

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Angiotensin II がモルモット肺静脈心筋自動能に与える影響
作成者（著者）	田中, 悠介
公開者	東邦大学
発行日	2020.03.15
掲載情報	東邦大学大学院薬学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 田中 光 /
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲962号
学位記番号	甲126号
学位授与年月日	2020.03.15
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD49212613

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

Angiotensin II がモルモット肺静脈心筋自動能に与える影響

薬理学教室 田中 悠介

【背景・目的】

肺静脈は肺と心房を繋ぐ血管であるが、その管壁には心房筋から連続する心筋層（肺静脈心筋）が存在する（図 1）。肺静脈心筋は自動能、すなわち、電氣的自発活動（活動電位）を発生し易い性質を有する。心臓のペースメーカーである洞房結節は自発活動を示すことで心臓の規則正しい拍動を支えるが、肺静脈心筋の自発活動はむしろ心臓拍動を乱す危険がある。実際、心房細動の原因の大部分が肺静脈から心房に伝わる電氣的興奮であることが判明し、肺静脈心筋は治療ターゲットとして注目されている。

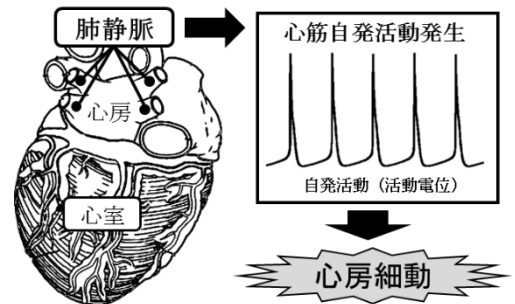


図 1 肺静脈心筋と心房細動

心房細動は心房が 1 分間に 400-600 回程度の高頻度で不規則に細かく震える不整脈であり、我が国には約 130 万人の患者が存在するといわれている。心房細動自体は致死的では無いものの、心原性脳梗塞や血栓塞栓症を誘発する危険があるため、治療の必要性は高い。心房細動のリスク要因として知られる高血圧や心不全などの病態下では renin-angiotensin 系が慢性的に活性化しており、これが心房細動誘発の一因であると考えられる。Renin-angiotensin 系の活性本体である angiotensin II は、心房に長期的に影響を与えて組織のリモデリングを促進し、心房細動を起こしやすい状態を作り出すと考えられてきた。一方、angiotensin II の心筋への急性作用に関する検討は少ない。私は、angiotensin II が心房細動の発生源である肺静脈心筋に対し急性的に作用し、心房細動の発生に関与するのではないかと考えた。本研究では電気生理学的観点から angiotensin II が肺静脈心筋自動能に与える影響を明らかにするとともに、その機序解明を目指した。

【方法】

Hartley 系モルモット (350 - 450g 雄) から心肺を摘出し、肺静脈組織標本を作製した。肺静脈心筋の自発活動は収縮力または活動電位として検出した。収縮力の測定にはアイソメトリックトランスデューサー、細胞内活動電位測定にはガラス微小電極を用いた。細胞形態及び細胞内 Ca^{2+} 動態は、単離肺静脈心筋細胞に Ca^{2+} 感受性蛍光プローブ (fluo-4 AM) を負荷し、高速走査型共焦点顕微鏡 (Nikon A1R) を用いて可視化した。

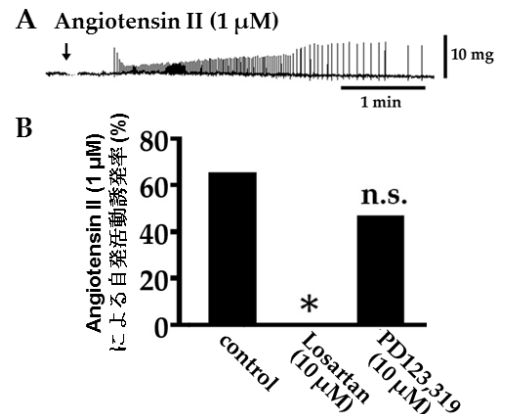


図 2 Angiotensin II による自発活動の誘発
A: typical trace B: 自発活動誘発率

【結果・考察】

1) Angiotensin II による肺静脈心筋自発活動の誘発 (収縮力測定)

