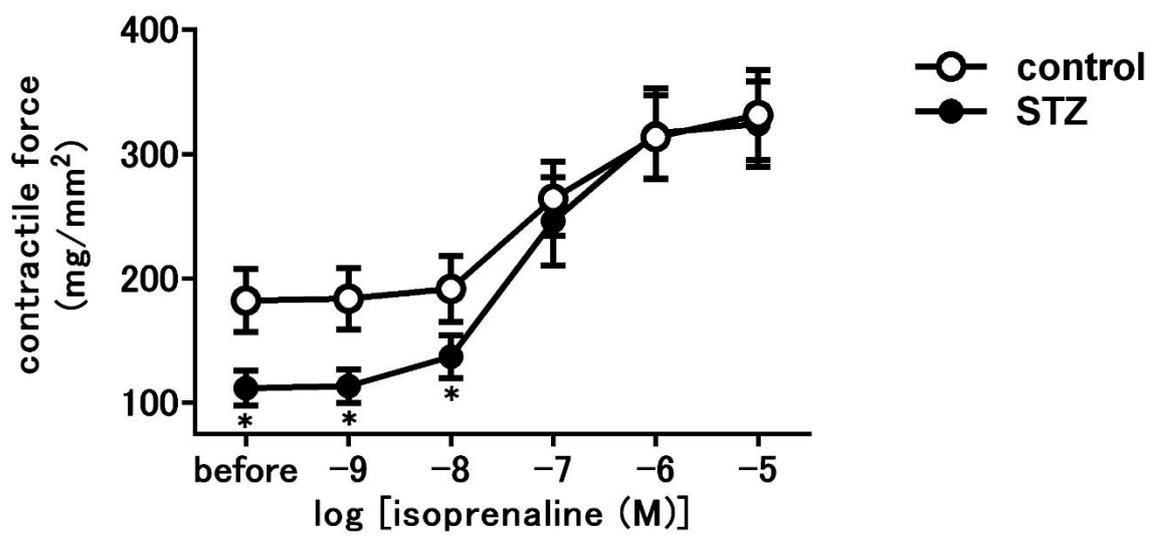


図 4-2 正常マウスおよび糖尿病マウス右心室筋収縮力に対する isoprenaline ($10^{-10} \sim 10^{-5} \text{ M}$) の作用

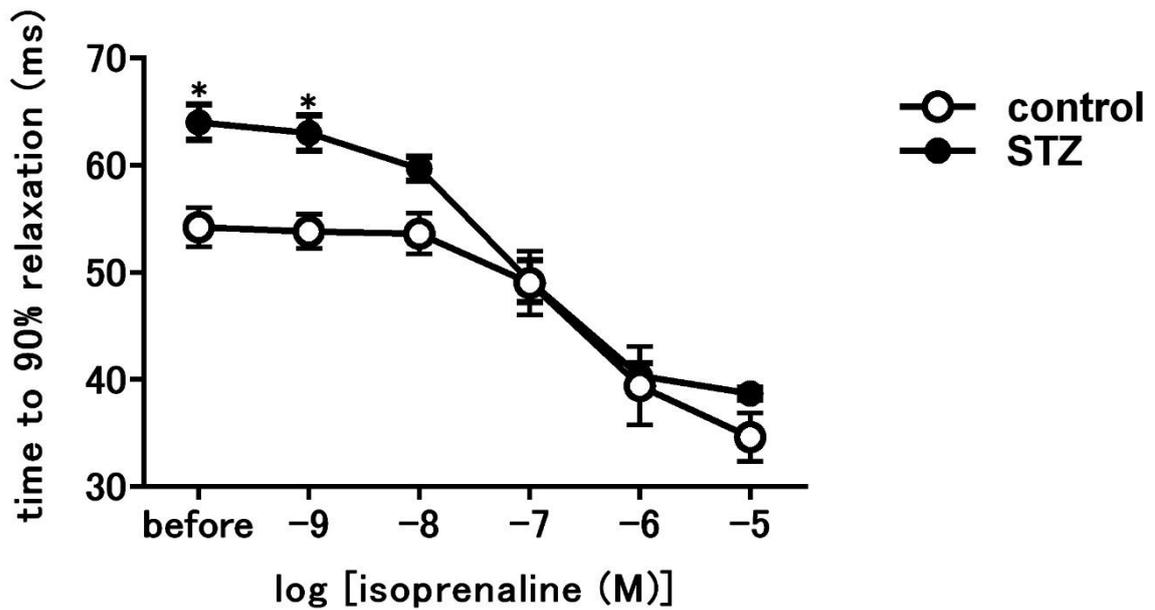


図 4-3 正常マウスおよび糖尿病マウス右心室筋 90%弛緩時間に対する isoprenaline (10^{-10} ~ 10^{-5} M) の作用

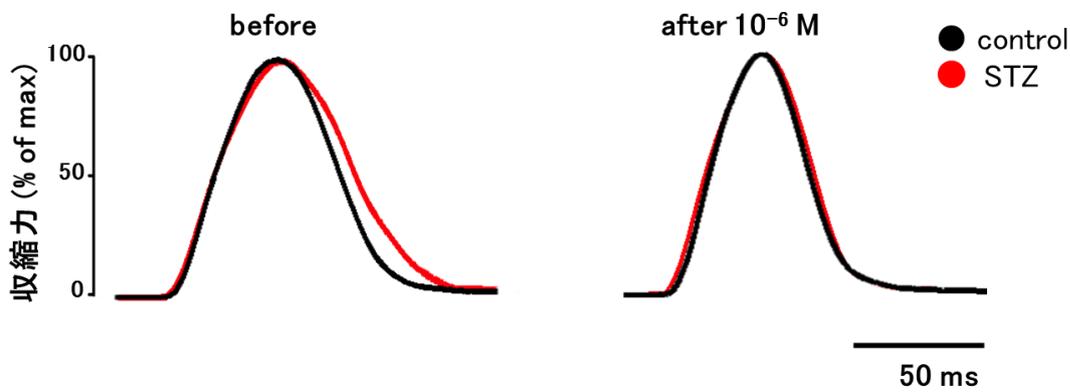


図 4-4 右心室筋に対する isoprenaline (10^{-6} M) 処置による弛緩時間の変化

	before	after 10^{-6} M
control	54.2 ± 1.8	39.4 ± 3.7*
STZ	63.0 ± 1.3	41.8 ± 1.1*

* $p < 0.05$ v.s. control

表 4-1 右心室筋に対する isoprenaline (10^{-6} M) 処置による 90%弛緩時間のパラメーター変化

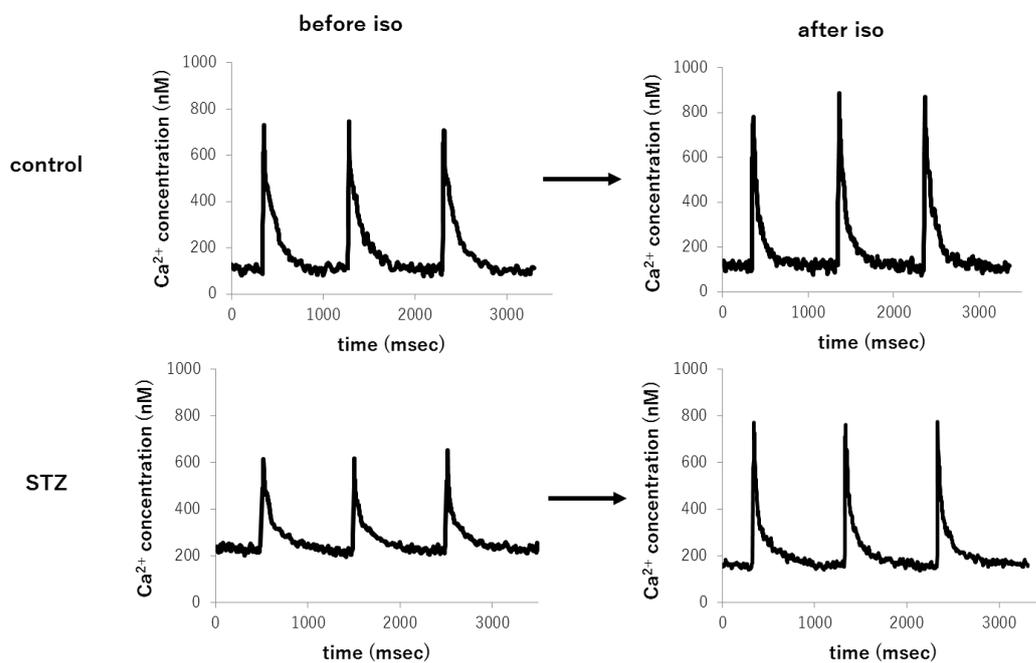


図 4-5 正常マウスおよび糖尿病マウス単離心室筋細胞の Ca^{2+} transient に対する isoprenaline(10^{-7} M)処置の作用

	control (n=5)		STZ (n=5)	
	before	after	before	after
peak (nM)	734.6 ± 27.9	841.9 ± 122.9	635.3 ± 30.8	803.2 ± 73.3
basal (nM)	128.6 ± 13.7	$76.7 \pm 12.8^*$	214.8 ± 50.6	$155.3 \pm 40.3^*$
amplitude (nM)	606.0 ± 40.1	765.2 ± 125.7	420.5 ± 32.2	647.9 ± 64.1
tau (msec)	108.9 ± 8.0	$68.7 \pm 3.6^*$	149.4 ± 2.7	$74.4 \pm 2.8^*$

*p < 0.05 v.s. before

表 4-2 正常マウスおよび糖尿病マウス単離心室筋細胞の isoprenaline(10^{-7} M)処置による Ca^{2+} transient のパラメーター変化

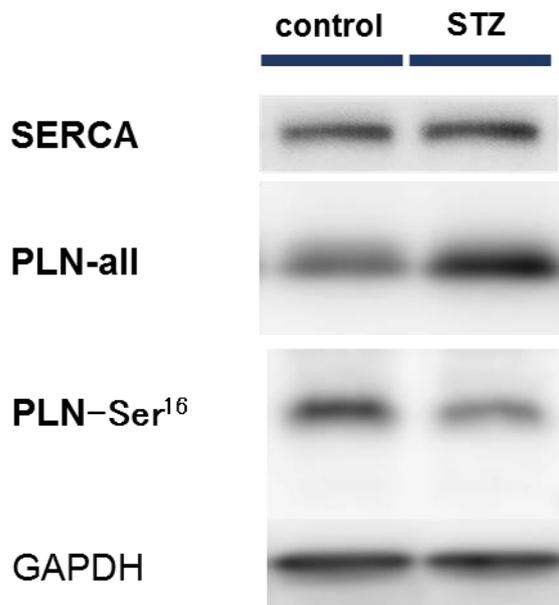
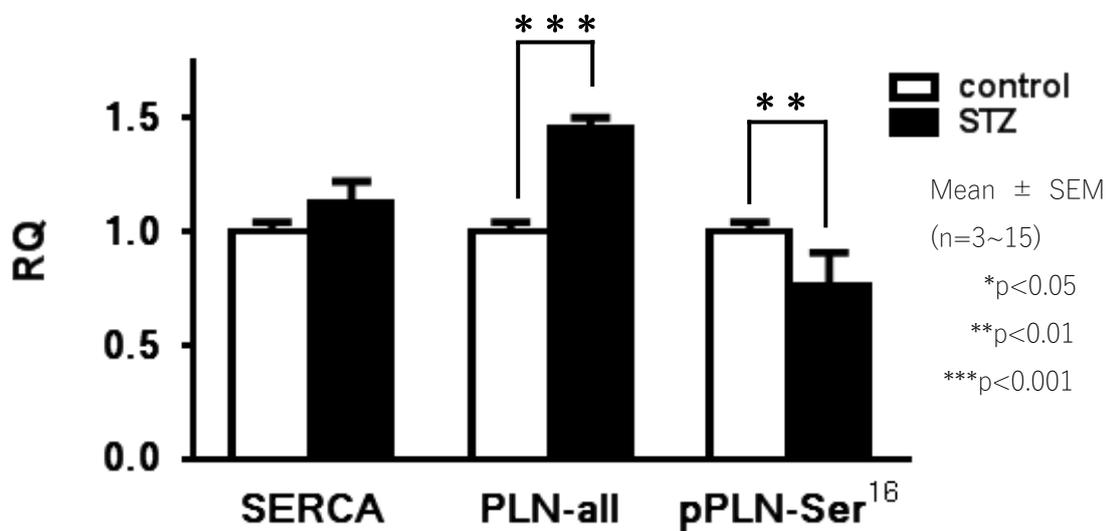


図 4-6 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋の SERCA、 phospholamban(PLN-all)、リン酸化 phospholamban (PLN-Ser¹⁶) のタンパク発現量



Relative quantities (RQ) were determined using GAPDH as an internal control.

図 4-7 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋の SERCA、 phospholamban(PLN-all)、リン酸化 phospholamban (PLN-Ser¹⁶) のタンパク発現量 (n=3~15)

β 受容体刺激

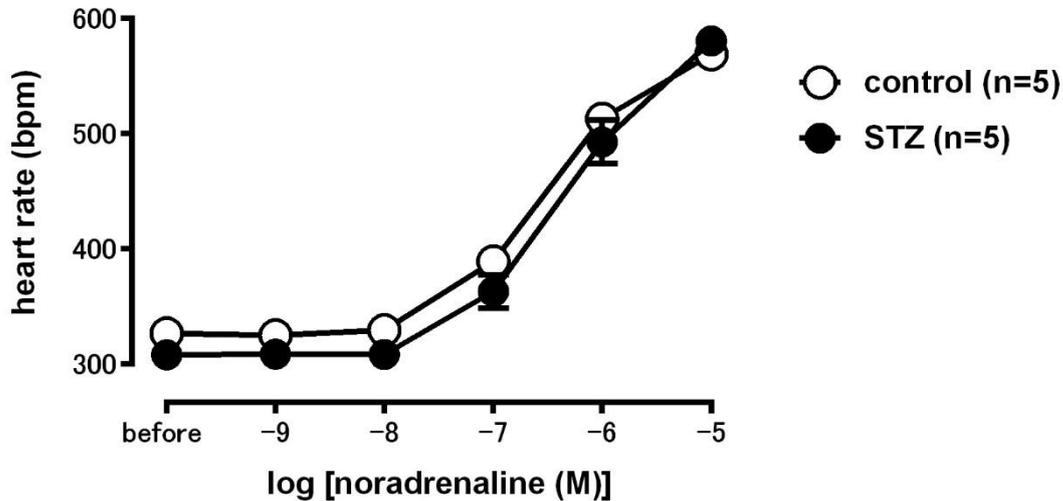


図 4-8 正常マウスおよび糖尿病マウスの心拍動数に対する β 受容体刺激の影響

第 2 節 考察

糖尿病マウス心筋の 90%弛緩時間および Ca^{2+} transient の減衰速度 (tau) は、いずれも isoprenaline 処置後により大幅に短縮し正常マウスの弛緩時間に近づいた (図 4-3~4-5、表 4-1、4-2)。前述のようにこれらの指標は SERCA による Ca^{2+} 取り込みを反映したものであり、糖尿病マウスにおいて低下していた SERCA の機能が β 受容体刺激により回復したと考えられる。ところが、糖尿病マウスにおける SERCA の発現量は予想に反して正常マウスよりわずかに増加していた (図 4-6、4-7)。このことから、糖尿病マウスにおける SERCA 機能の低下は、SERCA の制御系の変化に起因することが推測された。

SERCA の機能は調節タンパク質である phospholamban によって制御されている。Phospholamban は非リン酸化状態では SERCA に結合しその機能を抑制しているが、リン酸化されることにより SERCA から解離して抑制を解除する。Isoprenaline は β 受容体を刺激し、プロテインキナーゼ A (PKA) を介して phospholamban をリン酸化するため、結果的に SERCA の活性を促進し、筋小胞体への Ca^{2+} 再取り込みが増加する。今回の検討により、糖尿病マウスで phospholamban の発現量は正常マウスより増加しており、さらに、phospholamban のリン酸化の割合は低下していた。これらは何れも SERCA 活性を低下させる原因となる変化である。β 受容体刺激は phospholamban のリン酸化を促進することによりこの低下要因を解除し、糖尿病マウスの心筋の SERCA 活性を回復させたと理解できる。Phospholamban のリン酸化割合の減少の原因としては、O 結合型 β-N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 化の関与が考えられる。Phospholamban のリン酸化部位の一つとして、Ser¹⁶

が知られているが、この部位が *O*-GlcNAc による糖鎖修飾を受けると、リン酸化が抑制されることが報告されている (Yokoe S *et al.*, 2010)。この *O*-GlcNAc 化の基質となる UDP-GlcNAc はグルコースより生合成されるため、*O*-GlcNAc 化と糖尿病合併症の関連が注目されている。

Isoprenaline 処置による β 受容体刺激は、正常マウス、糖尿病マウスともに収縮力を増大させ、 $0.1 \mu\text{M}$ 以上の高濃度域では正常マウスと糖尿病マウスの収縮力の差が消失し、同程度の収縮力を示した (図 4-1、4-2)。従って、本モデルで生じている収縮機能障害は、弛緩機能障害と同様に、心筋組織の障害ではなく調節性の変化によって生じていると考えられる。すなわち phospholamban 制御の増強に起因する SERCA 機能の減弱により、筋小胞体に蓄えられる Ca^{2+} 量が減少し、CICR の際に ryanodine 受容体より放出される Ca^{2+} 量が減少することが収縮機能障害の主な原因であると考えられる。 β 受容体刺激により、 Ca^{2+} transient の amplitude の増大、basal Ca^{2+} 濃度の減少、減衰速度の増大が正常マウス、糖尿病マウスともに観察され、特に糖尿病マウスで顕著であった (図 4-5、表 4-2)。したがって、 β 受容体刺激による phospholamban のリン酸化の促進により、SERCA 機能が活性化し、筋小胞体に蓄えられる Ca^{2+} 量が増大することが、収縮力増強の要因の一つであると考えられる。このほかにも β 受容体刺激による L 型 Ca^{2+} チャンネルの活性化が収縮力増大の要因として考えられるが、正常マウスと糖尿病マウスの間で、活性化の程度が異なるかどうかは、膜電位固定法を用いて L 型 Ca^{2+} チャンネルの活性を直接観察するなど、さらなる検討が必要であると考えられる。

