

東邦大学審査学位論文（博士）

博士論文

Angiotensin II がモルモット肺静脈心筋
自動能に与える影響

東邦大学大学院 薬学研究科 博士課程

田中 悠介

指導:薬物学教室 田中 光 教授

目次

第1章 序論.....	3
第2章 実験方法.....	8
第1節 実験動物.....	8
第2節 栄養液の組成.....	8
第3節 肺静脈組織標本の作製.....	9
第4節 肺静脈心筋収縮力の測定.....	9
第5節 肺静脈心筋活動電位の測定.....	10
第6節 単離心筋細胞の調製.....	11
第7節 細胞膜、筋小胞体の観察.....	11
第8節 共焦点顕微鏡を用いた細胞内 Ca^{2+} 動態の画像解析.....	11
第9節 統計解析.....	12
第10節 試薬.....	12
第3章 Angiotensin II による自発活動の誘発と受容体機序.....	13
第1節 肺静脈心筋自発活動の基本的性質.....	13
第2節 Angiotensin II の肺静脈心筋自動能に対する影響.....	15
第3節 考察.....	19
第4節 結論.....	22
第4章 Angiotensin II が肺静脈心筋細胞 Ca^{2+} 動態に与える影響.....	23
第1節 肺静脈心筋細胞の基本的性質.....	23
第2節 Angiotensin II の肺静脈心筋細胞への作用.....	34
第3節 考察.....	37
第4節 結論.....	41

第 5 章 Angiotensin II による自発活動誘発機序の探索	42
第 1 節 Angiotensin II による自発活動誘発、緩徐脱分極の形成に関する検討	42
第 2 節 内因性 angiotensin II の肺静脈心筋自動能への関与	47
第 3 節 考察	52
第 4 節 結論	57
第 6 章 総括	58
第 7 章 謝辞	60
第 8 章 参考文献	61

第1章 序論

心臓は全身の血管にくまなく血液を送りこむことで酸素や栄養素、老廃物などを輸送するポンプとして生涯拍動し続ける。体液を攪拌する機能はある程度以上の大きさの生物に備わっているが、その様式は様々である。多くの無脊椎動物では独立した心臓は存在せず、体液とつながる解放血管系が存在し、血管の律動的収縮が体液を攪拌する。節足動物では体の長軸に沿って管状心臓が存在する。これらの原始的な体液攪拌装置はいずれも“律動的に収縮する管”であり、収縮と同期した活動電位様の電位変動も記録されている。脊椎動物の循環系は室状の心臓と血管の区別が明確であり、動脈では主に心臓が作り出す血圧により血液が送られるのに対し、静脈ではいわゆる筋ポンプなどにより受動的に血液が流れる。ただし、静脈の中には律動的収縮を行うものもあり、“律動的に収縮する管”としての性質を残しているように見える。(入沢宏、心臓の生理学)

ヒトを含む哺乳類は肺循環と体循環の2つの循環系を有し、2心房2心室型の心臓から2つの循環系に血液が同時に拍出される。心臓の拍動の源は、洞房結節にあるペースメーカー細胞から自発的かつ周期的に発生する活動電位である。活動電位は、心房→房室結節→His 束→右脚・左脚→Purkinje 線維→心室と順序よく伝導する。心筋細胞に活動電位が生じると、細胞の収縮・弛緩が連続的に発生し、これが心臓全体の細胞で起きることで心臓がポンプとして機能する。

心筋細胞の活動電位の形成には、 K^+ や Na^+ 、 Ca^{2+} といったイオンの働きが重要である。通常、心房・心室筋細胞の静止膜電位は、主に心筋細胞内外の K^+ 濃度勾配(細胞内: 140 mM、細胞外 4 mM)と、 K^+ チャネルの働きによって負の状態(-80~-90mV程度)に保たれている。ひとたび、隣接する心筋細胞で活動電位が発生すると、心筋細胞膜に脱分極が生じる。脱分極が Na^+ チャネル開口の閾値に達すると、心筋細胞内への急激な Na^+ の流入が起き、膜電位は正に反転する。脱分極の発生は、細胞膜上の電位依存性 Ca^{2+} チャネルを活性化し、心筋細胞に特徴的なプラトー相が形成される。プラトー相では細胞内への Ca^{2+} 流入が起これ、この Ca^{2+} が筋小胞体の ryanodine 受容体に作用すると、 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release : CICR)が発生する。筋小胞体から大量に放出された Ca^{2+} は、筋フィラメントに結合して収縮を起こす。収縮に使用された Ca^{2+} は、筋小胞体膜上の Ca^{2+} ポンプによって筋小胞体に回収されるか、排出機構によって心筋細胞外に汲み出される。これによって、弛緩が生じる。脱分極から 100~300 msec が経過すると、遅延整流性 K^+ チャネルが開口して K^+ が細胞外に流出し、再分極が始まる。再分極後期及び静止電位においては、内向き整流性 K^+ 電流が膜電位の安定に寄与する。

一般に、刺激伝導系以外の心筋細胞は安定した静止膜電位を持ち、ペースメーカーから発生する電気活動に呼応して受動的に活動電位を発生し、拍動する。一方で、心臓のペースメーカーである洞房結節は、自発的に活動電位を発生する性質(自動能)を有する。洞房結節

細胞の膜電位は、自動能を持たない心筋細胞と比較して浅く不安定であり、脱分極が起きる前の膜電位は $-50 \sim -70 \text{ mV}$ 程でしかない。これは、静止膜電位の安定化に重要な内向き整流性 K^+ 電流が少ないことに加え、様々な脱分極電流の顕在化が関与することに起因する。脱分極性電流の例として、過分極活性化陽イオン電流 (I_f)、T型 Ca^{2+} 電流 (I_{CaT})、L型 Ca^{2+} 電流 (I_{CaL}) などが挙げられる。洞房結節細胞では、活動電位が発生する前の膜電位に緩やかな脱分極相 (緩徐脱分極) が観察される (Fig 1-1 洞房結節)。緩徐脱分極は活動電位発生の歩調取りとして働いており、この勾配が閾値に達することで活動電位が発生する。つまり、緩徐脱分極によって自発的な活動電位 (自発活動) の発生が促され、その勾配によって心拍数がコントロールされている。

健全な心臓では、ペースメーカーとして機能するのは洞房結節であるが、自動能を有する心筋は洞房結節だけではない。実際、房室結節、ヒス・プルキニエ線維などの特殊心筋にも、自動能が備わっていて自発活動が発生し得る。しかしながら、それらの心筋細胞は、洞房結節細胞にくらべて自発活動の発火頻度が低いため、自らの活動電位が発生する前に洞房結節によって興奮させられる。そのため、基本的に洞房結節以外で自発活動が顕在化することはない。洞房結節以外の心筋が持つ自動能 (異所性自動能) は、洞房結節の機能が低下した場合において、心臓機能を維持するための予備的、潜在的ペースメーカーとして重要である。

異所性自動能の亢進は、心臓の電気伝導秩序を破綻させ、致死的な不整脈につながる恐れもある。洞房結節のペースメーカーとは異なるタイミングで心筋を興奮させるのみならず、活動電位が心筋内を巡回して高頻度の興奮が持続してしまう可能性もある。

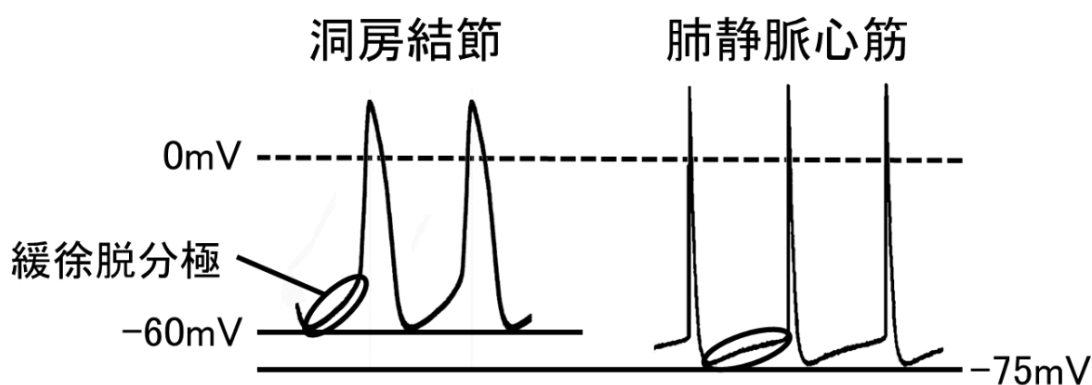


Fig 1-1 洞房結節、肺静脈心筋における自発活動の活動電位

異所性自動能の亢進が一因となる不整脈として、心房細動があげられる。心房細動は、心房が無秩序かつ高頻度 (250-350 回/min) に興奮する疾患である。統率のない速く不規則な興奮は、血行動態の増悪による心不全、もしくは血栓形成リスクの増加に伴う脳梗塞や心筋梗塞の発症につながるため、治療必要性の高い疾患である。心房細動の発症は加齢とともに増加する傾向にあり (Inoue H et al., 2009)、急速に高齢化が進む本邦では患者数が増加していくと考えられる。治療法としては、異所性自動能の発生源を焼灼することで電氣的に隔離するカテーテルアブレーションや、抗不整脈薬による薬物療法が複合的に用いられるが、それらが必ずしも有効とは限らず、心房細動の病態の理解や新規治療薬の開発が急務である。

近年、心房細動発生のトリガーとなる電気活動の大部分が肺静脈由来であることが明らかとなり、治療ターゲットとして注目されている (Haïssaguerre M et al., 1998 ; Chen SA et al., 1999)。肺静脈は血管であるが、その管壁に心筋層 (肺静脈心筋) が存在し (Brunton L and Fayrer, 1877 ; Tasaki H, 1969 ; Cheung DW, 1981)、左心房と組織学的、電気生理学的に連絡している (Fig 1-2 Takahara A et al., 2014)。イヌ、ウサギ、モルモット、マウスなど、一部の実験動物種では、摘出肺静脈組織標本や、肺静脈心筋細胞において自発活動の発生が報告されており、自動能を有することが判明している (イヌ: Chen YJ et al., 2000 ; ウサギ: Lo LW et al., 2007 ; モルモット: Tsuneoka Y et al., 2017 ; マウス: Tsuneoka Y et al., 2012)。肺静脈心筋細胞の活動電位間には、自動能を持つ心筋に特有の緩徐脱分極相があり (Fig 1-1 肺静脈心筋)、この勾配が自発活動の発生に寄与していることが示唆される。緩徐脱分極の勾配が肺静脈心筋のどのような性質に起因して生じるのかを検討することが、心房細動の発生機序を探る上で重要であると考えられる。

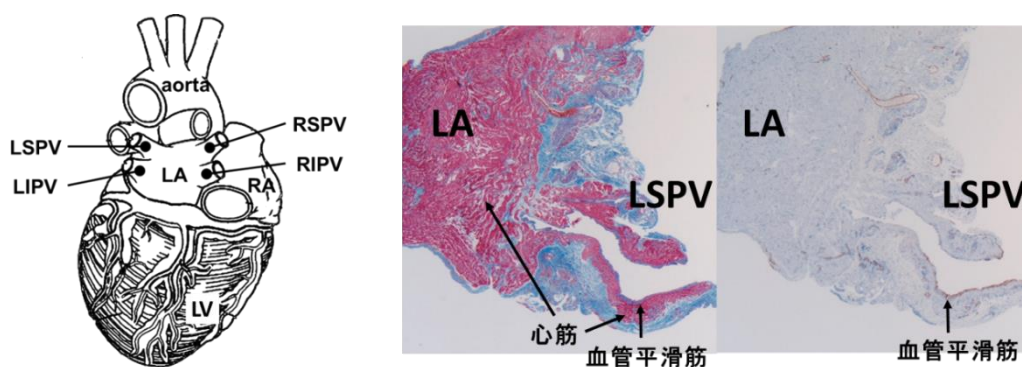


Fig 1-2 肺静脈の組織学的性質 (Takahara A et al., 2014 より引用)

(A) 心臓と肺静脈の位置関係

(B) 左心房・肺静脈断面の免疫染色画像

(左: Masson-trichrome 染色 右: α -smooth muscle actin 染色)

LSPV, left superior pulmonary vein; LIPV, left inferior pulmonary vein;

RSPV, right superior pulmonary vein; RIPV, right inferior pulmonary vein

LA, left atrium; RA, right atrium; LV, left ventricle

肺静脈心筋の活動電位を隣接する心房筋と比較すると、静止電位が浅い傾向にある。また、静止電位の形成に寄与する内向き整流性 K^+ 電流の電流密度も小さい (Chen YJ et al., 2002 ; Ehrlich JR et al., 2003 ; Tsuneoka Y et al., 2017)。これらの事実は、肺静脈心筋が左心房心筋に比べて膜電位の安定性が低い事を示しており、緩徐脱分極が生じる一因であると考えられる。緩徐脱分極の電位領域は、ペースメーカーである洞房結節とは異なっており、緩徐脱分極を形成する電流成分も異なっている可能性がある (Fig 1-1)。これまでに、肺静脈心筋において緩徐脱分極を形成する膜電流成分として Na^+-Ca^{2+} 交換機構 (NCX) 電流 (Honjo H et al., 2003 ; Namekata I et al., 2009 ; Okamoto Y et al., 2012) や持続性 Na^+ 電流 (Barajas-Martinez H et al., 2017 ; Chang SL et al., 2011 ; Irie M et al., 2019)、 Ca^{2+} 感受性クロライド電流 (Okamoto Y et al., 2014)、伸展活性化電流 (Hamaguchi S et al., 2016) などが報告されている。これらの膜電流成分は、心筋細胞内の Ca^{2+} に依存しており、細胞内の Ca^{2+} 動態が緩徐脱分極の形成、自発活動の発生に重要である事が示唆されつつある。

心房細動の発生には、異所性自動能の顕在化 (自発活動の発生) だけでなく、心房内での基質 (リエントリー経路) の形成も重要である。健常な心臓では、たとえ異所性に自発活動が発生したとしても、その興奮が持続することはない。しかし、心房内で高頻度の電氣的興奮が持続すると、心筋に電気生理学的変化が生じ、心房細動が持続しやすくなる (AF begets AF)。心房内での高頻度の電氣的興奮や、弁膜症をはじめとする基礎疾患は、慢性的な心筋肥大や心房拡大、線維化を引き起こす。これらの変化は構造的リモデリングと呼ばれ、電気伝導速度の減少や不均一化といったリエントリーの素地を形成する。心房細動が徐々に持続するようになると、心房は進展・拡張し、angiotensin II の増加や angiotensin 受容体の直接的な活性化が引き起こされる。Angiotensin 受容体の活性化は、細胞内シグナルキナーゼ (ERK1/2) を通じて心筋細胞増殖や細胞外マトリックスのタンパク質産生を促進することで、リモデリングを誘発する (Kim S et al., 2000 ; Hunyady L and Catt KJ, 2006)。イヌを用いた動物実験では、ACE (Angiotensin-converting enzyme) 阻害薬および Angiotensin AT_1 受容体遮断薬 (ARB) が、高頻度電気刺激誘発性の心房細動における有効不応期を延長した (Nashima H et al., 2000)。また、ARB の長期投与が構造的リモデリングと心房細動持続時間に与える影響を検討した研究では、ARB 非投与群と比べて、構造的リモデリングの進行抑制と、心房細動持続時間の短縮が観察された (Kumagai K et al., 2003 ; Nakashima H and Kumagai K, 2007)。このような背景から、ACE 阻害薬や ARB による renin-angiotensin 系の持続的な抑制が、心房細動の器質の形成を抑制することで、心房細動の発症抑制に有効性を示すのではないかと考えられてきた。

このように、angiotensin II が、心房細動の基質の形成に与える影響に関しては多くの検討がなされているが、発生トリガーである肺静脈心筋に与える影響に関しては情報が限られている。Angiotensin II の心臓作用として、陽性変時作用や、不整脈の誘発作用が報告されていることから、私は、angiotensin II が心房細動の基質だけでなく、発生トリガーであ

る肺静脈心筋に対しても作用し、病態形成に寄与するのではないかと考えた。Angiotensin II の活性阻害薬 (ACE 阻害薬、ARB) は、心房細動の臨床治療でも用いられることから、Angiotensin II が肺静脈心筋自動能を亢進させるなら、そのメカニズムから治療学的示唆を得られる可能性がある。

薬物学研究室では、十数年に渡って実験小動物 (モルモット、ラット、マウス) の肺静脈心筋を用いた検討が行われてきた。このうち、モルモットは古くから心臓研究に用いられる動物種であり、心臓の活動電位パラメータが他の実験小動物に比べてヒトに近いことが報告されている。また、モルモット摘出肺静脈では肺静脈心筋の自発活動が観察され、自発活動の活動電位間には緩徐脱分極が存在することから、angiotensin II の肺静脈局所への作用とそのメカニズムを検討することが可能であると考えた。

そこで、本研究では、angiotensin II がモルモット肺静脈心筋に与える影響を明らかにするとともに、肺静脈心筋細胞内 Ca^{2+} 動態や、肺静脈心筋活動電位における緩徐脱分極の勾配に着目し、そのメカニズムを明らかにすることを目指した。

第 3 章では、収縮力測定により肺静脈心筋自発活動を検出し、angiotensin II がモルモット肺静脈心筋自動能に与える影響と、その受容体メカニズムを検討した。

第 4 章では、肺静脈心筋細胞の細胞形態や Ca^{2+} 動態を他の心筋細胞と比較することで、自発活動における細胞内 Ca^{2+} の重要性を明らかにした。また、angiotensin II が肺静脈心筋 Ca^{2+} 動態に与える影響から、angiotensin II の作用の細胞内メカニズムを検討した。

第 5 章では、活動電位測定により、angiotensin II が膜電位に与える影響から、心筋細胞内の Ca^{2+} 変化が緩徐脱分極における膜電位変化に繋がるメカニズムを明らかにした。また、肺静脈標本内で内因性に angiotensin II が産生される可能性についても検討を行った。

第2章 実験方法

第1節 実験動物

Hartley系モルモット (350 g~450 g 雄) を用いて実験を行った。モルモットは白石実験動物から購入し、東邦大学実験動物センターで飼育した後に使用した。すべての実験において、”東邦大学動物実験等の実施に関する基本指針” 及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 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 pH 7.4

Normal Tyrode (mM)

NaCl ; 143.0 KCl ; 5.4 MgCl₂ ; 1.0 CaCl₂ ; 1.8 KH₂PO₄ ; 0.33 HEPES ; 5.0 glucose ; 5.5 pH 7.4 with NaOH

(Ca²⁺ 除去 Tyrode 液は CaCl₂ を添加しないほかは上記のイオン組成と同様)

KB (mM)

Glutamic acid ; 70.0 taurine ; 15.0 KCl ; 30.0 KH₂PO₄ ; 10.0 MgCl₂ ; 0.5 glucose ; 11.0 HEPES ; 10.0 EGTA ; 0.5 pH 7.4 with KOH

第3節 肺静脈組織標本の作製

モルモットを頸椎脱臼し頸部より放血致死後、開胸し直ちに心臓-肺を摘出した。室温で予め 95% O₂- 5% CO₂ 混合ガスを通気した Krebs-Henseleit 液中で心臓と肺を分離し、4 本ある肺静脈を肺組織から切り出すことで標本とした。(Figure 2-1)

第4節 肺静脈心筋収縮力の測定

筒状の肺静脈組織標本の心房側の一端を心房側から肺方向に向かって切り開き、マグナス管内のシリコンブロック上で切り口のうち一边をアイソメトリック・トランスデューサー (TB-611T、日本光電) に接続、もう一边を白金双極電極で固定した (Figure 2-2)。マグナス管内は 20 mL の Krebs-Henseleit 液 (36.0 ± 0.5 °C) で満たし、95% O₂- 5% CO₂ 混合ガスで通気した。肺静脈心筋では、一定確率で自発活動が発生している。自発活動が発生していない標本では、必要に応じて肺静脈標本に刺激装置 (SEN-2201, 3301、日本光電) から白金双電極を介して持続時間 3 msec、閾値の 1.5 倍の電圧の短形波で 1Hz の電気刺激を与えることで輪走筋方向の収縮を惹起し、収縮張力を測定した。自発活動が発生している場合は、電気刺激を与えずに観察した。静止時張力は各標本で最大の収縮張力が発生するように調整した。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) によって増幅し、Power Lab (AD Instruments) からの電気信号をパーソナルコンピュータ (Probook 4510S 日本 HP) に取り込み、Lab chart v7.3 (AD Instruments) により記録、解析を行った。

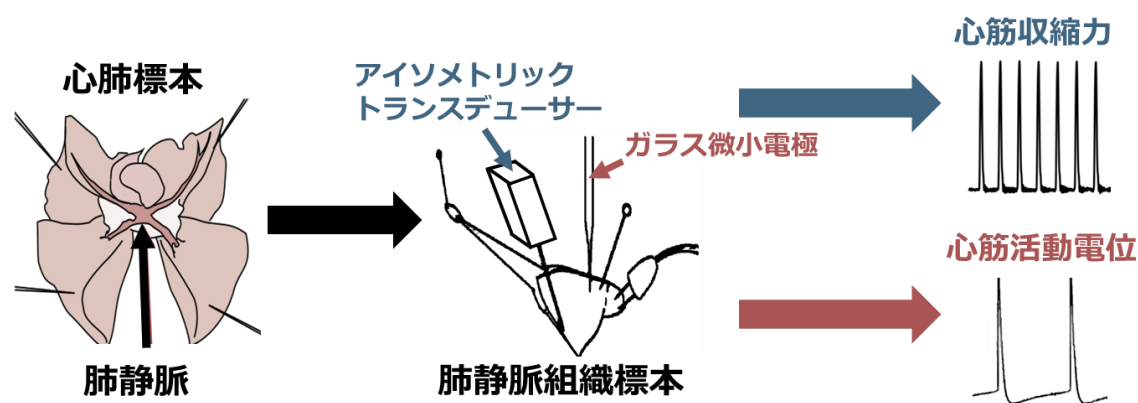


Fig 2-1 モルモット肺静脈組織標本での収縮力・活動電位測定

第5節 肺静脈心筋活動電位の測定

筒状の肺静脈組織標本の心房側の一端を心房側から肺方向に向かって切り開き、organ bath 底のシリコンブロック上にステンレス製ピンで固定した (Figure 2-3)。Organ bath 内は 20 mL の Krebs-Henseleit 液 (36.0 ± 0.5 °C) で満たし、95% O₂- 5% CO₂ 混合ガスで通気した。肺静脈心筋が自発活動を生じていない場合は、必要に応じて肺静脈標本に刺激装置 (SEN-2201、日本光電) から白金双電極を介して持続時間 3 msec、閾値の 1.5 倍の電圧の短形波で 1Hz の電気刺激を与えることで活動電位を惹起した。細胞内活動電位の測定には芯入硝子管 (CG-2, KEN ENTERPRISE) をプラー (PE-2, 成重科学) で加熱し引き伸ばすことで作製したガラス微小電極を用いた。ガラス微小電極内は、3M KCl を充填することで電極内抵抗を 20-30 M Ω とした。肺静脈組織標本内腔側からガラス微小電極を刺入し、電極内のプローブから得られた電気信号を高インピーダンス型アンプ (MEZ-7101 日本光電) で増幅した。増幅したアナログ信号はオシロスコープ (CS-8010 KENWOOD) でモニターしつつ、Power Lab (AD Instruments) で信号をデジタル変換し、パーソナルコンピュータ (Probook 650) に取り込み、Lab Chart v7.3 (AD Instruments) により記録、解析を行った。