摘出肺静脈組織標本のうち、約 3 割が自発収縮を示した。自発収縮を示さない標本に angiotensin II を投与すると、約半数で一過性に自発収縮が誘発された（図 2）。自発収縮の誘発は、losartan (AT_1 受容体遮断薬) の前処置によってほぼ完全に抑制された。一方、PD123,319 (AT_2 受容体遮断薬) の前処置は、angiotensin II の自発収縮誘発を抑制しなかった。これらの結果より、angiotensin II が AT_1 受容体を介して電氣的自発活動を誘発することが判明した。

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。

2) Angiotensin II による自発活動への筋小胞体の関与 (Ca²⁺蛍光イメージング)

肺静脈組織に存在する心筋以外の組織 (血管内皮、神経終末、平滑筋など) の影響を排除して心筋に対する直接作用を検討できる単離肺静脈心筋細胞を用い、angiotensin II による自発活動誘発の機序を検討した。単離心筋細胞への angiotensin II の投与は2種類のCa²⁺の動き、すなわちCa²⁺ spark およびCa²⁺ transient を誘発した (図 3)。Ca²⁺ spark は心筋細胞内の微小領域での非伝播性のCa²⁺上昇であり、筋小胞体からのCa²⁺ 放出を反映する。Ca²⁺ transient は心筋細胞全体でのCa²⁺ 上昇であり、活動電位の発生に相当する。肺静脈心筋細胞でCa²⁺ transient の発生に先行するCa²⁺ spark 発生頻度の経時変化を解析したところ、Ca²⁺ transient が発生する直前にCa²⁺ spark 発生頻度が顕著に増加していた (図 4)。これは、Ca²⁺ spark の増加がCa²⁺ transient 発生の原因となっていることを示している。Angiotensin II によるCa²⁺ spark の発生頻度増加及びCa²⁺ transient の誘発は losartan および xestospongine C (IP₃受容体遮断薬) の前処置によりそれぞれ抑制された。これらの結果から、angiotensin II は肺静脈心筋細胞膜上のAT₁受容体を直接刺激し、筋小胞体のIP₃受容体を介したCa²⁺放出 (Ca²⁺ spark) を促進することで電気的自発活動 (Ca²⁺ transient) を誘発していることが明らかになった。