β 受容体刺激は、糖尿病マウス心筋の弛緩機能障害を改善する一方で、心収縮力の増大や心拍数増大などの作用 (図 4-1、4-8) を示した。このような作用は、短期的には心機能を増大させ、強心薬としての有効性につながるものであるが、長期的には心臓の酸素消費量を増大させ、負荷を増大させることになるため、必ずしも望ましいものではない。そこで、 β 受容体を介さずに直接 SERCA に作用する薬物、あるいは phospholamban をリン酸化する薬物が弛緩機能障害に有用であると考え、次節において SERCA 活性化薬探索系を用いて検討を行った。

第3節 SERCA 活性化薬探索系

細胞小器官である筋小胞体 (SR) への Ca^{2+} 取り込み機能を直接的に検討することは、そこに作用する薬物の作用機序を詳細に解明できるなどの意義があるが技術的には容易ではない。様々な手法で検討はされているものの、それぞれに長所、短所がある。一例として、心筋組織をホモジネートして調製した SR の vesicle での検討 (Alexander *et al*, 1999) が挙げられるが、これらの手法は SERCA の Ca^{2+} 取り込み能を最も直接的に検討することができる一方で、細胞としての機能は破綻しており生理的な状態からは程遠い条件で検討を行っている。そこで、生理的条件に近い状態で SR への Ca^{2+} 取り込み作用を評価できる実験系として、 Ca^{2+} 蛍光プローブを取り込ませたマウス単離心室筋細胞と SERCA 阻害薬を用いた実験系を構築した。細胞質内の Ca^{2+} 濃度を増加させる機序として L 型 Ca^{2+} チャンネルの開口、ryanodine 受容体の開口、SERCA の阻害、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) の阻害などがあげられ、逆に細胞質内 Ca^{2+} 濃度を低下させる機序として SERCA の活性化、NCX の活性化、細胞膜の Ca^{2+} -ATPase (Plasma-Membrane Ca^{2+} -ATPase : PMCA) の活性化、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 取り込みの促進などがあげられる。故に、ある薬物により細胞内の定常状態 Ca^{2+} 濃度が低下し、その反応が SERCA 阻害薬である cyclopiazonic acid (CPA) により抑制されれば、その薬物は SERCA を活性化し SR への Ca^{2+} 取り込みを促進する作用を有すると考えられる。この実験系を用いて SERCA を活性化する薬物の探索を行った。

1) 単離心室筋細胞に対する isoprenaline (10^{-6} M) の作用

Isoprenaline (10^{-6} M) 処置で細胞質内 Ca^{2+} 濃度 (ratio (F340/F380) 値) は低下した (図 4-9)。この反応は β 受容体遮断薬 propranolol (10^{-6} M) や SERCA 阻害薬 CPA (10^{-5} M) 前処置で抑制されたが、NCX 阻害薬 SEA0400 (10^{-6} M) 前処置では抑制されなかった (図 4-9、4-10)。

2) 単離心室筋細胞に対する ellagic acid (10^{-5} M) の作用

Ellagic acid (10^{-5} M) 処置で細胞質内 Ca^{2+} 濃度 (ratio (F340/F380) 値) は低下した。この反応は、propranolol (10^{-6} M) 前処置で抑制されず、CPA (10^{-5} M) 前処置で抑制された (図 4-11、4-12)。

3) 収縮力・心拍動数に対する ellagic acid (10^{-5} M) の作用

Ellagic acid は収縮力に影響を与えなかったが、弛緩時間は正常マウス (n=6)・糖尿病マウス (n=6) とともに有意に短縮させた (図 4-13~4-15)。その短縮作用は糖尿病マウスでより大きかった (表 4-3)。また、ellagic acid は正常マウス (n=7)・糖尿病マウス (n=4) の摘出心房標本における心拍動数に影響を与えなかった (図 4-16)。

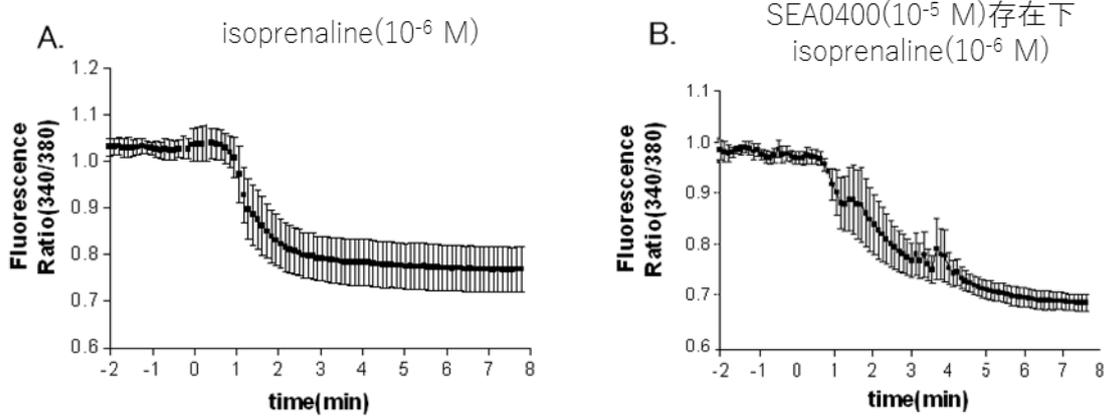


図 4-9 正常マウス単離心室筋細胞の定常状態 Ca^{2+} 濃度に対する isoprenaline(10^{-6} M)の影響(A)、 SEA0400(10^{-5} M)存在下 (B)

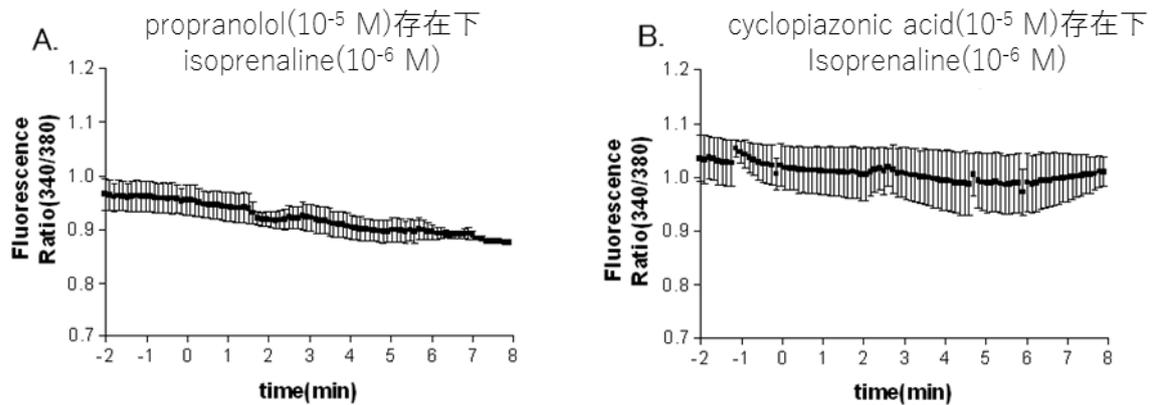


図 4-10 β 遮断薬、SERCA 阻害薬存在下における正常マウス単離心室筋細胞の定常状態 Ca^{2+} 濃度に対する isoprenaline(10^{-6} M)の影響
Propranolol(10^{-6} M)存在下 (A) 、cyclopiazonic acid(10^{-5} M)存在下 (B)

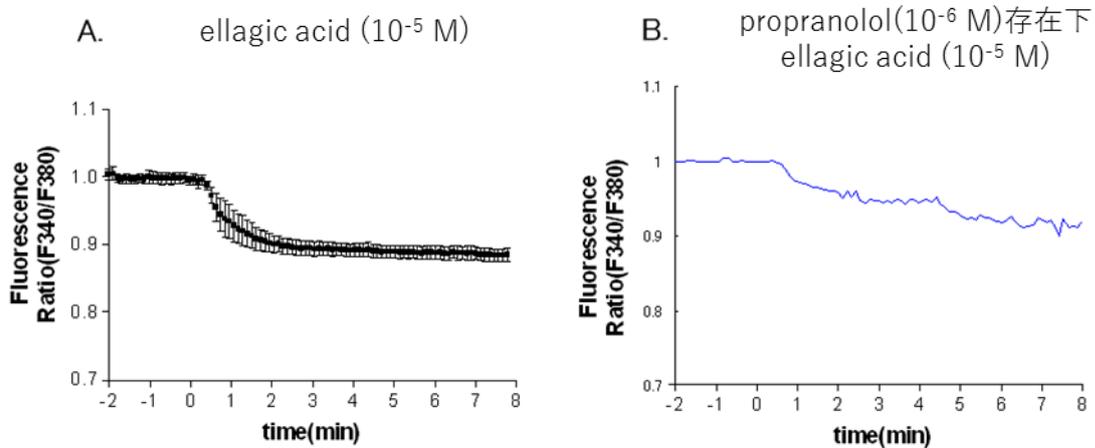


図 4-11 正常マウス単離心室筋細胞の定常状態 Ca^{2+} 濃度に対する ellagic acid(10^{-5} M)の影響 (A)、propranolol(10^{-6} M)存在下(B)

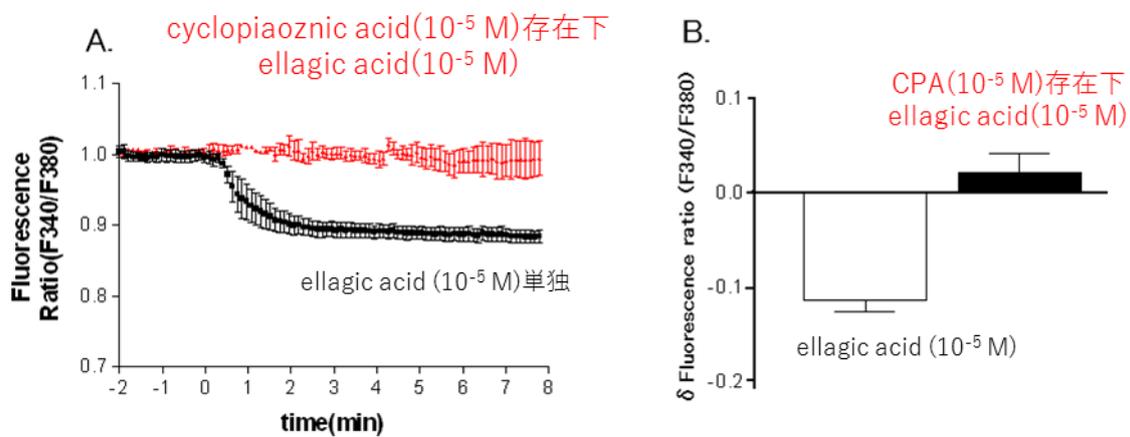


図 4-12 正常マウス単離心室筋細胞の定常状態 Ca^{2+} 濃度に対する ellagic acid(10^{-5} M)処置の影響と CPA(10^{-5} M)存在下 ellagic acid(10^{-5} M)の影響の比較

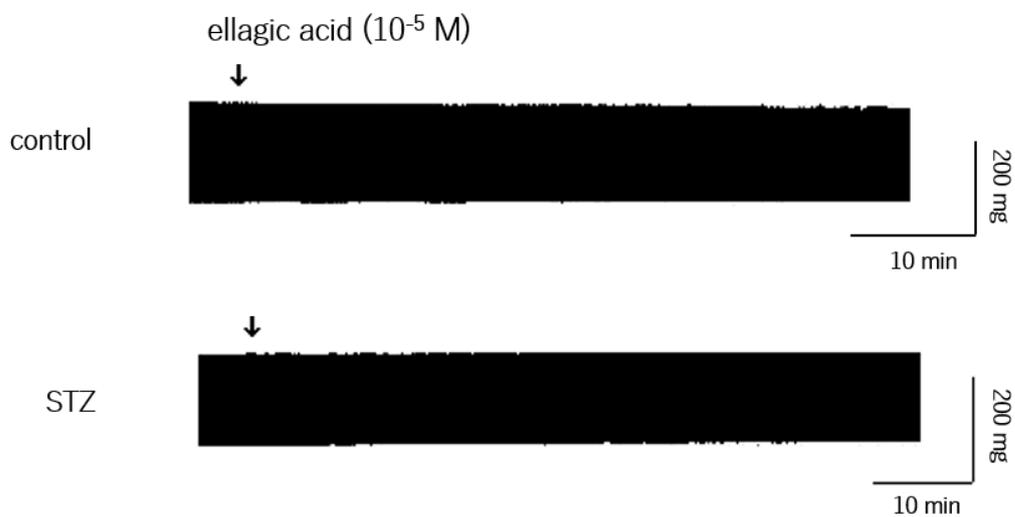


図 4-13 正常マウスおよび糖尿病マウス右心室筋収縮力に対する ellagic acid(10^{-5} M)の作用

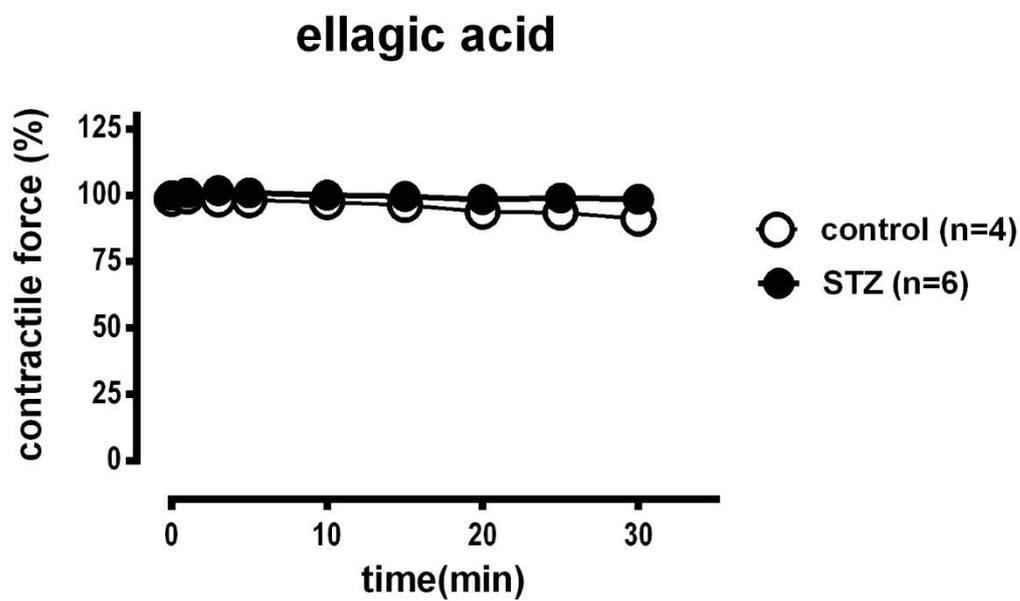


図 4-14 正常マウスおよび糖尿病マウス右心室筋収縮力に対する ellagic acid (10^{-5} M)の作用

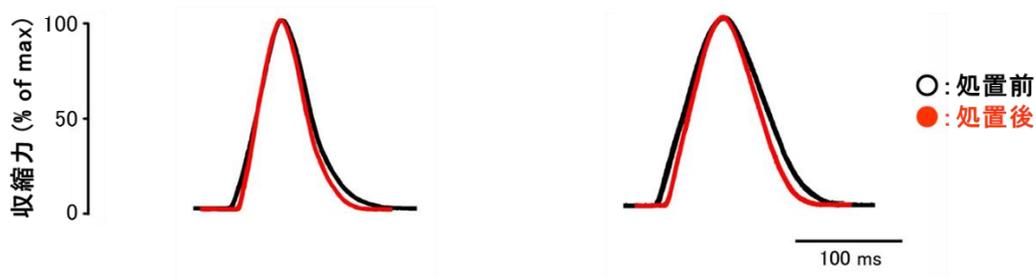


図 4-15 正常マウスおよび糖尿病マウス右心室筋の収縮力に対する ellagic acid の作用の比較

		control	STZ
弛緩時間 (ms)	before	59.9 ± 1.1	78.1 ± 2.0
	after	53.3 ± 1.0*	63.9 ± 2.4*
	shortening	6.6 ± 1.9	14.2 ± 2.0 [†]

*p<0.05 v.s. before、[†]p<0.05 v.s. control

表 4-3 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋の ellagic acid (10⁻⁵ M)による弛緩時間の変化 (各 n=6)

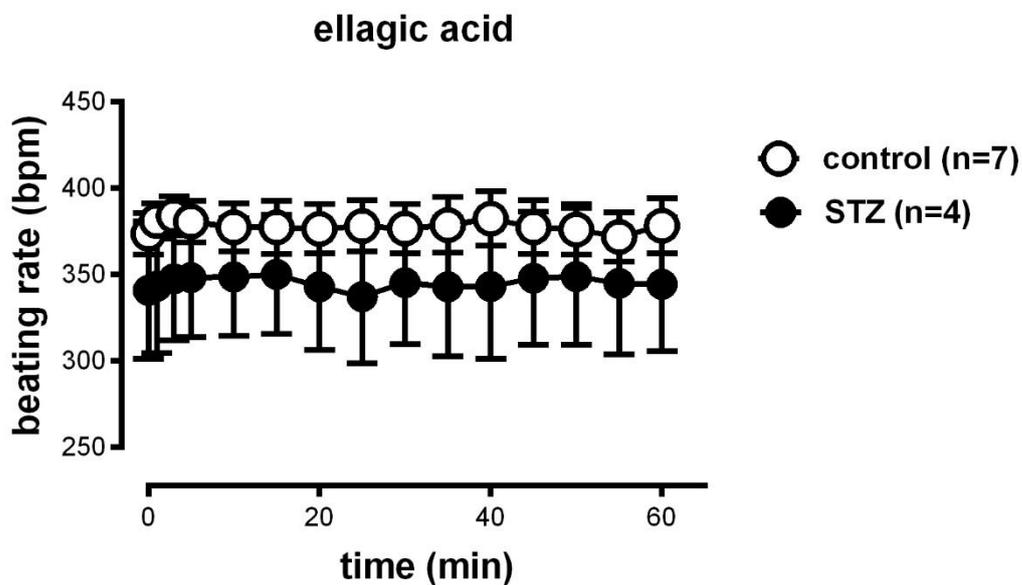


図 4-16 正常マウスおよび糖尿病マウス右心房筋の ellagic acid (10⁻⁵ M) 処置に対する心拍動数の変化

第4節 考察

SERCA 活性化薬探索系構築の検討において、isoprenaline (β 受容体刺激) 処置によりマウス単離心室筋細胞の定常状態 Ca^{2+} 濃度は低下し、この反応は SERCA 阻害薬である cyclopiazonic acid (CPA) 前処置により抑制された。また、isoprenaline は心収縮力・心拍動数ともに増大させた (図 4-1、4-2、4-10)。