活動電位のパラメータとして、緩徐脱分極の傾き (maximum rate of rise of the depolarization phase ; slope)、overshoot、amplitude、20%、50%、90%再分極時の活動電位の持続時間 (action potential duration at 20%、50%、90% repolarization ; APD₂₀、APD₅₀、APD₉₀)、最大立ち上がり速度 (maximum rate of rise ; \dot{V}_{max})、最大弛緩期電位 (maximum diastolic potential ; MDP)、静止膜電位 (resting potential ; RP) を用いた。(Figure 2-2)

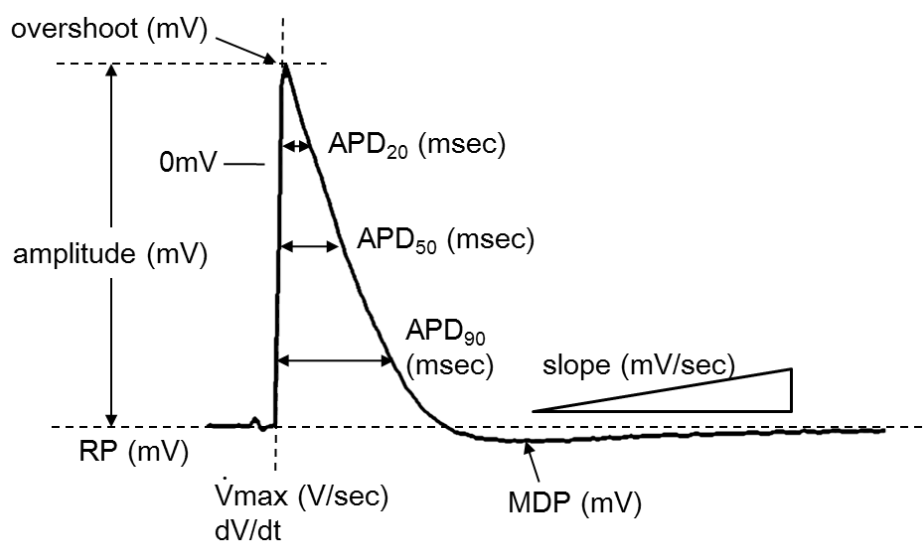


Fig 2-2 活動電位パラメータ

第 6 節 単離心筋細胞の調製

モルモットに pentobarbital sodium (250 mg/kg) を腹腔内投与して麻酔した後、*in situ* にて大動脈内に逆行性にカニューレを挿入した。その後、8mL/min の流速で Normal Tyrode 液を約 10 分間、次いで Ca²⁺除去 Tyrode 液を 25 分間、36 °C に加温して灌流した。さらにこの後は 6 mL/min の流速で、Ca²⁺除去 Tyrode 液に 0.134 mg / mL collagenase、0.022 mg / mL protease を添加した酵素溶液を約 10 分間灌流した。最後に collagenase を洗い流すための Ca²⁺除去 Tyrode 液を 20 分間、KB 液を 15 分間、室温で灌流した。灌流液はすべて 100% O₂ ガスで十分に通気した。灌流を止め心臓-肺を取り外した後、KB 液中で心臓と肺を分離した。その後、心臓を房室分離し、心室標本、心房標本を得た。また、実態顕微鏡下で 4 本の肺静脈組織標本を作製した。それぞれの標本は眼科バサミで粗くミンスし、ピペッティングにより心筋細胞を遊離させ、200 μm のナイロンメッシュで濾過することで細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液は実験に用いるまで 4 °C で保存した。

第 7 節 細胞膜、筋小胞体の観察

調製したモルモット肺静脈心筋細胞および心室筋細胞、心房筋細胞を用い、細胞膜、小胞体のそれぞれの蛍光プローブ PKH67-GL、BODIPY-thapsigargin を使用し、顕微鏡は LSM510 (Carl Zeiss 社)、レーザーは Argon/2 を用いて画像化解析を行った。ガラス製チャンバー内に移した単離心筋細胞に KB 中でそれぞれの蛍光プローブが 5 μM になるように加え、室温で約 10 分間放置し取り込んだ。測定、記録は室温、KB 液中で行った。488nm でプローブを励起し、505nm 以上の蛍光を検出し画像化した。

第 8 節 共焦点顕微鏡を用いた細胞内 Ca²⁺動態の画像化解析

調製したモルモット単離肺静脈心筋細胞、心室筋細胞、心房筋細胞を用い、Ca²⁺蛍光プローブである fluo-4 の acetoxymethyl 体 (AM 体) を使用し、A1R MP (Nikon 社) を用いて細胞内 Ca²⁺ 動態を画像化した。ガラス製チャンバー内に移した単離肺静脈心筋細胞に KB 液中で fluo-4 AM 体を 5 μM になるように加え、15 - 30 分間 incubation することで心筋細胞内に fluo-4 を取り込ませた。その後室温下で心筋細胞をチャンバー上に静置し、Ca²⁺ 除去 Tyrode 液、Normal Tyrode 液の順で灌流した。その後、種々の薬剤を添加した Normal Tyrode 液を灌流し、薬学的処置による細胞内 Ca²⁺ 動態の変化を観察した。励起光として波長 488 nm のレーザー光を照射し、500–550 nm の波長範囲の蛍光強度を測定した。蛍光強度の測定は 120 frame / sec のスキャンスピードで行い、経時変化を解析した。

第9節 統計解析

実験結果の数値は 平均値 \pm 標準誤差 で示した。また統計解析には GraphPad Prism 6.07 (GraphPad Software, Inc.) を用いた。有意差検定は、Paired t-test, student's t-test, Dunnett's test for multiple comparisons, Fisher's exact test を用いた。

第10節 試薬

以下の試薬は精製水に溶解して stock solution とした。

Angiotensin I (ペプチド研究所)
Angiotensin II (ペプチド研究所)
Captopril (Sigma-Aldrich)
Chymostatin (Sigma-Aldrich)
Losartan potassium (和光純薬工業)
Nickel (II) chloride hexahydrate (Sigma-Aldrich)
PD123,319 (Sigma-Aldrich)

以下の試薬は dimethyl sulfoxide (和光純薬工業) に溶解して stock solution とした。

2-APB (Sigma-Aldrich)
BODIPY-thapsigargin (invitrogen)
Carvedilol (東京化成工業)
Fluo-4 AM (同仁化学研究所)
PKH67-GL (SIGMA)
Ryanodine (和光純薬工業)
SEA0400 (本学薬学部薬化学教室にて合成 : Da la cruz et al., 2012)
Xestospongin C (和光純薬工業)

Pentobarbital Sodium Salt (東京化成工業) はプロピレングリコール (和光純薬工業) : エタノール (和光純薬工業) : 精製水 = 40 mL : 10.5 mL : 49.5 mL の溶媒に 5 g 溶解して stock solution とした。

Collagenase (1180 unit / mg : ヤクルト薬品工業)、Protease (5.3 unit / mg : Sigma-Aldrich) は 36 °Cに加熱した Ca²⁺ 除去 Tyrode 液に それぞれ 0.134 mg/mL、0.022 mg / mL となるように直接溶解した。

第3章 Angiotensin II による自発活動の誘発と受容体機序

本章では、Angiotensin II が肺静脈心筋自動能を亢進し、自発活動を誘発するか否かを明らかにし、その受容体機序を特定した。

第1節 肺静脈心筋自発活動の基本的性質

3-1 収縮力測定下での肺静脈心筋自発活動の性質

肺静脈標本に対して収縮力測定法を適用すると、肺静脈心筋の自発活動が収縮力として観察された。モルモット肺静脈心筋では、約 34% (62/182) で自然発生の自発活動が観察された (Fig 3-1 A)。モルモット肺静脈は心房より 4 つに分岐しているため、それぞれの部位 (LS: 左上; RS: 右上; LI: 左下; RI: 右下) での自発活動発生率を比較した。自然発生率は、 $LS > RS > RI > LI$ の順に高かった (Table 3-1)。自発活動が発生している標本のほとんどで、時間経過による自発活動発生頻度の低下が観察された (Fig 3-1 C)。自発活動していた標本のうち半数 (31/62) では、観察開始から急激に頻度が低下し、5 分以内に停止した。また、自発活動が 5 分~15 分間に停止したもの (14/62) は、発火頻度が右肩下がりであったが、15 分以上持続したもの (17/62) に関しては、観察開始から 5 分程度で発火頻度の安定化が見られた。(Fig 3-1 C)

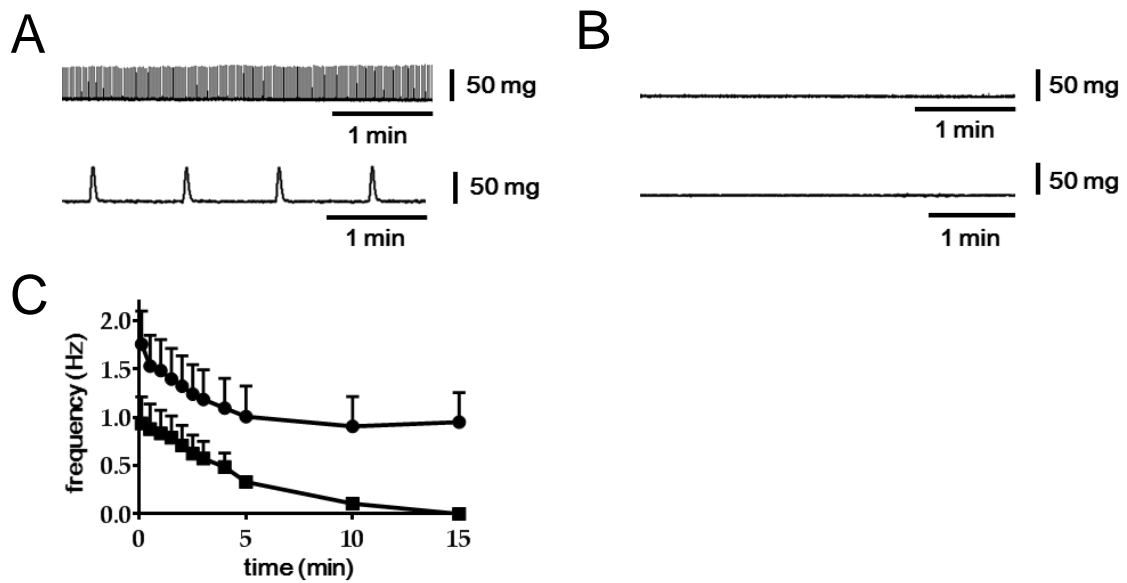


Fig 3-1 肺静脈心筋で発生していた自発活動

- (A) 自発活動している標本の収縮トレース (下段は拡大波形)
 (B) 自発活動していない標本の収縮トレース (下段は拡大波形)
 (C) 自発活動の発火頻度の経時変化

- : 15 min 以上持続した肺静脈心筋自発活動 (n = 17)
 ■ : 5 ~ 15 min 持続した肺静脈心筋自発活動 (n = 14)

部位	自発活動あり	自発活動なし	総数	自発活動発生率 (%)
LS	39	15	54	72.2
RS	12	38	50	24.0
LI	3	38	41	7.3
RI	8	28	36	22.2
合計	62	119	181	34.2

Table 3-1 肺静脈の部位毎での自発活動の発生率 (%)

第 2 節 Angiotensin II の肺静脈心筋自動能に対する影響

3-2-1 Angiotensin II による自発活動の誘発

Angiotensin II の自発活動誘発性の検討を行うために、自発活動が発生していない肺静脈標本に angiotensin II を organ bath 内 10 nM, 100 nM, 1 μ M となるようにそれぞれ単発投与した。Angiotensin II を投与すると、一定確率で自発活動の誘発が観察された (Fig 3-2 A)。自発活動の誘発率は、濃度依存的に増加していた (Fig 3-2 C、Table 3-2)。自発活動は、多くの場合 angiotensin II 投与後から 30 秒~1 分 程度で誘発された (Table 3-2)。自発活動が誘発された瞬間を 0 秒 として 30 秒毎に自発活動の平均発火頻度を算出すると、100 nM では自発活動の誘発から 2-2.5 分、100 nM、1 μ M では、30 秒-1 分で最大となり、その後徐々に減少した (Fig 3-2 B)。Angiotensin II による自発活動の誘発は、10 nM では全例で 10 分以上持続した一方で、100 nM、1 μ M 投与では、全例で 10 分以内に停止した。自発活動の最大発火頻度は 100 nM、1 μ M で誘発されたものに比べて、10 nM で誘発されたものの方が高い傾向にあった (Fig 3-2 B)。Angiotensin II 1 μ M で自発活動が誘発され、停止した直後に angiotensin II を 2 μ M となるように追加投与した場合、全例で自発活動は再誘発されなかった (7/7 data not shown)。

3-2-2 Angiotensin II の自発活動誘発に関する受容体機序の検討

自発活動が発生していない肺静脈標本に、それぞれ losartan 10 μ M (AT_1 受容体遮断薬)、PD123,319 10 μ M (AT_2 受容体遮断薬)、carvedilol 0.1 μ M ($\alpha\beta$ 遮断薬) 存在下で angiotensin II 1 μ M を投与し、自発活動誘発率を記録した (Fig 3-3 D、Table 3-2)。Losartan の存在下では、angiotensin II による自発活動誘発は完全に抑制された (Fig 3-3 A)。一方で、PD123,319、carvedilol それぞれの存在下では、angiotensin II による自発活動誘発は抑制されなかった (Fig 3-3 B, C)。また、PD123,319、carvedilol の存在下で発生した angiotensin II 誘発性自発活動は一過性であり、自発活動が誘発されるまでの時間、自発活動の持続時間、最大発火頻度は angiotensin II 単独投与の場合と比較して大きく変化していなかった (Table 3-2)。

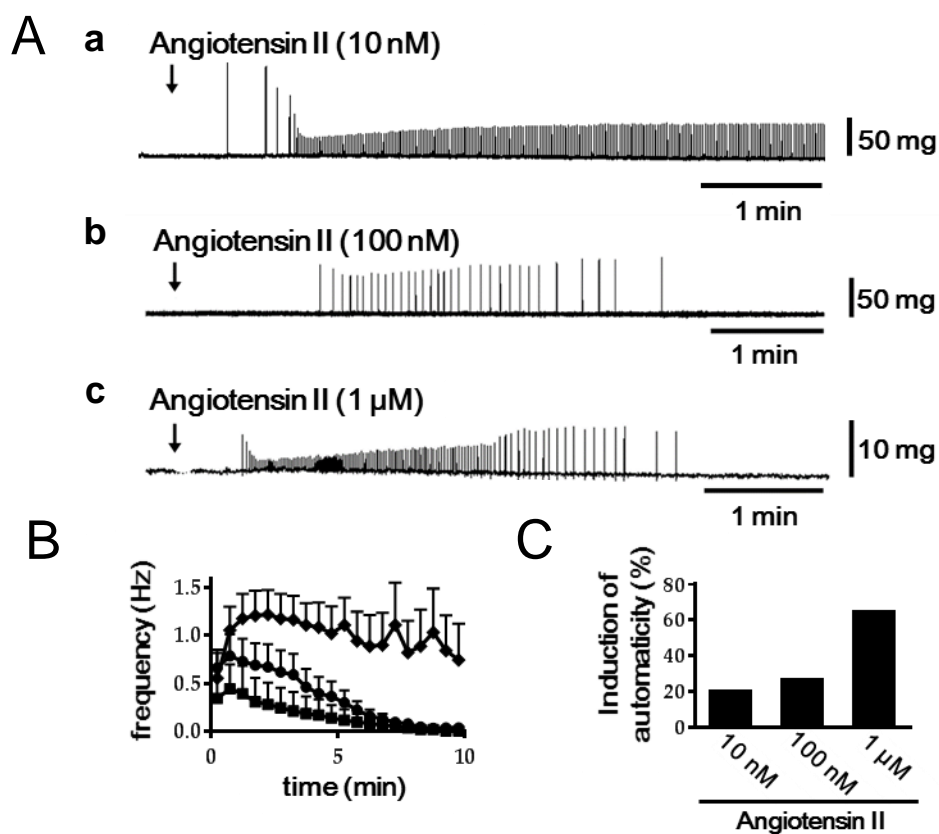


Fig 3-2

肺静脈組織標本での Angiotensin II による自発活動の誘発

(A) Angiotensin II 10 nM (a)、100 nM (b)、1 μM (c) 投与により発生した自発活動の収縮カトレース

(B) Angiotensin II 10 nM (◆ : n = 3)、100 nM (■ : n = 4)、1 μM (▲ : n = 11) で誘発された自発活動の発火頻度の経時変化 (0 min は自発活動が最初に発火した瞬間)

(C) Angiotensin II 10 nM、100 nM、1 μM による自発活動の誘発率 (%)

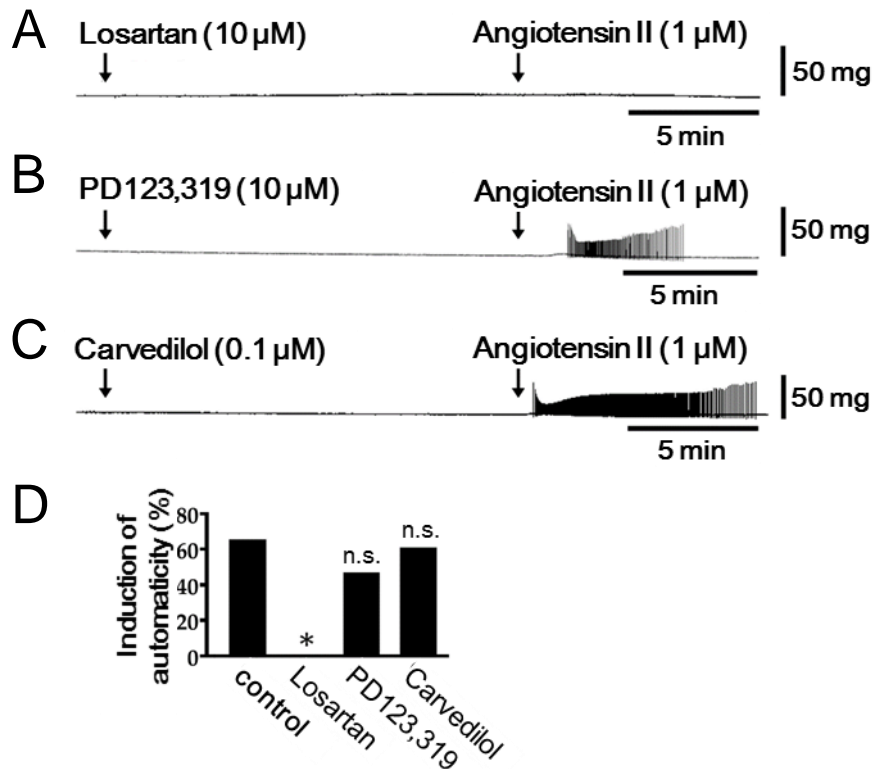


Fig 3-3 受容体遮断薬が angiotensin II の自発活動誘発作用に与える影響
 (A) Losartan 存在下で angiotensin II を投与した場合の収縮カトレース
 (B) PD123,319 存在下で angiotensin II を投与した場合の収縮カトレース
 (C) Carvedilol 存在下で angiotensin II を投与した場合の収縮カトレース
 (D) Losartan 10 μ M、PD123,319 10 μ M、carvedilol 0.1 μ M 存在下及び非存在下 (control) で angiotensin II 1 μ M を投与した場合の自発活動の誘発率 (%)
 * $p < 0.05$ vs control by Fischer's exact test.

	自発活動 誘発率 (%)	誘発された自発活動のパラメータ			n
		Latency (sec)	Duration (min)	Maximum frequency (Hz)	
Angiotensin II (10 nM)	3/15 (20.0%)	33.4 ± 8.8	> 10	1.2 ± 0.2	3
Angiotensin II (100 nM)	4/15 (26.7%)	66.4 ± 23.1	4.0 ± 1.6	0.4 ± 0.3	4
Angiotensin II (1 μM)	11/17 (64.7%)	50.4 ± 7.7	4.4 ± 1.1	0.8 ± 0.2	11
Losartan + angiotensin II (1 μM)	0/10 (0%)	-	-	-	0
PD123,319 + angiotensin II (1 μM)	6/13 (46.2%)	59.6 ± 17.8	3.5 ± 0.4	0.6 ± 0.1	6
Carvedilol + angiotensin II (1 μM)	6/10 (60.0%)	33.1 ± 7.9	6.3 ± 1.0	0.6 ± 0.1	6

Table 3-2 Angiotensin II 誘発性自発活動のパラメータ

Angiotensin II 10 nM、100 nM、1 μM を単発投与した場合と、losartan 10 μM、PD123,319 10 μM、carvedilol 0.1 μM それぞれの存在下で angiotensin II 1 μM を投与した場合の latency (自発活動誘発までの時間)、duration (自発活動の持続時間)、frequency (自発活動の最大発生頻度)

第3節 考察

モルモット肺静脈心筋自発活動の基本的性質

モルモット肺静脈心筋では、収縮力測定下、約3割の標本で自発活動の発生が観察された (Fig3-1 A, B)。今回の結果から、モルモット肺静脈標本で収縮力を測定することで、肺静脈心筋における自発活動を、活動電位と同様に、収縮力として検出することが可能であると判明した。この実験系を用いて、angiotensin II が肺静脈心筋自動能に与える影響を検討した。

肺静脈心筋における自発活動発生率には部位差があり、 $LS > RS > RI > LI$ の順で高かった (Table 3-1)。肺静脈心筋自動能の部位による違いは、ヒトの肺静脈でも観察される。心房細動の原因となった肺静脈での異所性電気興奮の発生率は、 $LS > RS > LI > RI$ の順で高いと報告されており (Haïssaguerre M et al., 1998)、モルモット肺静脈自発活動の発生のしやすさと似通っていた。このことは、ヒトとモルモットの肺静脈心筋に共通した性質があることを示していると考えられる。自発活動の発生率に部位差がある一方で、肺静脈心筋の活動電位パラメータの観点ではほとんど部位差がないことが明らかとなっている (恒岡弥生博士論文)。そのため、以下の検討では、4つの部位を区別なく用いることとした。

自発活動が発生していた肺静脈標本のほとんど全てで、時間経過に伴う自発活動の発火頻度の低下が観察された (Fig 3-1 C)。観察開始から15分以内に自発活動が停止した肺静脈標本での発火頻度は右肩下がりに低下したのに対し、15分以上持続した肺静脈標本では観察開始から5分程度で発火頻度が安定化する傾向にあった。第5章では、自発活動が発生している肺静脈標本を用いた検討を行ったが、これには観察開始から15分以上持続的に、安定した頻度で自発活動が発生している標本を用いた。なお、本章での検討では、angiotensin II が肺静脈心筋自動能を亢進するかどうかを検討するため、自発活動が発生していない肺静脈標本を用いた。

Angiotensin II の自発活動誘発作用と受容体機序

Angiotensin II は自発活動が発生していない標本で自発活動を誘発した (Fig 3-2 A)。また、自発活動の誘発率は濃度依存的に増加した (Fig 3-2 C)。これらの結果から、angiotensin II に肺静脈心筋自動能を亢進させる作用があることが明らかとなった。実験動物の組織や細胞を用いた検討では、主に 10–100 nM の angiotensin II を用いることが多いが、今後の検討では、angiotensin II の作用メカニズムを明らかにする目的から、最も自発活動誘発率が高かった 1 μ M を用いることとした。