結論 2: Angiotensin II による自発活動の誘発には筋小胞体のIP₃受容体からのCa²⁺放出が関与する。

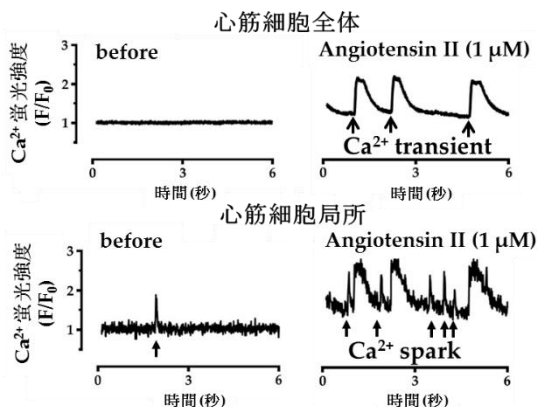


図 3 Angiotensin II による Ca²⁺ 動態の活性化

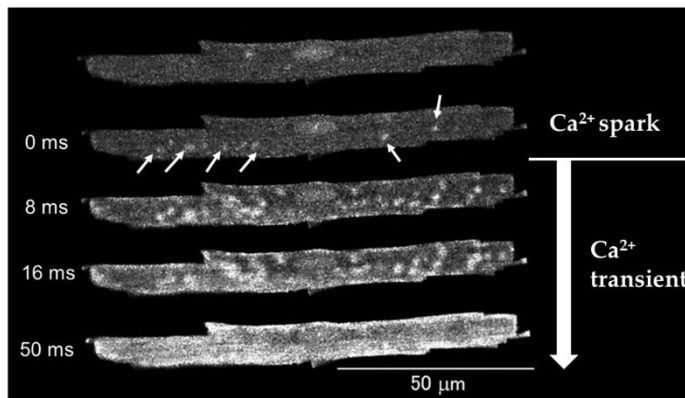


図 4 Ca²⁺ spark の増加と Ca²⁺ transient

3) Angiotensin II による緩徐脱分極の形成 (活動電位測定)

Angiotensin II による筋小胞体からのCa²⁺放出の促進がいかなる機序で電気的自発活動につながるのか、活動電位測定により検討した。肺静脈標本の約3割が心筋層で電気的自発活動を発生しており、活動電位に先行して緩やかな脱分極 (緩徐脱分極) を示した。緩徐脱分極は自動能を持つ心筋に特有の現象であり、電気的自発活動の歩調取りとして働く。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、約6割の標本で緩徐脱分極が出現するとともに自発活動が誘発された (図 5)。また、自発活動が発生している肺静脈標本に angiotensin II を投与すると、緩徐脱分極の傾きの増大と自発活動の発火頻度の増加が観察された (図 6)。さらに、自発活動が発生していない肺静脈標本に外部電気刺激により

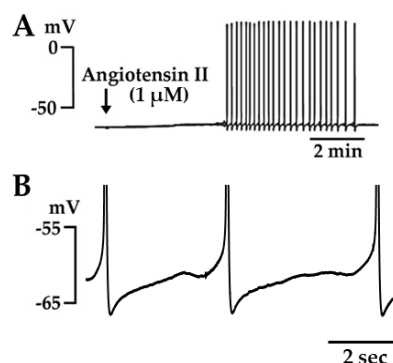


図 5 Angiotensin II による自発活動の誘発
A: typical trace
B: 自発活動発生後の緩徐脱分極

1 秒間隔で活動電位を惹起した条件下でも緩徐脱分極が観察されたが、**angiotensin II** はこの緩徐脱分極の傾きを増大させた。**Angiotensin II** のこれらの作用はいずれも **losartan** 前処置によって完全に抑制された(図 7)。これらの結果より、緩徐脱分極の傾き増大は自発活動発生の結果ではなく原因であり、**angiotensin II** は緩徐脱分極の傾きを増加させることにより肺静脈心筋の自発活動を促進していることが判明した。

Angiotensin II による緩徐脱分極の形成と自発活動の誘発は、**IP₃** 受容体遮断薬である **xestospongine C** の前処置によって抑制されたことから(図 7)、**IP₃** 受容体からの **Ca²⁺** 放出が緩徐脱分極の形成と自発活動誘発に必須であることが明らかになった。さらに、**angiotensin II** による緩徐脱分極の形成と自発活動の誘発は、**Na⁺/Ca²⁺** 交換機構 (**NCX**) 阻害薬である **SEA0400** 及び **nickel** それぞれの前処置によって抑制された。**NCX** は心筋細胞膜上に存在し、細胞外に **Ca²⁺** を排出するのと引き換えに 3 つの **Na⁺** を細胞内に流入させる。従って、**angiotensin II** により **IP₃** 受容体からの **Ca²⁺** 供給が増大し、**NCX** による **Ca²⁺** 排出に伴う内向き電流が増加して緩徐脱分極が形成され、電気的自発活動が誘発されたと考えられる。

結論 3: Angiotensin II によって供給が増大した細胞質 Ca²⁺ 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。

