

学位番号甲第 500 号

学位申請者 : 丸 山 博 子

主 論 文 : Impact of manipulation of energy substrates on
sinus nodal rhythm

(洞結節リズムに対するエネルギー基質の影響)

著 者 : Hiroko Maruyama, Masanori Ito, Nobuhito Goda,
Satomi Adachi-Akahane

公 表 誌 : Journal of the Medical Society of Toho University 61 (1) : 13-23, 2014

論文内容の要旨 :

心臓の高いエネルギー需要は、複数のエネルギー基質を ATP 産生に利用できる代謝調節により満たされている。生理的条件下では、心臓で産生される ATP の 60~80% は脂肪酸 β 酸化により産生され、残りはグルコースや乳酸などの炭水化物とケトン体の酸化から得られている。本研究の目的はエネルギー基質が洞房結節（洞結節）リズムに及ぼす影響を明らかにすることである。マウスの摘出心房筋の自発的な拍動数を、37°C に保温し酸素飽和させた改変 Tyrode 溶液中で静止張力を掛けて測定した。以下の 3 種類のエネルギー基質の条件で心房筋の拍動数を比較検討した。①10mM のグルコースと 0.4mM パルミチン酸（コントロール群）、②グルコースを 5mM に半減（低グルコース群）、③パルミチン酸を除去（脂肪酸欠損群）。

低グルコース群では、コントロール群に比べて拍動数は有意に低かった。脂肪酸欠損群においても、コントロール群に比して拍動数は有意に低かった。エネルギー基質を欠損させると拍動数が低くなるという結果を得たことから、エネルギー基質の変化が心房筋のエネルギー代謝に及ぼす影響を明らかにするために、3 群間における心房筋の代謝産物をメタボローム解析により網羅的に測定した。解糖系とクエン酸回路の代謝産物のレベルは 3 群間で差はみられなかった。ATP レベルについては、低グルコース群ではコントロール群よりも低かった。コントロール群と低グルコース群においては、拍動数と ATP レベルは正の関係を示した。一般的に ADP/ATP 比は心筋細胞のエネルギー状態を示し、この値が大きいと、ATP の供給が低下しているか、もしくは ATP の消費が亢進し

ていることを意味する。コントロール群と低グルコース群においては、拍動数が低下すると ADP/ATP 比は大きくなる傾向にあった。一方、脂肪酸欠損群の ATP レベルはコントロール群と同程度であった。意外なことに、コントロール群と脂肪酸欠損群においては、拍動数と ATP レベルに負の関係がみられた。拍動数と ADP/ATP 比の間には相関はみられなかった。以上の結果から、低グルコース群における拍動数の低下は、ATP 供給の不足に起因した結果と考えられた。一方、脂肪酸欠損群における拍動数の低下は、ATP 供給の不足に起因しない他のメカニズムによる結果と考えられた。

次に低酸素によるエネルギー代謝の変化が洞結節のペースメーカー活動に及ぼす影響を評価した。酸素飽和させた改変 Tyrode 溶液中で摘出心房筋の拍動数を安定化させた（酸素化条件）。酸素投与を 10 分間中止した（低酸素条件）後、100%酸素を 20 分間再投与した（再酸素化条件）。コントロール群では、低酸素条件において、拍動数が時間依存性に減衰した。再酸素化により酸素化条件と同程度まで拍動数は回復した。低グルコース群では、低酸素条件において、拍動数はコントロール群とほぼ同等のレベルまで低下したが、再酸素化による回復は悪かった。低グルコース群ではエネルギー代謝における脂肪酸 β 酸化の寄与が大きくなるが、脂肪酸はエネルギー効率がグルコースよりも低いため拍動数の回復が低下したものと推測された。一方、脂肪酸欠損群では、低酸素条件において、拍動数はコントロール群に比べ下がりにくい傾向にあったが、10 分後にはほぼ同等のレベルまで低下した。再酸素化により拍動数は酸素化条件と同程度まで回復した。心臓では低酸素に曝されると解糖系が亢進する。脂肪酸欠損群では、エネルギー基質は 100%グルコースに依存しているため、低酸素刺激下でも洞結節リズムは維持された可能性が考えられた。

