

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

# マウス心室筋収縮のアドレナリン $\alpha$ 受容体刺激応答の機序および発達変化

薬理学教室 濱口正悟

## 【背景・目的】

心筋の神経伝達物質や薬物に対する応答は動物種や発達段階、病気の有無により様々である。私は心筋の刺激応答の多様性について、興奮収縮機構の観点から法則性を見出し、統一的に理解したいと考えている。マウス心室筋収縮のアドレナリン  $\alpha$  受容体刺激応答は発達段階で異なっており、幼若心筋では陽性変力反応を、成体心筋では陰性変力反応を示す(図1)。私はこの発達変化を刺激応答と興奮収縮機構の関連性を研究するモデルと捉え、研究対象とした。先行研究により、成体心筋で観察される陰性変力反応には  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換機構(NCX)が関与することを示唆する知見が得られている。しかし、幼若心筋で観察される陽性変力反応の機序、および発達に伴い陽性変力反応から陰性変力反応へと転じる機序は明らかにされていない。本研究では、陽性変力反応の機序を解明し、それが発達にともない陰性変力反応に転ずる仕組みを興奮収縮機構と関連づけて理解することを目的とした。

## 【方法】

ddY 系マウスの胎生期(胎生 16-18 日齢)、新生仔(生後 0-2 日齢)、1 週齢、2 週齢、4 週齢から心臓を摘出し、心室筋組織標本および単離心室筋細胞を作製した。収縮力測定はマグヌス法、細胞内活動電位測定はガラス微小電極法、電流測定は whole-cell patch clamp 法により行った。細胞形態および細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態は単離細胞に蛍光プローブを負荷し落射蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡を用いて可視化・定量した。 $\alpha$  受容体刺激は propranolol(1  $\mu\text{M}$ )存在下、phenylephrine(10  $\mu\text{M}$ )により行った。

## 【結果・考察】

### 1) 陽性変力反応の機序

心筋収縮力を制御している細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化( $\text{Ca}^{2+}$  transient の振幅)は、陰性変力反応を示す 4 週齢心筋では  $\alpha$  受容体刺激により減少したが、陽性変力反応を示す新生仔心筋では増大した。この結果により  $\alpha$  受容体刺激応答の発達変化は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度への影響の変化に起因していることが判明した。NCX には細胞外へ  $\text{Ca}^{2+}$  をくみ出す“ $\text{Ca}^{2+}$  排出モード”と  $\text{Ca}^{2+}$  を細胞内へ流入させる“ $\text{Ca}^{2+}$  流入モード”が存在する(図2)。NCX の電流測定実験から  $\alpha$  受容体刺激が  $\text{Ca}^{2+}$  排出モードと流入モードの両方を活性化することが報告されており、陽性変力反応に  $\text{Ca}^{2+}$  流入モードの関与が考えられる。これを検証するため、NCX 阻害薬 SEA0400 を前処置した条件下で  $\alpha$  受容体刺激を行ったところ、陰性変力反応は抑制されたが、陽性変力反応は抑制されなかった。したがって陽性変力反応は NCX を介しておらず、陰性変力反応とは異なる機序により生じていることが判明した。様々な検討の結果、細胞内へ  $\text{Ca}^{2+}$  を流入させる L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの関与が判明した。すなわち、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの電流測定実験から  $\alpha$  受容体刺激により L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが活性化すること(図3)、また L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害薬 nifedipine により陽性変力反応が抑制されることが明らかになった。

**結論 1:**  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応は、陰性変力反応とは異なる機序、すなわち L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介した細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入増大により引き起こされている。

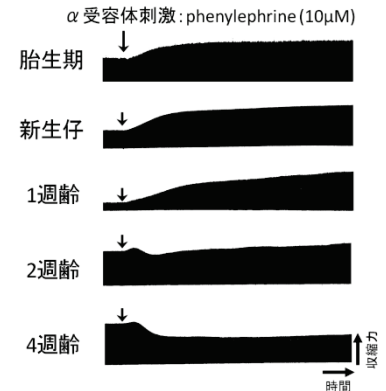


図1 マウス心室筋のアドレナリン  $\alpha$  受容体刺激応答の発達変化

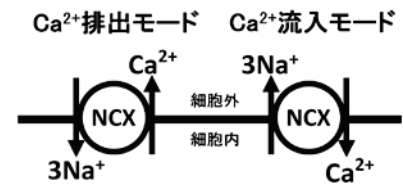


図2 NCX の動作様式

## 2) $\alpha$ 受容体刺激応答の発達変化

陽性変力反応と陰性変力反応が異なる機序により引き起こされていることから、発達に伴い陽性、陰性各成分を担う L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルと NCX の働きのバランスが変化することで、 $\alpha$ 受容体刺激応答が陽性から陰性へと変化すると考えられる。そこで各成分の発達変化について薬理的に検討した。