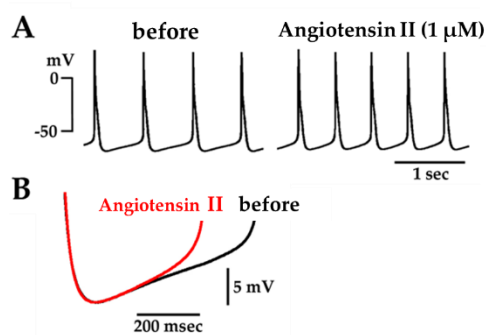


図 6 **Angiotensin II** による自発活動の促進
A: typical trace B: 緩徐脱分極の前後比較

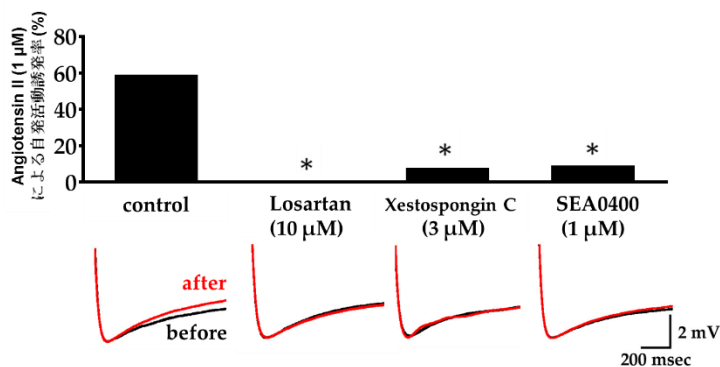


図 7 薬理的処置が **angiotensin II** の作用に与える影響
上段: 自発活動誘発率 下段: 緩徐脱分極の傾き

4) 内因性 **angiotensin II** による肺静脈心筋自発活動の亢進

興味深いことに、**angiotensin II** を投与しなくても自発活動を示している肺静脈標本に **losartan** を投与したところ、緩徐脱分極の傾きの抑制と自発活動頻度の低下がみられた(図 8)。外部から **angiotensin II** を投与していない標本に **losartan** が効いたことから、標本内で **angiotensin II** が産生されている可能性が考えられた。そこで、自発活動を示している標本に **captopril** (**ACE** 阻害薬)を投与したところ、やはり緩徐脱分極の傾きの抑制と自発活動頻度の低下がみられた。さらに、自発活動を示していない標本に **angiotensin II** の前駆体である **angiotensin I** を投与したところ、約 5 割の標本で自発活動が誘発された(図 9)。**Angiotensin I** による自発活動の誘発率や発火頻度、持続時間などは、**angiotensin II** によるものとほぼ同じか、わずかに少ない程度であった。**Angiotensin I** による自発活動の誘発は、**angiotensin II** の場合と同様に **losartan** および **captopril** で抑制された。これらの結果から、肺静脈組織内に **angiotensin II** を産生する仕組みが備わっており、外部から何も投与しない状態で観測される自発活動に寄与していることが判明した。ただし、**angiotensin II** により誘発された自発活動が **losartan** や **captopril** でほぼ完全に抑制されたのに対し、何も投与していない標本で見られた自発活動では抑制は完全ではなく、**losartan** や **captopril** 存在下でもいくつかの標本では自発活動が残存した。従って、自発活動の全てが内因性の **angiotensin II** によるものではなく、**angiotensin II** とは無関係の要因も関与していると考えられる。なお、**angiotensin I** による自発活動の誘発に対し **chymostatin** (**chymase**

