

氏 名 (本籍)	わか 若	やま 山	ゆう 裕	じ 司
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	医 博 第 1 9 1 9 号			
学位授与年月日	平 成 1 5 年 3 月 2 4 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻			
学位論文題目	ラット多細胞心筋における Ca^{2+} wave の発生・ 伝播に対する不均一収縮と局所伸展の影響			

(主 査)

論文審査委員	教授 白 土 邦 男	教授 仁 田 新 一
	教授 柳 澤 輝 行	

論文内容要旨

背景

ラット心筋組織（トラベクラ）の傷害端から誘発性伝播性収縮波（Triggered Propagated Contraction；TPC）及びカルシウム・ウェーブ（ Ca^{2+} wave）が誘発され、トラベクラに沿って伝播し、不整脈の原因となる。TPCの発生には傷害領域の伸展・弛緩サイクルの重要性が示唆されており、収縮蛋白からのカルシウム遊離によって TPC・ Ca^{2+} wave が誘発されると考えられている。しかしながら、トラベクラの伸展と遊離カルシウムの TPC・ Ca^{2+} wave への影響を調べた報告やその発生を直接観察・検討した報告はこれまで無い。そこで今回この研究において、実験Ⅰ：傷害部位から生じる Ca^{2+} wave に対するトラベクラ伸展・弛緩サイクルの影響、さらに遊離カルシウムや伸展活性化チャネル等の関与を検討；実験Ⅱ：トラベクラの局所灌流法で興奮-収縮連関（EC カップリング）及び心筋収縮の不均一領域を作成し、この領域の伸展・弛緩サイクルによって Ca^{2+} wave が発生するかどうかについて検討した。

方法

ラット右室からトラベクラを摘出、張力トランスデューサーで張力を、レーザー回折法でサルコミア長を、微小電極法で膜電位を測定、心筋長はサーボモーターでコントロールした。細胞内カルシウム濃度は微小電極法で Fura-2 を負荷後、その蛍光をフォトマルチプライアーチューブ（340 nm/380 nm ratio）及び SIT または高感度 CCD カメラ（360/380 nm ratio イメージ）で測定した。TPC・ Ca^{2+} wave は 7.5 秒頻回刺激（2-4 Hz）で誘発した。

結果

実験Ⅰ：頻回刺激（ 2.65 ± 0.13 Hz, 28°C 、細胞外カルシウム（ $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ）2.0 mM）の最終単収縮時に 100-200 ms の伸展パルスを加えた後、単収縮の弛緩末期に急速短縮し、その直後発生した TPC・ Ca^{2+} wave（ $n=27$ ）を観察した。10%伸展パルスによって最終刺激から TPC 張力のピーク（ Peak_{TPC} ）及びその時の Ca^{2+} wave のピーク（ Peak_{CW} ）までの時間は共に短縮し、 Peak_{TPC} 及び Peak_{CW} は増加した（ $n=13$ ）。この時、 Ca^{2+} wave の伝播速度（ V_{prop} ； $n=8$ ）も増加し、伸展時の発生張力と V_{prop} の変化は有意に正の相関関係を示した（ $r=0.84$, $n=12$, $p<0.01$ ）。伸展パルスによって不整脈も誘発しえた。10 μM Gd^{3+} （ $[\text{Ca}^{2+}]_o=5.2 \pm 0.73$ mM）はこれらの変化に影響を与えず、また TPC 発生時の伸展も Ca^{2+} wave には直接的影響を与えなかった。

実験Ⅱ：心筋局所の収縮抑制のため、カフェイン（CF：5 mM）、2,3-butanedione monoxime（BDM：20 mM）を加えた灌流液または低カルシウム液（LC：0.2 mM）を、ガラスピペットを

用いトラペクラに連続的に局所灌流し（約 300 μm の範囲）、頻回刺激で TPC \cdot Ca^{2+} wave を誘発した（2.5 Hz, 23°C, $[\text{Ca}^{2+}]_0 = 2\text{-}4\text{ mM}$ ）。局所灌流されていない健全心筋の収縮によって、CF \cdot BDM \cdot LC で局所灌流領域及び周辺の心筋（約 600 μm の範囲）は伸展された。Ca²⁺ wave（CF \cdot BDM \cdot LC 各 n=9）は局所灌流領域と健全部の境界領域から発生し、局所灌流外側の健全部に向かって伝播した（0.2-2.8 mm/s）。BDM \cdot LC では局所灌流部位の内側にも伝播した。この局所灌流モデルで不整脈が誘発され、灌流中止によって不整脈も消失した。

結 語

これらの結果から今回初めて、TPC \cdot Ca^{2+} wave が 1) 局所傷害とは関係なく、心筋の伸展 \cdot 弛緩サイクルに伴う収縮蛋白からの遊離カルシウムによって引き起こされること、2) 心筋伸展と遊離カルシウムを介する機序でその発生 \cdot 伝播が増強され、不整脈を発生しうることが示唆された。

審査結果の要旨

本学位論文は主たる二つの研究論文をもとに書かれた学位論文で、1つはすでに American Journal of Physiology に掲載済みであり、もう1つは近く投稿予定である。すなわち博士課程で研究した成果を二つの独立した論文という形で完成させており、十分評価に値する。

本研究では手法としてラットの多細胞心筋（トラベクラ）を用いており、その収縮力と細胞内カルシウム濃度を検討した。この手法はすでに心筋の生理実験としては確立した方法であり、その実験手法は十分信頼しうるものであると思われた。また本実験系は単離心筋細胞に比べより生理的な状態であり、実際の生体内の現象を研究するには非常に適していると考えられた。

本研究ではこの手法を用い、 Ca^{2+} wave の発生・伝播に関する研究を行っている。特に Ca^{2+} wave と局所伸展や不均一収縮との関連を明らかにしたことは、着眼点としては非常にユニークであり、また新しい知見が得られた。心筋の Ca^{2+} wave に関する研究は主に単離心筋細胞で行われており、心筋収縮との関連はそれほど検討されていない。本研究では心筋の不均一収縮に伴う局所サルコメアの伸展・弛緩と、その結果生じる収縮蛋白からのカルシウム遊離が Ca^{2+} wave を引き起こすことを初めて証明した。また心筋の伸展刺激が収縮蛋白からのカルシウム遊離を介して Ca^{2+} wave の伝播を増強しうることも、これまでにない新しい知見であった。このような収縮蛋白からの遊離カルシウムを介して細胞内のカルシウム動態に影響しうるということは、概念としては新しく非常に興味深いものである。

本研究ではさらに臨床的な関連として、 Ca^{2+} wave と不整脈の関係を検討し、不整脈発生の新しいモデルを提唱している。これまで心臓の不整脈はいわゆる電気現象の異常として研究されており、本研究のような心筋収縮の不均一性や心筋の伸展刺激が Ca^{2+} wave の発生・伝播を介して不整脈を引き起こすという概念は非常に斬新であると思われた。モデルとしての妥当性は今後も検討の余地があるが、いわゆる病的な心臓での心筋の局所伸展や過剰伸展が不整脈発生に関与しうる可能性を示したことは、臨床的に非常に興味深いことである。

以上、本学位論文はテーマも一貫しており、信頼しうる手法を用いて新しい知見を詳細に導きだした。その知見の重要性・斬新性に関して非常に優れたものであると考えられ、学位に十分値するものと結論される。