### 陽性変力反応の発達変化

陽性変力反応に関与している L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの機能について、その遮断薬 nifedipine を用いて検討した。Nifedipine の収縮力減弱作用は発達に伴い減少し、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの  $\text{Ca}^{2+}$  流入の役割が発達に伴い減少していることが判明した(図4)。しかし、電流測定の結果、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの電流密度(発現量)は発達に伴いむしろ増大していた。一方、マウス心筋活動電位の主要な再分極成分である一過性外向き電流(transient outward current)の電流密度が発達に伴い増大しており、活動電位持続時間が発達に伴い短縮していることが判明した(図5)。L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルからの  $\text{Ca}^{2+}$  流入時間と相関する活動電位持続時間の短縮は陽性変力反応の減弱の原因となる。その証拠に、 $\text{K}^+$  チャンネル開口薬 cromakalim により活動電位持続時間を短縮させると、新生仔心筋の  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応が減弱した。

**結論 2-1:** 発達に伴う活動電位持続時間の短縮により心筋収縮への L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの寄与が低下する。これが原因で  $\alpha$  受容体刺激に対する陽性変力反応が減弱する。

### 陰性変力反応の発達変化

陰性変力反応に関与している NCX の機能について、その阻害薬 SEA0400 を用いて薬理的に検討した。SEA0400 の収縮力増大作用が発達に伴い増大し、NCX の  $\text{Ca}^{2+}$  排出機能が発達に伴い増大していることが判明した(図6)。しかし NCX のタンパク発現量は発達に伴いむしろ減少することが報告されている。それにもかかわらず NCX による  $\text{Ca}^{2+}$  排出が発達に伴って増大する理由の1つとして、活動電位持続時間の短縮が考えられる。NCX は3つの  $\text{Na}^+$  と1つの  $\text{Ca}^{2+}$  を交換する起電性のトランスポーターであるため、活動電位持続時間が短いほど  $\text{Ca}^{2+}$  排出機能が強くなる。したがって、発達に伴う活動電位持続時間の短縮(図5)は、NCX による  $\text{Ca}^{2+}$  排出を増大させると考えられる。

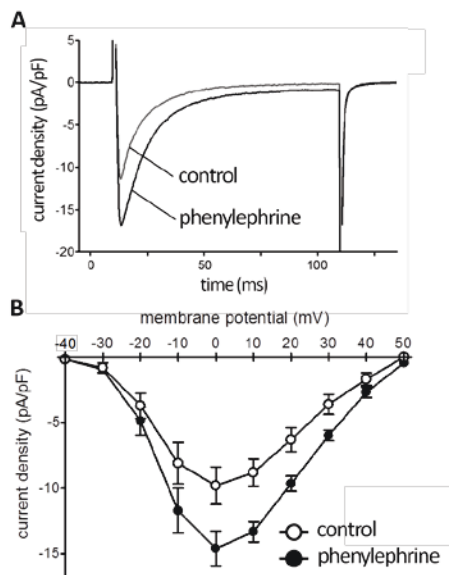


図3 新生仔心筋 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル電流に対する  $\alpha$  受容体刺激の影響  
A: typical trace B: 電流電圧関係

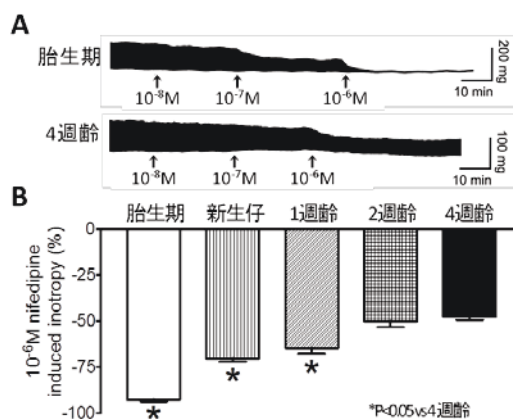


図4 収縮力に対する nifedipine の作用  
A: typical trace  
B:  $10^{-6}\text{M}$  nifedipine による収縮力減弱作用