阻害薬) による抑制は見られなかった。

結論 4: 肺静組織内に 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。

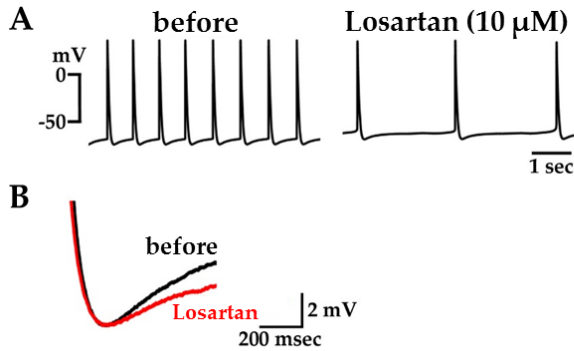


図 8 Losartan が自発活動に与える影響
A: typical trace B: 緩徐脱分極の前後比較

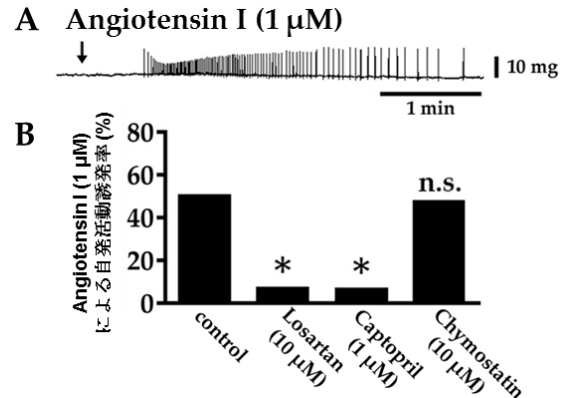


図 9 Angiotensin I による自発活動の誘発
A: typical trace B: 自発活動誘発率

【結語】

モルモット肺静脈心筋を用いた本研究により、angiotensin II が IP₃ 受容体を介して細胞内 Ca²⁺動態を変化させ、これが NCX を介して肺静脈心筋自動能を亢進させることが判明した(図 10)。筋小胞体から放出される Ca²⁺が、膜電位に影響して活動電位を惹起するという点で興味深い機序である。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。

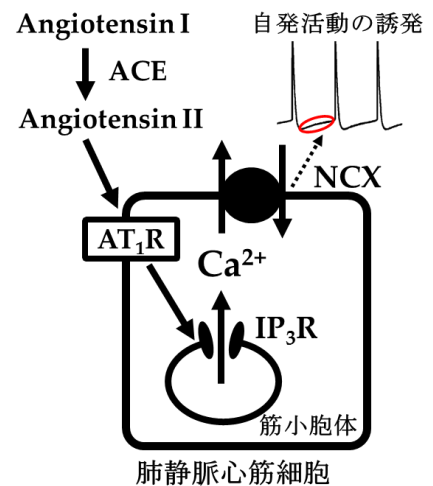


図 10 Angiotensin II の作用機序

【対象論文】

Yusuke Tanaka et al., Angiotensin II induces automatic activity of the isolated guinea pig pulmonary vein myocardium through activation of the IP₃ receptor and the Na⁺-Ca²⁺ exchanger. Int J Mol Sci. 20(7):1768, 2019

Iyuki Namekata, Yusuke Tanaka et al., Cell morphology and early-phase Ca²⁺ transients of guinea-pig pulmonary vein cardiomyocytes compared with atrial and ventricular cardiomyocytes. Bioimages. 27:1-12, 2019

【参考論文】

Shogo Hamaguchi, Yusuke Tanaka et al., Enhancement of automaticity by mechanical stretch in the isolated guinea pig pulmonary vein myocardium. Biol. Pharm. Bull. 39(7):1216-9, 2016

