

氏 名	狭川 浩規
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士甲博士第816号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項
学位授与年月日	平成30年 9月12日
学位論文題目	Postnatal developmental changes in the sensitivity of L-type Ca ²⁺ channel to inhibition by verapamil in a mouse heart model. (マウス心室筋細胞における L 型 Ca ²⁺ チャネルのベラパミル感受性の生後変化)
審査委員	主査 教授 扇田 久和 副査 教授 中野 恭幸 副査 教授 三浦 克之

別紙様式 3 (課程博士・論文博士共用)

論文内容要旨

*整理番号	823	(ふりがな) 氏名	さがわ ひろのり 狭川 浩規
学位論文題目	Postnatal developmental changes in the sensitivity of L-type Ca^{2+} channel to inhibition by verapamil in a mouse heart model (マウス心室筋細胞における L 型 Ca^{2+} チャンネルのベラパミル感受性の生後変化)		
<p>【目的】心筋の収縮機能の調節に関わる細胞質内カルシウムイオン (Ca^{2+}) は、様々な Ca^{2+} 輸送タンパク質によってその細胞内濃度が調節されている。形質膜の膜電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャンネル (I_{CaL}) は心室筋における興奮収縮連関や、洞房結節や房室結節における自動能に関して重要な役割を担っている。臨床の場合においては頻脈性不整脈や高血圧の治療に構造上異なる 3 種類の Ca^{2+} チャンネル遮断薬、すなわちフェニルアルキルアミン系 (ベラパミル)、ジヒドロピリジン系 (ニフェジピン)、ベンゾチアゼピン系 (ジルチアゼム) が用いられている。新生児および乳児ではニフェジピン、ジルチアゼムが用いられている一方で、ベラパミルは低血圧や徐脈をきたすことが知られており、小児不整脈ガイドライン (2010 年) で新生児および乳児におけるベラパミルの使用は禁忌とされている。しかし、その背景となる電気生理学的機序は十分には明らかにされていない。本論文では、異なる発達段階のマウスをモデル動物として用いてマウス心室筋細胞 I_{CaL} におけるベラパミル、ニフェジピン、ジルチアゼムに対する感受性の生後変化 (postnatal developmental changes) を調べ、新生児および乳児にベラパミルの投与で心機能低下が誘発されるメカニズムを明らかにすることを目的とした。得られた知見は Ca^{2+} チャンネル遮断薬の新生児期、乳児期の使用に関する安全性の考察に役立つことが期待される。</p> <p>【方法】本研究では生後 24 時間以内 (day-0)、生後 7 日 (day-7)、生後 14 日 (day-14)、生後 21 日 (day-21)、生後 28 日 (day-28) および生後 10~15 週 (10-15 week) のマウスから心臓を取り出し、ランゲンドルフ灌流法により酵素 (コラゲナーゼ) 処理を行い、心室筋細胞を単離した。全細胞型パッチクランプ法を用いてベラパミル、ニフェジピン、ジルチアゼムに対する薬剤感受性および刺激頻度依存性遮断作用を詳細に調べた。薬剤感受性に関する検討では臨床使用濃度 (血中濃度) を含んだ広い範囲の濃度で検討を行い、得られた用量反応 (抑制) 関係を Hill 式でフィットして半最大抑制濃度 (IC_{50}) を求めた。さらに I_{CaL} は胎仔から成体にかけて Cav1.3 チャンネルから Cav1.2 チャンネルに変換することが知られており、day-7 および 10-15 week マウス心室筋細胞を用いて Western blotting 法で Cav1.2 チャンネルおよび Cav1.3 チャンネルのタンパク質発現量を比較し、さらに Immunocytochemistry 法で Cav1.2 チャンネルおよび Cav1.3 チャンネルの発現の局在を比較した。</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を用いて印字すること。
 2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】ランゲンドルフ灌流法により単離した心室筋細胞の表面積の指標となる膜容量は day-0 (20.7 ± 8.3 pF) から 10-15 week (142.6 ± 10.7 pF) マウス心室筋細胞にかけて生後増加した。 I_{CaL} 電流の大きさも day-0 (4.8 ± 0.9 pA/pF) から 10-15 week (11.0 ± 2.2 pA/pF) マウス心室筋細胞にかけて生後増加した。しかし、半最大活性化電位 ($V_{1/2}$) および勾配因子 (k) はすべての発達段階で有意差を認めなかった。次に薬剤感受性および刺激頻度依存性遮断作用について検討した。ニフェジピン、ジルチアゼムはすべての発達段階でのマウス心室筋細胞で同程度に I_{CaL} 電流を抑制したのに対して、ベラパミルは day-28 および 10-15 week と比較して day-0、day-7、day-14、day-21 マウス心室筋細胞ではより強く I_{CaL} 電流を抑制した。また、ニフェジピンは day-7 および 10-15 week マウス心室筋細胞で刺激頻度依存性遮断作用を示さなかったのに対して、ベラパミルおよびジルチアゼムではともに刺激頻度依存性遮断作用を示した。最後に I_{CaL} の分子基盤としての Cav1.2 チャネルと Cav1.3 チャネルの発現量および細胞内局在を検討した。Cav1.2 チャネルの発現は day-7 および 10-15 week マウス心室筋細胞で認められ、形質膜に局在していた。一方で Cav1.3 チャネルの発現は day-7 マウス心室筋細胞では認められたのに対して 10-15 week マウス心室筋細胞では認めなかった。但し、day-7 マウス心室筋細胞では Cav1.3 チャネルは核周囲に局在するのみで形質膜では観察されなかった。