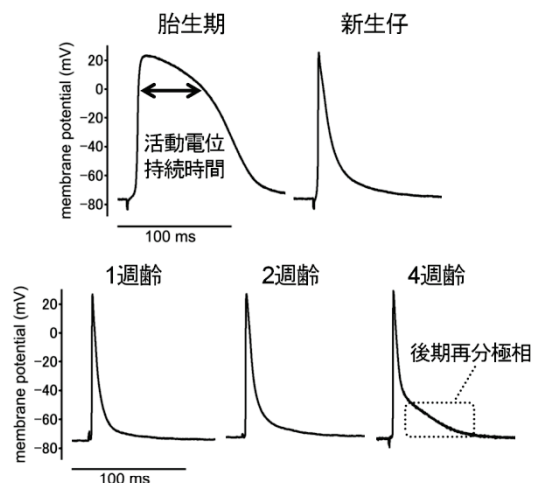


図5 マウス心室筋の活動電位の発達変化

発達に伴い NCX の  $\text{Ca}^{2+}$  排出機能が增大するもう 1 つの理由として、筋小胞体との連関が強まっていくことが考えられる。筋小胞体が発達し NCX と近接することで、 $\text{Ca}^{2+}$  が筋小胞体から供給されるようになる、つまり筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  放出機能が增大することで NCX の  $\text{Ca}^{2+}$  排出機能も増大するはずである(図8)。そこで筋小胞体機能について、その阻害薬 ryanodine を用いて薬理的に検討した。Ryanodine の収縮力減弱作用は発達に伴い増大し、筋小胞体機能が発達に伴い増大していることが判明した(図7)。蛍光イメージング法により筋小胞体が細胞中心部から細胞膜付近へと順に発達し、その存在量が增大することも明らかとなった(図9)。一方 NCX が存在する細胞膜が細胞内部へと陥入した T 管構造は、新生仔までは観察されず、1 週齢では細胞膜付近にのみに、2 週齢以降では細胞中心部にまでに陥入していることが明らかとなった(図9)。これは 2 週齢以降の T 管陥入により、細胞膜上の NCX と、細胞内部の筋小胞体が近接することを意味している。さらにマウス心室筋の活動電位には NCX の  $\text{Ca}^{2+}$  排出により形成される後期再分極相と呼ばれる部分があるが(図5)、この後期再分極相が 2 週齢以降に観察され、NCX 阻害薬 SEA0400 だけでなく、筋小胞体阻害薬 ryanodine によっても同じように消失したことも、NCX と筋小胞体が機能的に連関していることの証拠である。

**結論 2-2:** 発達に伴う活動電位持続時間の短縮及び筋小胞体機能の増大により NCX を介した細胞外への  $\text{Ca}^{2+}$  排出が増大する。これが原因で  $\alpha$  受容体刺激に対する陰性変力反応が増大する。

