

氏 名	星 野 真 介
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 6 3 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 4 年 9 月 1 2 日
学 位 論 文 題 目	Postnatal developmental decline in $I_{K1}$ in mouse ventricular myocytes isolated by the Langendorff perfusion method: comparison with the chunk method.  (ランゲンドルフ灌流法により単離されたマウス心室筋細胞における内向き整流性 $K^+$ 電流の生後の減衰に関する検討：機械的破碎法との比較)
審 査 委 員	主 査 教 授 岡 村 富 夫 副 査 教 授 三 ッ 浪 健 一 副 査 教 授 等 誠 司

## 論文内容要旨

*整理番号	668	(よりがな) 氏名	ほしの しんすけ 星野 真介
学位論文題目	Postnatal developmental decline in $I_{K1}$ in mouse ventricular myocytes isolated by Langendorff perfusion method: comparison with chunk method. (ランゲンドルフ灌流法により単離されたマウス心筋細胞における内向き整流性 $K^+$ 電流の生後の減衰に関する検討: 機械的破砕法(chunk method)との比較)		
<p>【目的】</p> <p>心室筋細胞における活動電位は神経や骨格筋と同様に細胞膜に存在する種々のイオンチャネルの開閉に伴う膜電流により形成される。電位依存性 <math>Na^+</math>チャネル (<math>I_{Na}</math>)、L型およびT型 <math>Ca^{2+}</math>チャネル (<math>I_{CaL}</math>, <math>I_{CaT}</math>) といった内向き電流と一過性外向き電流 (<math>I_{to}</math>)、4AP感受性超急速活性化型遅延整流 <math>K^+</math>電流 (<math>I_{Kur}</math>)、定常状態外向き <math>K^+</math>電流 (<math>I_{ss}</math>)、急速活性化型遅延整流 <math>K^+</math>電流 (<math>I_{Kr}</math>) ならびに、内向き整流性 <math>K^+</math>電流 (<math>I_{K1}</math>) などの外向き電流が活動電位の形成に関与している。これらの電流は動物種や心室筋細胞の単離方法によっても異なるとの報告がある。また、これらのチャネルの発現には生後変化があり、活動電位や静止膜電位の形成に影響を与えることが知られている。<math>I_{K1}</math>の生後変化に関しては、マウス、ラット、ラビットで生後増加するとの報告があるが、ラットでは生後減少する、あるいは変化しないとの報告もあり、未だ統一した見解が得られていない。通常心室筋細胞を用いて電流記録を行う場合、adultのマウスでは上行大動脈にカニキュレーションを行い、冠状動脈に酵素(コラゲナーゼ、プロテアーゼおよびトリプシン)を灌流するランゲンドルフ灌流を用いて心筋細胞の単離が行われている。しかし新生仔マウスでは心臓が極めて小さいため酵素液中での機械的破砕法(chunk method)が用いられてきた。イヌの心室筋細胞を用いた過去の報告では、遅延整流性 <math>K^+</math>電流はランゲンドルフ灌流法で単離した心室筋細胞では確認できるが、chunk methodで単離した心室筋細胞では記録できず、他の電流も chunk methodにより変化することが示唆される。今回我々はマウス心室筋細胞を全ての日齢においてランゲンドルフ灌流法を用いて単離し、<math>I_{K1}</math>, <math>I_{Kr}</math>, <math>I_{Kur}</math>, <math>I_{ss}</math>, <math>I_{CaL}</math> について生後変化を検討することを目的とした。</p> <p>【方法】</p> <p>本研究では生後0日(day-0)、7日(day-7)、14日(day-14)、adultのC57BL/6Jマウスを使用し、ランゲンドルフ灌流法を用いて心室筋細胞を単離した。比較として生後0日のマウスでは、顕微鏡下で心室筋を取り出し、細かく切り出した後、酵素液の中で浸透し単離する chunk method を用いて心室筋細胞を単離した。活動電位の記録、膜電流の測定には、全細胞型パッチクランプ法を用いた。倒立顕微鏡上に設置した細胞灌流槽に37℃の正常タイロード液を持続的に灌流し、心室筋細胞に対してガラスピペット電極を密着させ、電流および電位を記録した。<math>I_{K1}</math>と<math>I_{Kr}</math>はWestern blotting法を用いてタンパク質レベルでの比較を行い、さらに<math>I_{K1}</math>はreal-time PCRを用いて遺伝子レベルでの定量比較を行った。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。  
2. ※印の欄には記入しないこと。

(続紙)

