

## 論文の内容の要旨

論文題目 ラット肥大心筋における  
内向き整流カリウムチャネル発現の変化  
指導教官 永井 良三教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成9年4月入学  
医学博士課程  
内科学専攻  
氏名 福井 栄一

### 目的

心肥大は圧負荷および容量負荷に対する適応現象と考えられる。心肥大・心不全患者には心室性不整脈の合併が多いこと知られており、不整脈発生の一因として、心筋細胞における活動電位持続時間 (Action potential duration: APD) の延長が知られている。この機序の解明のため、活動電位の再分極相における外向き電流を担う $K^+$ 電流と内向き電流を担う $Ca^{2+}$ 電流の変化について主に生理学的な検討が様々なされてきたが、用いた動物種、肥大の作成法などの違いにより異なる結果が報告され未だ統一した見解は得られていない。

一方心筋が虚血にさらされるとAPDが短縮し、このときATP感受性 $K^+$ 電流( $I_{KATP}$ )が重要な役割をはたす。心肥大時の $I_{KATP}$ の変化としてはチャネルの電流密度は増大または不変であるが、いずれの報告においてもATPに対する感受性は低下していたが、その機序はまだ明らかではない。近年、心肥大によるイオンチャネルの発現の変化を遺伝子発現の量的変化としてとらえる試みが、主に $K^+$ チャネルについて検討されているが、主としてKvチャネルに属するチャネルであり、内向き整流 $K^+$ チャネル( $K_{ir}$ チャネル)の心肥大による遺伝子発現の変化についての報告は現在のところ認められない。今回、心室に発現する内向き整流 $K^+$ チャネル( $K_{ir}$ )であるIK1チャネル、 $K_{ATP}$ チャネルについて、生化学的手法を用いて、これらチャネルの発現の変化を検討した。

### 方法

#### 右室肥大モデルラットの作成

Sprague Dawley rat (雄 4週齢)、36匹に50mg/kg (体重) の2%モノクロタリン溶液を皮下注射し、右室肥大モデルを作成。モノクロタリン投与後7日目、14日目、21日目の各時点で12匹ずつのラットの総重量を計測後、心臓を摘出し、右室自由壁と中隔を含む左室に分離し各々重量を計測。

コントロールとして、モノクロタリン非投与群の36匹のラット（雄 4週齢）を用意した。

#### RNA 抽出

摘出心の右室自由壁と、中隔を含む左室を直ちに液体窒素で凍結させ、total RNA を抽出した。

#### プローブの作成

プローブ作成のため、Gen Bank をもとにして、Kir2.1、Kir2.2、Kir6.2、SUR2、および内部コントロールとして用いる glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に対し、DNAプライマーを用意し、ラット心室筋の total RNA を鋳型として RT-PCR を行い、各々の cDNA を作成した。cDNA をテンプレートとして digoxigenin ラベルの antisense RNA プローブ を作成した。

#### ノーザンブロット法

1% アガロースゲルに total RNA 20  $\mu$ g を電気泳動、Nylon membrane に転写し、Kir2.2 は 63°C、その他のプローブに関しては 65°C で一晩 hybridization を行った。洗浄、ブロッキング後、アルカリフォスファターゼ付加抗ジゴキシゲニン抗体と反応させ、CSPD で発光シグナルとして検出した。

#### 競合的 RT-PCR 法

SUR2 には SUR2A と SUR2B のスプライシングバリエーションがあり、選択的スプライシングが起こる部分を検出するようプライマーを用意し、競合的 RT-PCR をおこなった。

#### In situ hybridization

Kir6.2 の発現分布の変化を調べるために in situ hybridization をおこなった。パラフォルム固定した正常心筋と肥大心筋の包埋切片を脱パラフィンし、除蛋白処理後、プローブを47°Cで一晩反応させた。試料を発色させた後、アセトン、キシレンで脱水、封入した。

#### 結果

##### モデルラットの体重量および心重量

体重量は、7日目モノクロタリン投与群にて有意に減少し、14日目には有意差がなくなり、21日目においてはモノクロタリン投与群にて著明な減少を認めた。右室自由壁 / 中隔を含む左室の重量比は、モノクロタリン投与群では7日目より有意な増加を認め、その後経過にともないその差は増大した。

ノーザンブロット法でみた各サブユニット mRNA 発現レベルの変化

中隔を含む左室では、全てのサブユニットで mRNA 発現レベルに有意な変化は認められなかった。(n = 4)

右室自由壁では、Kir2.1ではコントロール群に比しモノクロタリン投与群では、投与後 7日目、14日目に発現レベルは有意に増加したが、21日目には有意差は認めなかった。(n = 6)

Kir2.2はコントロール群に比しモノクロタリン投与群では発現レベルに有意な変化を認めなかった。(n = 6)