次に、angiotensin II の受容体機序を検討した。心筋の受容体として、AT₁・AT₂ 受容体の存在が知られている (Zhu YC et al., 2003)。それぞれの選択的遮断薬である losartan、PD123,319 を用いた検討を行った。Losartan、PD123,319 それぞれの存在下で angiotensin II を投与すると、losartan の存在下で自発活動誘発が完全に抑制された (Fig 3-3A)。これらの結果から、モルモット肺静脈心筋において、自発活動誘発作用は AT₁ 受容体を介することが明らかとなった。AT₁ 受容体は、G 蛋白共役型受容体であり、受容体刺激が血管収縮作用、aldosterone 分泌作用、心臓リモデリング作用などを引き起こすことが知られている。モルモット心房に angiotensin II を投与すると、陽性変力作用 (Feolde E et al., 1993) や、陽性変時作用 (Nakashima A et al., 1982) を示すことが報告されている。モルモット以外の動物種の心房においても、angiotensin II が陽性変力作用 (ウサギ: freer RJ et al., 1976 ; イヌ: Kobayashi M et al., 1978) や陽性変時作用 (ウサギ: Thompson JL, 1970 ; イヌ: Kobayashi M et al., 1978) を示す。これらの作用の一部、もしくは大部分が心筋の AT₁ 受容体刺激を介した心筋細胞内の Ca²⁺動態の変化や膜からの Ca²⁺流入に起因していることが示唆されている (Lindpaintner K and Ganten D, 1991)。また、ヒト心房組織での検討において、angiotensin II が AT₁ 受容体刺激を介して心筋の期外収縮を誘発することから (von Lewinski D et al., 2008)、angiotensin II は、心筋細胞の Ca²⁺動態に影響を与え、心筋自動能を亢進させているとも考えられる。これらの報告及び本検討の結果から、angiotensin II による AT₁ 受容体刺激が、肺静脈心筋細胞内の Ca²⁺動態や膜電位を変化させることにより、モルモット肺静脈心筋自発活動を誘発していると予想された。Angiotensin II の肺静脈心筋細胞 Ca²⁺動態への影響に関しては第 4 章、膜電位への影響に関しては第 5 章で検討を行った。

PD123,319 存在下で angiotensin II を投与した場合、自発活動の誘発は抑制されなかった (Fig 3-3 B)。この結果から、AT₂ 受容体は angiotensin II による自発活動誘発にはあまり影響を与えていないと考えられた。一般に、AT₂ 受容体は AT₁ 受容体の作用とは拮抗的に働き、血管弛緩作用、組織のリモデリングの抑制作用などを有することが近年明らかとなってきている (Matavelli LC and Siragy HM, 2015)。AT₂ 受容体は病態下で発現が増加するとされており、ヒトでの検討においては、心房細動病態下において、健常な場合に比べて AT₂ 受容体のタンパク発現量が増加していることが報告されている (Goette A et al., 2000)。病的条件下では、angiotensin II の作用における AT₁ 受容体と AT₂ 受容体の重要性が変化する可能性がある。

Angiotensin II による自発活動の持続性は、濃度によって異なっており、10 nM の投与では持続性、100 nM、1 μ M の投与では一過性の自発活動が誘発された (Fig 3-2 AB, Table 3-2)。G 蛋白共役型受容体では、アゴニストの投与によって受容体が脱感作することが知られていて、AT₁ 受容体も例外ではない (Ferguson SS, 2001 ; Guo DF et al., 2001)。ラット大動脈平滑筋細胞、心室筋細胞での検討では、低濃度 (1 nM) の angiotensin II への複数回の暴露によっては、それぞれの反応性が低下しないのに対し、高濃度 (100 nM) では、最初の暴露から数十分の間 angiotensin II 投与に対する反応性の低下 (脱感作) が観察されている (Bernhem K et al., 2017)。本検討で Angiotensin II 100 nM、1 μ M による作用が一過性であったことには、AT₁ 受容体の脱感作による反応性の低下が関与している可能性がある。Angiotensin II を 1 μ M で投与し、自発活動が誘発された標本において、自発活動が停止した直後に angiotensin II を 2 μ M となるように追加投与した場合、自発活動が再誘発されなかったことも、この説を支持する。

今回の検討では、比較的高い濃度の angiotensin II (1 μ M) を用いた場合でも、自発活動の誘発率は 6 割程度であった (Fig 3-2 C, Table 3-2)。そのため、angiotensin II の作用がどのような条件下で顕在化しやすくなるのかに関しては今後検討すべき課題である。肺静脈心筋自発活動は、angiotensin II 以外にも様々な生理活性物質の影響を受けることが知られている (noradrenaline: Maupoli V et al., 2007 ; acetylcholine :Wang TM et al., 2005 ; endothelin-1 : Udyavar AR et al., 2007 ; nitric oxide : Lin YK et al.,2010 ; thyroid hormone : Chen YC et al., 2002)。これらの物質の活性の病態における変化が、angiotensin II の自発活動誘発作用を増強させる可能性がある。また、高血圧や心不全の病態下では、循環血液中に流れる angiotensin II レベルが高くなっていることが報告されていて (van de Wal RM et al., 2006)、このことが、病態下での肺静脈心筋自動能亢進に寄与している可能性がある。また、AT₁ 受容体は、アゴニストである angiotensin II による刺激を介さず、進展などの機械刺激によって受容体自体のコンホメーションが変化し、内因性活性が増加することが判明している (Akazawa H et al.,2008)。これらの報告のように、心房細動のリスク要因となるような病態では、生体内の環境が激変することによって、angiotensin II の作用に変化が起きる可能性がある。薬物学教室では、大動脈、大静脈の間にシャントを形成し、容量負荷をかけることで心肥大、心不全状態となったラット (AVS ラット: Hamaguchi S et al., 2015) や、streptozotisin によって誘発した糖尿病モデルマウス (金江春奈博士論文) の肺静脈心筋で、自発活動が発生しやすいことを明らかにしている。今後、これらの病態モデル動物の肺静脈心筋を用いて、angiotensin II の作用が増強されるか否かを検討したい。

神経の関与

Angiotensin II は、心筋に対して直接的に作用するだけでなく、自律神経終末からの伝達物質遊離の調節にも関与する。Angiotensin II が心筋に対して陽性変力作用、陽性変時作用を示すことはすでに述べたが、この作用の一部に、交感神経終末からの noradrenaline 遊離促進作用が関与する (Ziogas J et al., 1984 ; Brasch H et al., 1993)。肺静脈周囲には自律神経終末が密に存在しており、肺静脈局所で交感神経伝達物質が放出され得る (ヒト: Tan AY et al., 2006 ; モルモット: Haberberger R et al., 1997)。モルモットやラットの肺静脈組織での検討では、noradrenaline の投与が α_1 、 β_1 受容体を介して自発活動を誘発、促進することが報告されている (Irie M et al., 2017, Maupoli V et al., 2007)。本検討でも、angiotensin II の作用に交感神経終末からの noradrenaline 遊離促進が肺静脈心筋自発活動の誘発に関与している可能性があった。モルモット肺静脈心筋では、noradrenaline による自発活動の誘発が、 $\alpha\beta$ 受容体遮断薬 carvedilol 0.1 μM 存在下でほぼ完全に抑制される (Irie M et al., 2017)。そこで、carvedilol 0.1 μM 存在下で angiotensin II を投与したところ、自発活動誘発作用は抑制されなかった (Fig 3-3 C)。この結果から、angiotensin II のモルモット肺静脈心筋への作用に、交感神経終末からの noradrenaline 遊離促進が関与しないことが判明した。心房細動のリスク要因となる病態下 (高血圧、心不全、糖尿病) では、いずれも交感神経系の亢進が生じており、angiotensin II の神経作用が顕在化する可能性がある (Ahmad et al., 2013)。自律神経が亢進した場合に、angiotensin II の作用がどのように変化するかは今後の検討課題である。当研究室では、モルモット心房筋、心室筋組織標本に対して高頻度電気刺激を行うことによって自律神経活動を亢進させる実験系を保有している (小松 百花卒業論文)。これを肺静脈組織に応用することによって、自律神経活動が亢進した状態での angiotensin II の作用を検討可能である。

第 4 節 結論

Angiotensin II は AT₁ 受容体を介して自発活動を誘発する。

また、本章では、自律神経を介した noradrenaline の遊離が自発活動の誘発に関与していないことが判明した。このことから、angiotensin II は、肺静脈心筋細胞に対して直接作用していると予想された。そこで、次章では、angiotensin II の肺静脈心筋細胞に対する直接作用を、Ca²⁺動態の観点から検討した。

第4章 Angiotensin II が肺静脈心筋細胞 Ca²⁺動態に与える影響

本章では、第1節で肺静脈心筋細胞の形態及び Ca²⁺動態を心房筋細胞や心室筋細胞と比較し、肺静脈心筋細胞の形態学的な特徴と、Ca²⁺動態の性質について明らかにした。第二節にて、angiotensin II の投与が肺静脈心筋細胞の Ca²⁺動態に与える影響を観察し、angiotensin II の肺静脈心筋への直接作用を検討するとともに、自動能亢進作用の細胞内メカニズムを明らかにした。

第1節 肺静脈心筋細胞の基本的性質

4-1-1 心室筋細胞、心房筋細胞、肺静脈心筋細胞の形態学的性質

単離した心室筋細胞、心房筋細胞、肺静脈心筋細胞を微分干渉顕微鏡、蛍光顕微鏡下で観察した。微分干渉顕微鏡の観察では、心室筋細胞、心房筋細胞、肺静脈心筋細胞の全てで横紋が見られた(Fig 4-1 DIC)。心室筋細胞は rod-shape (棒状)、心房筋細胞は spindle-shape (紡錘状) であった。肺静脈心筋細胞は、多くが spindle-shape であったが、一部では rod-shape も見られた。肺静脈心筋細胞は、長軸 (length) は心室筋細胞や心房筋細胞より長く、短軸 (width) は心室筋細胞に比べて短かった (Table 4-1)。

蛍光顕微鏡観察下で、膜染色プローブである PKH-67 を導入して観察したところ、心室筋細胞では T 管構造が観察されるのに対し、心房筋細胞、肺静脈心筋細胞では T 管構造は観察されなかった (Fig 4-1 SL)。また、BODIPYTM thapsigargin を用いて筋小胞体を染色したところ、心室筋細胞、心房筋細胞、肺静脈心筋細胞の全てで、核を除く細胞全体に筋小胞体 (SR) が存在した (Fig 4-1 SR)。

4-1-2 心室筋細胞、心房筋細胞、肺静脈心筋細胞における Ca²⁺ transient

心室筋細胞、心房筋細胞、肺静脈心筋細胞に fluo-4 AM (5 μM) を導入し、細胞内 Ca²⁺ 蛍光を観察した。1Hz 電気刺激によって Ca²⁺ transient を誘発すると、心室筋細胞では、Ca²⁺ 蛍光強度の上昇が細胞全体で同時に発生していた (Fig 4-2 A)。細胞膜直下領域及び細胞中心部の局所的な Ca²⁺ 蛍光強度を測定した場合でも、同様の結果が得られた (Fig 4-2 BC)。一方で、心房筋細胞 (Fig 4-3) と肺静脈心筋細胞 (Fig 4-4) では、Ca²⁺ transient に伴う Ca²⁺ 蛍光の増加は、細胞膜直下 1 μm 以内の領域から始まり、細胞中心部へと wave 状に伝播した。心房および肺静脈心筋細胞における Ca²⁺ 蛍光の伝播速度は、それぞれ 98.0 ± 1.7 μm/s (n=5) および 97.1 ± 11.2 μm/s (n=5) であった。

4-1-3 肺静脈心筋細胞における自発的 Ca²⁺ transient

肺静脈心筋細胞では、1Hz 電気刺激を加えない場合でも、約 3 割で自発的な Ca²⁺ transient が発生していた (Fig 4-5)。Ca²⁺ transient に伴う Ca²⁺ 蛍光の増加は、細胞膜直下 1 μm 以内の領域から始まり、細胞中心部へと wave 状に伝播した。Ca²⁺ 蛍光の伝播速度は 99.6 ± 4.5 μm/s (n=5) であった。Ca²⁺ transient 発生の前後には、時折 Ca²⁺ spark の発生が観察された。1Hz 電気刺激誘発性 Ca²⁺ transient と自発的な Ca²⁺ transient の amplitude を比較したところ、自発的 Ca²⁺ transient の方が amplitude が大きい傾向にあったものの、統計的有意ではなかった (table 4-2)。

4-1-4 肺静脈心筋細胞における Ca²⁺ spark、Ca²⁺ wave、Ca²⁺ transient の関係性

肺静脈心筋細胞における自発的な Ca²⁺ transient の発生機序を探るために、Ca²⁺ transient の初期段階における Ca²⁺ spark と Ca²⁺ wave の関与を検討した。Ca²⁺ spark は、自発的な Ca²⁺ transient が発生していない肺静脈心筋細胞でも、一定の発生頻度で観察された (Fig 4-6)。心筋膜直下と心筋細胞の中心部で Ca²⁺ spark の出現頻度や発火パターンに大きな違いは見られなかった (table 4-3)。肺静脈心筋細胞では時折自発的な Ca²⁺ wave が発生していた (Fig 4-7)。自発的 Ca²⁺ wave の平均伝播速度は 97.8 ± 5.9 μm/s (n=5) であった。

自発的な Ca²⁺ transient の発生を観察すると、Ca²⁺ transient の発生直前に、Ca²⁺ spark が多く観察された (Fig 4-8 A)。Ca²⁺ transient の発生にいたるまでの Ca²⁺ spark の発火頻度の経時変化を集計した (Fig 4-8 B)。Ca²⁺ spark は緩徐に増加し、自発的 Ca²⁺ transient の発生直前に急激に増加した。これに続いて Ca²⁺ 蛍光の wave 状の伝播を含む自発的な Ca²⁺ transient の発生が観察された。

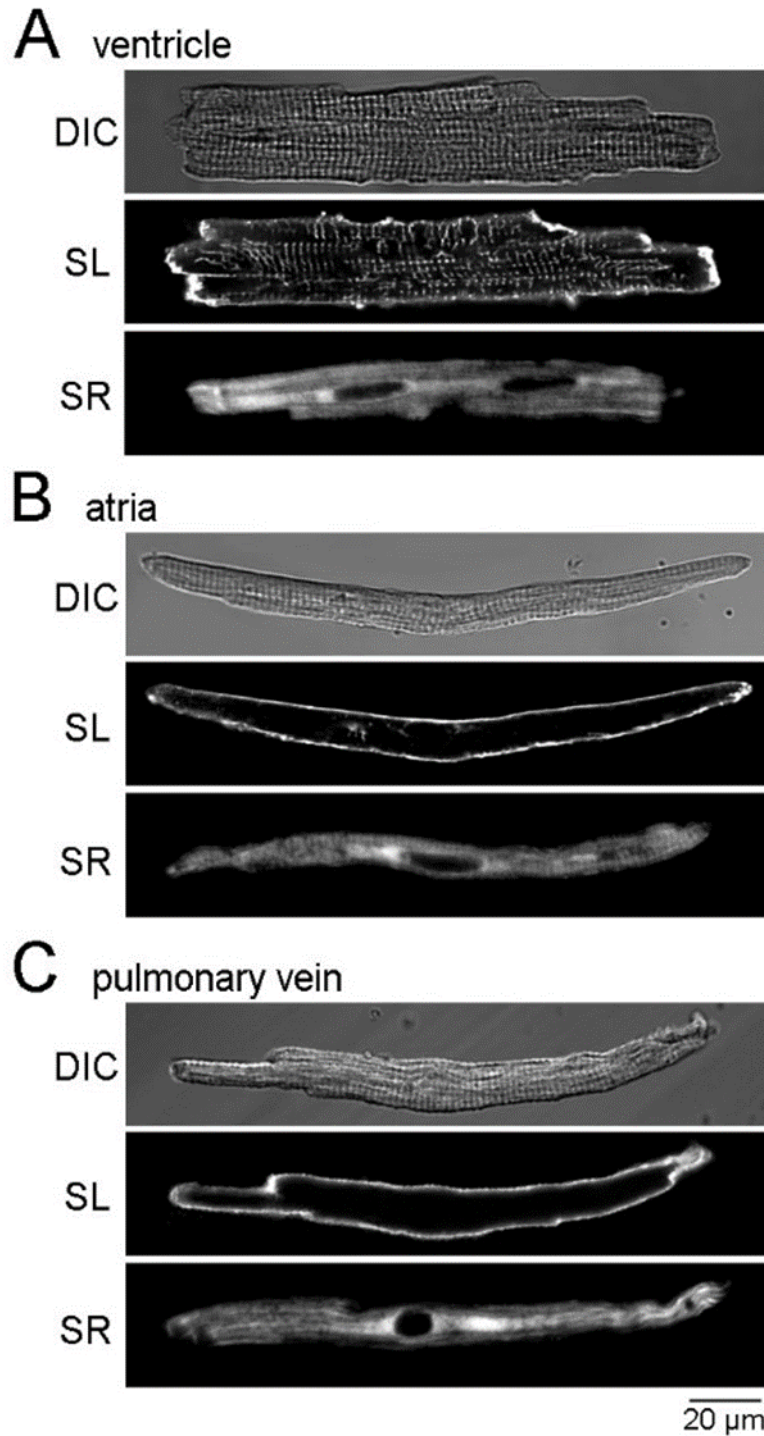


Fig 4-1 心室筋細胞 (A)、心房筋細胞 (B)、肺静脈心筋細胞 (C)の形態学的特徴

DIC : 微分干渉顕微鏡による細胞形態の観察

SL : 蛍光顕微鏡下 PKH67 による心筋細胞膜の染色

SR : 蛍光顕微鏡下 Bodipy™ thapsigargin による筋小胞体の染色

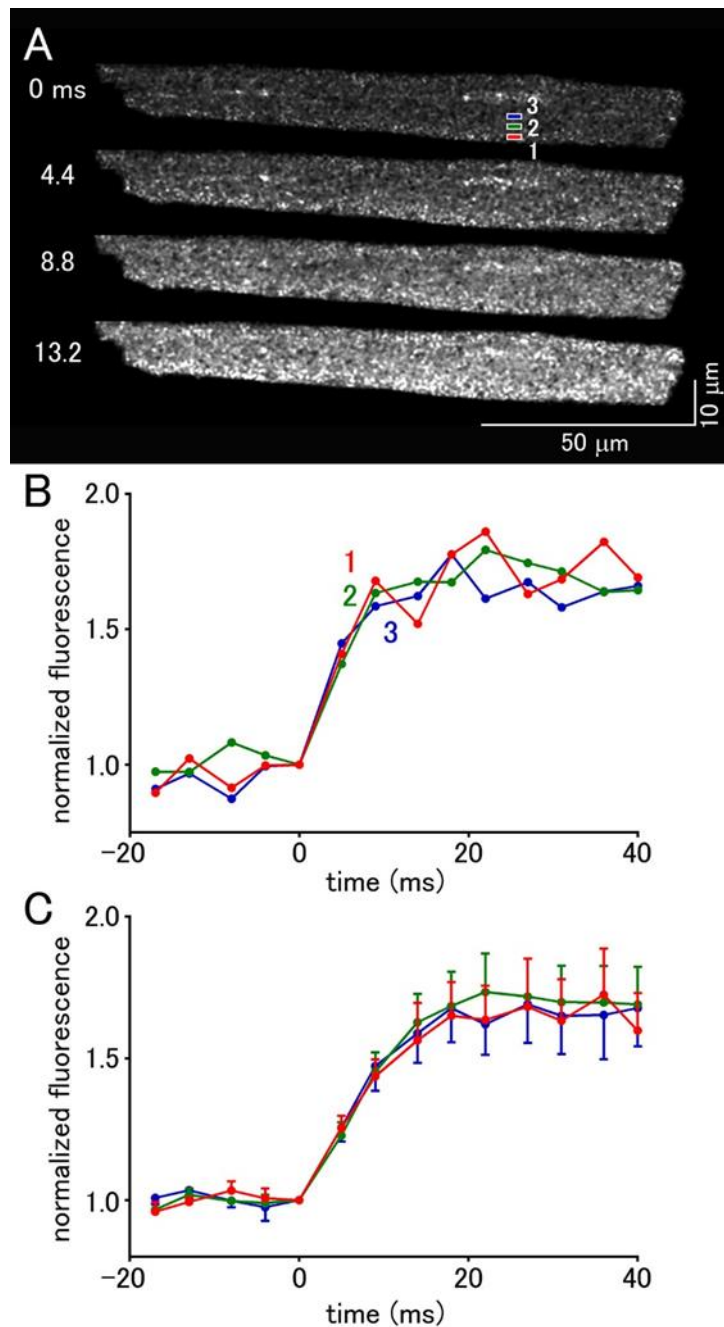


Fig 4-2 心室筋細胞における電気刺激誘発性 Ca^{2+} transient

(A)心室筋細胞において、1Hz 電気刺激で惹起した Ca^{2+} transient の蛍光画像
(0 ms は電気刺激を行った瞬間)

(B) A で示した心室筋細胞の局所 (1–3) における Ca^{2+} 蛍光強度変化

(C) 心室筋細胞局所での Ca^{2+} 蛍光強度変化 (n = 5)

B、C では細胞膜から 0–1 μm (赤)、3–4 μm (緑)、6–7 μm (青) における $1 \times 2 \mu\text{m}$ で囲った長方形領域内の局所的な平均蛍光強度の経時変化をそれぞれ棒グラフで示した

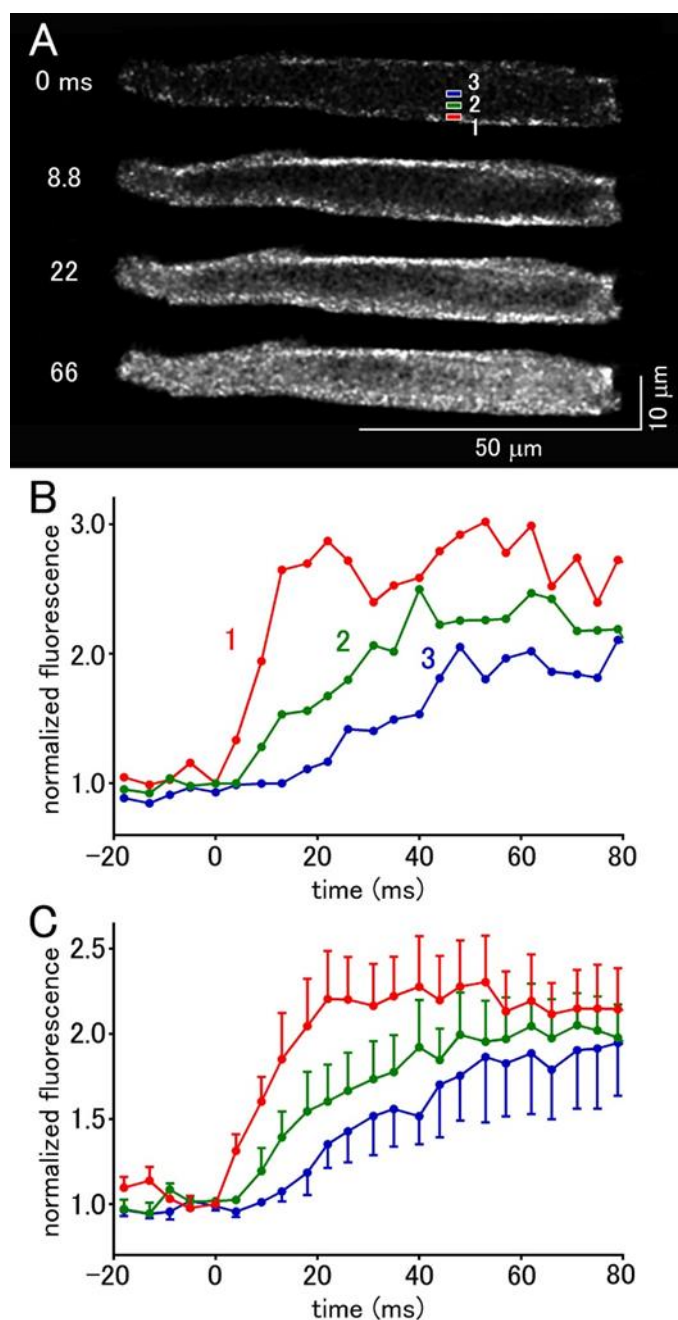


Fig 4-3 心房筋細胞における電気刺激誘発性 Ca²⁺ transient

(A)心房筋細胞において、1Hz 電気刺激で惹起した Ca²⁺ transient の蛍光画像
(0 ms は電気刺激を行った瞬間)