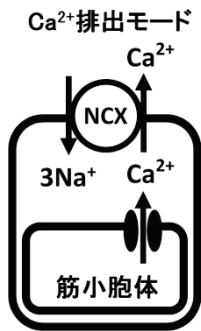


図8 NCX-筋小胞体連関

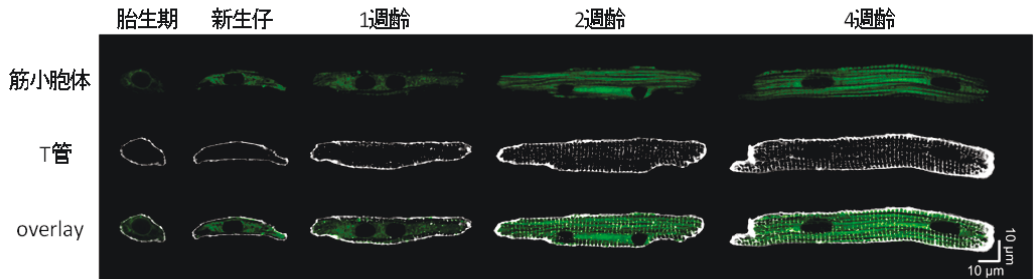


図9 共焦点顕微鏡による筋小胞体および T 管の観察

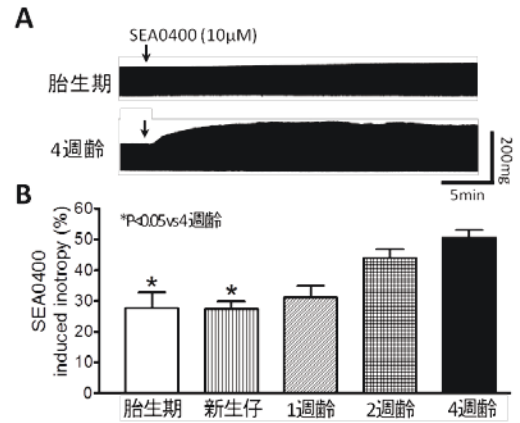


図6 収縮力に対する SEA0400 の作用  
A: typical trace  
B: SEA0400 による収縮力増大作用

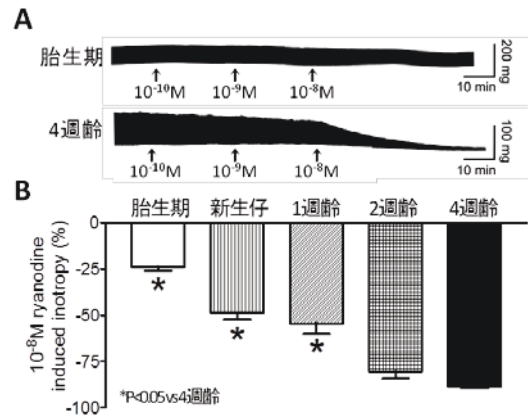


図7 収縮力に対する ryanodine の作用  
A: typical trace  
B: 10<sup>-8</sup>M ryanodine による収縮力増大作用

### 3) 糖尿病マウス心筋の $\alpha$ 受容体刺激応答

発達変化において見られたものと同様の $\alpha$ 受容体刺激応答と興奮収縮機構の関連性が病態時の変化においても見られるか否か検証するため、streptozotocin 誘発糖尿病マウス心筋を用いて検討した。4週齢の ddY 系雄性マウスに streptozotocin(200 mg/kg)を腹腔内投与し、4~6 週間飼育後、血糖値が 350 mg/dl 以上のものを糖尿病マウスとして用いた。

糖尿病マウス心筋の $\alpha$ 受容体刺激応答は陰性変力反応であったが、その程度は正常心筋に比べ減弱していた。糖尿病心筋では NCX による  $\text{Ca}^{2+}$ 排出を阻害する SEA0400 の収縮力増大作用は減弱しており、さらに NCX 機能と関連する活動電位持続時間が糖尿病心筋では延長していることも明らかとなった。この結果から糖尿病心筋では NCX の  $\text{Ca}^{2+}$ 排出機能が低下していることが示唆された。筋小胞体機能の指標として心筋の弛緩機能に注目した。糖尿病心筋では弛緩時間および  $\text{Ca}^{2+}$  transient の  $\text{Ca}^{2+}$ 減衰時間がどちらも正常心筋に比べ延長していた。糖尿病心筋では筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプ阻害薬 cyclopiazonic acid による弛緩時間延長作用と  $\text{Ca}^{2+}$ 減衰時間延長作用は減弱しているが、筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプ活性化薬 ellagic acid および gingerol による弛緩時間短縮作用と  $\text{Ca}^{2+}$ 減衰時間短縮作用は逆に増強されていた。これらの結果から、糖尿病心筋では筋小胞体機能が低下していることが示唆された。

**結論 3:** 糖尿病マウス心筋では、活動電位持続時間の延長と筋小胞体機能の低下により NCX を介した細胞外への  $\text{Ca}^{2+}$ 排出が減少しており、これが原因で $\alpha$ 受容体刺激に対する陰性変力反応が減弱している。すなわち、成体心筋と幼若心筋の間で見られたものと類似の対比が正常心筋と糖尿病心筋の間で見られる。