Isoprenaline を代表とする β 受容体刺激薬はアデニル酸シクラーゼ(AC)を活性化し cAMP 量を増やし、プロテインキナーゼ A(PKA)を活性化することにより各種タンパク質をリン酸化する。PKA により phospholamban がリン酸化され SERCA への抑制が解除されるため SERCA の Ca^{2+} 取り込み能が増強する。Cyclopiazonic acid (CPA) は真菌由来の mycotoxin であり Ca^{2+} に対して低親和性の E2 状態の ATP-ase に結合し、高親和性の E1 状態への転移を抑制することにより ATPase の Ca^{2+} 親和性を著しく低下させることで SERCA の Ca^{2+} 取り込み能を低下させる (Moncoq *et al.*, 2007、Brini and Carafoli, 2009)。このことから本実験系で観測された basal Ca^{2+} 濃度の低下は SERCA を介した SR への Ca^{2+} 取り込みの増強と考えることができる。

また、 β 受容体刺激による細胞質内 Ca^{2+} 濃度の低下は NCX 阻害薬 SEA0400 で抑制されなかった。SEA0400 は従来の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構(NCX)阻害薬よりも特異性の高い薬物であり、アドレナリン受容体、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} チャネル、 Na^+/K^+ ATPase、 Na^+/H^+ 交換機構などのトランスポーターに対して影響を与えないことが報告されている。また、収縮タンパクの Ca^{2+} 感受性や細胞内 pH に対しても影響を与えないと報告されている (Tanaka *et al.*, 2002、Tanaka *et al.*, 2005、Birinyi *et al.*, 2008)。よって、この反応には NCX からの Ca^{2+} 排出は関与していないと考えることができる。この実験系と一度に大量に検出できる 96 穴プレートなどの方法を組み合わせることにより、SR への Ca^{2+} 取り込みを促進する物質のスクリーニングが効率よく行えると考えられる。

主に berry 系の果実に含まれるポリフェノールの一種である ellagic acid 処置により定常状態の Ca^{2+} 濃度は低下し、この反応は CPA 前処置により抑制された (図 4-14)。また、SEA0400 前処置によりこの Ca^{2+} 濃度の低下は抑制されないことを確認している (date not shown)。以上の結果より、ellagic acid は SERCA を介した SR への Ca^{2+} 取り込みを増強する作用を有すると考えられる。Ellagic acid の詳細な作用機序は明らかではないが、イヌの心室筋から調製した SR の vesicle を用いた実験により、ellagic acid は Ca^{2+} に対する SERCA の親和性を増加させること、ウサギの心室筋や骨格筋の SR の vesicle を用いた検討によりホスホランバンに作用するとの報告がある (Berrebi *et al.*, 1997、Kathleen *et al.*, 1998、Antipenko *et al.*, 1999)。本実験において、ellagic acid を心筋組織に処置した結果、心収縮力や心拍動数に影響を与えなかった (図 4-14、図 4-16)。これは、isoprenaline との大きな違いであり、SERCA を直接活性化する作用が、弛緩 (拡張) 機能障害の治療に有用であることが示唆された。

小括：糖尿病マウスでは弛緩機能障害が顕著であった。 β 受容体刺激は phospholamban のリン酸化を介して SERCA を活性化し、弛緩機能障害を改善した。一方で、SERCA 特異的な薬物が開発されることで、心臓に負荷をかけずに弛緩（拡張）機能障害のみを改善できることが示唆された。

第5章 α アドレナリン受容体刺激応答

心臓の α 受容体は、 β 受容体とは異なるメカニズムで興奮収縮機構に関わっていることが知られている (Jensen BC *et al.*, 2014、Endoh M *et al.*, 2006)。また、多くの実験動物における心筋の α 受容体刺激は陽性変力反応 (収縮力増大) を生じることが報告されている。一方、マウス心室筋においては、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) からの Ca^{2+} 排出を介した陰性変力反応 (収縮力減少) を示すことを、当研究室は報告している (Tanaka H *et al.*, 1995、Nishimaru K *et al.*, 2001)。NCX は膜電位依存的であり、3つの Na^+ と 1つの Ca^{2+} を交換する起電性のトランスポーターである (Bers DM *et al.*, 2002)。このことから、NCX の働きと α 受容体刺激に対する陰性変力反応は、その心筋の活動電位持続時間 (APD) に依存していると推測される。つまり、活動電位持続時間が短いほど NCX は Ca^{2+} を排出しやすくなり、陰性変力反応も大きくなる。実際に、マウス心筋の活動電位は、早期再分極相を形成する一過性外向き電流 (I_{to}) のために、きわめて短い活動電位波形を有している (Nishimaru K *et al.*, 2001)。ラットの心室筋 (APD はマウスより長く、他の実験動物に比べると短い) では、 α 受容体刺激で陰性変力反応と陽性変力反応の両方を示す (Kamata K *et al.*, 1997、Kamata K *et al.*, 2006)。従って、 α 受容体刺激による変力反応で見られる種差は、APD と関連付けることができると考えられる。さらに、このような活動電位波形との関連性はマウス心筋の生後発達においても観察される (Hamaguchi S *et al.*, 2013)。当研究室では出生から 4 週齢にかけて活動電位持続時間の短縮と、 α 受容体刺激に対する変力反応の陽性から陰性への転換が同時進行することを見出した (Tanaka *et al.*, 1995)。では病態時の変化に関しても同様の図式が成立するのであろうか。前述のように、糖尿病マウスの活動電位持続時間は正常マウスに比べて延長していたことから、この疑問を解決するための格好のモデルになると考えられる。本章では、活動電位持続時間と NCX の働きに着目し、正常マウスと糖尿病マウスの α 受容体刺激に対する陰性変力反応について検討した。さらに、APD を薬物処置により延長または短縮させ、変力反応の変化を観測した。

第1節 正常マウス・糖尿病マウスにおける α 受容体刺激応答

1) 収縮力

正常マウス・糖尿病マウス心室筋ともに α 受容体刺激 (propranolol 10^{-6} M 存在下、phenylephrine 10^{-5} M : PE) に対して陰性変力反応 (収縮力減少) を示し、その反応性は糖尿病マウスで減弱していた (図 5-1)。 α 受容体刺激による収縮力の減少率は正常マウスで $-54.3 \pm 3.6\%$ ($n=6$)、糖尿病マウスで $-37.3 \pm 3.1\%$ ($n=5$) であった。濃度反応曲線より、反応濃度域、 pD_2 値 (正常マウス : 5.51 ± 0.08 、糖尿病マウス : 5.59 ± 0.51) に差は見られなかった (図 5-2)。

2) 活動電位持続時間 (APD)

活動電位測定において、正常マウス (n=6) と糖尿病マウス (n=6) を比較して活動電位持続時間 (APD₅₀) は糖尿病マウスで延長していた (図 5-3、5-4)。

3) α 受容体刺激と Na⁺/Ca²⁺交換機構 (NCX)

収縮力測定下で、NCX 阻害薬 SEA0400 存在下で α 受容体刺激薬 phenylephrine (10⁻⁵ M) を処置すると、正常マウス・糖尿病マウスともに陰性変力反応が抑制された (図 5-5、5-6)。SEA0400 存在下での phenylephrine による陰性変力反応は正常マウスで -6.8 ± 1.8% (n=5)、糖尿病マウスで -12.8 ± 3.9% (n=7) であった。

4) Na⁺/Ca²⁺交換機構 (NCX)

収縮力測定において、NCX 阻害薬 SEA0400 (10⁻⁵ M) に対する反応は正常マウス・糖尿病マウスともに陽性変力反応を示した。その反応性は糖尿病マウスで減弱していた (図 5-7、5-8)。SEA0400 による収縮力増大率は正常マウスで 71.0 ± 19.5% (n=5)、糖尿病マウスで 24.1 ± 7.8% (n=5) であった。正常マウス・糖尿病マウスの心筋組織における NCX の mRNA 量を測定したところ、糖尿病マウスで増加していた (図 5-9) (各 n=8)。

第 2 節 薬理的検討

1) 4-aminopyridine (K⁺チャネル遮断薬) に対する反応

正常マウス心室筋の活動電位を測定し、K⁺チャネル (一過性外向き電流 I_{to}) 遮断薬である 4-aminopyridine (4-AP: 3 mM) を処置すると、活動電位持続時間 (APD₅₀) は延長した (図 5-10、5-11)。収縮力測定において、4-AP 存在下の α 受容体刺激による陰性変力反応は、4-AP 非存在下と比較して減弱した (図 5-12、5-13)。

2) Cromakalim (K⁺チャネル開口薬) に対する反応

糖尿病マウス心室筋に、K⁺チャネル開口薬である cromakalim (3 × 10⁻⁵ M) を処置し活動電位を測定すると、活動電位持続時間 (APD₅₀) は短縮した (図 5-14、5-15)。収縮力測定において、cromakalim 存在下の α 受容体刺激による陰性変力反応は、cromakalim 非存在下と比較して増強した (図 5-16、5-17)。

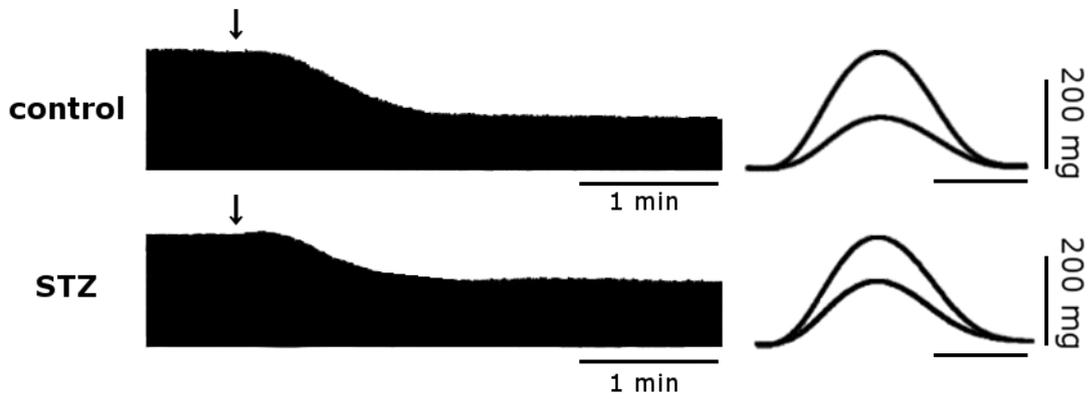


図 5-1 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋に対する phenylephrine (10^{-5} M) の作用

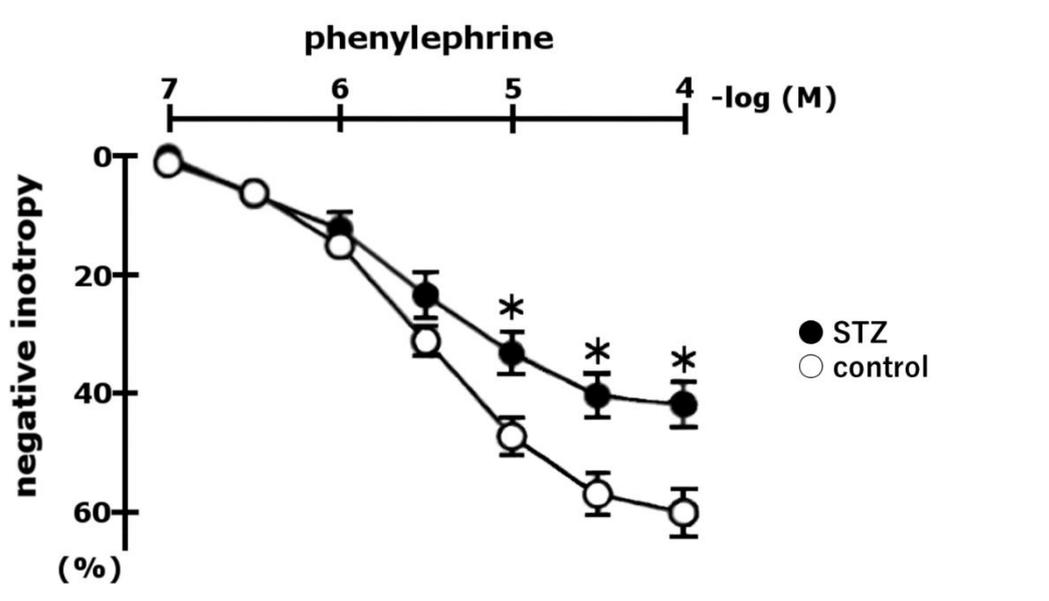


図 5-2 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋に対する α 受容体刺激の作用

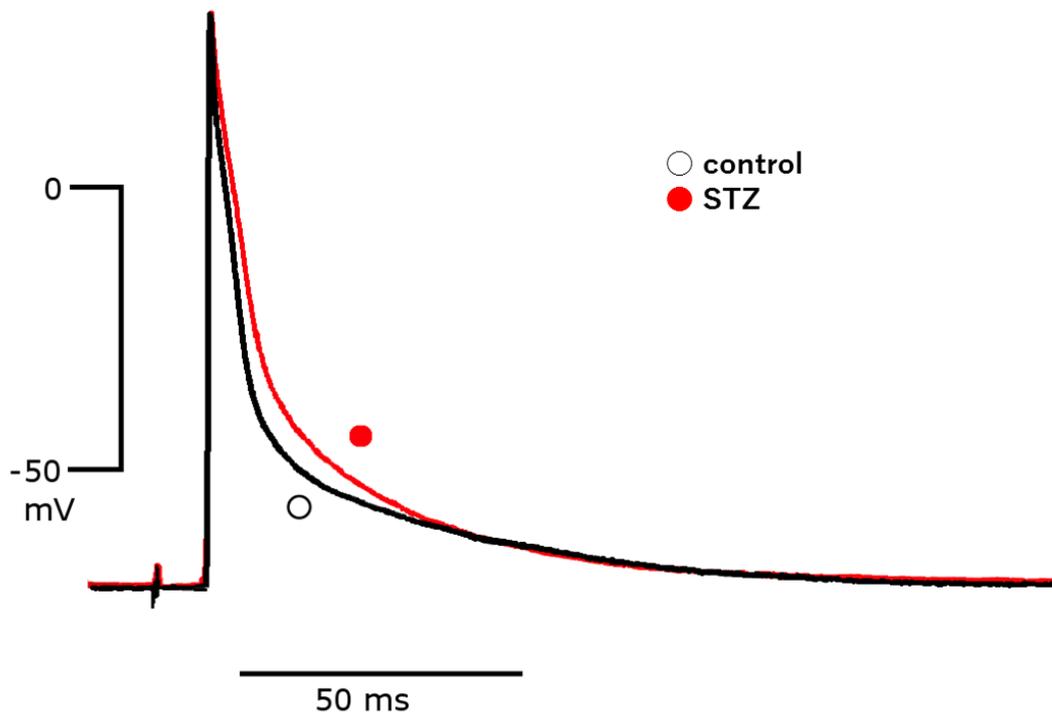


図 5-3 正常マウスおよび糖尿病マウスの活動電位波形 (第 3 章 図 3-1)

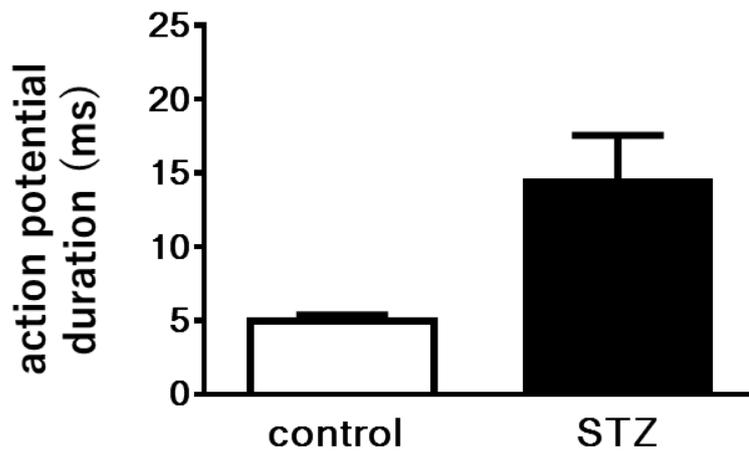


図 5-4 正常マウスおよび糖尿病マウスの活動電位持続時間 (APD)

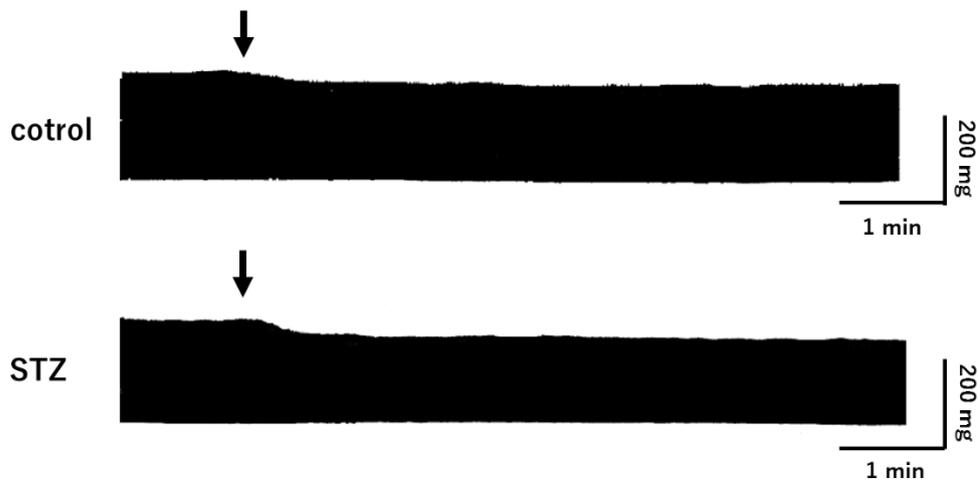


図 5-5 正常マウス・糖尿病マウス心室筋に対する NCX 阻害薬 SEA0400 (10^{-5} M) 存在下の phenylephrine (10^{-5} M) の作用

