

氏名・(本籍)	高木 大地 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1017 号
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Comparative study of hyperpolarization-activated currents in pulmonary vein cardiomyocytes isolated from rat, guinea pig, and rabbit (肺静脈心筋細胞の過分極活性化電流の種差についての検討)

論文審査委員	(主査) 渡邊 博之 教授		
	(副査) 河谷 正仁 教授	後藤 明輝 教授	

学位論文内容要旨

Comparative study of hyperpolarization-activated currents in pulmonary vein cardiomyocytes isolated from rat, guinea pig, and rabbit
(肺静脈心筋細胞の過分極活性化電流の種差についての検討)

申請者氏名 高木 大地

研究目的

心房細動は、臨床上最も頻度が多い頻脈性不整脈である。心房細動に伴うリズム異常は心機能の低下を引き起こすだけでなく、脳梗塞の発生率が増加する。心房細動の発症リスクは加齢とともに増加することが知られており、高齢化が進む日本においては解決すべき喫緊の課題である。心房細動の発生に肺静脈が深く関係することを Haissaguerre らが 1998 年に報告して以来、肺静脈内部に存在する心筋細胞（肺静脈心筋細胞）の存在が注目されてきた。これまでのところ、肺静脈心筋は心房筋とは異なり、自発活動を示し、心房細動の発生・維持に重要な役割を果たしていると考えられている。肺静脈心筋の潜在性自動能に寄与する電気生理学的性質の 1 つとして、活動電位後の弛緩期に緩徐に活性化する内向き電流(過分極活性化電流, I_h)の存在が指摘されている。イヌやウサギの肺静脈心筋細胞には、洞房結節細胞においてペースメーカー電流として機能している過分極活性化陽イオン電流(I_f)が存在する。 I_f は Na^+ と K^+ の混合電流で、 Cs^+ により選択的に抑制されるという性質を有している。一方、ラットの肺静脈心筋細胞においては、 I_f に代わって過分極活性化 Cl^- 電流 (I_{Clh}) がペースメーカー電流の一翼を担っているという報告がある。 I_{Clh} は I_f と同様に緩徐な活性化が特徴で、 I_f ブロッカーである Cs や、灌流液の K^+ , Na^+ の除去などの影響を受けない。何より、透過するイオンが Cl^- であるという点が I_f とは決定的に異なっている。また、 Cl^- 電流抑制薬によって、ラット肺静脈心筋細胞のノルエピネフリン誘発自動能が抑制されることから、肺静脈心筋の自動能において、 I_{Clh} が機能的役割を担っていることが示された。

このように、肺静脈心筋のペースメーカー電流の起因について、研究者や動物種により異なった報告がなされている。本研究の目的は、ラット・モルモット・ウサギから単離した肺静脈心筋の過分極活性化電流の種差を明らかにすることである。

研究方法

① 細胞単離

ラット(生後 8-12 週, 300-400g), モルモット(生後 5-10 週, 400-700g), ウサギ(生後 10-16 週, 2.0-3.0kg) の肺を残したランゲンドルフ灌流心を作成し、冠動脈から酵素液(ラット・モルモット: コラゲナーゼ 0.05%, うさぎ: コラゲナーゼ 0.07%・エラスターゼ 0.005%) を灌流し、肺静脈心筋を単離した。

② 電気生理学的分析

ホールセルパッチクランプ法を用いて、膜電位・膜電流を記録した。電極は抵抗が 2.0-5.0M Ω のものを用いた。同条件下で活動電位、ホールセル電流、過分極活性化電流、膜容量を記録した。

研究成績

[活動電位とホールセル電流]

各動物種より単離した肺静脈心筋の活動電位パラメータを計測した。その結果、静止膜電位は、ラット 71 \pm 2 mV (n=9), モルモット -58.4 \pm 4.8 mV (n=10), ウサギ -40.1 \pm 4.2 mV (n=9) であった。モルモットとラットではそれぞれ 10 例中 1 例, 9 例中 5 例で自発活動電位を認め、静止膜電位の浅い細胞において自発活動電位を発生しやすい傾向にあった。これらの結果は、過去の報告とほぼ一致した。

ホールセル電流では保持電位 -40mV から -100mV から +60mV までパルスを与えて計測した。脱分極側では、L 型カルシウム電流 (I_{CaL}) の活性化に続いて、脱分極に反応した遅延整流性カリウム電流が発生した。また、ウサギでは 21 例中 18 例で一過性外向きカリウム電流 (I_{to}) を認めた。ウサギの自発性活動電位は、 I_{to} を有さない例で多く認められた。一方、過分極では、どの動物種においても内向き整流 K^+ 電流 (I_{K1}) が主たる電流成分を占めており、 I_h は、 I_{K1} を Ba^{2+} で抑制した際に観察することができた。

[過分極活性化電流]

I_h の電流密度は、ラットでは -3.1 \pm 0.4 pA/pF, モルモットでは -1.9 \pm 0.2 pA/pF, ウサギでは -0.09 pA/pF であった。モルモットの I_h は Cs^+ によって抑制されたが、ラットの I_h は Cs^+ では抑制されず、 Cl^- 電流遮断薬である Cd^{2+} によって抑制された。