## 【結果】

ランゲンドルフ灌流法により単離した新生仔マウスの心室筋細胞は長径およそ  $50\ \mu\text{m}$  で横紋のある紡錘形であり、日齢が進むにつれ桿状に変化した。細胞の表面積の指標となる膜容量は day-0 から adult でおおよそ 4 倍に増加した。活動電位は day-0 ではプラトー層があり、相対的に活動電位持続時間 (APD) は長い、日齢と共にプラトー層は短くなり day-14 で adult と同程度となった。静止膜電位は day-0 で最も深く、日齢と共に浅くなった。次に膜電位固定下で  $I_{K1}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ksm}$ ,  $I_{ss}$ ,  $I_{Ca,L}$  電流の記録を行ったところ、 $I_{K1}$  は生後減衰し、 $I_{ss}$ ,  $I_{Ksm}$ ,  $I_{Ca,L}$  は生後増加した。 $I_{Kr}$  は活動電位の第 3 層を形成するが day-0 で最も大きく、adult では活動電位の形成に寄与していなかった。また day-0 で、chunk method とランゲンドルフ灌流により単離した心室筋細胞でこれらの電流の比較を行ったところ、chunk method により単離した心室筋細胞では、 $I_{K1}$  はおよそ 80% の減少を認めた。他の電流は有意差を認めなかった。 $I_{K1}$  は Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3 の 3 つのサブユニットから構成されておりタンパク質および遺伝子レベルでの定量比較を行ったところ、Kir2.1 および Kir2.2 は生後増加するのに対して、Kir2.3 は減少した。 $I_{K2}$  の構成タンパク質である Kv11.1 の発現を調べたところ、細胞膜まで到達した 155 kDa (fully glycosylated) と膜には到達していない未成熟な 135 kDa (core glycosylated) の 2 つのシグナルが検出された。day-0 ではいずれのシグナルも確認できたが、adult では 135 kDa のみが検出された。

## 【考察】

今回の実験で、我々はランゲンドルフ灌流法を用いた新生仔マウスの心室筋細胞の単離に初めて成功し、さらに過去の報告と異なり  $I_{K1}$  が生後日齢と共に減衰することを報告した。

day-0 マウスの心臓は極めて小さく、過去の報告では全て chunk method により心筋細胞は単離されてきた。しかし chunk method により単離された細胞の形態は丸く変形するため、細胞膜に存在するイオンチャネル活性に影響を与える可能性もある。またこれまでは chunk method により単離した心室筋細胞を初代培養後に使用している報告も多い。 $I_{K1}$  は初代培養により小さくなるという報告もあり、日齢に伴う電流の変化を正確に比較ができているとは言い難い。実際に我々がランゲンドルフ灌流により単離した day-0 の心室筋細胞は chunk method で単離した細胞に比べて  $I_{K1}$  は有意に大きく、生後に減衰が見られ、 $I_{K1}$  により形成される静止膜電位は day-0 で最も深かった。 $I_{K1}$  を構成する 3 つのサブユニット Kir2.1, Kir2.2 および Kir2.3 の役割は動物種や心筋の領域によっても異なることと報告されている。我々の実験では Kir2.1, および Kir2.2 は遺伝子およびタンパク質レベルで生後増加がみられたが、Kir2.3 は day-0 で最も発現が多かった。ラットでは新生児期に Kir2.3 が機能的に重要であるとの報告もあるが、 $I_{K1}$  の生後の減衰に関する分子機構は今後更なる検討が必要である。一方、 $I_{K2}$  は日齢と共に減少し、adult では  $I_{K2}$  の特異的ブロッカーである E-4031 を投与しても活動電位には影響しなかった。これより  $I_{K2}$  は新生仔期に重要な役割を果たしていることが示唆された。 $I_{Ksm}$ ,  $I_{ss}$ ,  $I_{Ca,L}$  は過去の報告と一致し生後増加した。

## 【結論】

我々は新生仔マウスでのランゲンドルフ灌流法による心筋細胞の単離に初めて成功し、 $I_{K1}$  が生後減衰することを確認した。これらの発見は、マウス心室筋における電気生理学的機能の生後変化のメカニズムの解明に重要な知見をもたらした。イオンチャネルの転写、翻訳といった分子レベルでの生後変化については今後さらなる検討が必要である。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	668	氏名	星野 真介
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>心室筋細胞における活動電位は神経や骨格筋と同様に細胞膜に存在する種々のイオンチャネルの開閉に伴う膜電流により形成される。これらのチャネルの発現には生後変化があり、活動電位や静止膜電位の形成に影響を与えることが知られている。本研究ではマウス心室筋細胞をランゲンドルフ灌流法ならびに chunk method を用いて単離し、種々のイオンチャネルの機能発現について生後変化を検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) ランゲンドルフ灌流により単離された細胞は chunk method により単離された細胞に比べて内向き整流性 K<sup>+</sup>電流 (<math>I_{K1}</math>) は有意に大きく、日齢と共に減衰する。</li> <li>2) <math>I_{K1}</math> を構成する 3 つのサブユニット Kir2.1、および Kir2.2 は遺伝子およびタンパク質レベルで生後増加がみられたが、Kir2.3 は出生時で最も発現が多い。</li> <li>3) 遅延整流性 K<sup>+</sup>電流 (<math>I_{Kr}</math>) も日齢と共に減少した。これより <math>I_{Kr}</math> は <math>I_{K1}</math> と共に、新生仔期に重要な役割を果たしていることが示唆された。</li> <li>4) <math>I_{Kur}</math>、<math>I_{ss}</math>、<math>I_{Ca,L}</math> は過去の報告と一致し生後増加した。</li> </ol> <p>本論文はマウス心室筋における電気生理学的機能の生後変化のメカニズムの解明に重要な知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 564 字)</p>			
(平成 24 年 9 月 3 日 )			