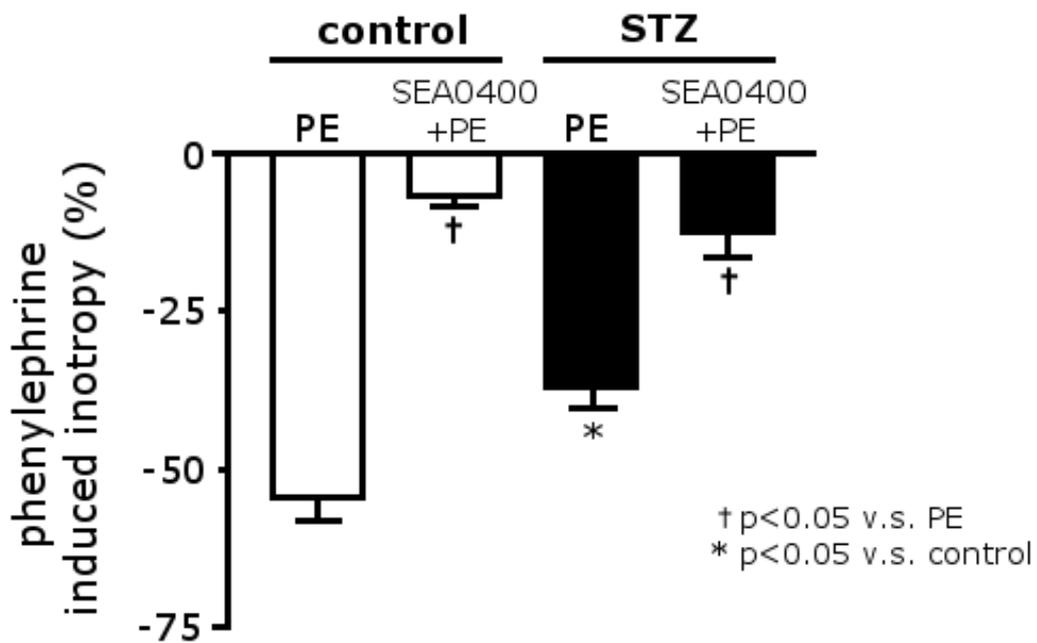


図 5-6 正常マウスおよび糖尿病マウス心室収縮力に対する phenylephrine (10^{-5} M) と SEA0400 存在下の phenylephrine (10^{-5} M) の作用

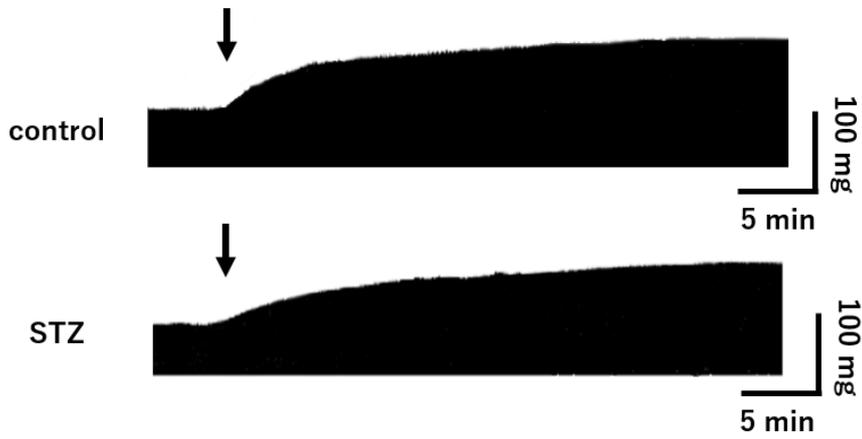


図 5-7 正常マウスおよび糖尿病マウスに対する SEA0400 (10^{-5} M) の作用

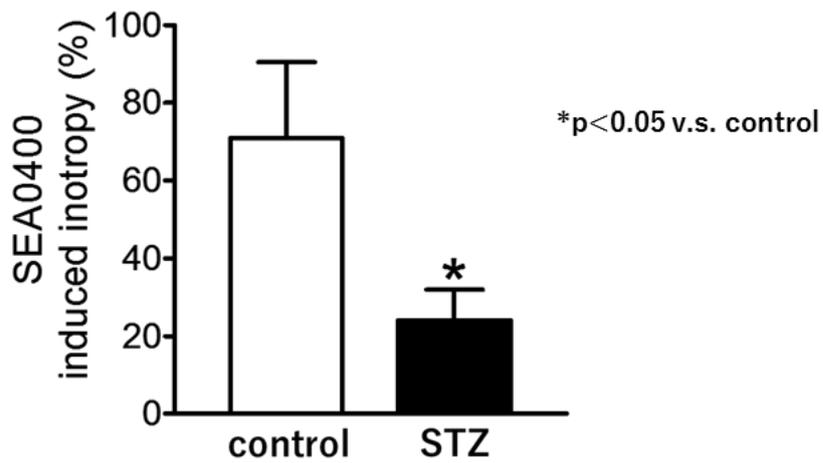
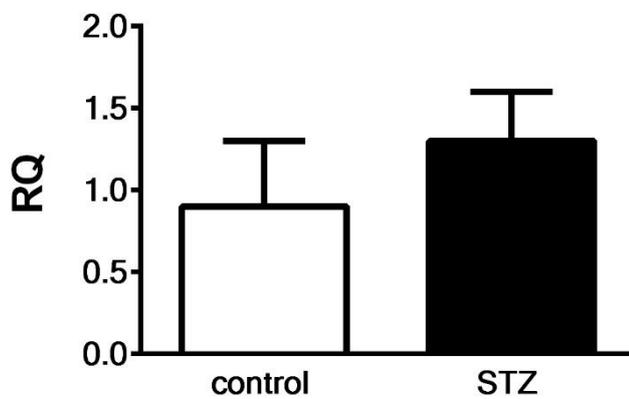


図 5-8 正常マウスおよび糖尿病マウスに対する SEA0400 (10^{-5} M) の作用



Relative quantities (RQ) were determined using GAPDH as an internal control.

図 5-9 正常マウスおよび糖尿病マウス心室筋 NCX の mRNA 量

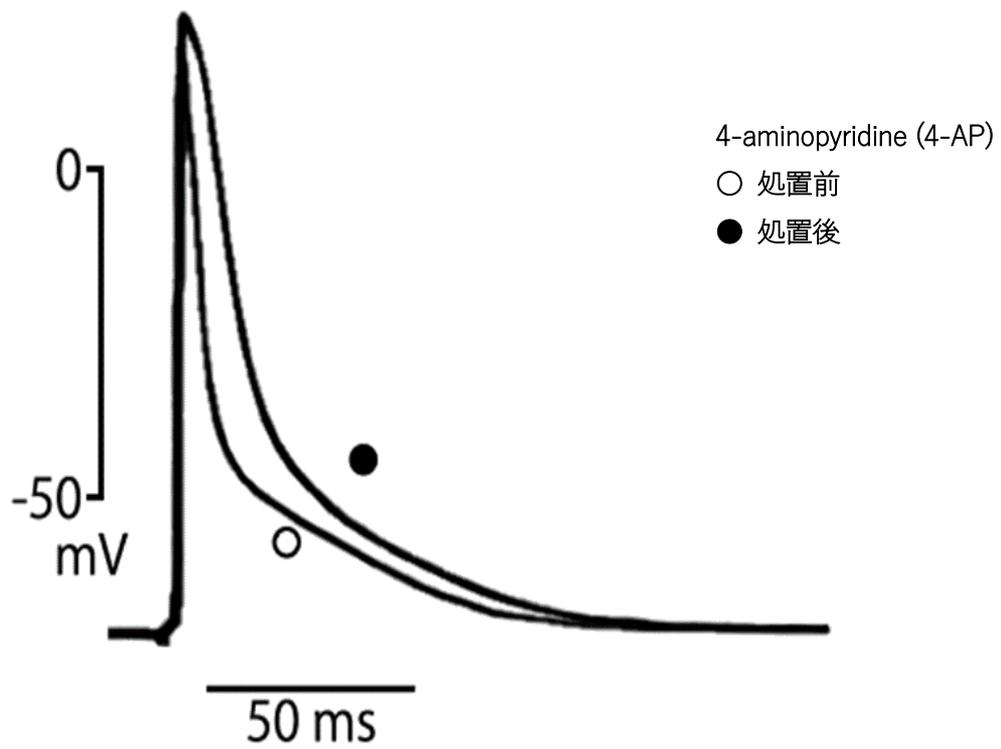


図 5-10 正常マウス心室筋活動電位に対する 4 aminopyridine(4-AP:3 mM)の作用

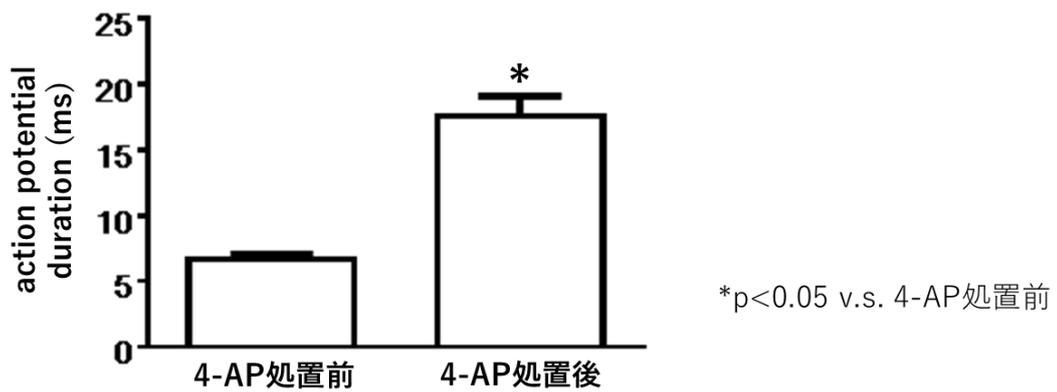


図 5-11 正常マウス心室筋活動電位持続時間に対する 4 aminopyridine(4-AP:3 mM)処置の変化

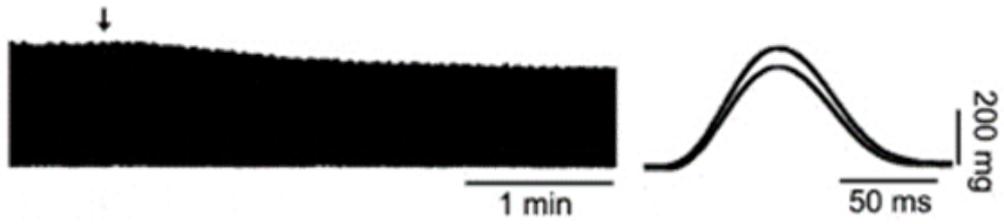


図 5-12 正常マウス心室筋収縮力に対する 4 aminopyridine(4-AP:3 mM)存在下の phenylephrine の作用

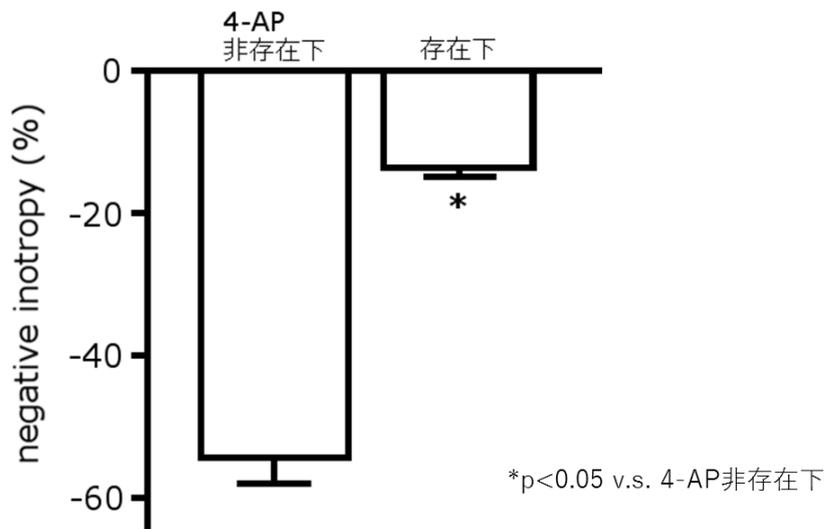


図 5-13 正常マウス心室筋収縮力に対する 4 aminopyridine(4-AP:3 mM)非存在下と存在下における phenylephrine による陰性変力反応変化率

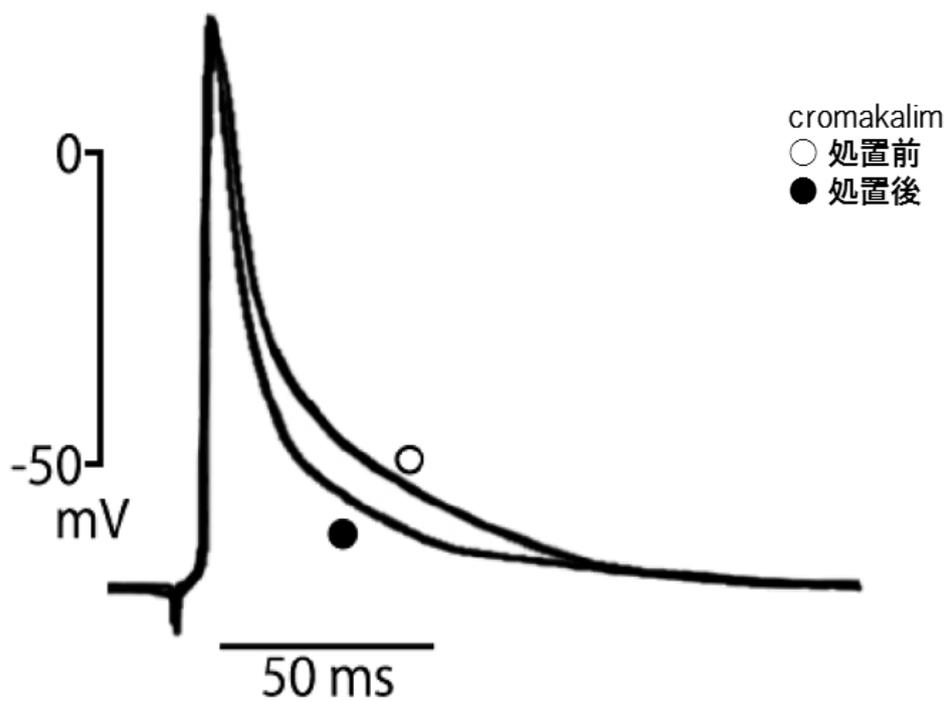


図 5-14 糖尿病マウス心室筋活動電位に対する cromakalim(3×10^{-5} M)の作用

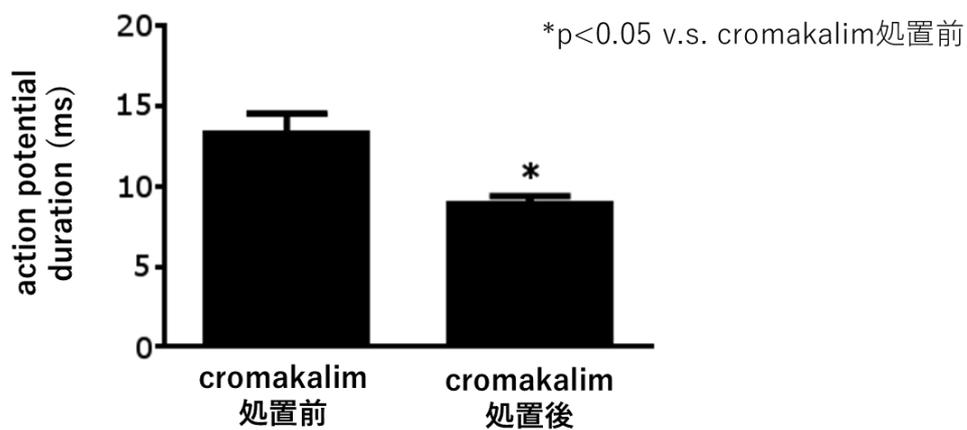


図 5-15 糖尿病マウス心室筋活動電位持続時間に対する cromakalim(3×10^{-5} M)処置の変化

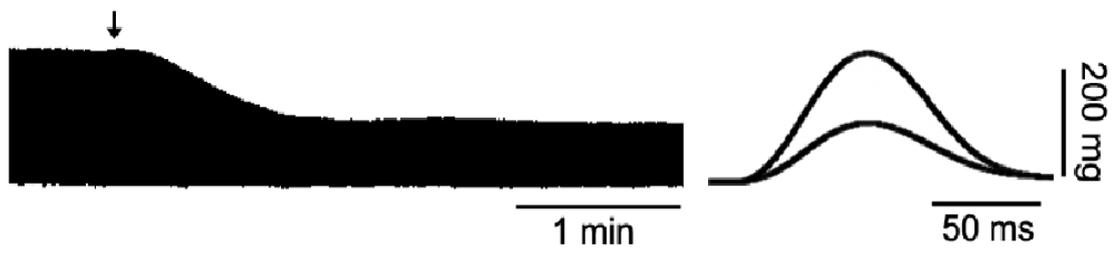


図 5-16 糖尿病マウス心室筋収縮力に対する cromakalim(3×10^{-5} M)存在下の phenylephrine の作用

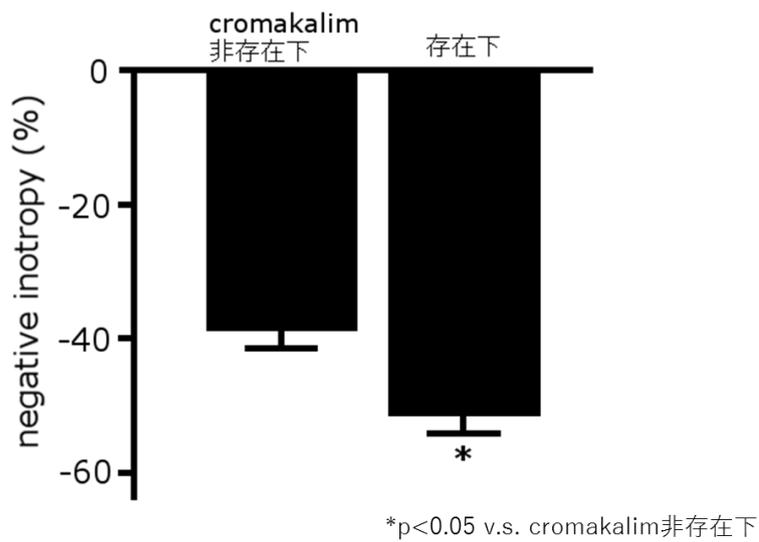


図 5-17 糖尿病マウス心室筋収縮力に対する cromakalim(3×10^{-5} M)非存在下と存在下における phenylephrine による陰性変力反応変化率