(B) A で示した心房筋細胞の局所 (1–3) における平均 Ca²⁺ 蛍光強度変化

(C) 心房筋細胞局所での Ca²⁺ 蛍光強度変化 (n = 5)

B、C では、細胞膜から 0–1 μm (赤)、2.5–3.5 μm (緑)、5–6 μm (青) における 1×2 μm で囲った長方形領域内の局所的な平均蛍光強度の経時変化をそれぞれ棒グラフで示した

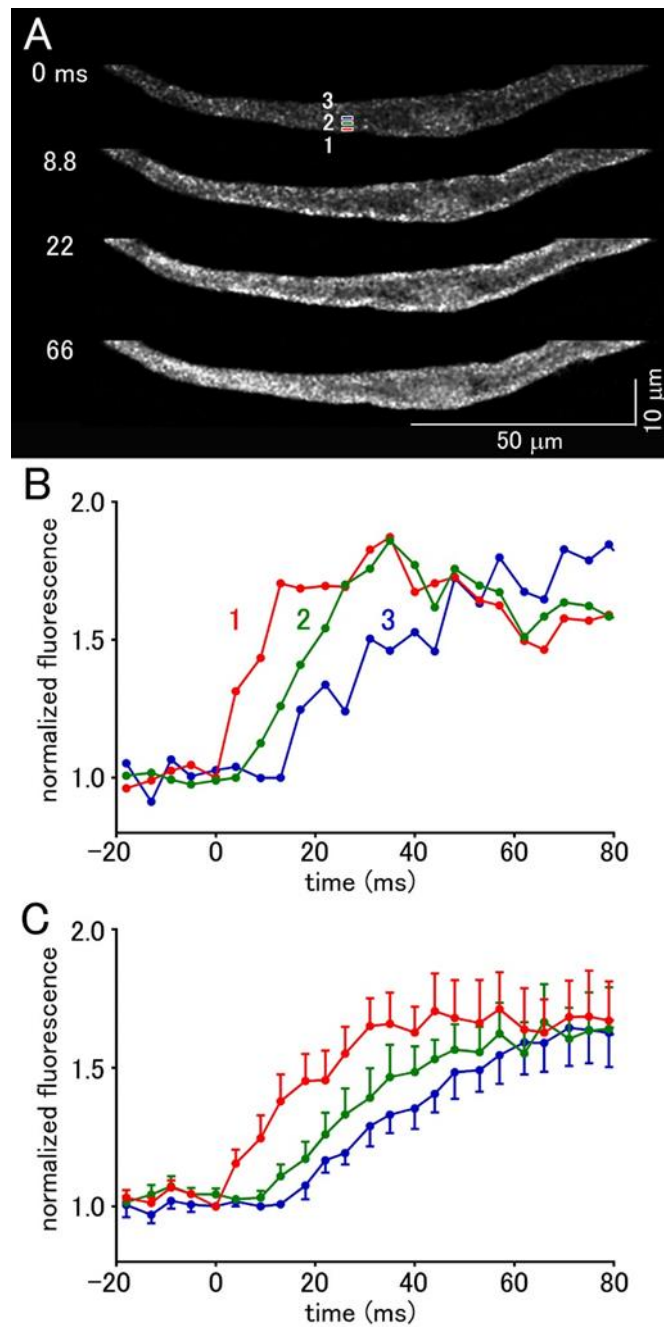


Fig 4-4 肺静脈心筋細胞における電気刺激誘発性 Ca^{2+} transient

(A) 肺静脈心筋細胞において、1Hz 電気刺激で惹起した Ca^{2+} transient の蛍光画像 (0 ms は電気刺激を行った瞬間)

(B) A で示した肺静脈心筋細胞の局所 (1–3) における平均 Ca^{2+} 蛍光強度変化

(C) 肺静脈心筋細胞局所での Ca^{2+} 蛍光強度変化 (n = 5)

B、C では、細胞膜から 0–0.8 μm (赤)、1.3–2.1 μm (緑)、2.6–3.4 μm (青) における 1 \times 2 μm で囲った長方形領域内の局所的な平均蛍光強度の経時変化をそれぞれ棒グラフで示した

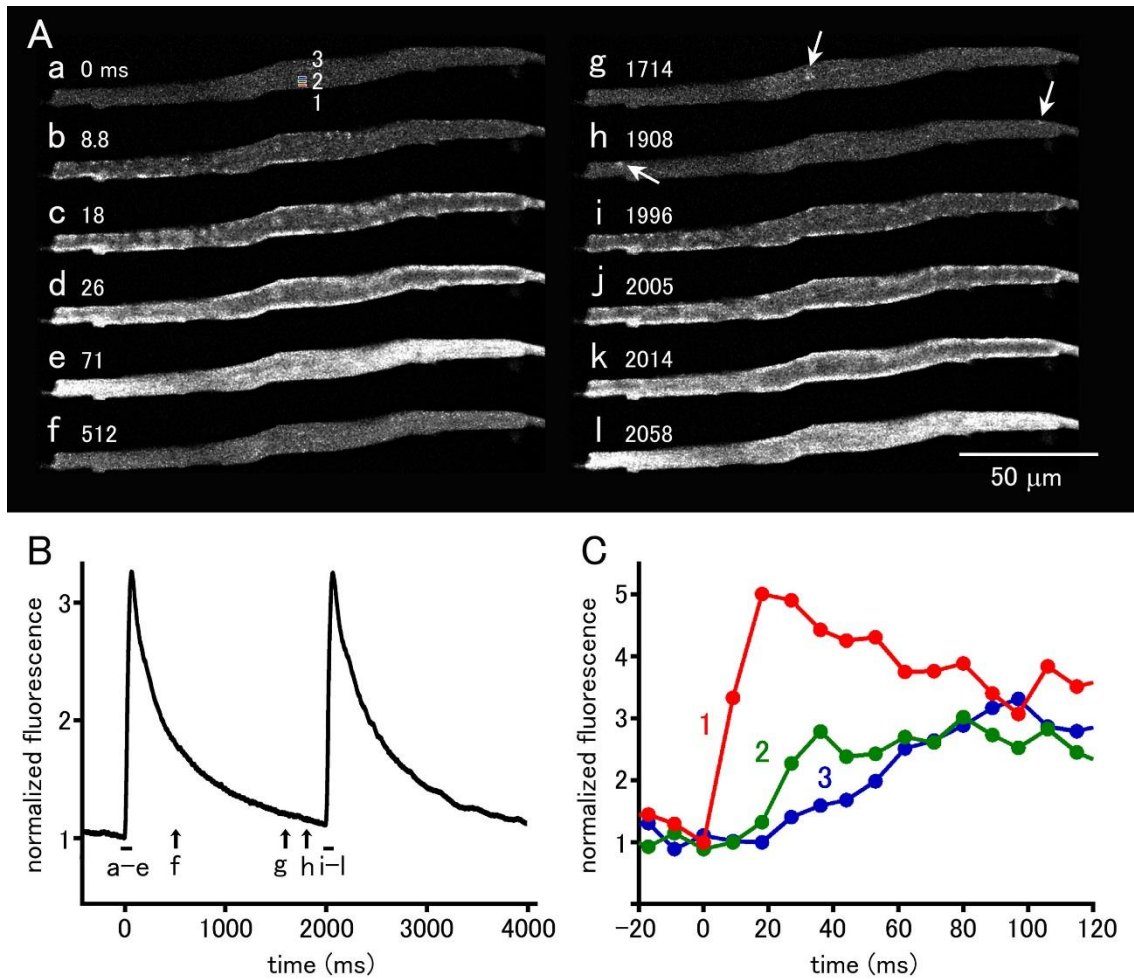


Fig 4-5 肺静脈心筋細胞での自発的 Ca^{2+} transient

(A) 肺静脈心筋で発生していた 2 発の自発的 Ca^{2+} transient の蛍光画像

矢印は自発的 Ca^{2+} transient の間に発生していた Ca^{2+} spark を示す

(B) 肺静脈心筋細胞全体での平均蛍光強度の経時変化

(C) 細胞膜から 0 - 0.8 μm (赤)、1.3 - 2.1 μm (緑)、2.6 - 3.4 μm (青) における 0.8 \times 2 μm で囲った長方形領域内の局所的な平均蛍光強度の経時変化

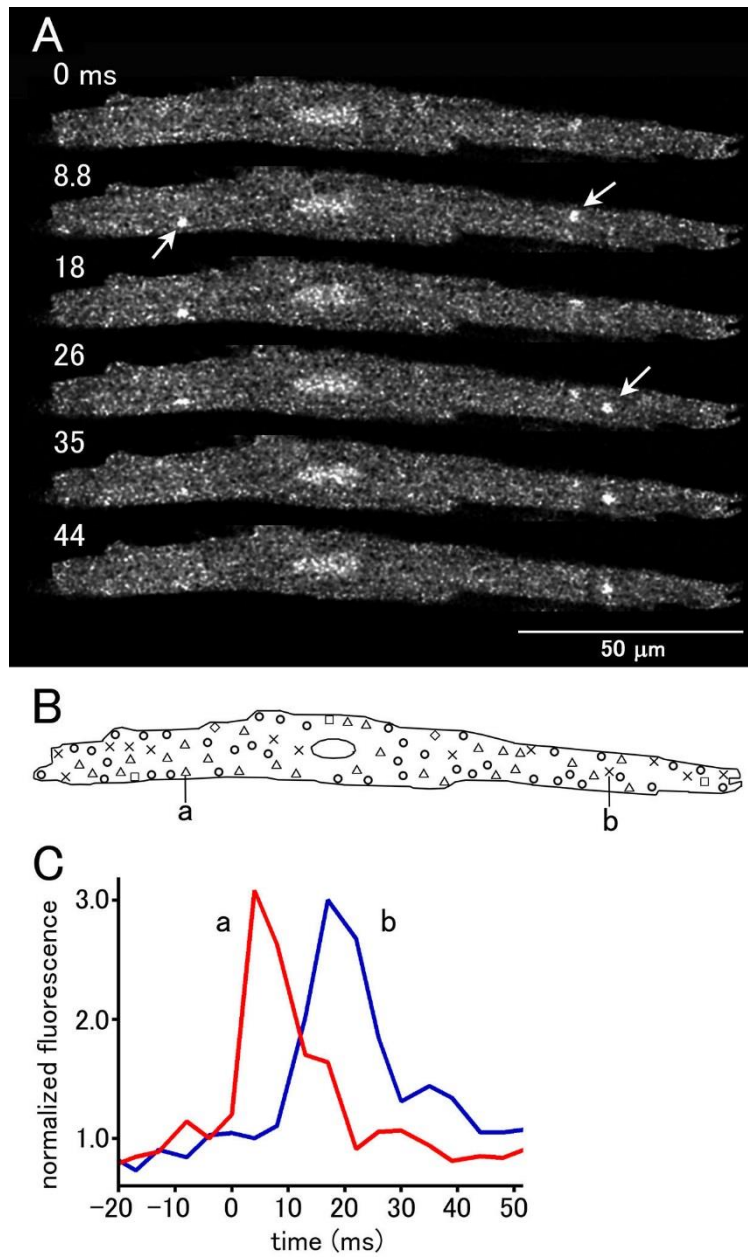


Fig 4-6 Ca^{2+} transient が発生していない肺静脈心筋細胞で観察された Ca^{2+} spark

(A) 肺静脈心筋細胞で観察された Ca^{2+} spark の蛍光画像 (矢印部分)

(B) 3 秒間に観察された Ca^{2+} spark の局所分布図

(○、△、×、□、◇がそれぞれ 1、2、3、4、5 回を示す)

(C) Ca^{2+} spark 発生部位局所 (直径 $1 \mu\text{m}$) での蛍光強度変化

(a) 膜直下 (b) 心筋細胞の中心部

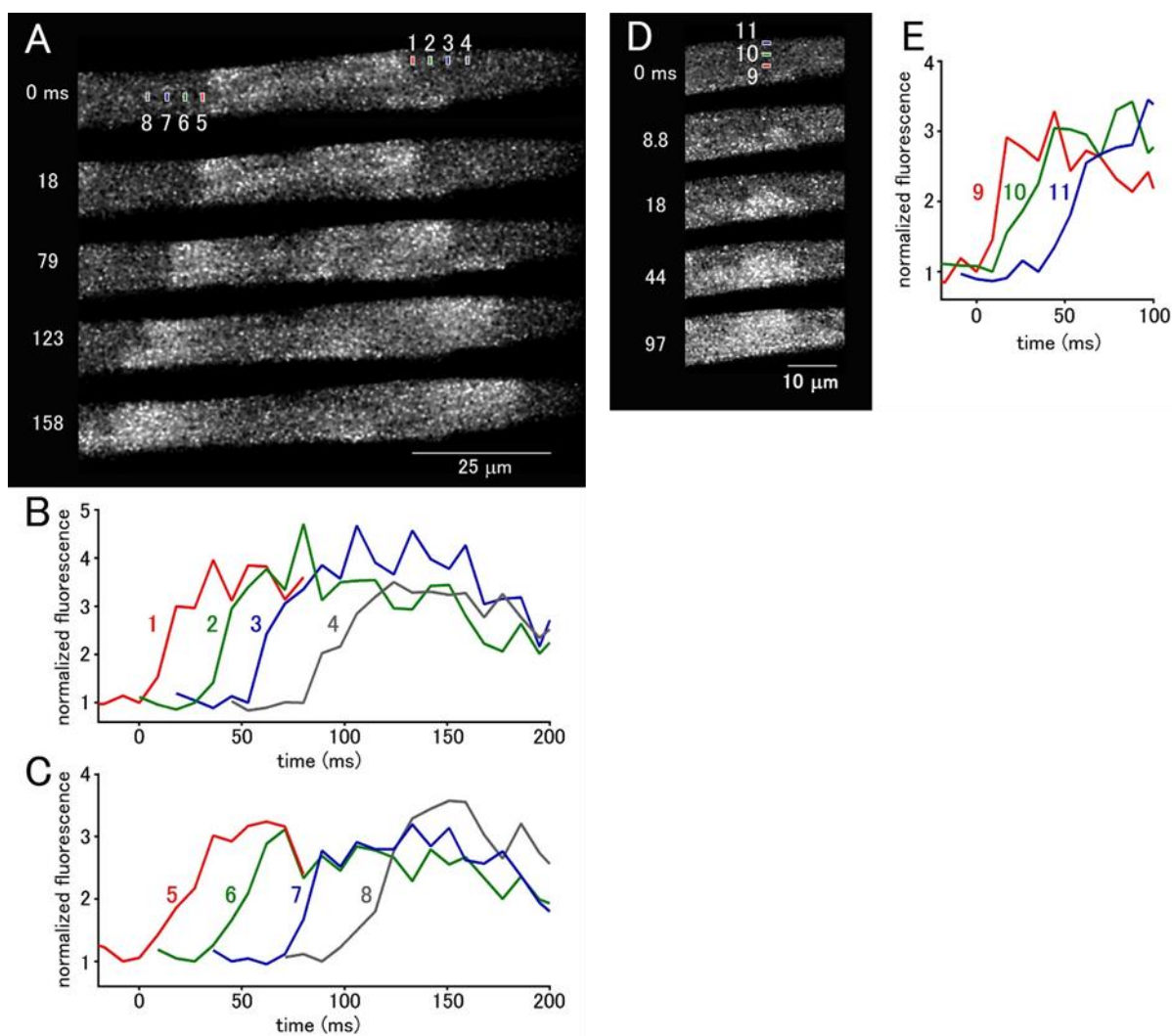


Fig 4-7 肺静脈心筋で自発的に発生していた Ca^{2+} wave

(A) 長軸方向に伝播する2つの Ca^{2+} wave の蛍光画像

(B) A の1-4で示した局所領域 ($1.5 \times 0.5 \mu\text{m}$) における Ca^{2+} 蛍光強度変化

(C) A の5-8で示した局所領域 ($1.5 \times 0.5 \mu\text{m}$) における Ca^{2+} 蛍光強度変化

(D) 全方向に向かって伝播する Ca^{2+} wave の蛍光画像

(E) D の9-11で示した局所領域 ($1 \times 2 \mu\text{m}$) における Ca^{2+} 蛍光強度変化

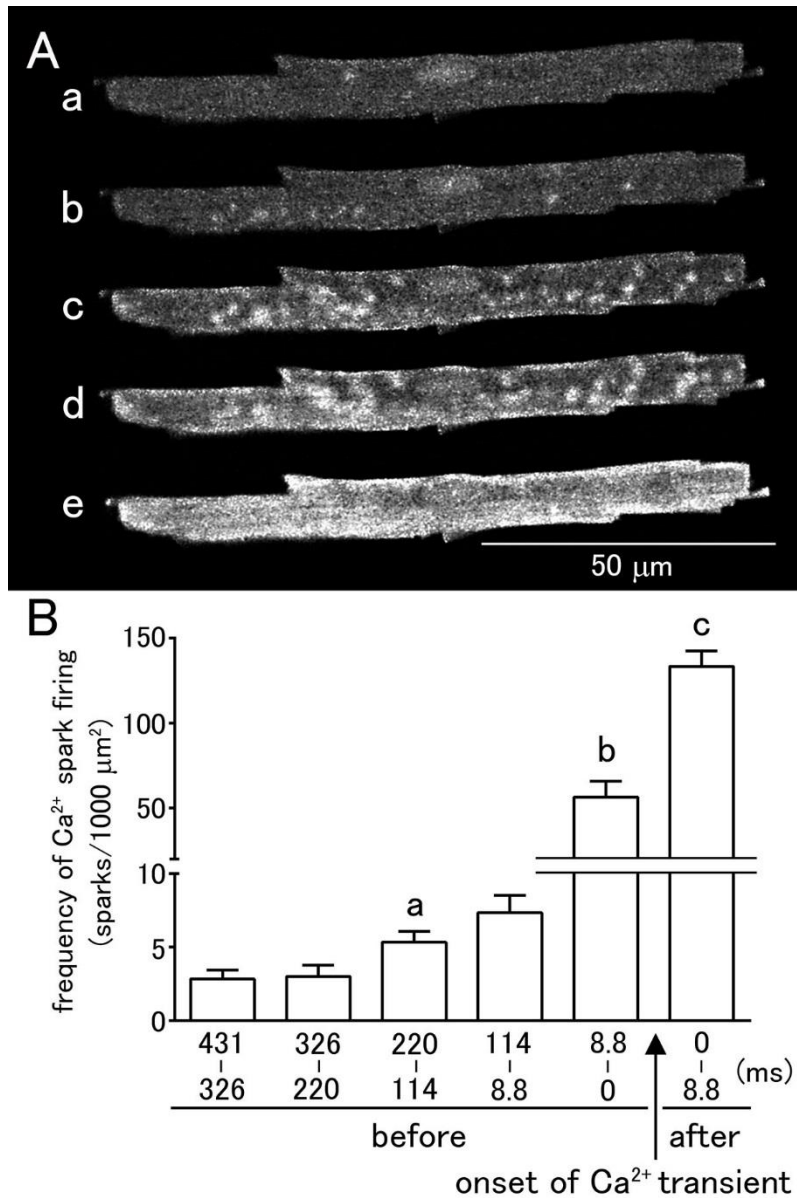


Fig 4-8 肺静脈心筋細胞での Ca^{2+} spark 及び 自発的 Ca^{2+} transient

(A) 自発的 Ca^{2+} transient 誘発前後の Ca^{2+} 蛍光画像

a: Ca^{2+} transient 間でみられた Ca^{2+} spark

b: Ca^{2+} transient 発生直前における Ca^{2+} spark の著明な増加

c: Ca^{2+} transient の発生直後

d: Ca^{2+} 上昇の中心部への伝播

e: 心筋細胞質全体の広がった Ca^{2+} 上昇

(B) 自発的 Ca^{2+} transient 発生前後の Ca^{2+} spark 発生頻度

	心室	心房	肺静脈心筋
length (μm)	147.4 \pm 2.1	142.8 \pm 2.5	159.9 \pm 1.7
width (μm)	21.4 \pm 0.4	11.8 \pm 0.2	12.0 \pm 0.2
number of cells	151	123	200

Table 4-1 心室筋、心房筋、肺静脈心筋の大きさ
Length は長軸方向、width は短軸方向の長さ

	evoked	spontaneous
subsarcolemmal region	0.71 \pm 0.14	1.78 \pm 0.56
central region	0.61 \pm 0.11	0.98 \pm 0.33

Table 4-2 1Hz 電気刺激誘発 Ca^{2+} transient と自発的 Ca^{2+} transient の比較
肺静脈心筋細胞において 1Hz 電気刺激で誘発した Ca^{2+} transient (evoked) と、自発的に発生していた Ca^{2+} transient (spontaneous) の amplitude [(peak fluorescence – basal fluorescence) / basal fluorescence] の比較
Subsarcolemmal region は心筋細胞膜下 0-1 μm 、central region は心筋細胞膜下 4-5 μm における 1 μm \times 2 μm 局所での amplitude

	subsarcolemmal	center
frequency (sparks/1000 $\mu\text{m}^2/\text{s}$)	55.3 \pm 7.8	58.9 \pm 8.5
basal fluorescence intensity	633.7 \pm 116.6	693.6 \pm 90.0
peak fluorescence intensity	1812.0 \pm 337.1	1872.0 \pm 244.0
ratio (peak/basal)	3.0 \pm 0.3	2.8 \pm 0.2
time to peak intensity (ms)	13.6 \pm 1.8	13.4 \pm 2.2
time for 1/2 decay (ms)	10.0 \pm 1.6	11.4 \pm 1.7

Table 4-3 肺静脈心筋細胞の膜直下と細胞中心部での Ca^{2+} spark 動態の比較
細胞膜直下 2 μm 以内 (subsarcolemmal) と細胞膜直下から 4 μm 以上離れた部位 (center) での Ca^{2+} spark 動態