Kir6.2は、コントロール群に比しモノクロタリン投与群では、投与後 7日目にて有意ではないが増加傾向を示し、14日目に有意に増加し、21日目にはほぼコントロール群のレベルに復した。(n = 6)

SUR2は、Kir6.2 と同様の变化を認めた。しかし14日目に見せた増加の程度は Kir6.2 に比し軽度であった。(n = 6)

競合的 RT-PCR 法による SUR2A、SUR2B の発現

検出された SUR2A、SUR2B に相当するバンドの発光シグナルの比 (SUR2A/SUR2B) は、いずれの群でも有意差は認めなかった。(n = 4)

In situ hybridization でみた Kir6.2 の発現分布

Kir6.2 mRNA の発現分布は、左室側ではコントロール群・モノクロタリン投与群ともに、経過をとおして心外膜側に強く特異的染色を認めた。一方右室自由壁においては、コントロール群においては左室と同様の発現分布を示し、モノクロタリン投与群は、7日目はコントロール群と差はなかったものの、14日目には全層にわたり染色を認めるようになり、21日目には内膜側・外膜側に比し中層における染色は弱くなった。

考察

心室ではKir2.1、Kir2.2とも発現しているが、成熟心筋細胞でのIK1チャンネルは、Kir2.2からなると推定されている。一方胎児型心筋細胞のIK1チャンネルはKir2.1で構成されると推定されている。

モノクロタリンを用いたラットモデルでは、IK1電流に経過を通して変化をみとめなかったとする報告があり、その一因として以下が考えられる。

①心肥大の形成時に心筋蛋白の多くが胎生期に出現しているアイソフォームへ変換する。今回認めたKir2.1 mRNA の発現の増加も、同様の胎児型蛋白への移行をみている可能性がある。IK1電流に変化を認めないのは、Kir2.1で構成されるIK1チャンネルはKir2.2で構成されるIK1チャンネルよりチャンネルコンダクタンスが小さいため、チャンネルが増加しても電流密度としては変化を示さない。

② Kir2.1 は心筋細胞のみならず、心臓における血管平滑筋細胞や神経細胞にも発現しており、心肥大の形成にともないこれら細胞に存在する Kir2.1 mRNA が増加している可能性が考えられる。よって心筋細胞のKir2.2

mRNA が変化しなかったため、IK1電流はその電流密度に変化を認めなかった可能性がある。

今回認められた Kir6.2 mRNA、SUR2 mRNA の変化は、肥大形成期、代償性肥大期にかけて発現が増加し、非代償期心不全期にはコントロール群のレベルまで減少した。これは肥大にともなう一種の適応現象および非代償期における適応破綻と考えられる。競合的 RT-PCR 法による検討により、SUR2A mRNA の発現の変化は SUR2 mRNA と同様と考えられる。肥大心における mRNA の発現の増加は、K<sub>ATP</sub>チャンネルの電流密度の増加との報告に一致する。ATP に対する感受性の低下の原因としては、SUR2 mRNA の発現の増加は Kir6.2 mRNA の発現の増加に比し軽度であったため、この発現量の増加の程度の違いがチャンネルの ATP に対する感受性に影響を与えている可能性がある。もう一つの可能性としては、SUR2 mRNA の発現の増加は、SUR2A mRNA のみならず SUR2B mRNA の発現量の増加も含んでいる。肥大心において、Kir6.2 と SUR2A で構成される K<sub>ATP</sub> チャンネルとともに Kir6.2 と SUR2B で構成される K<sub>ATP</sub> チャンネルが発現しており、そのため ATP に対する感受性が変化しているのかもしれない。

Kir6.2 mRNA の発現分布は、左室側および右室自由壁のコントロール群では心外膜側に多く発現を認めた。これは K<sub>ATP</sub> 電流 (IK<sub>ATP</sub>) は心外膜側に多いという所見に一致した所見といえる。一方モノクロタリン投与群では、肥大期には全層にわたる Kir6.2 mRNA の発現を認めた。この発現分布の変化は、虚血時に障害心筋に対して保護的に作用すると考えられている K<sub>ATP</sub> チャンネルの働きに適った変化と考えられる。非代償性心不全期での中層における発現の低下は、虚血時に中層において活動電位持続時間の短縮の程度が小さくなり、心室における貫壁性再分極時間のばらつきを増大させる可能性があると考えられる。

本研究では肥大に伴い内向き整流 K<sup>+</sup>チャンネルを構成するサブユニットごとに、その mRNA の発現に量的かつ質的变化があり、加えてその発現分布も変化しており、心肥大に伴う内向き整流 K<sup>+</sup>チャンネルの電流密度の変化および分布を考える際に十分に考慮すべき可能性を提示する結果と考えられた。