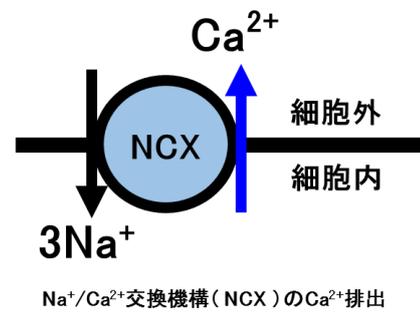
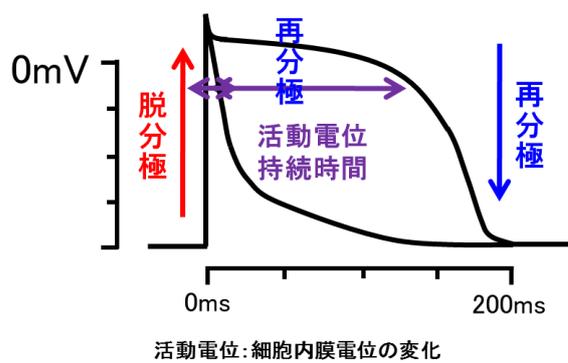
第3節 考察

正常マウス、糖尿病マウスともに phenylephrine による α 受容体刺激では陰性変力反応(収縮力減少)を示し、その反応性は糖尿病マウスで有意に小さかった(図 5-1、5-2)。また、 α 受容体刺激に対する陰性変力反応は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) 阻害薬 SEA0400 処置で抑制された(図 5-5、5-6)。このことから、正常マウス、糖尿病マウスともに α 受容体刺激に対する陰性変力反応は NCX の Ca^{2+} 排出を介した反応であることが示された。 α 受容体刺激における反応濃度域や、 pD_2 値に差は見られなかったことから、糖尿病マウスの陰性変力反応の減弱は受容体の数や親和性の低下によるものではないと考えられる。

活動電位持続時間 (APD) は糖尿病マウスで有意に延長していた(図 5-4)。このことは、糖尿病マウス心室筋において、一過性外向き電流 (I_{to}) の電流が減弱しているとの報告と矛盾しない結果である (Aomine M *et al.*, 2000、Torres-Jacome J *et al.*, 2013、Lopez-Izquierdo A *et al.*, 2014)。NCX の機能に関しては、SEA0400 に対する陽性変力反応の減弱が起きていたことから、糖尿病マウスで減弱していることが示された。ところが、NCX の mRNA 量は糖尿病マウスで増加していた(図 5-7~5-9)。このことは、発現量と機能的な働きが必ずしも一致していないことを示している。このような発現量と働きが逆転する原因は、NCX の働きが細胞膜の電位変化に大きく影響を受けているからであると考えられる。つまり、糖尿病マウスにおける活動電位持続時間の延長が、NCX による Ca^{2+} くみ出しを抑制し、陰性変力反応を減弱させたと考えられる。そこで、 α 受容体刺激に対する陰性変力反応の減弱の因果関係を明らかにするため、活動電位を薬物処置により変化させ、検証した。

正常マウス心室筋に K^+ チャネル遮断薬 4-aminopyridine を処置し APD を延長させると、 α 受容体受容体刺激に対する陰性変力反応は減弱した(図 5-10~5-13)。また、糖尿病マウス心室筋に K^+ チャネル開口薬 cromakalim を処置し APD を短縮させると、 α 受容体受容体刺激に対する陰性変力反応は増強した(図 5-14~5-17)。これらの結果は、短い APD であるほど、NCX からの Ca^{2+} 排出が起きやすくなり、 α 受容体刺激に対する陰性変力反応が大きくなるという法則性が、正常マウスと糖尿病マウスにおいても支配的であることを示す。APD 延長が起きている糖尿病ラットにおいて、 α 受容体刺激の陰性変力反応が消失するとの報告もある (Kamata K *et al.*, 1997、Kamata K *et al.*, 2006)。類似した相関は、マウス心室筋の発達変化でも報告されている (Tanaka H *et al.*, 1995、Hamaguchi S *et al.*, 2013)。活動電位と α 受容体刺激に対する陰性変力反応の逆相関が、その他の病態時でも当てはまる普遍的な法則として成り立つものか今後、さらに検討していく必要がある。活動電位持続時間の延長は、不応期を延長させ不整な刺激に対する応答を阻止するという代償的な仕組みとも考えられる。また、 α 受容体刺激に対する応答性の減弱は、収縮力減弱を補う仕組みとして働いている可能性がある。

小括：糖尿病マウスではAPDが延長しており、 α 受容体刺激に対する陰性変力反応が減弱していた。正常マウスの活動電位を薬物処置により延長させることで、 α 受容体刺激に対する応答性が、糖尿病マウスのもののように減弱した。同様に、糖尿病マウスの活動電位を薬物処置により短縮させると、 α 受容体刺激に対する反応性が正常マウスのレベルに近づいた。これらのことから、糖尿病マウスではAPDが延長することにより、NCXの Ca^{2+} 排出が起こりにくくなり、 α 受容体刺激に対する陰性変力反応が減弱することが示唆された。



(参考) 細胞内膜電位変化と $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) による Ca^{2+} 排出

第6章 自動能に関する検討

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。正所性自動能の源である洞房結節は、自発的に活動電位を発生し、これが心臓全体に伝わることで収縮を起こす、つまり心臓の歩調取りの役割を担っている。この洞房結節の活動電位の発生には複数のイオンチャネルが関与しているが、特にL型Ca²⁺チャネルの役割が大きいことが知られている。洞房結節における活動電位の発生頻度は、交感神経興奮により増大、副交感神経興奮により減少し、心拍数が調節されている。

肺静脈は、左心房に隣接して存在しており、肺循環においては肺から心房に血液を戻す役割をしている血管であるが、左心房からの起始部の中膜に心筋細胞が存在し、脈壁を袖状に覆っている(myocardial sleeve) (Nathan H *et al.*,1966)。この部位の心筋細胞、すなわち肺静脈心筋が異所性自動能を有しており電気活動を生じやすいことが複数の動物種で報告されている(Wongcharoen W *et al.*,2006、Honjo H *et al.*,2003)。この肺静脈心筋の自発的な電氣的活動、すなわち自発活動は通常低頻度であるため洞房結節の自動能によりマスクされているが、これが顕在化することで心房細動の発生に寄与することが示されている。肺静脈心筋は心房細動発症のきっかけとなる異常興奮が生じる部位であることが臨床的にも示されている (Haïssaguerre M *et al.*, 1998)。

糖尿病は心房細動をきたしやすい基礎疾患の一つに挙げられる (Goudis *et al.*, 2015)。糖尿病患者における死亡の主要な原因が心臓・血管系の障害であるとも言われている。前述の通り、心房細動は肺静脈心筋からの自発活動がトリガーとなっていると考えられており、糖尿病が肺静脈心筋に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。また、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が肺静脈心筋の自発活動を誘発することが知られている(Tsuneoka *et al.*, 2012, Namekata *et al.*, 2013)。これらの伝達経路に糖尿病が何らかの影響を及ぼしていることが様々な糖尿病モデル動物で報告されている。糖尿病により引き起こされる心房細動についてより理解を深めるためには、糖尿病モデルの肺静脈心筋について基本的性質を理解することが有効である。

本研究室では、モルモット肺静脈心筋の自発活動には筋小胞体からのCa²⁺放出とNa⁺/Ca²⁺交換機構が (Namekata I *et al.*,2009)、ラット肺静脈心筋のnoradrenaline誘発性自発活動にはL型Ca²⁺チャネルと筋小胞体からのCa²⁺放出が関与していること(Namekata I *et al.*,2010)、さらにマウス肺静脈にも心筋層が存在し約半数の標本で自発活動が発生することを報告した(Tsuneoka Y *et al.*,2013)。しかし、マウス肺静脈心筋細胞の膜電流については未だ十分な検討はなされていない。マウスは、肺静脈心筋の緩徐脱分極相をとらえることが困難であり、また、個体が小さいために手技が難儀であるなどの短所がある。その一方で、マウスは筋小胞体 (SR) の影響を観察しやすく、また、遺伝子改変動物としても広く用いられており、ノックアウトやノックインにより特定の遺伝子の関与を検討することが

できるなどの長所もあり、実験動物として汎用性が高い。

心房細動のリスクファクターである糖尿病により肺静脈心筋の電気生理学的性質がどのように変化しているのかについては明らかではない。本研究では正常マウスと糖尿病マウスの電氣的自発活動の発生率及び薬理的性質を比較、検討することを目的とした。

第1節 洞房結節自動能

正常マウス、糖尿病マウスともに摘出右心房標本は規則的に拍動した。正常マウスおよび糖尿病マウスの心拍動数を比較すると、糖尿病マウスでわずかに低下していた。心拍動数は正常マウスで 351.6 ± 5.8 bpm (n=5)、糖尿病マウスで 321.0 ± 8.9 bpm (n=5) であった (図 6-1)。

また、正常マウスおよび糖尿病マウスの心房に noradrenaline (10^{-6} M) を処置すると、濃度依存的に陽性変時作用 (心拍動数上昇) を示し、高濃度域では心拍動数の差が消失した (図 6-2)。

第2節 肺静脈心筋の基本的性質および交感神経の影響

1) 自発活動発生率・発火頻度の比較

正常マウスおよび糖尿病マウスともにガラス微小電極法により自発活動を測定することができた。正常マウスでは 107 例中 28 例 (26.2%) が自発活動を発生していたのに対し、糖尿病マウスでは 101 例中 48 例 (47.5%) が自発活動を発生しており自発活動の自然発生率は糖尿病マウスの方が有意に高かった。また、自発活動の発生率は 3 部位で異なっており、 $RS > L > RI$ であった (図 6-3、表 6-1)。この傾向は正常マウス、糖尿病マウスともに同様であった。自発活動の平均発火頻度は正常マウスで 2.27 ± 0.29 Hz (n=20)、糖尿病マウスで 3.05 ± 0.28 Hz (n=44) であり、糖尿病マウスで高い傾向が見られた (表 6-1)。

2) Noradrenaline (10^{-6} M)、phenylephrine (10^{-5} M)、isoprenaline (10^{-5} M) の作用

自発活動を有していない肺静脈心筋に noradrenaline を処置すると正常マウスおよび糖尿病マウス共に自発活動が誘発された。自発活動誘発率は正常マウスで 57.1% (7 例中 4 例)、糖尿病マウスでは 42.9% (7 例中 3 例) であった。また、noradrenaline 処置により自発活動が誘発されるまでに要した時間は正常マウスで 1 分 39 秒、糖尿病マウスで 2 分 39 秒であった (表 6-2)。

自発活動を有していない肺静脈心筋に α 受容体刺激薬である phenylephrine を処置 (propranolol 10^{-6} M 前処置) すると正常マウス (n=4) および糖尿病マウス (n=6) 共に自発活動は誘発されなかった (表 6-3)。

自発活動を有していない肺静脈心筋に β 受容体刺激薬である isoprenaline を処置すると正常マウスおよび糖尿病マウス共に自発活動が誘発された。自発活動誘発率は正常マウスでは 69.2% (13 例中 9 例)、糖尿病マウスでは 54.5% (11 例中 6 例)であった。また、isoprenaline 処置により自発活動が誘発されるまでに要した時間は正常マウスで 5 分 50 秒、糖尿病マウスで 7 分 45 秒であった (表 6-4)。

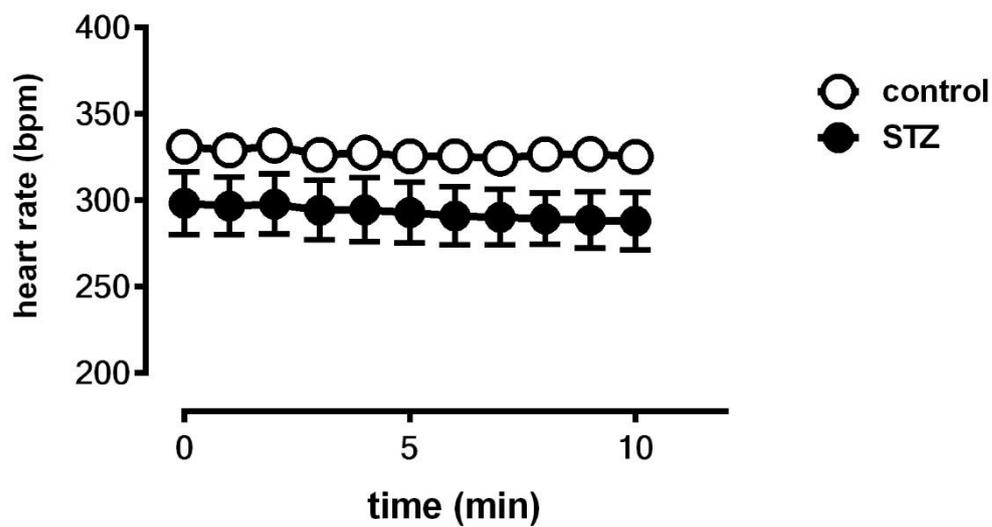


図 6-1 正常マウスおよび糖尿病マウスの心拍動数

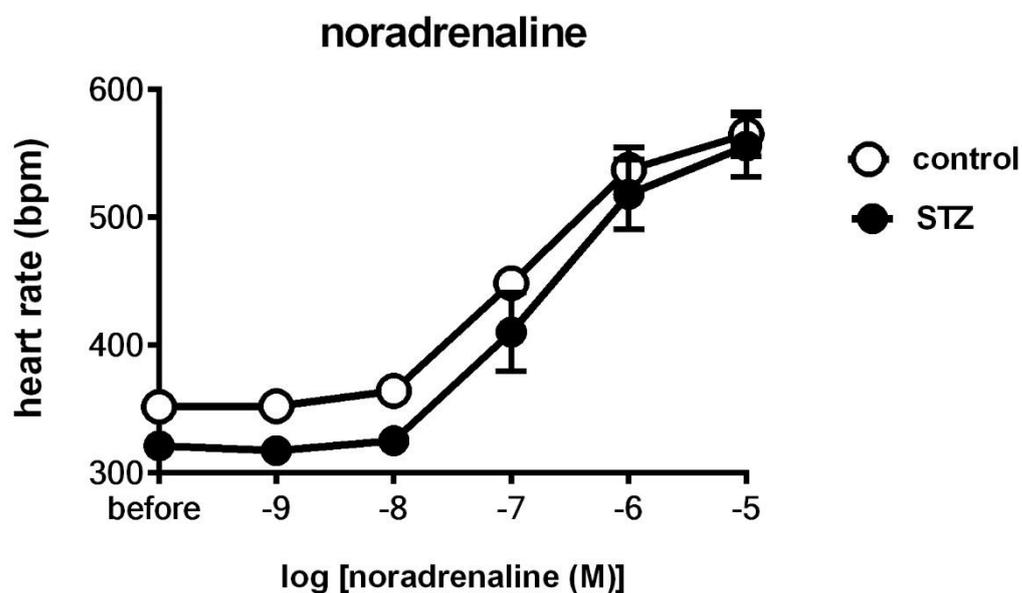


図 6-2 正常マウスおよび糖尿病マウス心拍動数に対する noradrenaline の作用

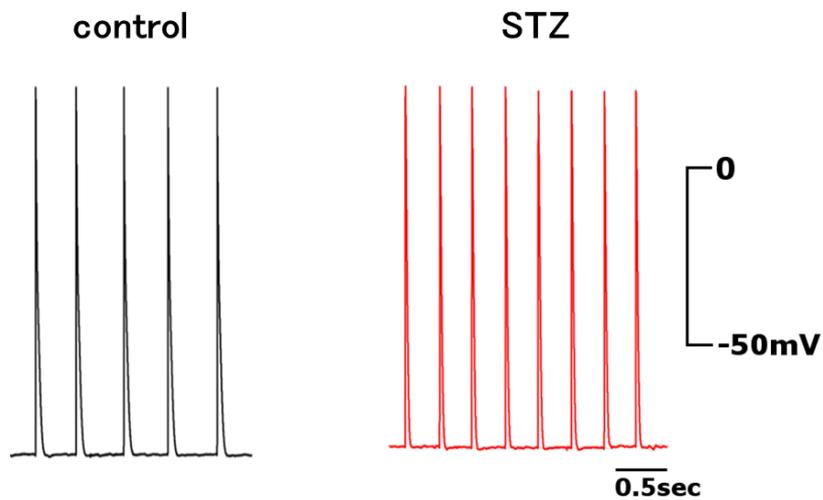


図 6-3 正常マウスおよび糖尿病マウス自発活動

control

	自発活動あり	自発活動なし
右上 (RS)	25 (53.2%)	22 (46.8%)
右下 (RI)	0 (0%)	25 (100%)
左 (L)	3 (8.6%)	32 (91.4%)
合計	28 (26.2%)	79 (73.8%)
平均発火頻度 (Hz)	2.3 ± 0.3	