第 2 節 Angiotensin II の肺静脈心筋細胞への作用

4-2-1 Angiotensin II が肺静脈心筋細胞 Ca^{2+} 動態に与える影響

Ca^{2+} transient を自然発生していない肺静脈心筋細胞に対して、angiotensin II (1 μM) を処置すると、6/15 (40 %) で Ca^{2+} transient の誘発が観察された (Fig4-9 AB, Fig 4-10 A)。また、 Ca^{2+} transient の発生の有無にかかわらず、 Ca^{2+} spark の発生頻度の増加が観察された (Fig4-9 AB, Fig 4-10 B)。また、angiotensin II (1 μM) の投与は、basal の Ca^{2+} 蛍光強度も増加させた (Fig 4-10 C)。

4-2-2 Angiotensin II の作用に関する薬理的検討

Ca^{2+} transient を自然発生していない肺静脈心筋細胞に対して、losartan (10 μM)、 IP_3 受容体遮断薬である xestospongine C (3 μM) それぞれの存在下で、Angiotensin II (1 μM) を投与した (Fig 4-10)。Losartan、xestospongine C の存在下では、angiotensin II による Ca^{2+} transient の誘発作用 (Fig 4-10 A)、 Ca^{2+} spark の発火頻度の増加作用 (Fig 4-10 B)、心筋細胞全体での basal の Ca^{2+} の増加作用が抑制された (Fig 4-10 C)。

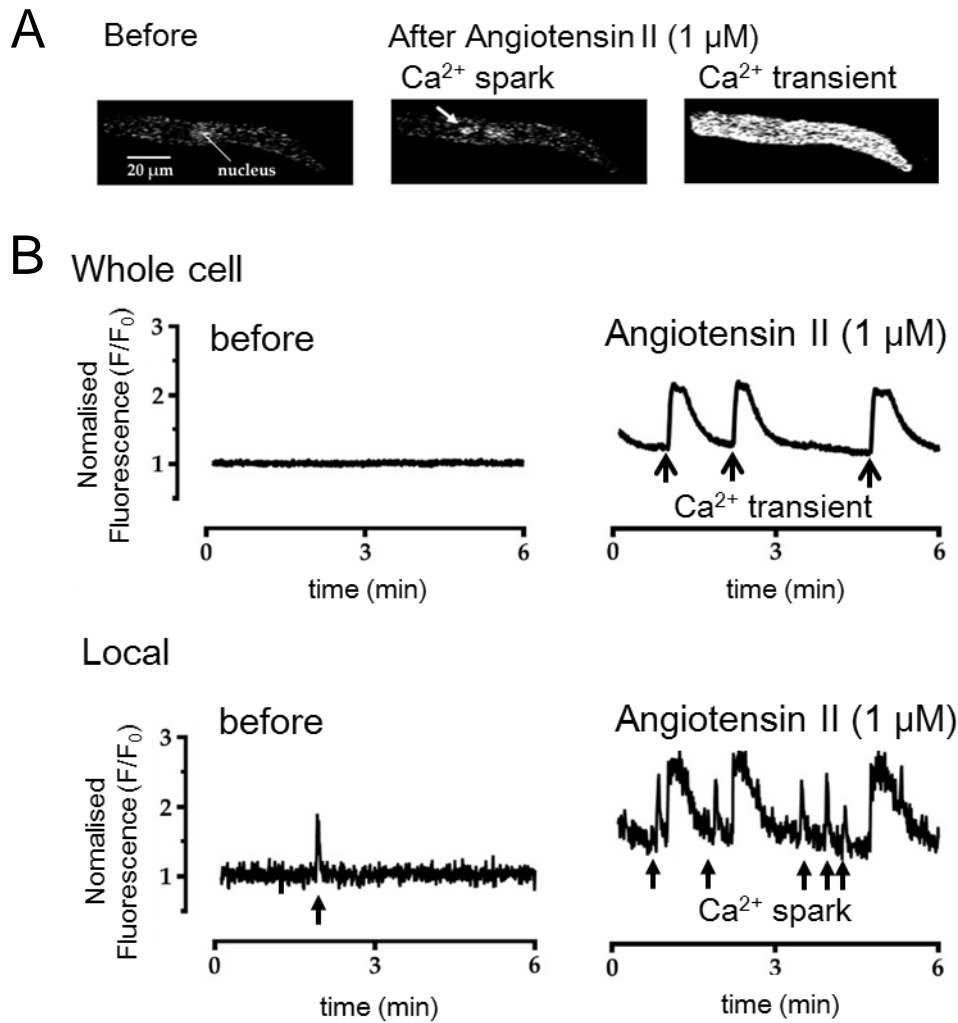


Fig 4-9 Angiotensin II が肺静脈心筋細胞の Ca²⁺動態に与える影響

- (A) Angiotensin II 1 μ M 投与前 (before) と投与後 (after angiotensin II) に誘発された Ca²⁺ spark、Ca²⁺ transient の蛍光画像
- (B) Angiotensin II 投与前後の細胞全体 (whole cell)、細胞内局所 (local : A の Ca²⁺ spark の蛍光画像に矢印で示した局所直径 1 μ m の円内) における Ca²⁺ 蛍光強度の経時変化

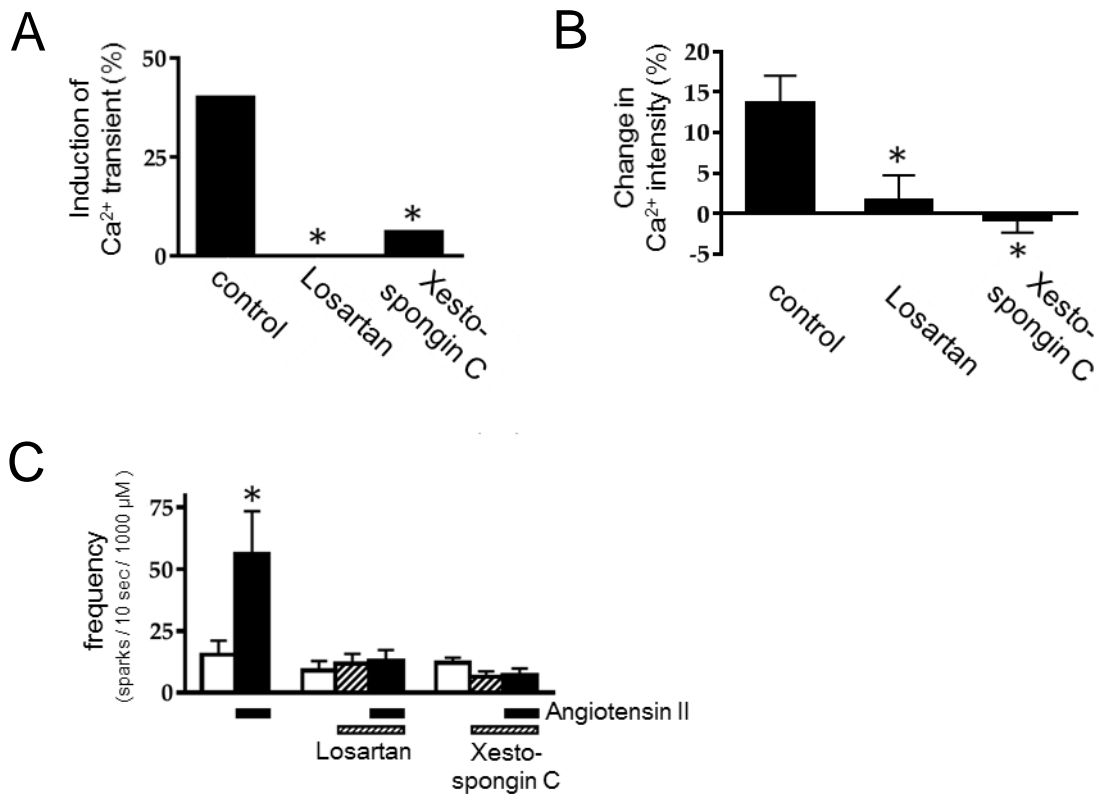


Fig 4-10 受容体遮断薬 angiotensin II の作用に与える影響

(A) 受容体遮断薬存在下 (losartan 10 μM、xestospongine C 3 μM) 及び非存在下 (control) で angiotensin II 1 μM を投与した場合の自発的 Ca²⁺ transient の誘発率 (n = 14-17)

*p < 0.05 vs control by Fischer's exact test

(B) 受容体遮断薬存在下 (losartan 10 μM、xestospongine C 3 μM) 及び非存在下 (control) で angiotensin II 1 μM を投与した場合の basal Ca²⁺ intensity の変化率 (n = 14-17)

*p < 0.05 vs control by dunnett's test for multiple comparison

(C) 受容体遮断薬 (losartan 10 μM、xestospongine C 3 μM)、angiotensin II 1 μM 投与による Ca²⁺ spark の発火頻度変化 (n = 6)

Open column : before

hatched column : 受容体遮断薬 投与後

closed column : angiotensin II 投与後

*p < 0.05 vs control by dunnett's test for multiple comparison

第3節 考察

肺静脈心筋細胞の性質

モルモット肺静脈心筋細胞の形態学的特徴、及び細胞内 Ca^{2+} 動態の特徴を心室筋、心房筋と比較した。モルモット肺静脈心筋細胞は、多くの場合 spindle-shape (紡錘状) であり、心房筋細胞、心室筋細胞と同様に、心筋細胞質全体に筋小胞体が存在していた (Fig 4-1)。肺静脈心筋細胞は、心房筋細胞に比べて長軸方向にわずかに長い傾向にあったが、短軸方向の長さに違いはなかった (Table 4-1)。モルモット肺静脈心筋細胞の細胞構造は、ウサギ (Chen et al., 2002) やイヌ (Chen et al., 2001) で報告されているものと似通っていた。T管構造は、モルモット心室筋においては観察されたものの、心房筋細胞、肺静脈心筋細胞では観察されなかった (Fig 4-1)。大部分の哺乳動物種由来の心室筋細胞は十分に発達したT管を持つが、心房筋・肺静脈心筋におけるT管の有無は動物種によって異なっている。一般に、ヒトを含む大型の哺乳動物種由来の心房筋細胞は、T管が豊富に存在する (Richards MA et al., 2011)。ラットでは、肺静脈心筋細胞の一部がT管を持つことが報告されている (Pasqualin C et al., 2018)。

心筋細胞では、 Ca^{2+} transient、 Ca^{2+} spark、 Ca^{2+} wave の3種類の Ca^{2+} 動態変化が観察される。 Ca^{2+} transient は、心筋細胞全体での一過性の Ca^{2+} 上昇であり、活動電位の発生に伴う心筋収縮を反映したものである。これに対して、 Ca^{2+} spark、 Ca^{2+} wave は活動電位を伴わない Ca^{2+} 動態変化である。 Ca^{2+} spark は心筋細胞質の微小領域での Ca^{2+} 上昇であり、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出の基本単位である (Tanaka H et al., 1997, 田中光、総説 2005)。 Ca^{2+} wave は、局所的な Ca^{2+} 上昇が心筋細胞質内を伝播する現象であり、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出がCICRによって連鎖的に発生することに起因する。

モルモット心室筋、心房筋、肺静脈心筋を外部電極によって電気刺激すると、 Ca^{2+} transient が発生した (Fig 4-2, 3, 4)。心室筋細胞では Ca^{2+} transient の発生に伴って、心筋細胞全体で同時に Ca^{2+} 上昇が観察された (Fig 4-2)。これは、ウサギ (Cordeiro JM et al., 2001) やラット (Berlin JA, 1995) の心室筋の Ca^{2+} transient でも同様であることが報告されている。心室筋細胞とは対称的に、心房筋細胞では Ca^{2+} transient の発生に伴う Ca^{2+} 上昇が心筋細胞膜直下から始まり、細胞中心部へと伝播した (Fig 4-3)。このような、心室筋と心房筋における Ca^{2+} transient 発生パターンの時間的、空間的な違いはT管の有無に由来すると考えられる (Brette F and Orchard C, 2003)。実際に、T管が存在する心筋細胞 (ほとんどの哺乳動物の心室筋) では Ca^{2+} transient の発生に伴って細胞質全体で同時に Ca^{2+} 濃度が上昇する (Tanaka H et al., 1998; 2001; Cordeiro JM et al., 2001)。一方で、T管を有さない心房筋細胞では、 Ca^{2+} transient 発生に伴う Ca^{2+} 濃度上昇が細胞膜直下から始まり、wave 状に細胞中心部へと伝播することが報告されている (Berlin et al., 1995; Hüser J et al., 1996; Kockskämper J et al., 2001; Tanaka H et al., 2001)。T管は細胞膜が細胞内に細く陥入した構造で、細胞膜での活動電位発生を素早く細胞内に伝える役割を果たしている。モルモット心室筋細胞では、T管が存在す

ることによって、心筋細胞膜と筋小胞体が近接しているため、 Ca^{2+} transient に伴って細胞全体で同時に Ca^{2+} 上昇が発生したと考えられる。心室筋細胞とは対称的に、心房筋細胞は T 管を欠いている。そのため、心筋細胞膜直下と細胞中心部では、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出を活性化するメカニズムが異なっていると考えられた。ラット心房筋細胞を電子顕微鏡で観察すると、心筋細胞膜と細胞膜直下の筋小胞体が位置的に共役している (Leeson TS, 1980; Yamasaki Y et al., 1997)。また、ウサギの心房筋細胞では、心筋細胞膜上の L 型 Ca^{2+} チャネルと筋小胞体膜上の Ca^{2+} 放出チャネルである ryanodine 受容体が共局在している (Carl SL et al., 1995)。従って、心筋細胞膜直下では、膜からの Ca^{2+} 流入によって ryanodine 受容体からの Ca^{2+} 放出が活性化されると考えられる。一方で、心房筋細胞の中心部では、ryanodine 受容体は Ca^{2+} チャネルと離れて存在しているため (Carl SL et al., 1995; Hatem SN et al., 1997)、CICR の連鎖によって Ca^{2+} 増加が wave 状に伝播していくと考えられた。肺静脈心筋細胞の Ca^{2+} transient は、膜直下から Ca^{2+} 上昇が始まり、細胞中心部に向かって wave 状に伝播する、心房筋細胞と似たパターンであった (Fig 4-4)。

モルモット肺静脈心筋細胞は、外部から電気刺激を行わない場合でも、約 3 割で自発的な Ca^{2+} transient の発生が観察された (Fig 4-5)。心房筋細胞でもこのような自発的な Ca^{2+} transient が観察される場合があるが、稀であった (恒岡弥生博士論文)。この結果は、肺静脈心筋細胞が、自ら活動電位を発生する仕組みを持っていることを示している。モルモット肺静脈心筋の自発活動は、 Ca^{2+} キレート剤の BAPTA AM (Irie et al., 2017) や、ryanodine (Namekata I et al., 2009) の投与によって抑制される。また、モルモット以外の動物種でも、細胞内 Ca^{2+} の肺静脈心筋の自発活動への関与が報告されている (ウサギ: Honjo et al., 2003; ラット: Okamoto et al., 2012)。モルモット肺静脈組織に対する ouabain の投与 (Namekata et al., 2009) や、高頻度の電気刺激 (Takahara et al., 2011) によって細胞内 Ca^{2+} を増加させると、自発活動が誘発される。これらの報告は、肺静脈心筋自発活動が細胞内 Ca^{2+} に依存していることを示している。自発的な Ca^{2+} transient は、電気刺激誘発性の Ca^{2+} transient に比べ amplitude が大きい傾向にあった (Table 4-2)。これは、それぞれの Ca^{2+} transient の Ca^{2+} ハンドリングに違いがある可能性を示唆している。肺静脈心筋細胞は T 管を欠いていたが、心房筋や心室筋と同じように、細胞全体に筋小胞体が存在していた (Fig 4-1)。この結果は、肺静脈心筋における Ca^{2+} transient も、心房筋細胞のように CICR の連鎖によって生じていることを示唆している。肺静脈心筋細胞における Ca^{2+} transient の wave 状伝播の速度が、肺静脈心筋細胞で発生していた Ca^{2+} wave (Fig 4-7) と変わらなかったこともこの仮説を支持している。肺静脈心筋での Ca^{2+} wave の伝播速度は約 $100 \mu\text{m/s}$ であったが、これは同じ実験条件下の心房筋細胞、心室筋細胞における Ca^{2+} wave の伝播速度と大差なかった (Tanaka H et al., 2001; Namekata I et al., 2004)。つまり、心房筋細胞、心室筋細胞、肺静脈心筋細胞のいずれも、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出メカニズムに大きな違いはないと考えられた。また、モルモット肺静脈心筋細胞における Ca^{2+} spark 動態は膜直下と心筋細胞中心部で変わらず (Fig 4-6, Table 4-3)、心房筋細胞、心室筋細胞のものと似通っていた (Tanaka H et al., 1997; 1998)。これらの結

果は、心筋細胞における Ca^{2+} transient の Ca^{2+} 上昇パターン (心室型・心房型) が、 Ca^{2+} 放出を行う筋小胞体自体の違いではなく、T 管の有無によって決まっている、ということを示している。

Ca^{2+} spark と Ca^{2+} transient の関係性に関する検討では、自発的な Ca^{2+} transient の発生前に、 Ca^{2+} spark の発火頻度の著明な増加が見られることが明らかとなった (Fig 4-8)。また、本検討のように、経時変化による解析ではないものの、自発的 Ca^{2+} transient が発生しているウサギの肺静脈心筋細胞で、自発的 Ca^{2+} transient が発生していない肺静脈心筋細胞よりも Ca^{2+} spark の発生頻度が高いことが報告されている (Chang SH et al., 2008)。 Ca^{2+} spark の増加と Ca^{2+} transient の発生に相関性があると考えられることから、 Ca^{2+} spark の発生が Ca^{2+} transient の発生に発展していることが示唆される。つまり、 Ca^{2+} spark の増加が心筋細胞内で Ca^{2+} を増加させ、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出を促し、CICR によって筋小胞体からの Ca^{2+} 放出をさらに増加させる...という正のフィードバックが起これ、 Ca^{2+} spark の発火頻度が徐々に増加したと考えられる。本結果より、細胞内で増えた Ca^{2+} は何らかの方法で細胞膜電位の脱分極を引き起こし、それが閾値に達することで、 Ca^{2+} transient (活動電位) が誘発されたのではないかと推察した。

心房筋でも、肺静脈心筋細胞に似た Ca^{2+} spark が生じるものの、自発的 Ca^{2+} transient が発生することは稀であった (恒岡弥生博士論文)。また、本検討では、肺静脈心筋細胞の Ca^{2+} spark 動態に心房筋との違いは観察されていない。つまり、心房筋細胞に比べて肺静脈心筋細胞で自発的 Ca^{2+} transient が発生しやすい原因は、筋小胞体機能の違いではなく、膜電流成分の違いに起因すると考えられた。第 1 章でも述べたように、肺静脈心筋は静止膜電位の安定性が低く、緩徐脱分極が観察される。本章の結果から、 Ca^{2+} spark によって肺静脈心筋細胞内に増えた Ca^{2+} が、細胞内 Ca^{2+} 依存性の機構によって脱分極電流成分に変換され、緩徐脱分極が形成されているのではないかと考えた。細胞内 Ca^{2+} が脱分極電流に変換されるメカニズムに関しては、第 5 章で検討を行った。

Angiotensin II が肺静脈心筋細胞 Ca²⁺動態に与える影響とそのメカニズム

自発的な Ca²⁺ transient が発生していない肺静脈心筋細胞に、angiotensin II を投与すると、Ca²⁺ spark の発火頻度の増加及び Ca²⁺ transient の誘発が観察された (Fig 4-9, 10 AB)。また、心筋細胞内全体での Ca²⁺ 蛍光強度は増加していた (Fig 4-10 C)。これらの作用は losartan の存在下で抑制された (Fig 4-10)。これらの結果から、angiotensin II は肺静脈心筋細胞の AT₁ 受容体に直接作用して、自発活動を誘発することが判明した。Angiotensin II 投与による Ca²⁺ spark の発火頻度の増加は、ヒト心房筋細胞でも観察されているが (Gassanov N et al., 2005)、今回の結果では、angiotensin II の投与が Ca²⁺ spark の発火頻度を増加させるだけでなく、細胞内 Ca²⁺ の増加と自発的 Ca²⁺ transient を誘発することも明らかとなった。つまり、angiotensin II が Ca²⁺ spark を促進することにより、細胞内 Ca²⁺ を増加させ、Ca²⁺ 依存性の脱分極電流を活性化したと考えられた。

次に、angiotensin II がどのように Ca²⁺ spark を誘発したかについて検討した。筋小胞体から Ca²⁺ 放出するチャンネルとして、ryanodine 受容体と IP₃ 受容体が知られている。IP₃ 受容体は様々な組織の小胞体に存在し、Ca²⁺ 放出を制御することで生体機能を制御している (Mikoshiha K, 2015)。IP₃ 受容体は心筋にも存在しており、心臓機能の調節にも関与する (Garcia MI and Boehning D, 2017)。Angiotensin II は、ニワトリ胚の心筋細胞において、IP₃ の産生を促進することが報告されている (Goutsouliak V and Rabkin SW, 1998)。また、IP₃ 受容体を心臓に過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、angiotensin II によって心肥大が生じるが、IP₃ の活性を抑制する IP₃ スポンジを導入したトランスジェニックマウスではこの作用が抑制される (Nakayama H et al., 2010)。これらの報告から、angiotensin II の作用に IP₃ 受容体の活性化が関与する可能性があると考えた。そこで、IP₃ 受容体の選択的遮断薬である xestospongine C 存在下で angiotensin II を投与する検討を行った。Xestospongine C は、海綿より単離された膜透過性で選択性の高い IP₃ 受容体遮断薬である (Miyamoto S et al., 2000)。Xestospongine C 存在下で angiotensin II を投与すると、Ca²⁺ spark の促進、細胞内 Ca²⁺ の増加、Ca²⁺ transient の誘発がほぼ完全に抑制された (Fig 4-10)。この結果から、肺静脈心筋細胞における angiotensin II の作用が、IP₃ 受容体の活性化に起因することが明らかとなった。IP₃ 受容体が自動能を持つ心筋細胞における Ca²⁺ spark、自発的 Ca²⁺ transient の発生に関与することは、マウス洞房結節のペースメーカー細胞 (Kapoor N et al., 2015)、ラット肺静脈心筋細胞 (Logantha SJ et al., 2010) でも報告されている。本研究の結果及びこれらの検討は、IP₃ 受容体が心筋自動能において重要な役割を果たしていることを示唆している。心筋細胞に豊富に存在している ryanodine 受容体の心筋自動能に対する関与については、次章で検討を行った。

また、本研究では検討を行わなかったが、angiotensin II による Ca²⁺ transient の誘発には、筋小胞体からの Ca²⁺ 放出の促進だけでなく、心筋細胞膜からの Ca²⁺ 流入の促進が関与している可能性もある。マウス心筋細胞では、angiotensin II が L 型 Ca²⁺ channel の活性化を引き起こすことが報告されている (Kashihara T et al., 2017)。また、angiotensin II をモルモット

肺静脈組織に投与した場合、陽性変力作用が観察されるが、この作用は L 型 Ca^{2+} チャネルの遮断薬 nifedipine の投与で抑制された (清水幸恵卒業論文)。このように、angiotensin II の作用における Ca^{2+} チャネルの関与は多く報告されており、肺静脈心筋自動能にどの程度寄与しているかは、今後の検討課題の一つである。

第 4 節 結論

肺静脈心筋細胞では、細胞内の Ca^{2+} spark の増加が自発的 Ca^{2+} transient の発生に繋がる。

肺静脈心筋細胞には、T 管が存在せず、 Ca^{2+} transient 発生初期における Ca^{2+} 上昇パターン、 Ca^{2+} spark の性質は心房筋と似通っていた。一方で、肺静脈心筋細胞では自発的な Ca^{2+} transient が発生しやすい傾向にあった。このような違いは、肺静脈心筋細胞の膜電位が心房筋細胞に比べて不安定であり、 Ca^{2+} 依存性の脱分極電流成分が活性化しやすいことに起因すると考えた。