#### 【結語】

マウス心室筋収縮のアドレナリン $\alpha$ 受容体刺激応答には陽性、陰性の 2 つの成分が存在し、そのバランスにより全体の反応の方向性と大きさが決まることが判明した(図10)。陽性、陰性各成分を担う L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルおよび  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の機能を規定しているのはこれらの発現量ではなく、活動電位波形と筋小胞体機能という興奮収縮機構の基本的特徴であった。すなわち、“活動電位持続時間が短く、筋小胞体機能が高い心筋ほど、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルからの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入の役割は小さく、NCX による  $\text{Ca}^{2+}$ 排出の役割は大きい”という法則に基づき、アドレナリン $\alpha$ 受容体刺激応答の発達変化と糖尿病時の変化を統一的に説明することができた。このように心筋収縮の刺激応答を興奮収縮機構と関連付けて解明することにより多様な心機能を統一的に理解できると考える。

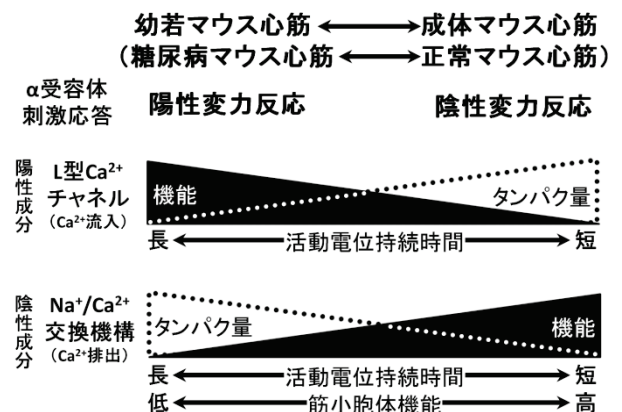


図10  $\alpha$ 受容体刺激応答と興奮収縮機構の関係

#### 【対象論文】

- 1) **Shogo Hamaguchi** et al., Developmental changes in excitation–contraction mechanisms of the mouse ventricular myocardium as revealed by functional and confocal imaging analyses. *J Pharmacol Sci.* 123(2):167-175, 2013
- 2) Iyuki Namekata, **Shogo Hamaguchi** et al., Ellagic acid and gingerol, activators of the sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, ameliorate diabetes mellitus-induced diastolic dysfunction in isolated murine ventricular myocardia. *Eur J Pharmacol.* 706(1-3):48-55, 2013

## 濱口正悟氏 博士論文審査結果の要旨

心臓は循環系において血液を拍出するポンプであるが、その働きは体の必要に対応すべく自律神経や各種ホルモンにより制御されている。心筋収縮力の生理活性物質に対する応答は一様ではなく、同一の物質に対しても動物種や発達段階、病気の有無により反応の方向性や大きさは様々である。濱口氏の研究は、この心筋の応答の多様性を興奮収縮機構の基本的性質と関連づけて論理的・統一的に理解することを目指したものである。交感神経系は心臓機能の最大の制御要因であるが、伝達物質のノルアドレナリンは $\alpha$ 受容体および $\beta$ 受容体に作用して収縮力に影響を与える。 $\beta$ 受容体の刺激が心筋の種類によらず常に陽性変力反応(収縮力増大)をもたらすのに対し、 $\alpha$ 受容体刺激に対する応答は心筋の種類により陽性変力反応、陰性変力反応(収縮力減少)、無反応と様々である。濱口氏が研究対象として選んだマウス心室筋収縮のアドレナリン $\alpha$ 受容体刺激応答は、新生仔心筋では陽性であるが、生後発達に伴い徐々に変化し、成体心筋では陰性変力反応となる。マウス心筋は生後発達に伴い、電気生理学的性質や細胞内カルシウムイオン動態など興奮収縮機構も大きく変化することが示唆されている。そこで濱口氏はこの $\alpha$ 受容体刺激応答の発達変化を刺激応答と興奮収縮機構の関連性を研究するモデルと捉え、摘出心筋の収縮力測定、電気生理学的手法、蛍光イメージング法および薬理学的手法を駆使し、研究を行った。