I_h の活性化曲線を、末尾電流のピーク値を測定しプロットしたものを、Boltzmann の式で回帰することで求めたところ、 $V_{1/2}$ はラットで -97.3 \pm 8.8mV, モルモットにおいては -66.0 \pm 3.3mV であった。モルモット I_h の $V_{1/2}$ は、他の動物種の洞房結節細胞から記録された I_f のそれらと同等であり、 I_{Clh} より I_f の方がより浅い膜電位で活性化することが示された。

[Ba 感受性電流の比較]

過分極パルスにより記録される I_{K1} について、 Ba^{2+} 感受性電流として解析した。その結果、 I_{K1} はラット及びモルモットに比べてウサギでは電流密度が有意に小さいことが示された。

結論

本研究は、肺静脈心筋における過分極活性化電流はモルモットでは I_f が、ラットでは I_{Clh} が主要成分であることを示した。ウサギでは、ラット・モルモットと比較した場合、過分極活性化電流密度非常に小さかった。以上より、過分極活性化電流を担うイオンチャネルとその電流密度は、動物種で明らかに異なる。本研究結果は、肺静脈の催不整脈性の根底にある細胞メカニズムの理解に貢献し、ヒト肺静脈心筋細胞の過分極活性化電流を明らかにするという新たな研究の必要性を示した。

学位（博士 - 甲）論文審査結果の要旨

主査： 渡邊 博之
申請者： 高木 大地

Comparative study of hyperpolarization-activated currents in pulmonary vein cardiomyocytes isolated from rat, guinea pig, and rabbit
(肺静脈心筋細胞の過分極活性化電流の種差)

要旨

著者の研究は、論文内容要旨が示すように、心房細動の発生に深く関与する肺静脈心筋細胞の潜在性自動能、とくにその構成成分の一つである過分極活性化内向き電流 (I_h 、活動電位後の弛緩期に緩徐に活性化する内向き電流) の動物種による違いを、パッチクランプ法を用いて検討したものである。これまで過分極活性化内向き電流には、 Na^+ と K^+ の混合電流である過分極活性化陽イオン電流 (I_f) と過分極活性化 Cl^- 電流 ($I_{Cl,h}$) の存在が報告されていた。著者は、ラット(生後 8-12 週)、モルモット(生後 5-10 週)、ウサギ(生後 10-16 週)の肺を残したランゲンドルフ灌流心を作製し、冠動脈から酵素液(ラット・モルモット:コラゲナーゼ 0.05%, ウサギ:コラゲナーゼ 0.07%・エラスターゼ 0.005%) を灌流し、肺静脈心筋を単離することに成功、その後、各肺静脈心筋での活動電位や静止膜電位、過分極活性化内向き電流などを測定した。その結果、肺静脈心筋における過分極活性化電流はモルモットでは I_f が、ラットでは $I_{Cl,h}$ が主要成分であること、ウサギでは、ラット・モルモットと比較した場合、過分極活性化電流密度非常に小さいことを示した。以上から、過分極活性化電流を担うイオンチャネルとその電流密度は、動物種で明らかに異なり、今後肺静脈心筋の催不整脈性の検討すなわち臨床へのフィードバックを考える上で、動物種の相違に基づき、ヒト肺静脈心筋細胞での過分極活性化電流の同定という新たな研究の必要性を示したともいえる。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

1998 年に肺静脈内部に存在する心筋細胞(肺静脈心筋細胞)が心房細動の発生に関与することが発見され、その肺静脈心筋が心房筋と異なり自発活動を示すことは知られていた。しかし、その自発活動の詳細なイオンメカニズムは明らかとなっておらず、動物種による違いも検討されていなかった。

本研究の斬新さは、3 種類の動物の各肺静脈心筋細胞の単離に成功し、それら細胞間での過分極活性化内向き電流の差異を明らかにしたことにある。

2) 重要性

3 種類の動物での各肺静脈心筋細胞の過分極活性化内向き電流の相違を明らかにしたことは、今後抗不整脈薬(心房細動治療薬)開発のプロセスに大きく貢献すると考えられる。また、それ以外の IK_1 、静止膜電位の動物間での相違に関する結果も新規治療薬開発を行う上で、今後貴重な情報となると思われ、本研究の重要性が認識される。

3) 研究方法の正確性

パッチクランプ法で用いた細胞内外液組成は、従来からの確立した方法を用いている。得られた電流サイズもこれまでの報告と大きな差はなく、正確に肺静脈心筋細胞を単離できているものと判断する。また、各肺静脈心筋細胞の静止膜電位の違いがみられたことを明確に説明するため裏付け実験を行い、その結果 Ba^{2+} 感受性 K^+ 電流の大きさに違いがあると確認したことは、一連の研究の正確性を示すものである。いずれも統計学的検討を加えており、客観的な評価法で、正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

これまでの歴史的背景と未解決点、この研究を行うことによる臨床的価値、すなわち研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔かつ明瞭に記載していると考えられる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。