次に、酸素化条件および低酸素条件における心房筋のグルコース消費量を測定した。コントロール群では、低酸素条件 10 分後のグルコース消費量は酸素化条件のグルコース消費量と比べて有意に増加した。低グルコース群では、酸素化条件および低酸素条件において、コントロール群に比べ、グルコース消費量が有意に低かった。低グルコース群では、エネルギー代謝における脂肪酸の β 酸化への寄与が大きくなるため、グルコースの酸化および解糖系が抑制されたと推測された。一方、脂肪酸欠損群では代謝基質は 100%グルコースに依存するためグルコース消費量が増加すると予想していたが、意外なことに、酸素化条件におけるグルコース消費量は、脂肪酸欠損群とコントロール群で差がなかった。しかし、低酸素条件では、脂肪酸欠損群はコントロール群よりも早期からグルコース消費量の増加がみられた。通常、低酸素状態において、心臓のエネルギー代謝は脂肪酸 β 酸化から解糖系へシフトする。低酸素暴露により、脂肪酸欠損群においてエネルギー基質がグルコースへシフトしていることが露呈したものと考えられた。コントロール群と低グルコース群では、酸素化条件において拍動数とグルコース消費量に正の関係が認められた。これは拍動数と ATP レベルの関係と一致する結果であった。一方、酸素化条件におけるコントロール群と脂肪酸欠損群においては、拍動数とグルコース消費量との間に有意な相関はみられなかった。

以上の結果より本研究において、グルコース代謝により産生された ATP が洞結節リズムの維持に必要であることが明らかになった。また、脂肪酸は、ATP 産生とは別の調節機構を介して洞結節の拍動数の制御に関与している可能性を見いだした。洞結節においては、脂肪酸の酸化からグルコースの酸化へエネルギー代謝をシフトさせることにより、ATP の産生効率を確保し、代謝障害から洞結節の機能を保護できるものと考えられる。

1. 論文審査の要旨および担当者

学位番号甲第 500 号	氏 名	丸 山 博 子
論文審査担当者	主 査	佐 地 勉
	副 査	池 田 隆 徳
	副 査	高 松 研
	副 査	東 丸 貴 信
	副 査	山 下 茂
<p>論文審査の結果の要旨 :</p> <p>今回の研究は、糖、脂肪酸などのエネルギー基質が洞結節細胞に与える影響と、培養 Tyrode 液の異なる酸素濃度の設定条件下における洞結節機能を観察した研究である。この研究は心臓のリズム異常や不整脈の発症メカニズムの領域にも関連し、これまでの心室筋細胞で得られた情報と異なり、新しい着眼点と言える。</p> <p>方法は、C57BL 雄の成熟マウスから摘出した心房筋を改変 Tyrode 液中で懸垂して、収縮または拍動数を測定し心房筋の β 受容体刺激 (Isoproterenol) に対する正常反応の確認 (Fig1 上図)。</p> <p>Isoproterenol に対して、10^{-7}M を peak にした濃度依存性の拍動数増加が確認され、標本の妥当性が示された (Fig1 下図)。まず、エネルギー基質 (グルコース、脂肪酸) の変化が拍動数に及ぼす影響が検討され、② 低グルコース (5mM グルコース+0.4mM パルミチン酸) 条件下では、① 対照群 (10mM グルコース+0.4mM パルミチン酸) に比べ拍動数が低下した。また③ 脂肪酸欠損群 (10mM グルコースのみ) 条件下でも有意に拍動数が低下した。</p> <p>小括 1 糖や脂肪酸の濃度低下により洞結節のペースメーカー活動が抑制され徐脈となった。</p> <p>ついで、①②③の条件下での energy 代謝に及ぼす影響を見るため、自発収縮している摘出心房筋の代謝産物を測定した (メタボローム解析)。解糖系とクエン酸回路 (TCA 回路) の代謝産物の値は①~③の 3 群間 (左から対照群、低グルコース、脂肪酸欠乏) で有意差はなかった (Fig2)。ATP レベルは②低グルコース群で①対照群より低下していた。一方、③脂肪酸欠損群では①対照群と同程度の値であった (Fig3)。ATP と拍動数の関連性をみると、②低グルコース群において、拍動数と ATP レベル間に正の相関が認められた。また拍動数が低下すると ADP/ATP 比が大きくなった。(この比は心臓のエネルギー状態を示し、大きいと ATP の供給が低下しているか、ATP の消費が亢進していることを意味する) (Fig 4 上)。一方、③脂肪酸欠損群では、拍動数と ATP レベルに負の相関がみられたが、拍動数と ADP/ATP 比には有意な相関がなかった (Fig 4 下)。</p> <p>小括 2 低グルコース状態での拍動数と ATP レベルの相関に関して、低グルコース群における拍動数低下は ATP 供給の不足に起因している。一方、脂肪酸欠損状態においては、拍動数は低下したが ATP レベルは保たれていた。つまり脂肪酸欠損での拍動数低下は ATP 供給の不足に起因しないことが判明し、他のメカニズムによるものが疑われた。さらに、①~③の 3 つの条件下で、低酸素状態における拍動数を検討した。まず 1) 拍動数を 20 分間</p>		