Angiotensin II による自発活動の誘発には筋小胞体の IP_3 受容体からの Ca^{2+} 放出が関与する。

Angiotensin II は IP_3 受容体からの Ca^{2+} 放出を促進することにより、肺静脈心筋細胞における、自発活動が誘発されやすい性質をより顕著なものにすると考えられる。次章では、angiotensin II による IP_3 受容体の活性化が、どのように緩徐脱分極に影響を与え、自発活動を誘発しているのかについて検討した。

第 5 章 Angiotensin II による自発活動誘発機序の探索

前章にて、angiotensin II が肺静脈心筋細胞に直接作用し、筋小胞体の IP₃ 受容体の活性化及び細胞内 Ca²⁺の増加を介して Ca²⁺ transient を誘発することが明らかとなった。そこで、本章では、活動電位測定を用いて、活動電位間の緩徐脱分極の勾配形成に angiotensin II が与える影響、及びその電気生理学的メカニズムに注目し、細胞内 Ca²⁺が緩徐脱分極の形成に繋がる機序を検討した。

第 1 節 Angiotensin II による自発活動誘発、緩徐脱分極の形成に関する検討

5-1-1 Angiotensin II による自発活動誘発・促進

活動電位測定法を用いて肺静脈心筋の膜電位を観察した。自発活動が発生していなかった肺静脈標本に対して angiotensin II 1 μM を処置したところ、約 6 割 (7/12) で自発的な活動電位が観察された (Fig 5-1 Aa, B)。自発活動誘発前後の静止電位領域に着目すると、自発活動の発生直前には静止電位の揺れ (oscillation) が観察され、自発活動の誘発後は緩徐脱分極が形成されていた (Fig 5-1 Ab)。xestospongine C 0.1, 0.3, 3 μM、SEA0400 0.1, 0.3, 1 μM 存在下でそれぞれ angiotensin II 1 μM を投与したところ、angiotensin II による自発活動の誘発は濃度依存的に抑制された (Fig 5-1 B)。2-APB (2 μM) の存在下で angiotensin II (1 μM) を投与すると、統計的有意ではないものの、自発活動誘発が抑制される傾向が見られた (Fig 5-1 B)。Nickel (2 mM)、ryanodine (0.1 μM) それぞれの存在下で angiotensin II (1 μM) を投与すると、自発活動の誘発は有意に抑制された (Fig 5-1 B)。

約 3 割 (40/131) の標本では自発活動が観察された。自発活動の活動電位間には緩徐脱分極が観察された (Fig 5-2 A before)。自発活動が発生していた肺静脈標本に対し angiotensin II (1 μM) を投与すると、自発活動の緩徐脱分極の傾き増加、発火頻度の増加がみられた (Fig 5-2)。

5-1-2 Angiotensin II が緩徐脱分極に与える影響

外部誘導電極より 1Hz で電気刺激を与え、1 秒間隔で活動電位を惹起したところ、自発活動が発生していた標本における活動電位と同様に、緩徐脱分極が観察された (Fig 5-3 A)。緩徐脱分極の傾きは、angiotensin II の投与によって増加した (Fig 5-3 Ba, C)。Losartan 10 μM、xestospongine C 3 μM、SEA0400 1 μM、ryanodine 0.1 μM の存在下で angiotensin II を投与すると、緩徐脱分極の傾きの増加は抑制された (Fig 5-3 B b-e, C)。

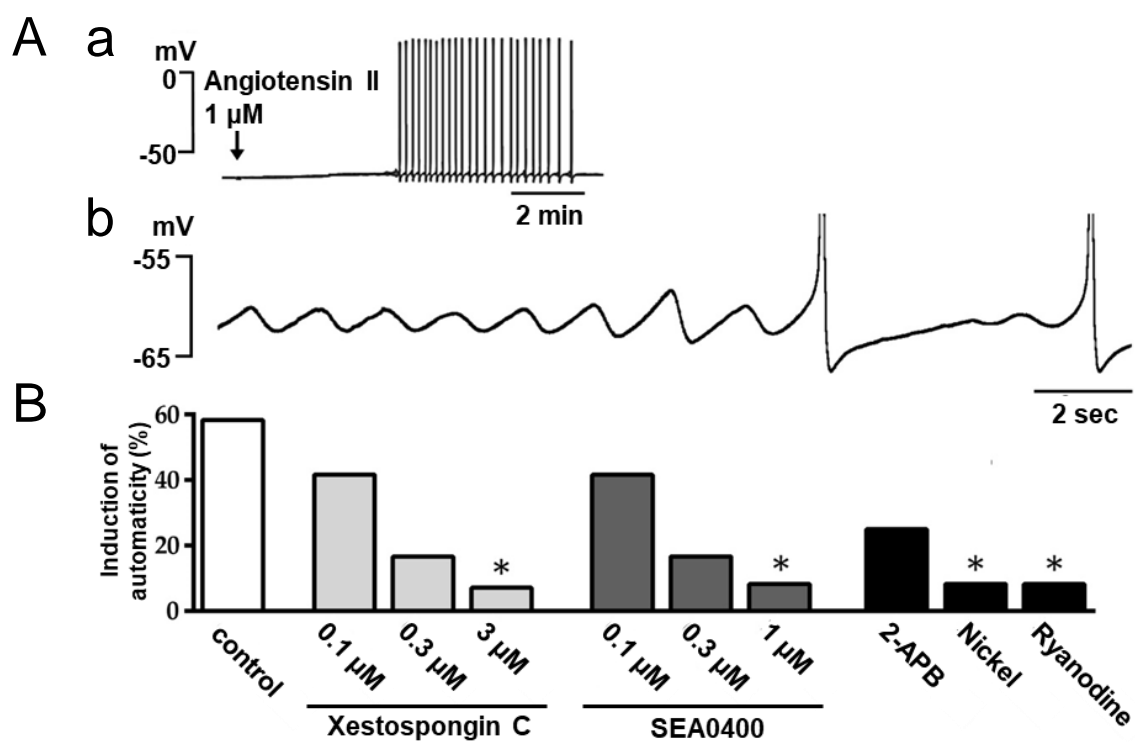


Fig 5-1 Angiotensin II による自発活動の誘発

(A) Angiotensin II 投与前後の膜電位トレース(a) と静止電位付近の拡大 (b)

(B) Angiotensin II 1 μ M 単独投与 (control) と、xestospongine C 0.1-3 μ M、SEA0400 0.1-1 μ M、2-APB 2 μ M、nickel 2 mM、ryanodine 0.1 μ M 存在下で angiotensin II 1 μ M を投与した場合の自発活動誘発率の比較 (n = 12-14)

*p < 0.05 vs control by fischer's exact test

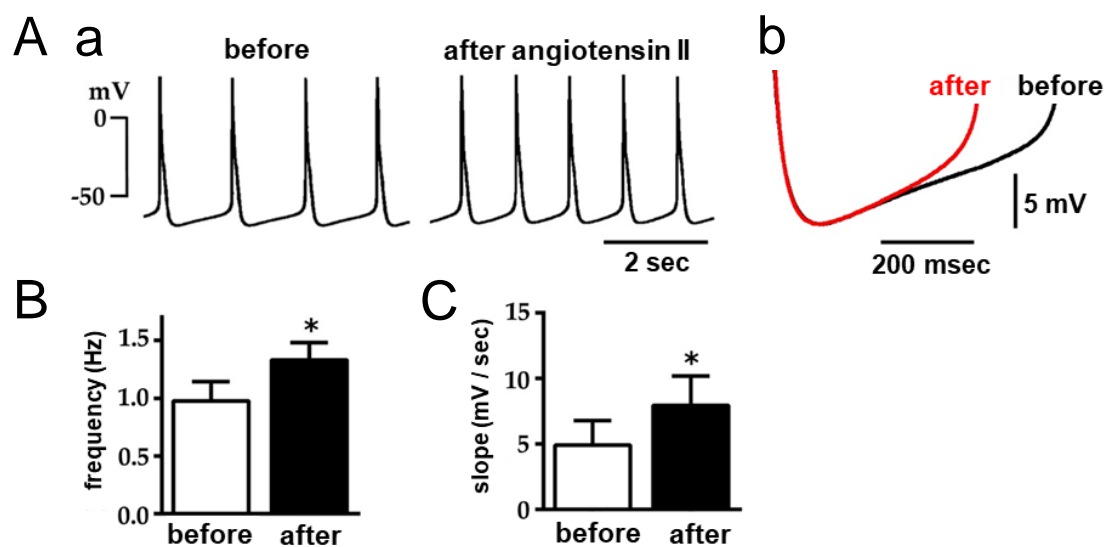


Fig 5-2 自発活動が発生している標本への **angiotensin II** の投与

(A) Angiotensin II 1 μ M 投与前後の膜電位トレース (a) と、緩徐脱分極の拡大 (b)

(B) Angiotensin II 1 μ M 投与前後の自発活動発火頻度 (frequency)

(C) Angiotensin II 1 μ M 投与前後の緩徐脱分極の傾き (slope)

* $p < 0.05$ vs control by paired t -test

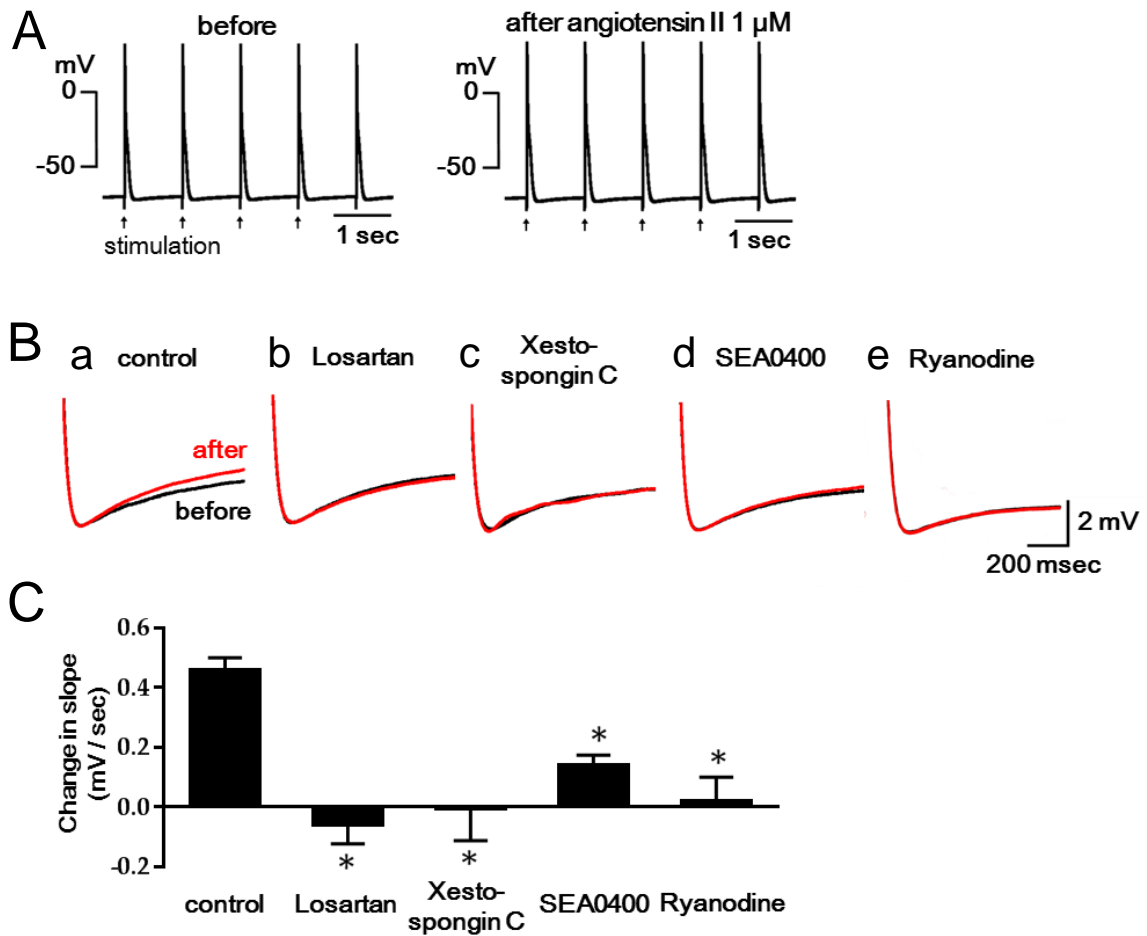


Fig 5-3 Angiotensin II が電気刺激誘発性活動電位の緩徐脱分極に与える影響

- (A) 1Hz 電気刺激によって惹起された活動電位波形のトレース
- (B) Angiotensin II 1 μ M 単独 (control: a)、losartan 10 μ M (b)、xestospongin C 3 μ M (c)、SEA0400 1 μ M (d)、ryanodine 0.1 1 μ M (e) 存在下で angiotensin II を投与した場合の緩徐脱分極のトレース
- (C) Angiotensin II 1 μ M 単独、losartan 10 μ M、xestospongin C 3 μ M、SEA0400 1 μ M、ryanodine 0.1 1 μ M 存在下で angiotensin II を投与した場合の緩徐脱分極の傾き (slope) の実数値変化 (n = 6-7)
p < 0.05 vs control by Dunnett's test

	Angiotensin II 誘発性自発活動 (n=7)	自発活動 (n=6)		1Hz 電気刺激誘発性 活動電位 (n=6)	
		Before	After	Before	After
Frequency (Hz)	0.51 ± 0.14	0.98 ± 0.02	1.33 ± 0.11*	-	-
MDP (mV)	- 71.0 ± 1.0	-70.4 ± 2.4	-71.5 ± 2.0	-75.6 ± 1.5	-74.7 ± 1.2
Slope (mV/sec)	2.70 ± 0.40	4.90 ± 1.79	7.94 ± 2.12*	2.66 ± 0.37	3.12 ± 0.38*
(dV/dt) _{max} (V/sec)	99.3 ± 24.5	116.2 ± 18.2	122.6 ± 16.5	150.7 ± 7.8	148.3 ± 7.8
Amplitude (mV)	92.5 ± 2.5	97.3 ± 3.3	100.7 ± 3.1*	106.7 ± 1.1	107.5 ± 1.4
APD ₉₀ (msec)	84.2 ± 2.6	82.3 ± 3.8	85.2 ± 3.3	84.6 ± 2.7	90.7 ± 2.3*

Table 5-1 Angiotensin II による活動電位変化

Angiotensin II 1 μM 誘発性自発活動の活動電位パラメータ (左)

自発活動が発生している標本において angiotensin II 1 μM を投与した前後の活動電位パラメータ (中央)

1Hz 電気刺激下で惹起された活動電位のパラメータに angiotensin II 1 μM が与える影響 (右)

第2節 内因性 angiotensin II の肺静脈心筋自動能への関与

5-2-1 自発活動が発生している肺静脈標本への losartan、captopril の投与

自発活動が発生している肺静脈標本に losartan 10 μ M、captopril 10 μ M (ACE 阻害薬) を投与すると、自発活動の緩徐脱分極の抑制、自発活動の発火頻度の低下が観察された (Fig 5-4)。

5-2-2 自発活動が発生していない肺静脈標本への angiotensin I の投与 (収縮力測定)

自発活動が発生していない肺静脈標本に、angiotensin I 1 μ M を単独投与した。Angiotensin I を処置すると、一定確率で自発活動の誘発が観察された (Fig 5-5A)。誘発された自発活動は一過性であり、全例で 10 min 以内に停止した。

続いて、自発活動が発生していない肺静脈標本に対し、losartan 10 μ M、captopril 1 μ M、chymostatin 10 μ M (chymase 阻害薬) 存在下で、angiotensin I を投与し、自発活動誘発性の変化を観察した (Fig 5-5 B-D, Table 5-2)。Losartan、captopril の存在下では angiotensin I の自発活動誘発作用は抑制された。一方で、chymostatin の存在下では angiotensin I の自発活動誘発作用は抑制されなかった。また、chymostatin の存在下で発生した angiotensin I 誘発性自発活動は一過性であり、自発活動が誘発されるまでの時間、自発活動の持続時間、最大発火頻度は angiotensin I 単独投与の場合と比較して大きく変化していなかった (Table 5-2)。

5-2-3 自発活動が発生している肺静脈標本への SEA0400、xestospongine C の投与

自発活動が発生している肺静脈標本に SEA0400 1 μ M、xestospongine C 3 μ M をそれぞれ投与すると、自発活動の緩徐脱分極の抑制、自発活動の発火頻度の低下が観察された (Fig 5-6)。

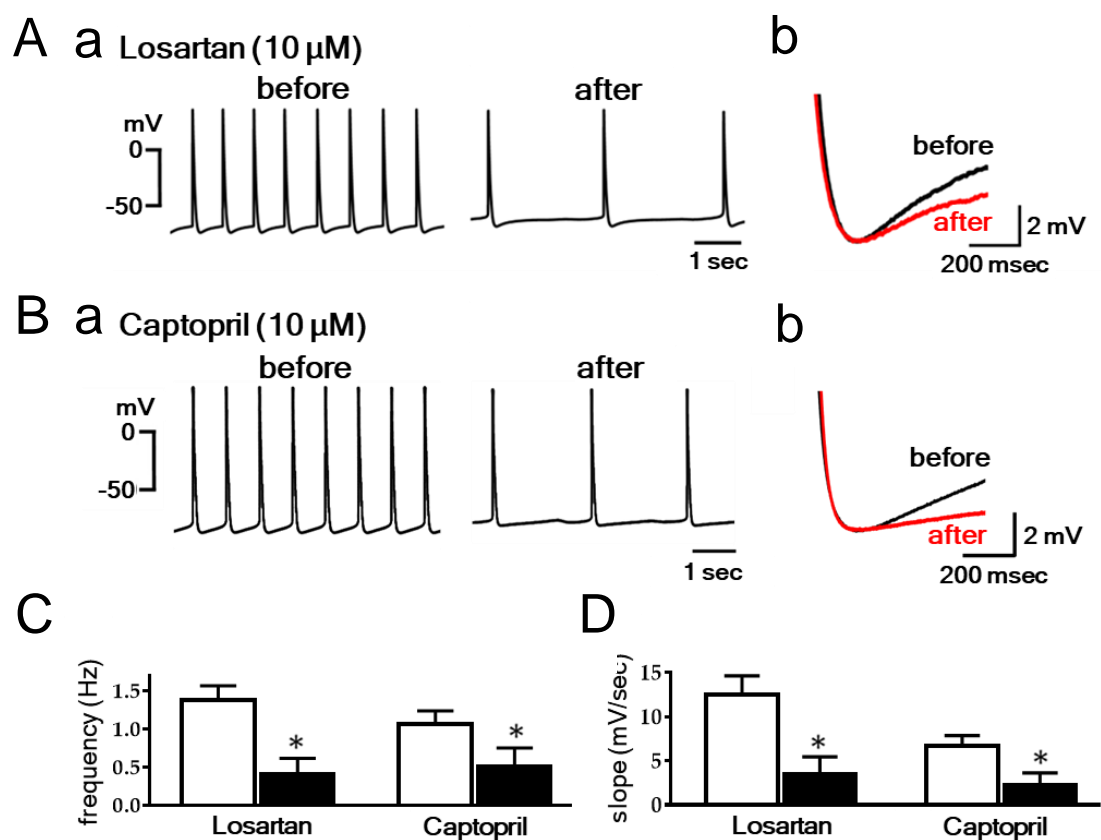


Fig 5-4 Losartan 及び captoprol が肺静脈心筋自発活動に与える影響

(A) Losartan 10 μ M 投与前後の膜電位トレース (a) と、緩徐脱分極の拡大 (b)

(B) Captopril 10 μ M 投与前後の膜電位トレース (a) と、緩徐脱分極の拡大 (b)

(C) Losartan 10 μ M、captopril 10 μ M 投与前後の自発活動発火頻度 (frequency)

(D) Losartan 10 μ M、captopril 10 μ M 投与前後の緩徐脱分極の傾き (slope)

* $p < 0.05$ vs control by paired t -test

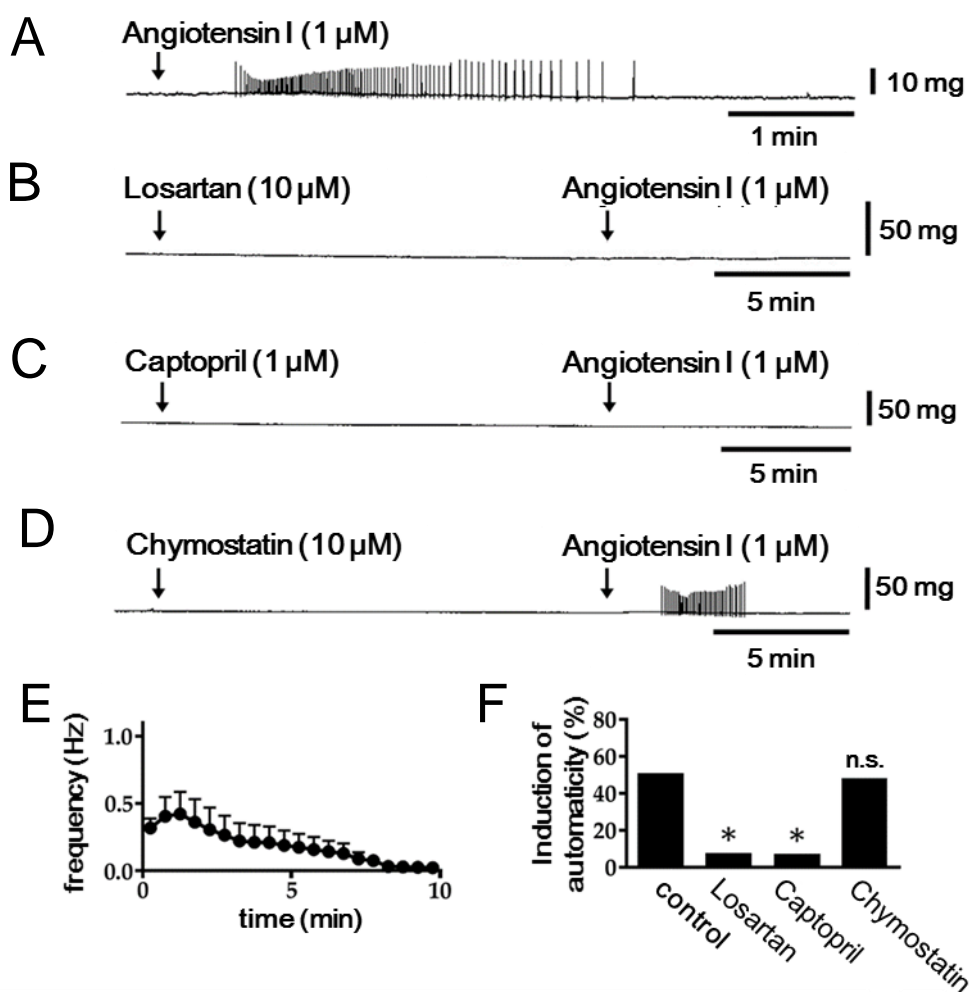


Fig 5-5 受容体遮断薬が angiotensin II の作用に与える影響

(A) Angiotensin I を投与した場合の収縮力トレース

(B) Losartan 存在下で angiotensin I を投与した場合の収縮力トレース

(C) Captopril 存在下で angiotensin I を投与した場合の収縮力トレース

(D) Chymostatin 存在下で angiotensin I を投与した場合の収縮力トレース

(E) Angiotensin I 1μM (n = 11) で誘発された自発活動の発火頻度の経時変化
(0 min は自発活動が最初に発火した瞬間)

(F) Losartan、captopril、chymostatin 存在下及び非存在下 (control) で angiotensin I を投与した場合の自発活動の誘発率 (%)

*p < 0.05 vs control by Fischer's exact test.