【考察】本研究結果により、 I_{CaL} のベラパミル感受性は離乳後 (day-28 および 10-15 week) と比較して、離乳前 (day-0、day-7、day-14、day-21) のマウス心室筋細胞で高いことが明らかになった。一方でニフェジピンおよびジルチアゼムでは離乳前後で感受性に差を認めなかった。また、刺激頻度依存性遮断作用に関してはベラパミルに加えてジルチアゼムでも確認された。よって、臨床の場における新生児期・乳児期のベラパミル投与による心機能低下は I_{CaL} のベラパミル感受性が高いことが関与しており、刺激頻度依存性遮断作用は決定的な因子ではないと考えられた。現在のところ、 I_{CaL} のベラパミル感受性の生後変化のメカニズムは十分には解明されていないが、いくつかの可能性が考えられる。例えば、心筋細胞の I_{CaL} は α 、 β 、 γ サブユニットから構成されており、その構成成分の生後変化が関わっている可能性がある。なお、離乳前 (day-7) のマウス心室筋細胞では Cav1.3 チャネルが発現していることが確認されたが、その局在は核周囲のみで形質膜では観察されなかったため、Cav1.3 チャネルは生後の I_{CaL} の機能的な役割に寄与していないと考えられた。

【結論】マウス心室筋細胞における I_{CaL} のベラパミル感受性は、離乳後のマウス心室筋細胞と比較して、離乳前のマウス心室筋細胞で高いことが明らかになった。この現象が臨床の場における新生児期・乳児期のベラパミル投与による心機能低下に関与していると考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	823	氏名	狭川 浩規
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>異なる発生段階のマウスをモデル動物として用い、マウス心室筋細胞L型 Ca^{2+}チャネル ($I_{Ca,L}$) のベラパミル、ニフェジピン、ジルチアゼムに対する感受性の生後変化を解析した。この解析から新生児および乳児にベラパミル投与で心機能低下が誘発されるメカニズムとして以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 単離心筋細胞の表面積の指標となるマウス心室筋細胞の膜容量は、生後0日から生後10-15週にかけて増加し、$I_{Ca,L}$電流も増加した。 2) 半最大活性化電位 ($V_{1/2}$) および勾配因子 (k) は全ての発生段階で有意差を認めなかった。 3) ニフェジピン、ジルチアゼムは全ての発達段階のマウス心室筋細胞で同程度に $I_{Ca,L}$電流を抑制したのに対し、ベラパミルは生後28日および生後10-15週と比較して、生後0日、生後7日、生後14日および生後21日ではより強く $I_{Ca,L}$電流を抑制した。 4) ニフェジピンは生後7日および生後10-15週のマウス心室筋細胞で刺激頻度依存性遮断作用を示さなかったのに対し、ベラパミルおよびジルチアゼムではともに刺激頻度依存性遮断作用を示した。 <p>以上より、本論文は新生児および乳児でベラパミルが心機能を低下させるメカニズムの一端について新たな知見を与えたものであり、また、最終試験として論文内容に関連した試問を受けたところ合格と判断されたので、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 555字)</p> <p style="text-align: right;">(平成30年 8月27日)</p>			