STZ

	自発活動あり	自発活動なし
右上 (RS)	38 (80.9%)	9 (19.1%)
右下 (RI)	1 (5.3%)	18 (94.7%)
左 (L)	9 (25.7%)	26 (74.3%)
合計	48 (47.5) **	53 (52.5%)
平均発火頻度 (Hz)	3.0 ± 0.3	

**p<0.01 v.s. control χ^2 検定

表 6-1 正常マウスおよび糖尿病マウス部位別自発活動発生率

	正常マウス	糖尿病マウス
全数(本)	7	7
自発活動誘発(本)	4	3
自発活動誘発率(%)	57.1	42.9
平均発火頻度(Hz)	6.27	5.44
自発活動誘発までの平均時間	1 min 39 sec	2 min 39 sec

表 6-2 正常マウスおよび糖尿病マウスの noradrenaline 処置に対する応答

	正常マウス	糖尿病マウス
全数(本)	4	6
自発活動誘発(本)	0	0
自発活動誘発率(%)	0	0

表 6-3 正常マウスおよび糖尿病マウスの α 受容体刺激に対する応答

	正常マウス	糖尿病マウス
全数(本)	13	11
自発活動誘発(本)	9	6
自発活動誘発率(%)	69.2	54.5
平均発火頻度(Hz)	6.24	4.84
自発活動誘発までの平均時間	5 min 50 sec	7 min 45 sec

表 6-4 正常マウスおよび糖尿病マウスの β 受容体刺激に対する応答

第3節 考察

洞房結節自動能、すなわち心拍動数は糖尿病マウスでわずかに低下していた（図 6-1）。また、noradrenaline に対する反応は正常マウスと糖尿病マウスで差はほとんど見られなかった（図 6-2）。この結果は、1 型糖尿病マウスで心拍が減少している報告と矛盾しない（Stables *et al.*, 2015）。

摘出肺静脈標本の自発活動発生率は正常マウスに比べて糖尿病マウスで有意に高かった（表 6-1）。また、自発活動の平均発火頻度も糖尿病マウスで有意に高かった。このことから、糖尿病では正常時と比較して肺静脈心筋の活動性が亢進していることが示された。

交感神経伝達物質の noradrenaline によって肺静脈心筋の自発活動が誘発された。noradrenaline は G タンパク共役型受容体を刺激することによって心筋細胞の活動電位を変化させ、心臓のポンプ機能を修飾している。肺静脈心筋では左心房に比べて自律神経支配密度が高いこと報告されており（Gao *et al.*, 2011, Tan *et al.*, 2006）、このことが生体内において自発活動の発生に関与していることが考えられる。

Phenylephrine による α 受容体刺激では自発活動が誘発されず、isoprenaline による β 受容体刺激では半数以上で自発活動誘発がみられた（表 6-3、6-4）。このことから、マウス肺静脈心筋自発活動には β 受容体に対する刺激やその下流のシグナル伝達の経路が関係していると考えられる。一方、正常マウス及び糖尿病マウス共に isoprenaline 処置よりも noradrenaline 処置の方が自発活動誘発までの時間が短かったことから、 α 受容体刺激が β 受容体刺激による自発活動誘発を促進していることが考えられる。

また、正常マウスと糖尿病マウスを比較すると noradrenaline、isoprenaline 処置共に正常マウスで自発活動誘発率が高く、誘発されるまでの時間が短かった（表 6-2～6-4）。これは、糖尿病マウスでは肺静脈心筋自発活動の自然発生率が高く、それ以外の肺静脈心筋は刺激を与えられても自発活動が誘発されにくい状態になっており、逆に、正常マウスでは肺静脈心筋自発活動の自然発生率が低く、刺激を与えられると比較的に容易に自発活動が誘発される状態になっていたと考えられる。

小括：糖尿病マウス肺静脈心筋は正常マウスと比較して、活動性が亢進していた。このことは、糖尿病患者での心房細動発症に寄与すると考えることができた。交感神経は肺静脈心筋に対して、増悪効果を示し、糖尿病性神経障害がさらに肺静脈心筋自発活動を亢進させる要因となる可能性が示唆された。

第4節 肺静脈心筋自発活動に対する薬理的検討

1) L型 Ca²⁺チャネルに関する検討

自発活動を有している肺静脈心筋にL型 Ca²⁺チャネル阻害薬である nifedipine を累積処置 (10⁻⁸~10⁻⁵ M) したところ、両群ともに濃度依存的に発火頻度は低下し、10⁻⁵ M では正常マウス(n=2)および糖尿病マウス(n=2)ともに自発活動は停止した。濃度反応曲線より、発火頻度低下の程度に両群間の差はみられなかった(図 6-4)。

2) Cl⁻チャネルに関する検討

Cl⁻チャネル阻害薬である niflumic acid (3×10⁻⁵ M) を自発活動を有している標本に処置したところ、正常マウス (n=5) および糖尿病マウス (n=3) ともに自発活動は停止した。その発火頻度低下の程度に両群間の差は見られなかった (図 6-5)。

3) 筋小胞体 (SR) からの Ca²⁺放出に関する検討

正常マウス (n=3) 及び糖尿病マウス (n=5) に SR から Ca²⁺を放出する IP₃ 受容体の阻害薬である xestospongine C (3×10⁻⁶ M) を処置したところ、両群ともにわずかに発火頻度が低下したが、頻度低下の程度に両群間の差は見られなかった (図 6-6)。

正常マウス (n=3) 及び糖尿病マウス (n=5) に SR から Ca²⁺を放出する ryanodine 受容体の阻害薬である ryanodine (10⁻⁶ M) を処置したところ、両群で頻度低下が観察されたが、両群間で頻度低下の程度に差は見られなかった (図 6-7)。

Xestospongine C と ryanodine の効果を比較すると、自発活動の頻度を低下させる効果は ryanodine の方が大きかった (図 6-8)。

4) Na⁺/Ca²⁺交換機構(NCX)に関する検討

NCX の阻害薬である SEA0400 (10⁻⁶ M) を自発活動を有する標本に処置すると正常マウス・糖尿病マウスともに頻度が低下した。頻度低下の程度は正常マウスで大きかった (図 6-9)。

5) 持続性 Na⁺電流に関する検討

持続性 Na⁺電流の阻害薬である GS-458967 (10⁻⁶ M) を自発活動を有する標本に処置したところ、正常マウス・糖尿病マウスともに発火が頻度低下した。頻度低下の程度は糖尿病マウスで大きかった (図 6-10)。