田中悠介氏は angiotensin II が肺静脈心筋の自動能に与える影響を詳細に研究し、細胞内 Ca^{2+} と連動する自発的活動電位の発生機序を明らかにした。肺静脈は肺と心房を繋ぐ血管であるが、その管壁には心房筋から連続する心筋層(肺静脈心筋)が存在する。肺静脈心筋は自動能を持ち、電氣的自発活動(活動電位)を発生しやすい性質を持つ。近年、心房細動の原因の大部分が肺静脈から心房に伝わる電氣的興奮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。心房細動は心房が1分間に400-600回程度の高頻度で不規則に細かく震える不整脈であり、心源性脳梗塞や血栓塞栓症を誘発する危険があるため治療の必要性は高い。心房細動のリスク要因である高血圧や心不全などの病態下では renin-angiotensin 系が慢性的に活性化しており、これが心房細動を誘発する一因であるとされている。renin-angiotensin 系の活性本体である angiotensin II は、心房に長期的に影響を与えて組織のリモデリングを促進し、心房細動を起こしやすい状態を作り出すと考えられており、angiotensin II の心筋への急性作用に関する検討は少ないのが現状である。田中悠介氏は、angiotensin II が心房細動の発生源である肺静脈心筋に対し急性的に作用し、心房細動の発生に関与するのではないかと考え、モルモット摘出肺静脈心筋を用いて細胞膜の電気現象と細胞内 Ca^{2+} 動態の観点から angiotensin II が肺静脈心筋自動能に与える影響とその機序を明らかにすることを目指した。

摘出肺静脈組織標本のうち、約3割が自発収縮を示した。自発収縮を示さない標本に angiotensin II を処置すると、約半数で一過性に自発収縮が誘発され、薬理的検討から AT_1 受容体の関与が明らかになった。単離心筋細胞への angiotensin II の処置は、 Ca^{2+} spark (心筋細胞内の微小領域での非伝播性の Ca^{2+} 上昇、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出を反映) および Ca^{2+} transient (心筋細胞全体での Ca^{2+} 上昇であり、活動電位の発生に相当) の2種類の Ca^{2+} 動態変化を誘発した。経時変化解析の結果、 Ca^{2+} transient が発生する直前に Ca^{2+} spark 発生頻度が顕著に増加しており、 Ca^{2+} spark の増加が Ca^{2+} transient 発生の原因となっていることが示唆された。薬理的検討の結果、angiotensin II は肺静脈心筋細胞膜上の AT_1 受容体を直接刺激し、筋小胞体の IP_3 受容体を介した Ca^{2+} 放出を促進することで電氣的自発活動を誘発していることが明らかになった。

肺静脈標本の約3割が心筋層で電氣的自発活動を発生しており、活動電位に先行して緩徐脱分極がみられた。Angiotensin II により、緩徐脱分極が出現や傾きの増大と電氣的自発活動の発火頻度の増加が観察され、angiotensin II は緩徐脱分極の傾きを増加させることにより肺静脈心筋の自発活動を促進していることが判明した。薬理的検討の結果、angiotensin II により IP_3 受容体からの Ca^{2+} 供給が増大し、 NCX による Ca^{2+} 排出に伴う内向き電流が増加して緩徐脱分極が形成され、電氣的自発活動が誘発されることが明らかになった。興味深いことに、angiotensin II を投与しない状態で観測される自発活動に対しても angiotensin II 誘発自発活動と同じ薬理的性質を示したことから、

肺静脈組織内に angiotensin II を産生する仕組みが備わっており、自発活動に寄与していることが判明した。

田中悠介氏の研究により、angiotensin II が IP_3 受容体を介して細胞内 Ca^{2+} 動態を変化させ、これが NCX を介して肺静脈心筋自動能を亢進させることが判明した。本来は細胞膜の電気現象の支配下にあるはずの細胞内 Ca が、逆に細胞膜に影響して活動電位を惹起すると言う点で興味深い機序である。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来たが、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される。

田中悠介氏は循環器系の解剖生理学および薬理作用に関する専門知識をもとに精力的に本研究を遂行し、高度な実験技術を駆使して一定の結論を導くことに成功した。その成果は2報の英文学術論文として世界に発信することが出来たが、その過程で教室内の後輩達を指導し、研究に引き込むことができた。田中氏は本研究で獲得した科学的視点や論理性を活かして実務家薬剤師として医療に貢献することを志しているが、このような資質を有する田中氏は指導的立場で活躍することが期待される。これらのことから、田中悠介氏は博士(薬学)の学位にふさわしいと判断する。

令和2年2月18日

東邦大学薬学部薬物学教室教授

田中 光