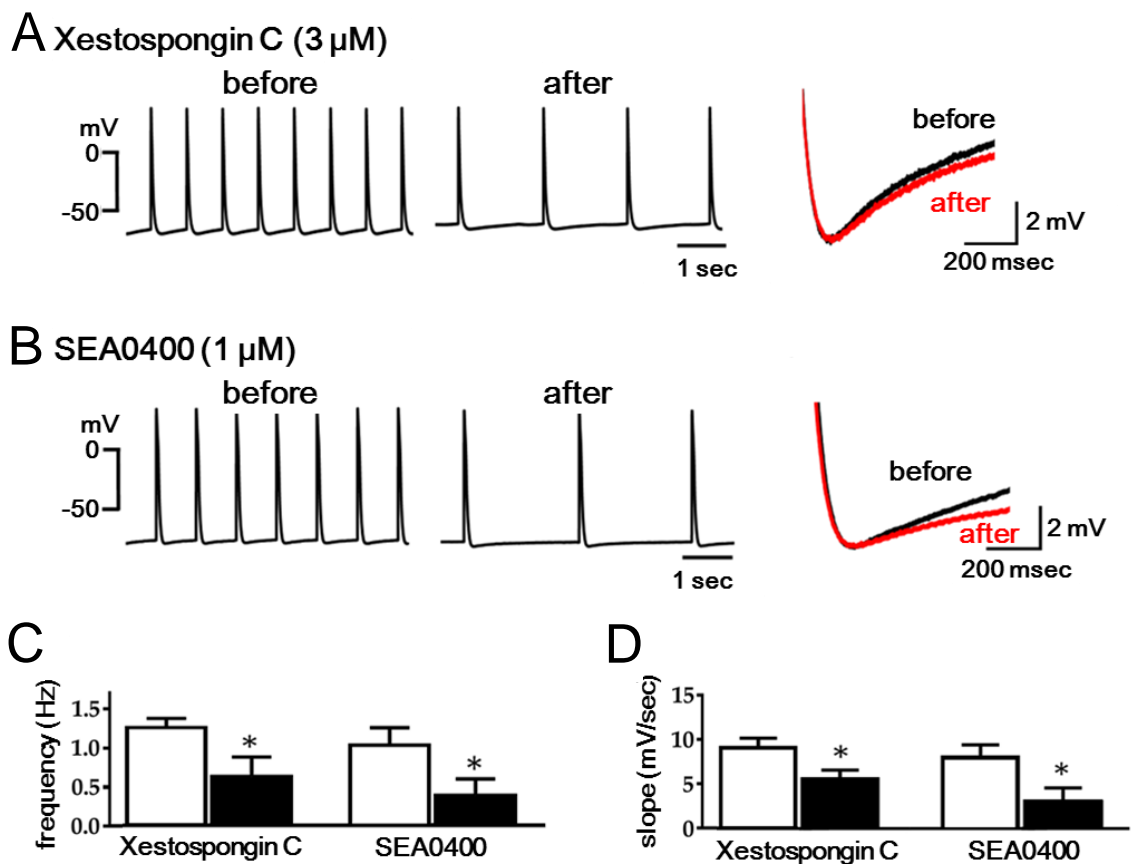


Fig 5-6 Xestospongin C 及び SEA0400 が肺静脈心筋自発活動に与える影響

(A) Xestospongin C 3 μ M 投与前後の膜電位トレース (a) と緩徐脱分極の拡大 (b)

(B) SEA0400 1 μ M 投与前後の膜電位トレース (a) と緩徐脱分極の拡大 (b)

(C) Xestospongin C 3 μ M、SEA0400 1 μ M 投与前後の自発活動発火頻度 (frequency)

(D) Xestospongin C 3 μ M、SEA0400 1 μ M 投与前後の緩徐脱分極の傾き (slope)

* $p < 0.05$ vs control by paired t -test

	自発活動 誘発率 (%)	誘発された自発活動のパラメータ			n
		Latency (sec)	Duration (min)	Maximum Frequency (Hz)	
Angiotensin I	10/20 (50.0%)	47.8 ± 9.2	9.2 ± 3.1	0.4 ± 0.2	10
Losartan + Angiotensin I	1/15 (6.7%)	7.6	6.1	1.3	1
Captopril + Angiotensin I	1/16 (6.3%)	79.6	2.7	0.3	1
Chymostatin + Angiotensin I	9/19 (47.4%)	62.2 ± 16.1	2.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	9

Table 5-2 Angiotensin I 誘発性自発活動のパラメータ

Angiotensin I 1 μM を単発投与した場合と、losartan 10 μM、captopril 1 μM、chymostatin 10 μM それぞれの存在下で angiotensin I 1 μM を投与した場合の latency (自発活動誘発までの時間)、duration (自発活動の持続時間)、frequency (自発活動の最大発生頻度)

第3節 考察

Angiotensin II による自発活動誘発機序の検討

肺静脈心筋の膜電位測定下では約3割で自発活動が発生していた。これは、第3章の収縮力測定での自発活動の発生率、第4章における肺静脈心筋細胞での自発的 Ca^{2+} transient の発生率と一致する結果となった。自発活動が発生している肺静脈標本においては、自発活動の活動電位間に緩徐脱分極が観察された (Fig 5-2 B before)。第1章でも述べたように、緩徐脱分極は自発活動の歩調取りとして働き、その勾配は、自動能の大きさを計る尺度となり得る。そこで、自発活動が発生していない標本、自発活動が発生している標本の両方で、静止電位領域における緩徐脱分極に注目した検討を行った。

自発活動が発生していない肺静脈標本に、angiotensin II を投与すると、一定確率で一過性の活動電位の誘発が観察された (Fig 5-1 Aa)。また、自発活動の発火に先行して静止電位の oscillation が観察された (Fig 5-1 Ab 前半)。活動電位の発生後は活動電位間に緩徐脱分極の形成が認められた (Fig 5-1 Ab 後半)。 Ca^{2+} oscillation は Na^+/K^+ ATPase の阻害薬である ouabain の投与で自発活動を誘発した場合でも、自発活動に先行して発生する (Namekata I et al., 2009)。肺静脈心筋細胞への ouabain の投与は、肺静脈心筋細胞内の Ca^{2+} を顕著に増加させ、 Ca^{2+} transient を誘発することから、angiotensin II の投与時も、細胞内 Ca^{2+} の増加が膜電位の oscillation に繋がっていると考えられる。肺静脈心筋細胞に angiotensin II を投与すると、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出の促進および心筋細胞内の Ca^{2+} の増加が起こり、それに続いて自発的 Ca^{2+} transient の誘発が観察された (第4章)。この結果から、angiotensin II の投与は肺静脈心筋細胞内 Ca^{2+} の増加を介して脱分極性の電流成分を活性化し、緩徐脱分極の勾配を増加させ、膜電位が閾値に達すると自発活動が発生すると考えられた。

自発活動が発生している肺静脈標本に対して angiotensin II を投与すると、緩徐脱分極の勾配の傾きの増加と、自発活動の発火頻度増加の両者が観察されたが、それ以外の活動電位パラメータ (MDP 、 $(dV/dt)_{\text{max}}$ 、 APD_{90}) は大きく変化させなかった (Fig 5-2, Table 5-1)。この結果より、angiotensin II が肺静脈心筋自動能を亢進し、自発活動の発火頻度を増大させることが示された。しかし、この結果だけでは、緩徐脱分極の傾きの増加が発火頻度の増加に繋がっているかどうかは明らかでない。発火頻度の増加によって緩徐脱分極の傾きの増加が引き起こされている可能性も考えられるからである。そこで、外部電極からの電気刺激によって定頻度 (1 Hz) で惹起した活動電位を用いた検討を行った。電気刺激で惹起した活動電位間にも、緩徐脱分極が観察される (Fig 5-3 A)。この緩徐脱分極の傾きは angiotensin II の投与で増加した (Fig 5-3 Ba)。この結果から、angiotensin II の緩徐脱分極の傾きの増加が、発火頻度変化に依存したものではないことが判明し、緩徐脱分極の傾き増加が原因となって、自発活動の発火頻度の増加が起こることが明らかとなった。

Angiotensin II による自発活動の誘発は、losartan、xestospongins C それぞれの存在下で抑制された (Fig 5-3 Bbc)。 IP_3 受容体遮断薬である 2-APB (Okamoto Y et al., 2012) の存在下で

は、有意ではないものの、自発活動誘発が抑制される傾向にあった (Fig 5-1 B)。これらの結果から、angiotensin II による自発活動誘発に、IP₃ 受容体の活性化が関与することが再確認された。また、1Hz 電気刺激下で angiotensin II を投与した場合でも緩徐脱分極の傾きは増加したが、この作用は losartan、xestospongins C の存在下で抑制された (Fig 5-3 Bbc)。これらの結果から、angiotensin II による肺静脈心筋細胞内 Ca²⁺の増加が緩徐脱分極の形成を促進し、自発活動の誘発につながることを示された。

次に、IP₃ 受容体を介して増加した細胞内 Ca²⁺が、どのようにして緩徐脱分極の形成を促進するのかを検討した。肺静脈心筋細胞内の Ca²⁺を介した肺静脈心筋の緩徐脱分極の形成、自発活動の誘発機序に、心筋細胞膜上に存在する Na⁺/Ca²⁺交換機構 (NCX) が関与することが指摘されている (Honjo H et al., 2003; Wongcharoen et al., 2006; Namekata I et al., 2009)。Angiotensin II による自発活動誘発への NCX の関与を明らかにするために、NCX の選択的阻害薬である SEA0400 (Tanaka H et al., 2002) を用いた。SEA0400 は NCX のサブタイプのうち、心臓に多く存在する NCX1 を抑制する (Iwamoto T et al., 2004)。SEA0400 存在下で angiotensin II を投与したところ、非存在下に比べて自発活動の誘発が抑制された。SEA0400 と同様、NCX 阻害作用を持つ nickel (Kimura J et al., 1987) によっても angiotensin II による自発活動の誘発は抑制された。また、1Hz 電気刺激下で angiotensin II を投与する検討でも、SEA0400 の存在下で angiotensin II による緩徐脱分極の傾き増加は抑制された。これらの結果から、angiotensin II による緩徐脱分極の形成、自発活動の誘発に NCX が関与することが明らかとなった。NCX は、細胞膜上で Na⁺と Ca²⁺を 3 対 1 で交換する起電性のトランスポーターである。NCX には、Ca²⁺を細胞外に汲み出す Ca²⁺排出モード (forward mode: 内向き電流) と、細胞内に Na⁺が蓄積した場合に Ca²⁺を流入させる Ca²⁺流入モード (reverse mode: 外向き電流) がある。NCX は心筋活動電位のほとんどの時間で forward mode で働き (Bers DM, 2000)、活動電位が発生した直後に細胞内 Na⁺が増加した場合のみ一時的に reverse mode で働くと考えられている。そのため、肺静脈心筋の緩徐脱分極の電位領域では、NCX は forward mode で働いており、これが緩徐脱分極の形成に寄与すると考えられる。Angiotensin II の投与は IP₃ 受容体の活性化を介して筋小胞体からの Ca²⁺放出を促進し、細胞内 Ca²⁺を増加させる (第 4 章)。肺静脈心筋細胞内で増加した Ca²⁺が間接的に NCX の forward mode での回転を促進し、これによって生じた内向き電流が緩徐脱分極の形成を促進し、自発活動を誘発すると考えられた。ウサギ肺静脈心筋細胞において、angiotensin II の投与が NCX 電流を増加させることが報告されている (Chen YJ et al., 2006)。また、ラット肺静脈心筋においては、noradrenaline によって自発活動が誘発されるが、この機序に IP₃ 受容体の活性化が関与していることが報告されている (Okamoto Y et al., 2012)。IP₃ 受容体及び NCX は、モルモット以外の実験動物種においても、肺静脈心筋自動能の形成促進に重要な機序であるのかもしれない。

Ryanodine の存在下で angiotensin II を投与すると、自発活動の誘発が抑制された。また、1Hz 電気刺激下での Angiotensin II による緩徐脱分極の傾きの増加も、ryanodine の存在下

で抑制された。これらの結果から、angiotensin II のよる自発活動の誘発に、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出が必須であることが明らかになった。しかしながら、Ryanodine は筋小胞体上の Ca^{2+} 放出チャネルを開口固定し、筋小胞体内の Ca^{2+} を枯渇させるため (Zucchi R and Ronca-Testoni S, 1997)、ryanodine 受容体自体がどの程度自発活動の誘発に寄与しているかは明らかではない。これに関しては ryanodine 受容体を開口阻害する薬物の開発が待たれる。

内因性 angiotensin II の関与

興味深いことに、losartan は angiotensin II を投与していない場合でも、肺静脈心筋自発活動の緩徐脱分極の傾きを減少させるとともに、自発活動の発火頻度を低下させた (Fig 5-4 A, C, D)。外部からアゴニストを投与しない状態で受容体遮断薬が自発活動を抑制した、という結果から、肺静脈標本内で内因性に angiotensin II が産生されている可能性が考えられた。一般に、angiotensin II は angiotensin I から ACE によって変換されて産生される。そこで、ACE 阻害薬である captopril を自発活動が発生している肺静脈標本に投与した。その結果、自発活動の緩徐脱分極の傾きの減少と、自発活動の発火頻度の低下が観察された (Fig 5-4 B-D)。つまり、肺静脈標本内に内因性に angiotensin I が存在しており、標本内で ACE によって angiotensin II に変換された可能性が考えられた。

そこで、次に angiotensin I が肺静脈心筋自発活動を誘発しうるのかを組織標本での収縮力測定を用いて検討した。自発活動が発生していない肺静脈標本に angiotensin I を投与すると、自発活動の誘発が観察された (Fig 5-5 A, F)。自発活動の誘発率と最大発火頻度は、angiotensin II によるものと同じか、わずかに少ない程度であった (Table 3-1, Table 5-2)。Angiotensin I による自発活動の誘発は、losartan の存在下で抑制された (Fig 5-5 B, F)。これらの結果から、angiotensin I は自発活動誘発作用を持つことが判明し、この作用は angiotensin I が angiotensin II に変換されることによって生じていると考えられた。Angiotensin I の自発活動誘発作用は、captopril の存在下で抑制された (Fig 5-5 C, F)。このことから、angiotensin I の自発活動誘発作用は、肺静脈組織標本内に存在する ACE による angiotensin II への変換を介して生じていることが示された。ACE は血管内皮に存在し、Angiotensin I から II への変換に関与する (Erdős EG, 1976)。これまでの結果から、モルモット肺静脈の血管内皮に ACE が存在し、angiotensin II への変換を行っていると考えられた。しかしながら、ACE が心筋を含む内皮以外の組織に存在する可能性も十分に考えられるため、ACE の局在に関しては、今後更なる検討が必要である。Angiotensin I を angiotensin II に変換する酵素として、ACE 以外に chymase も知られている。Chymase は心臓や血管で存在が報告されている、局所型の angiotensin II 産生酵素である。モルモット chymase を阻害することが報告される chymostatin (Caughey GH et al., 2008) を用いて検討を行ったところ、angiotensin I による自発活動の誘発作用は chymostatin の存在下では抑制されなかった (Fig 5-5 D, F)。この結果から、健常モルモットにおいては angiotensin I の angiotensin II への変換に、chymase は関与しないことが判明した。Chymase はリモデリングが進行した肥厚血管において活性が増加す

るとの報告もある (高井真司 et al., 1999)。このため、病的状態で chymase の活性が増加し、自発活動の誘発に関与する可能性が考えられる。

これまでの検討から、内因性 Angiotensin II の産生に ACE が関与することが明らかとなったが、それ以外にも標本内で直接 angiotensin II が産生させる経路があることが報告されている。心筋に対し伸展刺激を加えると、心筋自体から autocrine mechanism によって angiotensin II が産生される (Sadoshima J et al., 1993)。今回の検討では、組織標本をシリコン上にピンで固定しており、これによる伸展が内因性 angiotensin II 産生を起こしたとも考えられる。肺静脈組織標本に関しても、伸展刺激が肺静脈心筋自発活動を誘発されることが報告されており (Hamaguchi et al., 2016)、このメカニズムに内因性 angiotensin II が関与している可能性がある。また、心筋細胞内に renin-angiotensin 系が存在しており、angiotensin II 産生が行われるとの報告もある (Kumar R et al., 2008)。この細胞内 renin-angiotensin 系は、糖尿病病態下で活性化されることも同じ研究グループが報告している。このことは、病態が内因性 angiotensin 系を活性化することを示唆している。Angiotensin II 自体が伝達物質として神経終末から放出される可能性もある。ラット、ヒトにおいて免疫染色による検討から、神経ニューロン内に angiotensin II が noradrenaline とともに共局在していることが報告されている (Patil J et al., 2011)。このため、肺静脈周囲の神経終末からの angiotensin II 遊離が自発活動に関与していて、神経活動の亢進が内因性 angiotensin II の活性を増大させる可能性がある。これらの心筋及び神経における内因性 angiotensin II 産生の報告から、内因性 angiotensin II は病態において活性化されることが示唆される。どのような条件下で内因性 angiotensin II が活性化されやすくなるのかについては今後の検討課題である。

自発活動が発生している肺静脈標本に対する xestospongine C、SEA0400 それぞれの投与は、自発活動の緩徐脱分極の傾きを減少させ、自発活動の発火頻度を低下させた。これらの結果は、外部から angiotensin II を投与した場合と同様に、自発活動が元から発生している肺静脈標本においても、IP₃ 受容体、NCX を介した機序が重要であることを示している。また、内因性 angiotensin II が自発活動に関与しているという仮説を支持しているとも考えられる。これらの遮断薬が自発活動を抑制することは、心房細動のトリガーの自動能を抑制することで、心房細動の治療薬候補となる可能性があることを示唆している。IP₃ 受容体、NCX は様々な組織に存在していることから、現段階では治療応用は難しいと考えられるが、肺静脈心筋選択的にこれらを遮断する手法が発見されれば優れた治療法となる可能性がある。

総括

本章の結果から、angiotensin II によるモルモット肺静脈心筋自動能の亢進には、肺静脈心筋細胞の IP_3 受容体と NCX の活性化が関与しており、筋小胞体から放出された Ca^{2+} が膜電位に影響して活動電位を引き起こすことが明らかとなった。また、内因性に angiotensin II が産生される経路が存在することが示唆され、病的状態における内因性 angiotensin II の産生増大が肺静脈心筋自動能の亢進につながると考えられた。

従来、Angiotensin II は慢性的な組織リモデリングの促進を介して、心房細動を始めとする不整脈の発症に関与すると考えられてきたが、本研究の結果は、angiotensin II が不整脈の基質だけでなく、不整脈のトリガーとなる肺静脈心筋自動能を亢進することで、病態を悪化させ得ることを示したものである。

臨床では、angiotensin II の活性阻害薬 (ACE 阻害薬、ARB) は、心房細動の発症に必要な基質の形成を抑制する治療、すなわちアップストリーム療法に有効であると考えられ、有効性を確認するために多くの臨床試験が行われてきた (不整脈薬物治療ガイドライン 2020)。しかし、今の所、臨床試験における ACE 阻害薬や ARB の心房細動のアップストリーム療法における治療効果は限定的であり、どのような条件下で治療有効性が高まるのかを検討することが急務である。心房細動は、発症までに数十年の年月がかかる上、発症機序が非常に複雑であるため、臨床試験で angiotensin II のような一因子の影響を検討することは非常に難しい。また、臨床研究においてはそれぞれの患者背景が異なっており、どのような条件下で renin-angiotensin 系が活性化しやすく、肺静脈心筋自動能が亢進しやすいかを知ることにもまた難しい。病態下では Angiotensin II の血中レベルや受容体活性、産生経路など様々な要因が劇的に変化すると考えられる。

本研究で明らかになった angiotensin II の肺静脈心筋への作用とそのメカニズムをもとに、病態における angiotensin II の反応性の変化や、内因性 angiotensin II の寄与に関する検討が進み、心房細動の病態への理解、治療薬の開発につながることに期待したい。

第 4 節 結論

Angiotensin II によって供給が増大した細胞質 Ca^{2+} が NCX によって排出される際の内向き電流が緩徐脱分極を形成し、自発活動を誘発する。

Angiotensin II による肺静脈心筋細胞内の Ca^{2+} の増加が膜電位変化に繋がる機序が明らかとなった。細胞内 Ca^{2+} が膜電位に影響を与えることで活動電位を惹起するという興味深い機序である。

肺静脈標本内に ACE を介した angiotensin II 産生経路が存在し、肺静脈心筋自動能を亢進させる。

内因性 angiotensin II の産生経路の 1 例として、標本内の ACE を介した機序があることが判明した。組織標本内で内因性に angiotensin II が産生される経路がいくつか報告されており、病態下で活性化され得ると考えられる。

第6章 総括

本研究では、モルモット摘出肺静脈標本を用いて肺静脈心筋自動能への angiotensin II の影響に関して検討を行い、以下の結論が得られた。

結論 1： Angiotensin II は AT_1 受容体を介して肺静脈心筋の自発活動を誘発する。

結論 2： 肺静脈心筋細胞では、細胞内の Ca^{2+} spark の増加が自発的 Ca^{2+} transient の発生に繋がる。

結論 3： Angiotensin II による自発活動の誘発には筋小胞体の IP_3 受容体からの Ca^{2+} 放出が関与する。

結論 4： Angiotensin II によって供給が増大した細胞質 Ca^{2+} が NCX によって排出される際の内向き電流が緩徐脱分極を形成し、自発活動を誘発する。

結論 5： 肺静脈標本内に ACE を介した angiotensin II 産生経路が存在し、肺静脈心筋自動能を亢進させる。

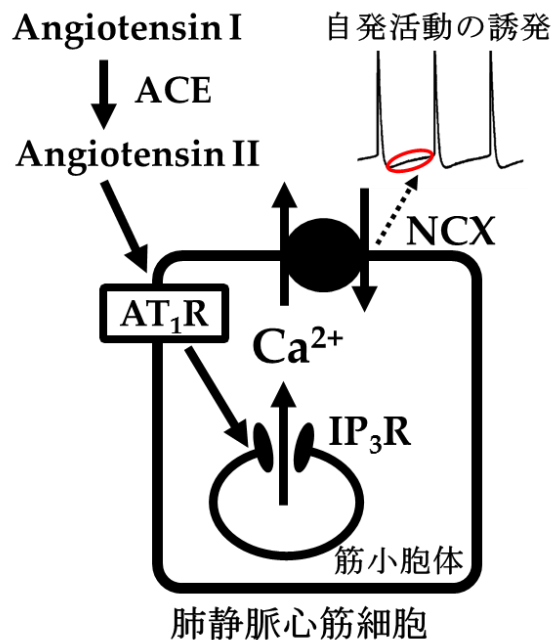


Fig 6 Angiotensin II の作用機序

Angiotensin II はモルモット肺静脈心筋の AT₁ 受容体に直接作用し、自動能を亢進させることが明らかとなった。また、angiotensin II によるモルモット肺静脈心筋自動能の亢進には IP₃ 受容体と NCX の活性化が関与しており、筋小胞体から放出された Ca²⁺が膜電位に影響して活動電位を引き起こすことが明らかとなった。Angiotensin II は不整脈を伴う各種病態下で働きが増大し、慢性的な組織リモデリングを促進して不整脈を起こし易い状態に心筋を導く、つまり不整脈基質の形成を介して病態を悪化させると考えられてきたが、本研究は angiotensin II が不整脈のトリガーとなる肺静脈心筋自発活動を活性化することで病態を悪化させ得るという新たな視点を提示したものである。今後、病態時の肺静脈心筋自発活動に関する理解が深まり、心房細動の薬物治療の有効性向上や新規治療薬の開発につながることを期待する。

第7章 謝辞

本研究の遂行にあたり、御指導、御教鞭を賜りました東邦大学薬学研究科薬物学教室の田中光教授に心から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、瀨口正悟講師に心から感謝致します。

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

令和2年1月10日

薬物学教室 田中 悠介

第 8 章 参考文献

Ahmad Y, Lip GY, Lane DA. Recent developments in understanding epidemiology and risk determinants of atrial fibrillation as a cause of stroke. *Can J Cardiol*. 2013 Jul;29(7 Suppl):S4-S13.