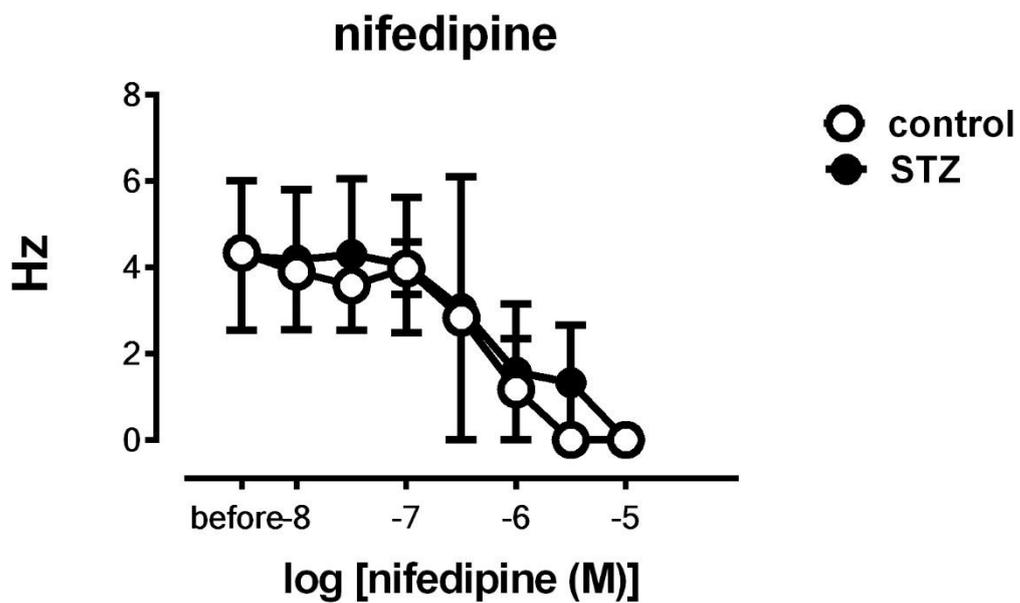


図 6-4 正常マウスおよび糖尿病マウスの nifedipine 累積処置 (10^{-8} ~ 10^{-5} M) による発火頻度変化

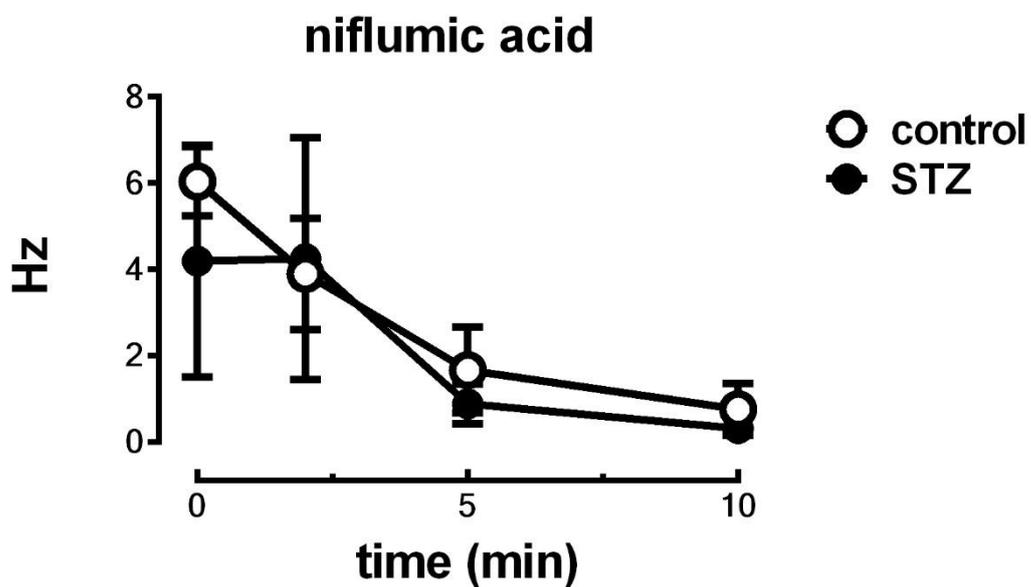


図 6-5 正常マウスおよび糖尿病マウスの niflumic acid (3×10^{-5} M) 処置による発火頻度変化

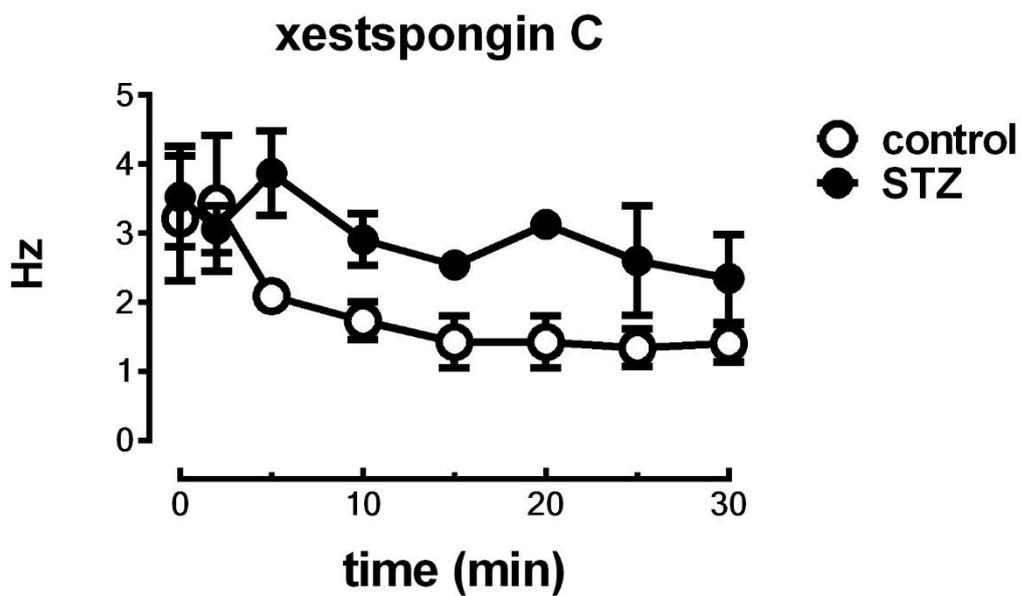


図 6-6 正常マウスおよび糖尿病マウスの xestospongine C (3×10^{-6} M) 処置による発火頻度変化

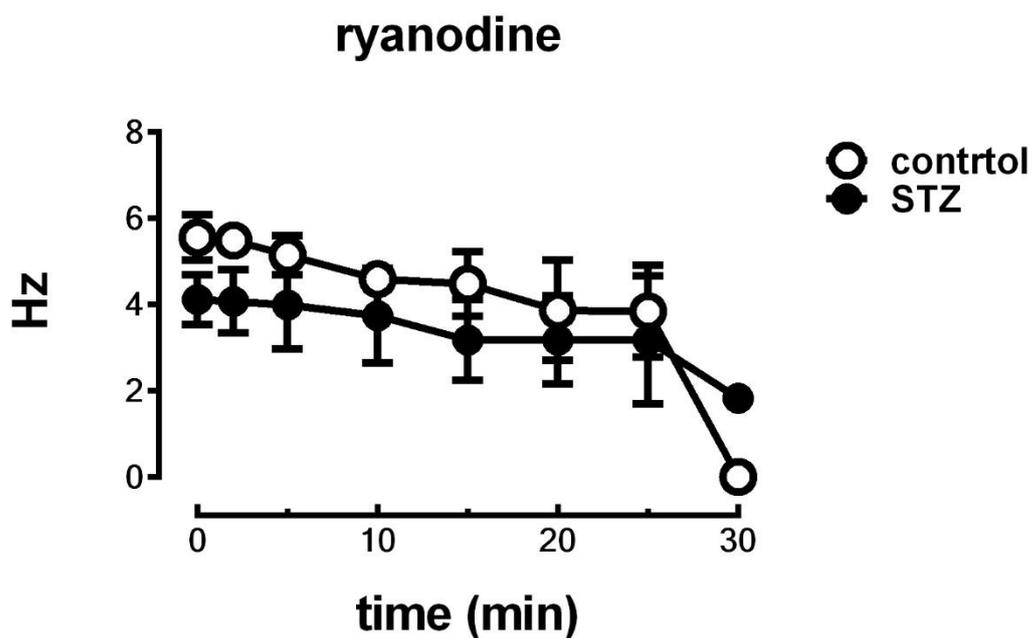


図 6-7 正常マウスおよび糖尿病マウスの ryanodine (10^{-6} M) 処置による発火頻度変化

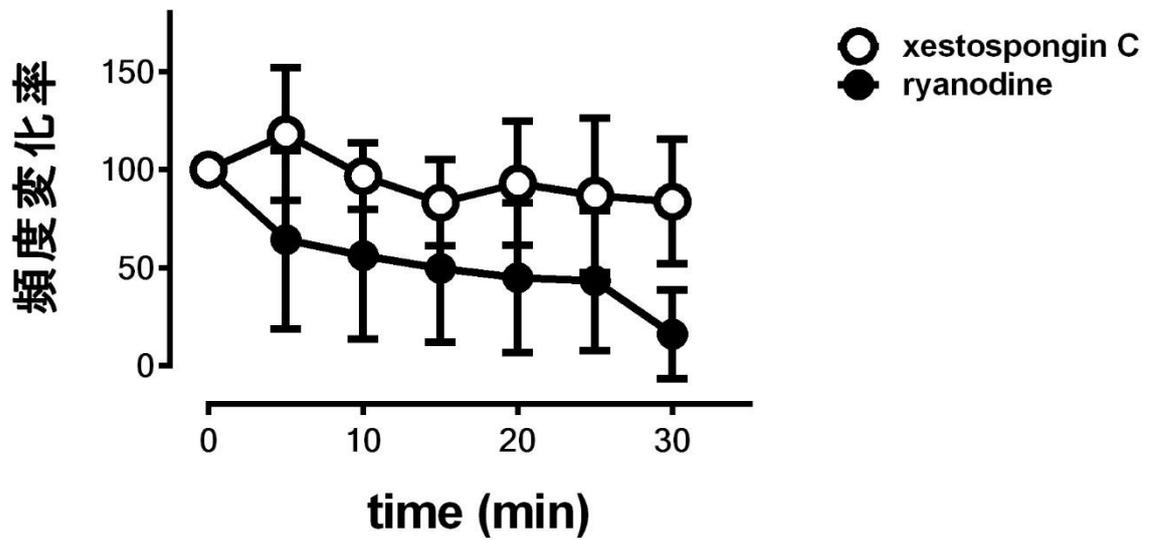


図 6-8 肺静脈心筋自発活動に対する xestospongine C と ryanodine の頻度変化率の比較

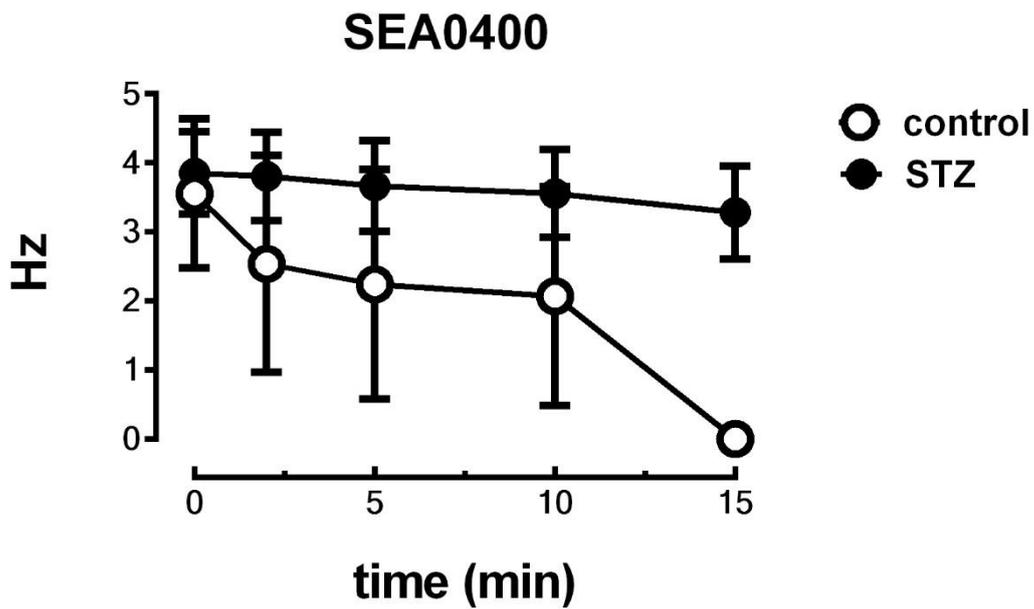


図 6-9 正常マウス及び糖尿病マウスの SEA400 (10^{-6} M) 処置による発火頻度変化

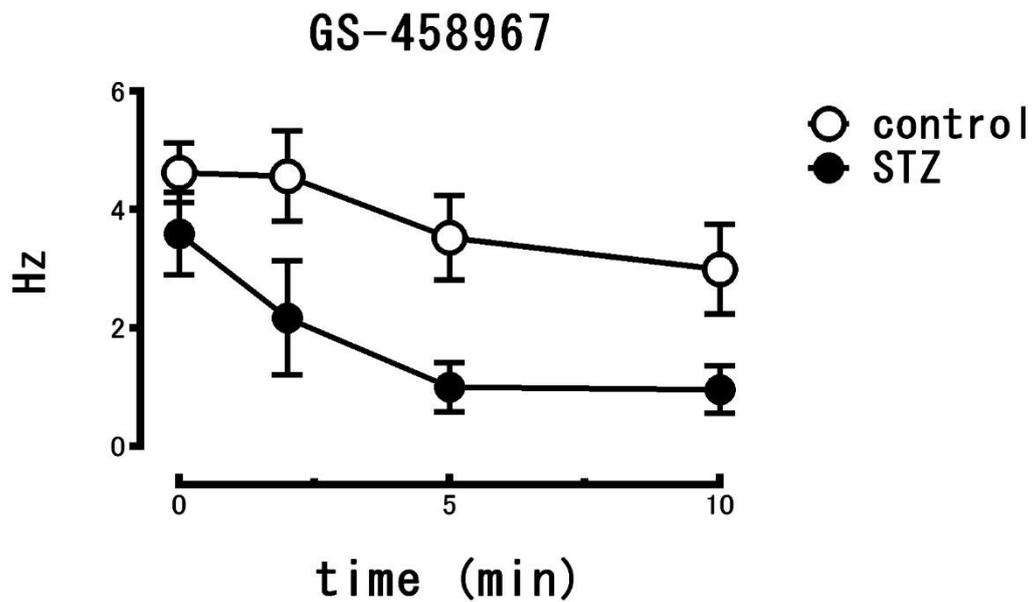
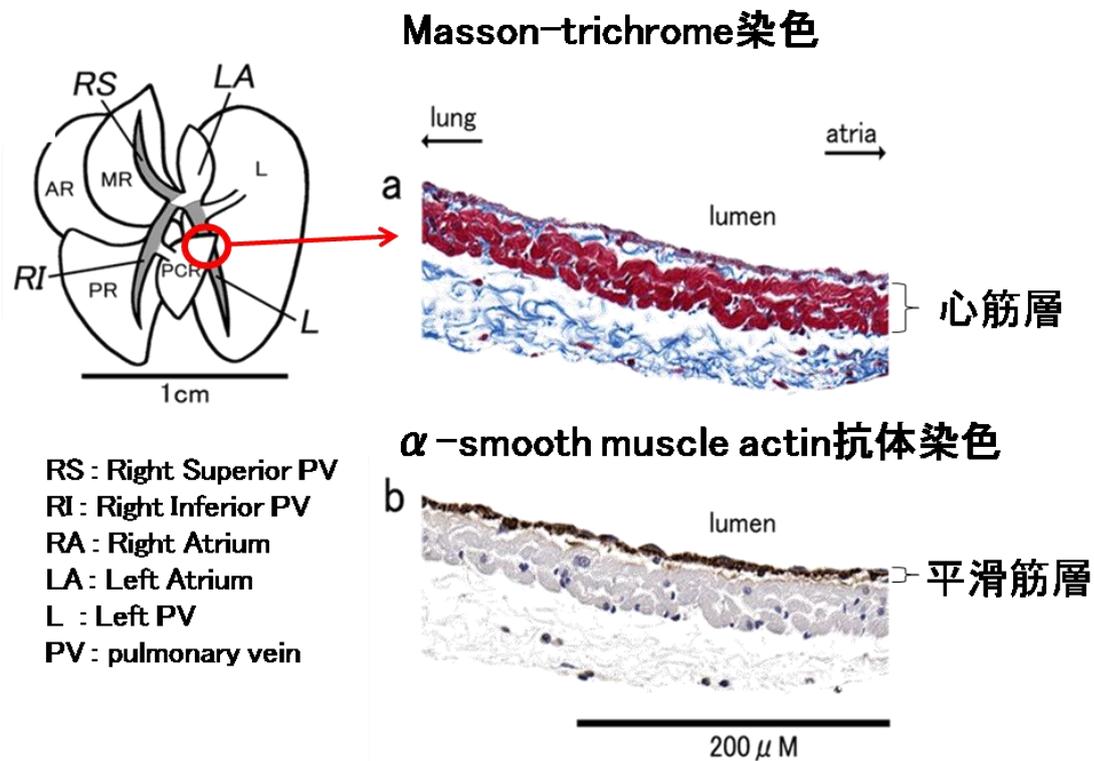


図 6-10 正常マウス及び糖尿病マウスの GS-458967 (10^{-6} M) 処置による発火頻度変化



(参考) ddY 系マウス肺静脈の染色 (恒岡弥生 博士論文)

第5節 考察

肺静脈心筋自発活動の発生には細胞内 Ca^{2+} が関与していると考えられている。一般に、細胞内 Ca^{2+} の挙動は、まず細胞膜の脱分極によって開口した電位依存性の L 型 Ca^{2+} チャネルから細胞内へ Ca^{2+} が流入し、この Ca^{2+} が筋小胞体 (SR) 上の ryanodine 受容体を開口させる。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は SR からの Ca^{2+} 放出が主な要因となっているが、SR 上の Ca^{2+} 放出チャネルには ryanodine 受容体と IP_3 受容体の 2 種類が知られている。このようにして細胞質内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、その後 Ca^{2+} は主に SR の SERCA によって濃度勾配に逆らって SR へ再取り込みされるか、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構 (NCX) によって細胞外に排出されることで細胞内 Ca^{2+} 濃度が減少する。

まず、 Ca^{2+} に関連する細胞膜のイオンチャネルに着目した。L 型 Ca^{2+} チャネルの阻害薬である nifedipine によって自発活動が停止したことから、L 型 Ca^{2+} チャネルを介した内向き電流が自発活動の発生に寄与していることが示された。また、L 型 Ca^{2+} チャネルの自発活動発生への寄与は正常マウスと糖尿病マウスで差がなく、このことは、L 型 Ca^{2+} チャネルの mRNA 量が正常マウスと糖尿病マウスでほとんど差がないという報告 (Teshima Y *et al.*, 1999, Takasawa S *et al.*, 1997) と矛盾しない。また Ca^{2+} によって活性化される Cl^- チャネル (Ca^{2+} activated Cl^- チャネル) の阻害薬である niflumic acid で自発活動の停止が見られ、自発活動に対する Cl^- チャネルの関与が示唆された。 Cl^- チャネルの平衡電位は -40mV 付近にあり、活動電位の発火に必要な緩徐脱分極付近の電位 (およそ -60mV) では、細胞内 Cl^- イオンが細胞外へと流出し、内向き電流が生じていると考えられる。自発活動発生における Cl^- チャネルの寄与はラット肺静脈心筋自発活動においても検討されており (Okamoto *et al.*, 2014)、 Cl^- チャネルの新たな役割に注目したい。

次に、細胞内 Ca^{2+} の主な供給源である筋小胞体 (SR) に存在する 2 種類の Ca^{2+} 放出チャネル (ryanodine 受容体、 IP_3 受容体) について検討した。どちらの阻害薬 (ryanodine、xestospongine C) でも自発活動の発火頻度低下が見られ、マウス肺静脈心筋自発活動においても SR が寄与していることが明らかとなった。しかしその作用は ryanodine の方が大きいものであったため、マウス肺静脈自発活動発生には ryanodine 受容体からの Ca^{2+} 放出の影響が大きいと考えられる。 α 受容体の下流には NCX の活性化、 IP_3 受容体の活性化、内向き整流性 K^+ チャネルの抑制 (De jonge HW *et al.*, 1995) があり、 β 受容体の下流には Na^+/K^+ ATPase (Dobretsov M *et al.*, 1998)、L 型 Ca^{2+} チャネルの活性化 (Ngumo F *et al.*, 2009)、遅延整流性 K^+ チャネルの活性化 (Yazawa K *et al.*, 1990)、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出の増大 (Tanaka H *et al.*, 1997) などがあると報告されている。 α 受容体刺激では自発活動が誘発されず (第 1 節)、その下流にある IP_3 受容体を阻害しても自発活動に対して大きく影響を及ぼさなかったこと (第 3 節) からマウス肺静脈心筋自発活動発生にこれらの経路はあまり関与しないと考えられる。一方、 β 受容体刺激では自発活動が誘発され、その下流の L 型 Ca^{2+} チャネルや ryanodine 受容体が自発活動発生に寄与していたことから、 β 受容体刺激により細胞内

Ca²⁺濃度が上昇し、自発活動に至ったと考えられる。これらのことから、マウス肺静脈心筋自発活動には交感神経が関与しており、特に G_s 共役型受容体関連の経路が自発活動の発生に寄与していると考えられる。

また、細胞膜上の Ca²⁺トランスポーターである Na⁺/Ca²⁺交換機構 (NCX) に着目した。正常マウスでは NCX 阻害薬 SEA0400 処置によって自発活動が抑制されたことから、マウス肺静脈心筋自発活動の発生には NCX が関与していると考えられる。NCX は、細胞内 Ca²⁺を細胞外にくみ出すと同時に 3つの Na⁺を細胞内に取り込んでいる。その際、内向き電流が生じ、自発活動の発生に寄与している可能性がある。一方、糖尿病マウスでは SEA0400 処置による自発活動停止はみられず、発火頻度の低下のみがみられた。正常マウスと比較して糖尿病マウス肺静脈心筋自発活動の SEA0400 による頻度低下は小さく、この要因として糖尿病マウス肺静脈心筋で活動電位持続時間 (APD) が延長していたこと (第 3 章) と、NCX 機能低下が挙げられる (第 5 章)。

さらに、新たな脱分極電流成分として持続性 Na⁺電流に着目した。持続性 Na⁺電流阻害薬を処置したところ、糖尿病マウスで発火頻度低下が大きく観察された。持続性 Na⁺電流は肺静脈心筋自発活動で見られる緩徐脱分極相の形成や心房細動発症と関連することが明らかとなっており (Luiz *et al.*, 2014, Shryock *et al.*, 2013)、今後のさらなる検討が期待される。

本研究を通じて、マウスの肺静脈は心筋層が薄いためガラス微小電極の刺入が難しく、電氣的自発活動の安定性もモルモットやラットと比べて低い印象があった。また、自発活動の本質である緩徐脱分極を捉えることもきわめて困難であった。そのような制約はあるが、自発活動を観測し、薬理的処置の影響を観測することは可能であった。各種遺伝子改変動物がマウスで供給される事を考えると、今後肺静脈心筋自動能の研究を進める上で、マウスという動物種も一定の価値を有するといえよう。

小括: マウス肺静脈心筋自発活動発生には、種々のイオンチャネルやトランスポーターが関与していることが明らかとなった。肺静脈由来の糖尿病性心房細動治療のターゲット探索において、これらの知見が有意義なものとなることを期待する。

第7章 総括

Streptozotocin 誘発性糖尿病モデルマウス摘出心筋標本を用いて、心筋の活動電位、 Ca^{2+} transient、収縮・弛緩機能について検討し、以下の知見を得ることが出来た。

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。

結論2：糖尿病心筋の拡張機能低下は SERCA の制御異常が主な原因であり、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ある。

結論3：糖尿病マウスでは、 α 受容体刺激による陰性変力反応が減弱しているが、その原因のひとつが、活動電位持続時間の延長である。

結論4：糖尿病は肺静脈心筋細胞のイオンチャ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。

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。弛緩機能不全や心房細動発生の原因と考えられている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見られ、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ことを期待する。

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部薬物学教室 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、行方衣由紀准教授、瀧口正悟講師に深く感謝致します。

分子生物学的実験データの提供、ご指導を賜りました本学医学部統合生理学講座 赤羽悟美教授、および教室員の先生方に深く感謝致します。

SEA0400 を提供くださいました、本学薬学部薬化学教室 加藤恵介教授、および教室員の皆様に深く感謝致します。

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

平成30年1月10日
薬物学教室 金江 春奈

第9章 参考文献

- Agata N, Tanaka H, Shigenobu K.
Inotropic effects of ryanodine and nicardipine on fetal, neonatal and adult guinea-pig myocardium.
Eur J Pharmacol. 1994;260:47-55.
- Antipenko AY, Spielman AI, Kirchberger MA.
Interactions of 6-gingerol and ellagic acid with the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase.
J Pharmacol Exp Ther. 1999;290:227-234.
- Aomine M, Yamao T.
Electrophysiological properties of ventricular muscle obtained from spontaneously diabetic mice.
Exp. Anim. 2000;49:23-33.
- Belardinelli L, Giles WR, Rajamani S, Karagueuzian HS, Shryock JC.
Cardiac late Na^+ current: Proarrhythmic effects, roles in long QT syndromes, and pathological relationship to CaMKII and oxidative stress.
Heart Rhythm. 2015;12(2):440-448
- Belke DD, Swanson EA, Dillmann WH.
Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart.
Diabetes. 2004;53(12):3201-3208.
- Berrebi-Bertrand I, Lahouratate P, Lahouratate V, Camelin JC, Guibert J, Bril A.
Mechanism of action of sarcoplasmic reticulum calcium-uptake activators--discrimination between sarco(endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and phospholamban interaction.
Eur J Biochem. 1997;247(3):801-809.
- Bers DM.
Cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange function in rabbit, mouse and man: what's the difference?
J Mol Cell Cardiol. 2002;34:369-373.
- Bilginoglu A, Kandilci HB, Turan B.
Intracellular Levels of Na^+ and TTX-sensitive Na^+ Channel Current in Diabetic Rat Ventricular Cardiomyocytes.
Cardiovasc Toxicol .2013;13:138-147

- Binah O, Arieli R, Beck R, Rosen MR, Palti Y.
Ventricular electrophysiological properties: is interspecies variability related to thyroid state?
Am J Physiol. 1987;252:H1265-H1274.
- Birinyi P, Tóth A, Jóna I, Acsai K, Almássy J, Nagy N, Prorok J, Gherasim I, Papp Z, Hertelendi Z, Szentandrassy N, Bányász T, Fülöp F, Papp JG, Varró A, Nánási PP, Magyar J.
The Na⁺/Ca²⁺ exchange blocker SEA0400 fails to enhance cytosolic Ca²⁺ transient and contractility in canine ventricular cardiomyocytes.
Cardiovasc Res. 2008;78(3):476-484.
- Borlaug BA, Kass DA.
Mechanisms of diastolic dysfunction in heart failure.
Trends Cardiovasc Med. 2006;16(8):273-279.
- Brini M, Carafoli E.
Calcium pumps in health and disease.
Physiol Rev. 2009;89(4):1341-1378.
- Cheng YS, Dai DZ, Dai Y, Zhu DD, Liu BC.
Exogenous hydrogen sulphide ameliorates diabetic cardiomyopathy in rats by reversing disordered calcium-handling system in sarcoplasmic reticulum.
J Pharm Pharmacol. 2016;68(3):379-388.
- Coll KE, Johnson RG Jr, McKenna E.
Relationship between phospholamban and nucleotide activation of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ adenosinetriphosphatase.
Biochemistry 1999;38:2444-2451
- De Jonge HW, Van Heugten HA, Lamers JM.
Signal transduction by the phosphatidylinositol cycle in myocardium.
J Mol Cell Cardiol, 1995;27:93-106
- De la Cruz GG, Groschner K, Kappe CO, Glasnov TN.
High-speed microwave assisted synthesis of SEA0400, a selective inhibitor of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger.
Tetrahedron Lett. 2012;53:3731-3734.
- Dinçer UD, Bidasee KR, Güner S, Tay A, Özçelikay AT, Altan VM.
The effect of diabetes on expression of β_1 , β_2 , β_3 -adrenoreceptors in rat hearts.
Diabetes. 2001;50:455-461.