まず陽性・陰性それぞれの変力反応に対し薬理学的検討を加えた結果、陽性変力反応はカルシウムチャネルを介した細胞外からの $\text{Ca}^{2+}$ 流入を、陰性変力反応は $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構による細胞外への $\text{Ca}^{2+}$ 汲み出しの増大を、それぞれ介していることが判明した。陽性、陰性それぞれの変力反応が、異なった機序を介していることが明らかになったことで、各反応の発達変化を個別に研究することが可能になった。発達に伴う陽性変力反応の減弱は、L型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルからの $\text{Ca}^{2+}$ 流入時間と相関する活動電位持続時間の短縮と時間的に相関しており、発達に伴う興奮収縮機構の細胞膜依存型から筋小胞体依存型への変化が原因であることが判明した。薬理学的処置による活動電位の強制的短縮実験の結果もこの結論を指示するものであった。発達に伴う陰性変力反応の増大は、活動電位持続時間の短縮による $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の $\text{Ca}^{2+}$ 汲み出し能力の増大によるものであることが判明した。筋小胞体と $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の協調的働きによる $\text{Ca}^{2+}$ 汲み出しの指標である活動電位の後期再分極相が生後発達に伴い出現するという結果もこの結論を支持するものであった。濱口氏はさらに心筋の病態時の変化についても検討し、糖尿病マウスの心筋は、正常心筋に比べて活動電位持続時間が長い上に、筋小胞体機能が低下していることを明らかにした。糖尿病心筋のアドレナリン $\alpha$ 受容体刺激応答は陰性であったが、その大きさは正常心筋に比べ減弱していた。つまり、成体心筋と幼若心筋の間で見られたのと類似の対比が正常心筋と糖尿病心筋の間で見られたことになる。これらの結果から“活動電位持続時間が短く、筋小胞体機能が高い心筋ほど、L型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルからの $\text{Ca}^{2+}$ 流入の役割は小さく、 $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構による $\text{Ca}^{2+}$ 排出の役割は大きい”という法則が導かれ、これにより、マ

ウス心筋の生後発達に伴う変化と、病態時の変化を統一的に説明することが出来た。

濱口氏の研究は有効な実験手法を総動員する包括的アプローチを特徴とするが、その最大の成果は心筋応答の多様性の統一的な説明に成功したことである。すなわち、発達や病態に伴う活動電位持続時間の変化をL型Ca<sup>2+</sup>チャンネルおよびNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換機構の挙動と関連づけ、さらにα受容体刺激応答の変化へと論理的につなげることが出来た。一般に研究対象に対する科学的理解は、現象の観察・記述に始まり、普遍的法則性および機序の解明に到達し、さらには数理モデル構築による現象の予測・制御へと発展するものであるとも表現できる。心筋の発達変化や病態時の変化に関しては数多くの研究がなされているが、そのほとんどが個別の現象の観察・記述にとどまっており、普遍的理解を目指した例はきわめて少ない。濱口氏の研究は機能性分子の挙動に注目することにより“法則性および機序の解明”の段階にまで到達した意欲的なものであり、さらに数理モデルを構築するための基盤を形成するものでもあるという意味で高く評価できるものである。

興味深いことに、マウス心臓における陽性、陰性各変力反応の主役であることが判明したカルシウムチャンネルおよびNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換機構のタンパク発現量は、変力反応とは逆に、それぞれ発達に伴い増加および減少することが報告されている。つまり、これらのタンパク質の働きの大きさを規定しているのはその発現量ではなく、むしろ活動電位持続時間という背景要因であると結論された。現代の生命科学は分子生物学的手法による個別のタンパク質の構造や発現量の詳細な解析を中心に発達してきたが、一般にタンパク質の発現量と機能は相関するものであることを前提に結論が導かれ、細胞機能が理解されている。濱口氏の上記の結論は、生細胞中でのタンパク質の機能は膜電位、イオン濃度、周辺に存在するオルガネラなど、細胞環境の違いに応じて大きく異なっていることを示しており、生命現象の理解のためには細胞機能をあらゆる視点から捉える多面的・包括的アプローチが必須であることをあらためて示すものである。

このように濱口正悟氏の論文は、心臓機能制御に関する普遍的理解に大きく貢献するとともに、生命科学のあり方についても示唆に富むものである。従って、濱口正悟氏は博士(薬学)に値すると結論する。

平成 26 年 2 月 26 日

東邦大学薬学部薬物学教室

田 中 光