Akazawa H, Yasuda N, Komuro I. Mechanisms and functions of agonist-independent activation in the angiotensin II type 1 receptor. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Apr 29;302(2):140-7.

Barajas-Martinez H, Goodrow RJ, Hu D, Patel P, Desai M, Panama BK, Treat JA, Aistrup GL, Cordeiro JM. Biophysical and molecular comparison of sodium current in cells isolated from canine atria and pulmonary vein. *Pflugers Arch*. 2017 Jun;469(5-6):703-712.

Berlin JR. Spatiotemporal changes of Ca^{2+} during electrically evoked contractions in atrial and ventricular cells. *Am J Physiol*. 1995 Sep;269(3 Pt 2):H1165-70.

Bernhem K, Krishnan K, Bondar A, Brismar H, Aperia A, Scott L. AT_1 -receptor response to non-saturating Ang-II concentrations is amplified by calcium channel blockers. *BMC Cardiovasc Disord*. 2017 May 17;17(1):126.

Bers DM. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res*. 2000 Aug 18;87(4):275-81.

Brasch H, Sieroslowski L, Dominiak P. Angiotensin II increases norepinephrine release from atria by acting on angiotensin subtype 1 receptors. *Hypertension*. 1993 Nov;22(5):699-704.

Brette F, Orchard C. T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circ Res*. 2003 Jun 13;92(11):1182-92.

Brunton L, Fayrer J. Note on the independent pulsatio of the pulmonary veins and vena cava. *Proc. R. Soc. Lond*. 1877 Dec;25:174-176.

Carl SL, Felix K, Caswell AH, Brandt NR, Brunschwig JP, Meissner G, Ferguson DG. Immunolocalization of triadin, DHP receptors, and ryanodine receptors in adult and developing skeletal muscle of rats. *Muscle Nerve*. 1995 Nov;18(11):1232-43.

Caughey GH, Beauchamp J, Schlatter D, Raymond WW, Trivedi NN, Banner D, Mauser H, Fingerle J. Guinea pig chymase is leucine-specific: a novel example of functional plasticity in the chymase/granzyme family of serine peptidases. *J Biol Chem*. 2008 May 16;283(20):13943-51.

Chang SH, Chen YC, Chiang SJ, Higa S, Cheng CC, Chen YJ, Chen SA. Increased Ca^{2+} sparks and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} stores potentially determine the spontaneous activity of pulmonary vein cardiomyocytes. *Life Sci*. 2008 Aug 15;83(7-8):284-92.

Chang SL, Chen YC, Yeh YH, Lin YK, Wu TJ, Lin CI, Chen SA, Chen YJ. Heart failure enhanced pulmonary vein arrhythmogenesis and dysregulated sodium and calcium homeostasis with increased calcium sparks. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2011 Dec;22(12):1378-86.

Chaugai S, Meng WY, Ali Sepehry A. Effects of RAAS Blockers on Atrial Fibrillation Prophylaxis: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2016 Jul;21(4):388-404.

Chen SA, Hsieh MH, Tai CT, Tsai CF, Prakash VS, Yu WC, Hsu TL, Ding YA, Chang MS. Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from the pulmonary veins: electrophysiological characteristics, pharmacological responses, and effects of radiofrequency ablation. *Circulation*. 1999 Nov 2;100(18):1879-86.

Chen YC, Chen SA, Chen YJ, Chang MS, Chan P, Lin CI. Effects of thyroid hormone on the arrhythmogenic activity of pulmonary vein cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Jan 16;39(2):366-72.

Chen YJ, Chen SA, Chang MS, Lin CI. Arrhythmogenic activity of cardiac muscle in pulmonary veins of the dog: implication for the genesis of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2000 Nov;48(2):265-73.

Chen YJ, Chen SA, Chen YC, Yeh HI, Chan P, Chang MS, Lin CI. Effects of rapid atrial pacing on the arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from pulmonary veins: implication in initiation of atrial fibrillation. *Circulation*. 2001 Dec 4;104(23):2849-54.

Chen YJ, Chen SA, Chen YC, Yeh HI, Chang MS, Lin CI. Electrophysiology of single cardiomyocytes isolated from rabbit pulmonary veins: implication in initiation of focal atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol*. 2002 Jan;97(1):26-34.

Chen YJ, Chen YC, Tai CT, Yeh HI, Lin CI, Chen SA. Angiotensin II and angiotensin II receptor blocker modulate the arrhythmogenic activity of pulmonary veins. *Br J Pharmacol*. 2006 Jan;147(1):12-22.

Cheung DW. Electrical activity of the pulmonary vein and its interaction with the right atrium in the guinea-pig. *J Physiol*. 1981 May;314:445-56.

Cordeiro JM, Spitzer KW, Giles WR, Ershler PE, Cannell MB, Bridge JH. Location of the initiation site of calcium transients and sparks in rabbit heart Purkinje cells. *J Physiol*. 2001 Mar 1;531(Pt 2):301-14.

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 Jul;53:3731–3734.

Disertori M, Latini R, Maggioni AP, Delise P, Di Pasquale G, Franzosi MG, Staszewsky L, Tognoni G; GISSI-AF Investigators. Rationale and design of the GISSI-Atrial Fibrillation Trial: a randomized, prospective, multicentre study on the use of valsartan, an angiotensin II AT₁-receptor blocker, in the prevention of atrial fibrillation recurrence. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2006 Jan;7(1):29-38.

Ehrlich JR, Cha TJ, Zhang L, Chartier D, Melnyk P, Hohnloser SH, Nattel S. Cellular electrophysiology of canine pulmonary vein cardiomyocytes: action potential and ionic current properties. *J Physiol*. 2003 Sep 15;551(Pt 3):801-13.

Erdős EG. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Am J Med*. 1976 May 31;60(6):749-59.

Feolde E, Vigne P, Frelin C. Angiotensin AT₁ receptors mediate a positive inotropic effect of angiotensin II in guinea pig atria. *Eur J Pharmacol*. 1993 Mar 15;245(1):63-6.

Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*. 2001 Mar;53(1):1-24.

Freer RJ, Pappano AJ, Peach MJ, Bing KT, McLean MJ, Vogel S, Sperelakis N. Mechanism for the positive inotropic effect of angiotensin II on isolated cardiac muscle. *Circ Res*. 1976 Aug;39(2):178-83.

Garcia MI, Boehning D. Cardiac inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017 Jun;1864(6):907-914.

Gassanov N, Brandt MC, Michels G, Lindner M, Er F, Hoppe UC. Angiotensin II-induced changes of calcium sparks and ionic currents in human atrial myocytes: potential role for early remodeling in atrial fibrillation. *Cell Calcium.* 2006 Feb;39(2):175-86.

Goette A, Arndt M, Röcken C, Spiess A, Staack T, Geller JC, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U. Regulation of angiotensin II receptor subtypes during atrial fibrillation in humans. *Circulation.* 2000 Jun 13;101(23):2678-81.

Goutsouliak V, Rabkin SW. Comparison of angiotensin II type-1 and type-2 receptor antagonists on angiotensin II-induced IP₃ generation in cardiomyocytes. *Gen Pharmacol.* 1998 Mar;30(3):367-72.

Guo DF, Sun YL, Hamet P, Inagami T. The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Res.* 2001 Sep;11(3):165-80.

Haberberger R, Schemann M, Sann H, Kummer W. Innervation pattern of guinea pig pulmonary vasculature depends on vascular diameter. *J Appl Physiol (1985).* 1997 Feb;82(2):426-34.

Hamaguchi S, Hikita K, Tanaka Y, Tsuneoka Y, Namekata I, Tanaka H. Enhancement of Automaticity by Mechanical Stretch of the Isolated Guinea Pig Pulmonary Vein Myocardium. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(7):1216-9.

Hamaguchi S, Tsuneoka Y, Tanaka A, Irie M, Tsuruta M, Nakayama T, Namekata I, Nada M, Aimoto M, Takahara A, Tanaka H. Manifestation of automaticity in the pulmonary-vein myocardium of rats with abdominal aorto-venocaval shunt. *J Pharmacol Sci.* 2015 Aug;128(4):212-5.

Hatem SN, Bénardeau A, Rücker-Martin C, Marty I, de Chamisso P, Villaz M, Mercadier JJ. Different compartments of sarcoplasmic reticulum participate in the excitation-contraction coupling process in human atrial myocytes. *Circ Res.* 1997 Mar;80(3):345-53.

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 Sep 3;339(10):659-66.

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 Apr 15;107(14):1937-43.

Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT₁ receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol*. 2006 May;20(5):953-70.

Hüser J, Lipsius SL, Blatter LA. Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *J Physiol*. 1996 Aug 1;494 (Pt 3):641-51.

Inoue H, Fujiki A, Origasa H, Ogawa S, Okumura K, Kubota I, Aizawa Y, Yamashita T, Atarashi H, Horie M, Ohe T, Doi Y, Shimizu A, Chishaki A, Saikawa T, Yano K, Kitabatake A, Mitamura H, Kodama I, Kamakura S. Prevalence of atrial fibrillation in the general population of Japan: an analysis based on periodic health examination. *Int J Cardiol*. 2009 Oct 2;137(2):102-7.

Irie M, Hiiro H, Hamaguchi S, Namekata I, Tanaka H. Involvement of the persistent Na⁺ current in the diastolic depolarization and automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium. *J Pharmacol Sci*. 2019 Sep;141(1):9-16.

Irie M, Tsuneoka Y, Shimobayashi M, Hasegawa N, Tanaka Y, Mochizuki S, Ichige S, Hamaguchi S, Namekata I, Tanaka H. Involvement of alpha- and beta-adrenoceptors in the automaticity of the isolated guinea pig pulmonary vein myocardium. *J Pharmacol Sci*. 2017 Apr;133(4):247-253.

Iwamoto T, Kita S, Uehara A, Imanaga I, Matsuda T, Baba A, Katsuragi T. Molecular determinants of Na⁺/Ca²⁺ exchange (NCX1) inhibition by SEA0400. *J Biol Chem*. 2004 Feb 27;279(9):7544-53.

Kapoor N, Tran A, Kang J, Zhang R, Philipson KD, Goldhaber JJ. Regulation of calcium clock-mediated pacemaking by inositol-1,4,5-trisphosphate receptors in mouse sinoatrial nodal cells. *J Physiol*. 2015 Jun 15;593(12):2649-63.

Kashihara T, Nakada T, Kojima K, Takeshita T, Yamada M. Angiotensin II activates Ca_v1.2 Ca²⁺ channels through β-arrestin2 and casein kinase 2 in mouse immature cardiomyocytes. *J Physiol*. 2017 Jul 1;595(13):4207-4225.

Kim S, Zhan Y, Izumi Y, Yasumoto H, Yano M, Iwao H. In vivo activation of rat aortic platelet-derived growth factor and epidermal growth factor receptors by angiotensin II and hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Dec;20(12):2539-45.

Kimura J, Miyamae S, Noma A. Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol.* 1987 Mar;384:199-222.

Kobayashi M, Furukawa Y, Chiba S. Positive chronotropic and inotropic effects of angiotensin II in the dog heart. *Eur J Pharmacol.* 1978 Jul 1;50(1):17-25.

Kockskämper J, Sheehan KA, Bare DJ, Lipsius SL, Mignery GA, Blatter LA. Activation and propagation of Ca²⁺ release during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. *Biophys J.* 2001 Nov;81(5):2590-605.

Kumagai K, Nakashima H, Urata H, Gondo N, Arakawa K, Saku K. Effects of angiotensin II type 1 receptor antagonist on electrical and structural remodeling in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Jun 18;41(12):2197-204.

Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: implications in cardiovascular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008 Mar;17(2):168-73.

Leeson TS. T-tubules, couplings and myofibrillar arrangements in rat atrial myocardium. *Acta Anat (Basel).* 1980;108(3):374-88.

Li TJ, Zang WD, Chen YL, Geng N, Ma SM, Li XD. Renin-angiotensin system inhibitors for prevention of recurrent atrial fibrillation: a meta-analysis. *Int J Clin Pract.* 2013 Jun;67(6):536-43.

Lin YK, Lu YY, Chen YC, Chen YJ, Chen SA. Nitroprusside modulates pulmonary vein arrhythmogenic activity. *J Biomed Sci.* 2010 Mar 20;17(1):20.

Lindpaintner K, Ganten D. The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ Res.* 1991 Apr;68(4):905-21.

Lo LW, Chen YC, Chen YJ, Wongcharoen W, Lin CI, Chen SA. Calmodulin kinase II inhibition prevents arrhythmic activity induced by alpha and beta adrenergic agonists in rabbit pulmonary veins. *Eur J Pharmacol.* 2007 Oct 1;571(2-3):197-208.

Logantha SJ, Cruickshank SF, Rowan EG, Drummond RM. Spontaneous and electrically evoked Ca²⁺ transients in cardiomyocytes of the rat pulmonary vein. *Cell Calcium*. 2010 Aug-Sep;48(2-3):150-60.

Matavelli LC, Siragy HM. AT₂ receptor activities and pathophysiological implications. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015 Mar;65(3):226-32.

Maupoil V, Bronquard C, Freslon JL, Cosnay P, Findlay I. Ectopic activity in the rat pulmonary vein can arise from simultaneous activation of alpha1- and beta1-adrenoceptors. *Br J Pharmacol*. 2007 Apr;150(7):899-905.

Mikoshiha K. Role of IP₃ receptor signaling in cell functions and diseases. *Adv Biol Regul*. 2015 Jan;57:217-27.

Miyamoto S, Izumi M, Hori M, Kobayashi M, Ozaki H, Karaki H. Xestospongins C, a selective and membrane-permeable inhibitor of IP₃ receptor, attenuates the positive inotropic effect of alpha-adrenergic stimulation in guinea-pig papillary muscle. *Br J Pharmacol*. 2000 Jun;130(3):650-4.

Miyauchi Y, Fishbein MC, Karagueuzian HS. Electrical current-induced atrial and pulmonary vein action potential duration shortening and repetitive activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Jul;287(1):H178-86.

Nakashima A, Angus JA, Johnston CI. Chronotropic effects of angiotensin I, angiotensin II, bradykinin and vasopressin in guinea pig atria. *Eur J Pharmacol*. 1982 Jul 16;81(3):479-85.

Nakashima H, Kumagai K, Urata H, Gondo N, Ideishi M, Arakawa K. Angiotensin II antagonist prevents electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation*. 2000 Jun 6;101(22):2612-7.

Nakashima H, Kumagai K. Reverse-remodeling effects of angiotensin II type 1 receptor blocker in a canine atrial fibrillation model. *Circ J*. 2007 Dec;71(12):1977-82.

Nakayama H, Bodi I, Maillet M, DeSantiago J, Domeier TL, Mikoshiha K, Lorenz JN, Blatter LA, Bers DM, Molkenkin JD. The IP₃ receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. *Circ Res*. 2010 Sep 3;107(5):659-66.

Namekata I, Tsuneoka Y, Takahara A, Shimada H, Sugimoto T, Takeda K, Nagaharu M, Shigenobu K, Kawanishi T, Tanaka H. Involvement of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the automaticity of guinea-pig pulmonary vein myocardium as revealed by SEA0400. *J Pharmacol Sci.* 2009 May;110(1):111-6.

Namekata I, Yamagishi R, Kato Y, Nakamura R, Tanaka H. Propagation of normal and abnormal cytoplasmic Ca²⁺ oscillation into the cell nucleus in cardiomyocytes. *Bioimages* 12:61-69

Novo G, Guttilla D, Fazio G, Cooper D, Novo S. The role of the renin-angiotensin system in atrial fibrillation and the therapeutic effects of ACE-Is and ARBS. *Br J Clin Pharmacol.* 2008 Sep;66(3):345-51.

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 Jan;66:53-62.

Okamoto Y, Takano M, Ohba T, Ono K. Arrhythmogenic coupling between the Na⁺-Ca²⁺ exchanger and inositol 1,4,5-triphosphate receptor in rat pulmonary vein cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 May;52(5):988-97.

Pasqualin C, Yu A, Malécot CO, Gannier F, Cognard C, Godin-Ribuot D, Morand J, Bredeloux P, Maupoil V. Structural heterogeneity of the rat pulmonary vein myocardium: consequences on intracellular calcium dynamics and arrhythmogenic potential. *Sci Rep.* 2018 Feb 19;8(1):3244.

Patil J, Stucki S, Nussberger J, Schaffner T, Gyax S, Bohlender J, Imboden H. Angiotensinergic and noradrenergic neurons in the rat and human heart. *Regul Pept.* 2011 Feb 25;167(1):31-41.

Richards MA, Clarke JD, Saravanan P, Voigt N, Dobrev D, Eisner DA, Trafford AW, Dibb KM. Transverse tubules are a common feature in large mammalian atrial myocytes including human. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Nov;301(5):H1996-2005.

Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):977-84.

Schneider MP, Hua TA, Böhm M, Wachtell K, Kjeldsen SE, Schmieder RE. Prevention of atrial fibrillation by Renin-Angiotensin system inhibition a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2010 May 25;55(21):2299-307.

Takahara A, Hagiwara M, Namekata I, Tanaka H. Pulmonary vein myocardium as a possible pharmacological target for the treatment of atrial fibrillation. *J Pharmacol Sci.* 2014;126(1):1-7. Epub 2014 Aug 23.

Tan AY, Chen PS, Chen LS, Fishbein MC. Autonomic nerves in pulmonary veins. *Heart Rhythm.* 2007 Mar;4(3 Suppl):S57-60.

Tanaka H, Masumiya H, Sekine T, Kase J, Kawanishi T, Hayakawa T, Miyata S, Sato Y, Nakamura R, Shigenobu K. Involvement of Ca^{2+} waves in excitation-contraction coupling of rat atrial cardiomyocytes. *Life Sci.* 2001 Dec 28;70(6):715-26.

Tanaka H, Nishimaru K, Sekine T, Kawanishi T, Nakamura R, Yamagaki K, Shigenobu K. Two-dimensional millisecond analysis of intracellular Ca^{2+} sparks in cardiac myocytes by rapid scanning confocal microscopy: increase in amplitude by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Apr 17;233(2):413-8.

Tanaka H, Sekine T, Kawanishi T, Nakamura R, Shigenobu K. Intrasarcomere $[Ca^{2+}]$ gradients and their spatio-temporal relation to Ca^{2+} sparks in rat cardiomyocytes. *J Physiol.* 1998 Apr 1;508 (Pt 1):145-52.

Tasaki H. Electrophysiological study of the striated muscle cells of the extrapulmonary vein of the guinea-pig. *Jpn Circ J.* 1969 Oct;33(10):1087-98.

Thompson JL. Effect of angiotensin on the cardioaccelerator response to sympathetic nerve stimulation in isolated rabbit hearts. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1970 Dec;135(3):825-30.

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 density in the automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium. *J Pharmacol Sci.* 2017 Apr;133(4):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.

Udyavar AR, Chen YC, Chen YJ, Cheng CC, Lin CI, Chen SA. Endothelin-1 modulates the arrhythmogenic activity of pulmonary veins. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2008 Mar;19(3):285-92.

Van Liefde I, Vauquelin G. Sartan-AT₁ receptor interactions: in vitro evidence for insurmountable antagonism and inverse agonism. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 Apr 29;302(2):237-43.

Verdecchia P, Angeli F, Reboldi G. Hypertension and Atrial Fibrillation: Doubts and Certainties From Basic and Clinical Studies. *Circ Res.* 2018 Jan 19;122(2):352-368.

von Lewinski D, Kockskämper J, Rübertus SU, Zhu D, Schmitto JD, Schöndube FA, Hasenfuss G, Pieske B. Direct pro-arrhythmogenic effects of angiotensin II can be suppressed by AT₁ receptor blockade in human atrial myocardium. *Eur J Heart Fail.* 2008 Dec;10(12):1172-6.

Wang TM, Luk HN, Sheu JR, Wu HP, Chiang CE. Inducibility of abnormal automaticity and triggered activity in myocardial sleeves of canine pulmonary veins. *Int J Cardiol.* 2005 Sep 15;104(1):59-66.

Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation.* 1995 Oct 1;92(7):1954-68.

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 Jun 1;70(3):497-508.

Yamasaki Y, Furuya Y, Araki K, Matsuura K, Kobayashi M, Ogata T. Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of the sarcoplasmic reticulum of the rat atrial myocardial cells. *Anat Rec.* 1997 May;248(1):70-5.

Zhu YC, Zhu YZ, Lu N, Wang MJ, Wang YX, Yao T. Role of angiotensin AT₁ and AT₂ receptors in cardiac hypertrophy and cardiac remodelling. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003 Dec;30(12):911-8.

Ziogas J, Story DF, Rand MJ. Effects of locally generated angiotensin II on noradrenergic transmission in guinea-pig isolated atria. *Eur J Pharmacol.* 1984 Oct 30;106(1):11-8.

Zucchi R, Ronca-Testoni S. The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev.* 1997 Mar;49(1):1-51.

入沢 宏 心臓の生理学 岩波書店 (1982 年)

岡田 隆夫 (監訳) J Rodney Levick (著) 心臓・循環の生理学
メディカルサイエンス・インターナショナル (2011 年)

金江春奈 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 博士論文 (2017 年)

恒岡弥生 肺静脈心筋における電氣的自発活動の発生機序に関する研究 博士論文 (2013 年)

高井真司、金徳男、宮崎端夫 キマーゼの病態生理学的意義とその阻害薬の有用性 日薬理
誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 1999;114 補冊 1; 41-47

山下徹 心房細動のダウンストリームアプローチ：新たな心房細動治療薬とその標的分子
日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 2010;135, 62-65.

小松百花 マウス左心房筋収縮力に対する自律神経刺激の影響 卒業論文 (2017 年)

清水幸恵卒業論文 肺静脈心筋の小胞体機能に関する薬理学的研究 (2017 年)

田中 光、川西 徹、重信 弘毅 共焦点レーザー顕微鏡による心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の高速画
像化と薬理学 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 2015;126, 287-294

田中 秀央 なぜ心房細動は起きるのか 京府医大誌 2010; 119 (4), 261-268