- Dinçer UD, Onay A, Ari N, Özçelikay AT, Altan VM.
The effects of diabetes on beta-adrenoceptor mediated responsiveness of human and rat atria.
Diabetes Res Clin Pract. 1998;40(2):113-122.
- Dobretsov M, Hastings SL, Stimers JR.
Na⁺-K⁺ pump cycle during β -adrenergic stimulation of adult rat cardiac myocytes.
J Physiol. 1998;507:527-539
- Endoh M.
Signal transduction and Ca²⁺ signaling in intact myocardium.
J Pharmacol Sci. 2006;100:525-537.
- Frank KF, Bölck B, Erdmann E, Schwinger RH.
Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation.
Cardiovasc Res. 2003;57:20-27.
- Galderisi M.
Diastolic dysfunction and diabetic cardiomyopathy: evaluation by Doppler echocardiography.
J Am Coll Cardiol. 2006;48(8):1548-1551.
- Gao CH, Wang F, Jiang R, Zhang J, Mou H, Yin YH.
A region-specific quantitative profile of autonomic innervation of the canine left atrium and pulmonary veins.
Auton Neurosci. 2011;162(1-2):42-47.
- Golfman L, Dixon IM, Takeda N, Lukas A, Dakshinamurti K, Dhalla NS.
Cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchange and Na⁺-K⁺ ATPase activities and gene expression in alloxan-induced diabetes in rats.
Mol Cell Biochem. 1998;188(1-2):91-101.
- Goudis CA, Korantzopoulos P, Ntalas IV, Kallergis EM, Liu T, Ketikoglou DG.
Diabetes mellitus and atrial fibrillation: Pathophysiological mechanisms and potential upstream therapies.
Int J Cardiol. 2015;184:617-622.
- Györke I, Hester N, Jones LR, Györke S.
The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium.
Biophys J. 2004;86(4):2121-2128.

- Hamaguchi S, Kawakami Y, Honda Y, Nemoto K, Sano A, Namekata I, Tanaka H.
Developmental changes in excitation-contraction mechanisms of the mouse ventricular myocardium as revealed by functional and confocal imaging analyses.
J Pharmacol Sci. 2013;123:167-175.
- Hamilton N, Ianuzzo C.D.
Contractile and calcium regulating capacities of myocardia of different sized mammals scale with resting heart rate.
Mol Cell Biochem. 1991;106:133-141.
- Hattori Y, Matsuda N, Kimura J, Ishitani T, Tamada A, Gando S, Kemmotsu O, Kanno M.
Diminished function and expression of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger in diabetic rats: implication in Ca²⁺ overload.
J Physiol. 2000;527:85-94.
- Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Métayer P, Clémenty J.
Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins.
N Engl J Med. 1998;339:659-666.
- Honjo H, Boyett MR, Niwa R, Inada S, Yamamoto M, Mitsui K, Horiuchi T, Shibata N, Kamiya K, Kodama I.
Pacing-induced spontaneous activity in myocardial sleeves of pulmonary veins after treatment with ryanodine.
Circulation. 2003;107:1937-1943
- Irie M, Tsuneoka Y, Shimobayashi M, Hasegawa N, Mochizuki S, Ichige S, Hamaguchi S, Namekata I, Tanaka H.
Involvement of alpha- and beta-adrenoceptors in the automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium.
J Pharmacol Sci. 2017;133:247-253.
- Jensen BC, O'Connell TD, Simpson PC.
Alpha-1-adrenergic receptors in heart failure: the adaptive arm of the cardiac response to chronic catecholamine stimulation.
J Cardiovasc Pharmacol. 2014;63:291-301.
- Jourdon P, Feuvray D.
Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats.
J Physiol. 1993;470:411-429.

- Kamata K, Satoh T, Matsumoto T, Noguchi E, Kobayashi T, Tanaka H, et al.
Enhancement of methoxamine-induced contractile responses of rat ventricular muscle in streptozotocin-induced diabetes is associated with α 1A adrenoceptor upregulation.
Acta Physiol. 2006;188:173-183.
- Kamata K, Satoh T, Matsumoto T, Noguchi E, Taguchi K, Kobayashi T, Tanaka H, Shigenobu K.
Enhancement of methoxamine-induced contractile responses of rat ventricular muscle in streptozotocin-induced diabetes is associated with α 1A adrenoceptor upregulation.
Acta Physiol (Oxf). 2006;188(3-4):173-83.
- Kamata K, Satoh T, Tanaka H, Shigenobu K.
Changes in electrophysiological and mechanical responses of the rat papillary muscle to α - and β -agonist in streptozotocin-induced diabetes.
Can J Physiol Pharmacol. 1997;75:781-788.
- Kayama Y, Raaz U, Jagger A, Adam M, Schellinger IN, Sakamoto M, Suzuki H, Toyama K, Spin JM, Tsao PS.
Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress.
Int J Mol Sci. 2015;16(10):25234-25263.
- Korte FS, Mokolke EA, Sturek M, McDonald KS.
Exercise improves impaired ventricular function and alterations of cardiac myofibrillar proteins in diabetic dyslipidemic pigs.
J Appl Physiol (1985). 2005;98(2):461-467.
- Liu X, Takeda N, Dhalla NS.
Troponin I phosphorylation in heart homogenate from diabetic rat.
Biochim Biophys Acta. 1996;1316(2):78-84.
- Lopez-Izquierdo A, Pereira RO, Wende AR, Punske BB, Abel ED, Tristani-Firouzi M.
The absence of insulin signaling in the heart induces changes in potassium channel expression and ventricular repolarization.
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2014;306:H747-H754.
- Lu Z, Jiang Y, Xu X, Ballou L.M, Cohen I.S, Lin R.Z.
Decreased L-type Ca^{2+} current in cardiac myocytes of type 1 diabetic Akita mice due to reduced phosphatidylinositol 3-kinase signaling.
Diabetes. 2007;56:2780-2789.

- Meo M, Meste O, Signore S, Sorrentino A, Cannata A, Zhou Y, Matsuda A, Luciani M, Kannappan R, Goichberg P, Leri A, Anversa P, Rota M.
Reduction in Kv Current Enhances the Temporal Dispersion of the Action Potential in Diabetic Myocytes: Insights From a Novel Repolarization Algorithm.
J Am Heart Assoc. 2016;5(2).pii:e003078.
- Moncoq K, Trieber CA, Young HS.
The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump.
J Biol Chem. 2007;282(13):9748-57.
- Namekata I, Hamaguchi S, Wakasugi Y, Ohhara M, Hirota Y, Tanaka H.
Ellagic acid and gingerol, activators of the sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, ameliorate diabetes mellitus-induced diastolic dysfunction in isolated murine ventricular myocardia.
Eur J Pharmacol. 2013;706(1-3):48-55.
- Namekata I, Tsuneoka Y, Tanaka H.
Electrophysiological and pharmacological properties of the pulmonary vein myocardium.
Biol Pharm Bull. 2013;36(1):2-7.
- Namekata I, Tsuneoka Y, Akiba A, Nakamura H, Shimada H, Takahara A, Tanaka H.
Intracellular calcium and membrane potential oscillations in the guinea-pig and rat pulmonary vein myocardium.
Bioimages. 2010;18:11-22
- Namekata I, Tsuneoka Y, Takahara A, Shimada H, Sugimoto T, Takeda K, Nagaharu M, Shigenobu K, Kawanishi T, Tanaka T.
Involvement of the Na^{+}/Ca^{2+} exchanger in the automaticity of guinea-pig pulmonary vein myocardium as revealed by SEA0400.
J PharmacolSci. 2009;110:111-116
- Namekata I, Fujiki S, Kawakami Y, Moriwaki R, Takeda K, Kawanishi T, Takahara A, Shigenobu, K, Tanaka H.
Intracellular mechanisms and receptor types for endothelin-1-induced positive and negative inotropy in mouse ventricular myocardium.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 2008;376:385-395.

Nathan H, Eliakim M.

The junction between the left atrium and the pulmonary veins. An anatomic study of human hearts.

Circulation. 1966;34:412-422.

Nguemo F, Sasse P, Fleischmann BK, Kamanyi A, Schunkert H, Hescheler J, Reppel M.

Modulation of L-type Ca^{2+} channel current density and inactivation by β -adrenergic stimulation during murine cardiac embryogenesis.

Basic Res Cardiol. 2009;104:295-306

Nishimaru K, Kobayashi M, Matsuda T, Tanaka Y, Tanaka H, Shigenobu K.

Alpha-Adrenoceptor stimulation-mediated negative inotropism and enhanced $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in mouse ventricle.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001;280:H132-H141.

Oka-Manabe S, Maruyama T, Urae R, Amamoto T, Niho Y.

Prominent bifid T waves observed in the QT prolongation caused by complete atrioventricular blockade in a hypokalemic diabetic patient.

J Electrocardiol. 1999;32(3):289-292.

Okamoto Y, Kawamura K, Nakamura Y, Ono K.

Pathological impact of hyperpolarization-activated chloride current peculiar to rat pulmonary vein cardiomyocytes.

J Mol Cell Cardiol. 2014;66:53-62

Reuter H, Henderson SA, Han T, Matsuda T, Baba A, Ross RS, Goldhaber JI, Philipson KD.

Knockout mice for pharmacological screening testing the specificity of $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitors.

Circ Res. 2002;91:90-92.

Reuter H, Henderson SA, Han T, Mottino GA, Frank JS, Ross RS, Goldhaber JI, Philipson KD.

Cardiac excitation-contraction coupling in the absence of $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchange.

Cell Calcium. 2003;34:19-26.

Sato S.

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. 2008;294(4):H1708-H1715.

Satoh N.

Effects of MCC-135 on Ca²⁺ uptake by sarcoplasmic reticulum and myofilament sensitivity to Ca²⁺ in isolated ventricular muscles of rats with diabetic cardiomyopathy.
Mol Cell Biochem. 2003;249:45-51.

Satoh N, Sato T, Shimada M, Yamada K, Kitada Y.

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. 2001;298:1161-1166.

Schmidt U, Hajjar RJ, Kim CS, Lebeche D, Doye AA, Gwathmey JK.

Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca²⁺-ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban.
Am J Physiol. 1999;277(2):H474-480.

Schwinger RH, Böhm M, Schmidt U, Karczewski P, Bavendiek U, Flesch M, Krause E, Erdmann E.

Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced Ca²⁺ uptake and Ca²⁺-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts.
Circulation. 1995;92:3220-3228.

Shryock JC, Song Y, Rajamani S, Antzelevitch C, Belardinelli L.

The arrhythmogenic consequences of increasing late I_{Na} in the cardiomyocyte.
Cardiovascular Research .2013;99:600–611

Skibsbjerg L, Poulet C, Diness JG, Bentzen BH, Yuan L, Kappert U, Matschke K, Wettwer E, Ravens U, Grønnet M, Christ T, Jespersen T.

Small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels contribute to action potential repolarization in human atria.
Cardiovasc Res. 2014;103(1):156-167.

Stables CL, Auerbach DS, Whitesall SE, D'Alecy LG, Feldman EL.

Differential impact of type-1 and type-2 diabetes on control of heart rate in mice.
Auton Neurosci. 2016;194:17-25.

Stølen TO, Høydal MA, Kemi OJ, Catalucci D, Ceci M, Aasum E, Larsen T, Rolim N, Condorelli G, Smith GL, Wisløff U.

Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy.
Circ Res. 2009;105:527-536.

- Su Z, Li F, Spitzer KW, Yao A, Ritter M, Barry WH.
Comparison of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase function in human, dog, rabbit, and mouse ventricular myocytes.
J Mol Cell Cardiol. 2003;35:761-767.
- Suarez J, Scott B, Dillmann WH.
Conditional increase in SERCA2a protein is able to reverse contractile dysfunction and abnormal calcium flux in established diabetic cardiomyopathy.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008;295(5):R1439-R1445.
- Takasawa S, Akiyama T, Nata K, Kuroki M, Tohgo A, Noguchi N, Kobayashi S, Kato I, Katada T, Okamoto H.
Cyclic ADP-ribose and Inositol 1,4,5-Trisphosphate as alternate second messengers for intracellular Ca²⁺ mobilization in normal and diabetic beta-Cells.
J Biol Chem. 1998;273(5):2497-2500.
- Takeda N, Nakamura I, Hatanaka T, Ohkubo T, Nagano M.
Myocardial mechanical and myosin isoenzyme alterations in streptozotocin-diabetic rats.
Jpn Heart J. 1988;29(4):455-63.
- Tan AY, Li H, Wachsmann-Hogiu S, Chen LS, Chen PS, Fishbein MC.
Autonomic innervation and segmental muscular disconnections at the human pulmonary vein-atrial junction: implications for catheter ablation of atrial-pulmonary vein junction.
J Am Coll Cardiol. 2006;48(1):132-143.
- Tanaka H, Namekata I, Nouchi H, Shigenobu K, Kawanishi T, Takahara A.
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. 2009;109:327-333.
- Tanaka H, Namekata I, Takeda K, Kazama A, Shimizu Y, Moriwaki R, Hirayama W, Sato A, Kawanishi T, Shigenobu K.
Unique excitation-contraction characteristics of mouse myocardium as revealed by SEA0400, a specific inhibitor of Na⁺-Ca²⁺ exchanger.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2005;371(6):526-534.
- Tanaka H, Nishimaru K, Aikawa T, Hirayama W, Tanaka Y, Shigenobu K.
Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger, on myocardial ionic currents.
Br J Pharmacol. 2002;135(5):1096-100.

- Tanaka H, Masumiya H, Sekine T, Kase J, Kawanishi T, Hayakawa T, Miyata S, Sato Y, Nakamura R, Shigenobu K.
Involvement of Ca²⁺ waves in excitation-contraction coupling of rat atrial cardiomyocytes.
Life Sci. 2001;70(6):715-726.
- Tanaka H, Sekine T, Nishimaru K, Shigenobu K.
Role of sarcoplasmic reticulum in myocardial contraction of neonatal and adult mice.
Comp. Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 1998;120:431-438.
- Tanaka H, Nishimaru K, Sekine T, Kawanishi T, Nakamura R, Yamagaki K, Shigenobu K.
Two-dimensional millisecond analysis of intracellular Ca²⁺ sparks in cardiac myocytes by rapid scanning confocal microscopy: increase in amplitude by isoproterenol.
BiochemBiophys Res Commun. 1997;233:413-418
- Tanaka H, Kawanishi T, Kato Y, Nakamura R, Shigenobu K.
Restricted propagation of cytoplasmic Ca²⁺ oscillation into the nucleus in guinea pig cardiac myocytes as revealed by rapid scanning confocal microscopy and indo-1.
Jpn J Pharmacol. 1996;70(3):235-42.
- Tanaka H, Manita S, Matsuda T, Adachi M, Shigenobu K.
Sustained negative inotropism mediated by alpha-adrenoceptors in adult mouse myocardia: developmental conversion from positive response in the neonate.
Br J Pharmacol. 1995;114:673-677.
- Teshima Y, Saikawa T, Yonemochi H, Hidaka S, Yoshimatsu H, Sakata T.
Alteration of heart uncoupling protein-2 mRNA regulated by sympathetic nerve and triiodothyronine during postnatal period in rats.
Biochimica et Biophysica Acta. 1999;1448(3):409-415
- Thackeray JT, Beanlands RS, DaSilva JN.
Altered sympathetic nervous system signaling in the diabetic heart: emerging targets for molecular imaging.
Am J Nucl Med Mol Imaging. 2012;2:314-334.
- Teupe C, Rosak C.
Diabetic cardiomyopathy and diastolic heart failure -- difficulties with relaxation.
Diabetes Res Clin Pract. 2012;97(2):185-94.

- Torres-Jacome J, Gallego M, Rodriguez-Robledo JM, Sanchez-Chapula JA, Casis O.
Improvement of the metabolic status recovers cardiac potassium channel synthesis in experimental diabetes.
Acta Physiologica. 2013;207:447-459.
- Trost S.U, Belke DD, Bluhm WF, Meyer M, Swanson E, Dillmann WH.
Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy.
Diabetes. 2002;51(4):1166-1171.
- Tsuneoka Y, Irie M, Tanaka Y, Sugimoto T, Kobayashi Y, Kusakabe T, Kato K, Hamaguchi S, Namekata I, Tanaka H.
Permissive role of reduced inwardly-rectifying potassium current in the automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium.
J Pharmacol Sci. 2017;133:195-202.
- Tsuneoka Y, Kobayashi Y, Honda Y, Namekata I, Tanaka H.
Electrical activity of the mouse pulmonary vein myocardium.
J Pharmacol Sci. 2012;119(3):287-92.
- Waddingham MT, Edgley AJ, Tsuchimochi H, Kelly DJ, Shirai M, Pearson JT.
Contractile apparatus dysfunction early in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy.
World J Diabetes. 2015;6:943-960.
- Wang M, Zhang W, Zhu J, Fu G, Zhou B.
Breviscapine ameliorates cardiac dysfunction and regulates the myocardial Ca²⁺-cycling proteins in streptozotocin-induced diabetic rats.
Acta Diabetol. 2010;47:209-218.
- Wongcharoen W, Chen YC, Chen YJ, Chang CM, Yeh HI, Lin CI, Chen SA.
Effects of a Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitor on pulmonary vein electrical activity and ouabain-induced arrhythmogenicity.
Cardiovasc Res. 2006;70:497-508.
- Yaras N, Ugur M, Ozdemir S, Gurdal H, Purali N, Lacampagne A, Vassort G, Turan B.
Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca²⁺ release channel (RyR₂) and Ca²⁺ homeostasis in rat heart.
Diabetes. 2005;54(11):3082-3088.

Yazawa K, Kameyama M.

Mechanism of receptor-mediated modulation of the delayed outward potassium current in guinea-pig ventricular myocytes.

J Physiol. 1990;421:135-150

Yokoe S, Asahi M, Takeda T, Otsu K, Taniguchi N, Miyoshi E, Suzuki K.

Inhibition of phospholamban phosphorylation by O-GlcNAcylation: implications for diabetic cardiomyopathy.

Glycobiology. 2010;20(10):1217-1226.

Yu X, Tesiram YA, Towner RA, Abbott A, Patterson E, Huang S, Garrett MW, Chandrasekaran S, Matsuzaki S, Szweda LI, Gordon BE, Kem DC.

Early myocardial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: a study using in vivo magnetic resonance imaging (MRI).

Cardiovascular diabetology. 2007;6:6.

Zhong Y, Ahmed S, Grupp IL, Matlib MA.

Altered SR protein expression associated with contractile dysfunction in diabetic rat hearts.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001;281(3):H1137-H1147.

恒岡弥生

肺静脈心筋における電気的自発活動の発生機序に関する研究

東邦大学大学院薬学研究科 博士論文 (2013)