安定させた＝酸素下条件、2) 酸素通気を5分ないし10分間停止した＝低酸素条件、3) 酸素通気を再開し、再度20分間安定化させた＝再酸素下条件で行った。

拍動数は②低グルコース群(■バー)では、酸素下条件下ですでに対照群に比べ低下しており(†印)、低酸素条件下においては対照群(□バー)とほぼ同程度まで低下した。(上図右側は%表示)(Fig 5 上図) ③脂肪酸欠乏群(⊠ 灰色バー)では、酸素下条件下ですでに対照群に比べ拍動数が(◆印)低下しており、低酸素条件下においても10分後には同程度に低下した(Fig 5 下図)。

小括3 低グルコース、脂肪酸欠乏状態では、低酸素条件でさらに拍動数が低下し、再酸素下条件においても低下したままであった。(対照群では、再酸素下条件で拍動数が回復した)。

最後にグルコース消費量を、酸素下条件と低酸素下条件で測定した結果、②低グルコース条件下では酸素下条件、低酸素下条件においても対照群に比しグルコース消費量が有意に低下していた(■バー)。(Fig 6 上左図)

③脂肪酸欠乏下条件では、酸素下条件ではグルコース消費量は有意に低下しておらず、一方低酸素下条件ではグルコース消費量が対照群に比し増加した(⊠ 灰色バー)。(Fig 6 上右図)。酸素下条件における拍動数とグルコース消費量の関係は、対照群と低グルコース群では正の相関を示し、拍動数上昇とともにグルコース消費が増加した。一方、脂肪酸欠乏条件では、拍動数とグルコース消費量は相関しなかった(Fig 6 下図)。

小括4 低グルコース条件では、低酸素で拍動数の回復が悪く、グルコース消費量とATPレベル減少に伴い拍動数が低下する。グルコースは洞結節の機能維持に必要なエネルギー基質である。脂肪酸欠乏条件では、低グルコースや、低酸素条件下においても、洞結節機能は維持された。グルコース消費量やATPレベルと拍動数には相関がなかった。つまりグルコース消費やATP産生に依存しないメカニズムによって拍動数が低下していると考えられた。

以上より、本研究により洞結節リズムの維持には、グルコース代謝により産生されたATPが必要であり、一方脂肪酸はATP産生とは別の機序を介して関与している可能性が判明した。心臓のATP産生の60～80%は脂肪酸β酸化により産生されており、残りはグルコースとケトン体の酸化から得られている。ある種の条件下では、特に先天代謝異常など脂肪酸代謝異常症では、脂肪酸酸化からグルコースの酸化へエネルギー産生をシフトさせATPの産生を確保していると結論された。

審査では、Tyrode灌流液の組成とヒトにおける生理的条件との差、加えたInsulinの影響、心房筋の疲弊について(実験施行時間)、観察時間は10分以内か、虚血状態は無かったか、酸素下条件の妥当性、ヒトでは虚血時ATP産生はどうなっていると予測するか、等が質問されたが著者は適切にその機序について応答出来ていた。この一連の研究は、研究成果が乏しい洞結節機能における新しい知見と思われ、論文の内容も充実しており、学位に相当する貴重な研究論文と思われた。

