

見られた。第2のパターンすなわちburst状の波形はラット肺静脈心筋においても観測されたものと共通している。ラットとマウスに共通する要因として、心筋の再分極電流を担うK<sup>+</sup>チャネル分子種が他の動物で多く発現している遅延整流性K<sup>+</sup>チャネルの系統ではなく、活性化・不活性化が速い一過性外向き電流transient outward current (I<sub>to</sub>)であることが挙げられる。推測ではあるが、一過性外向き電流が速い再分極を起こした後に不活性化し、その時点で未だ

Na<sup>+</sup>チャネルやCa<sup>2+</sup>チャネルを通る内向き電流成分が完全に不活性化していなければ、直ちに次の脱分極を生じる可能性が考えられる。マウスでは一過性外向き電流の挙動がラットよりもさらに速く、再分極の半ばで不活性化が進行して減弱するため、EAD様の第3のパターンが現れるのとも考えられる。これらの点を明らかにするためには、膜電位固定法を用いた電流成分の詳細な解析や、computer simulationを用いた総合的解析などが必要であろう。

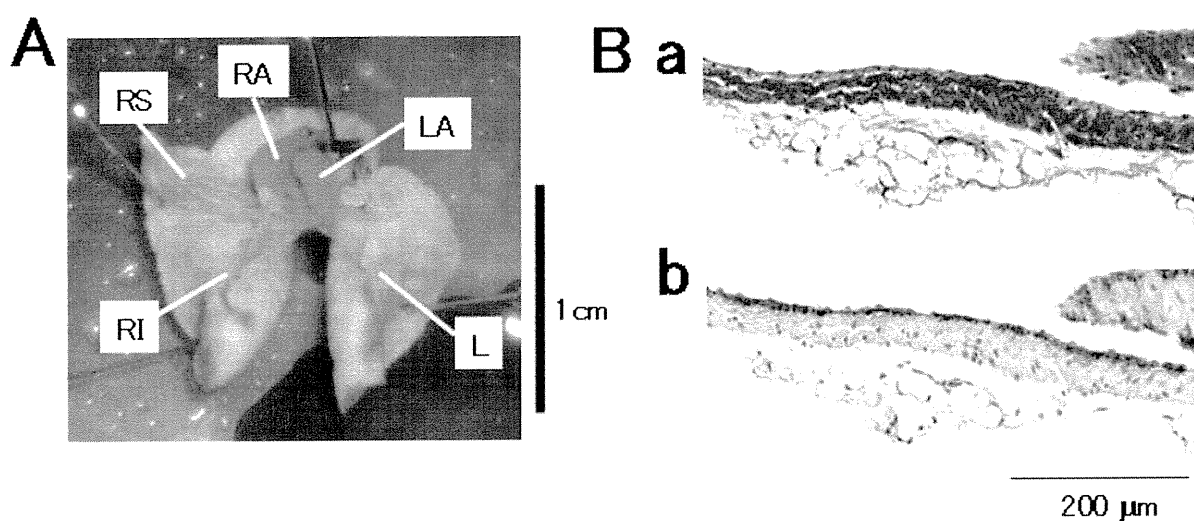


図4：マウス肺静脈における心筋層の存在。

A：マウス肺静脈の走行。RA, LAは左右の心房、RS, RI, Lは右上、右下および左の肺静脈を示す。

B：マウス肺静脈標本の長軸方向断面のMasson trichrome染色(a)および抗smooth muscle  $\alpha$ -actin染色(b)。

部位	自発活動発生	自発活動発生率(%)
RS	20/30	66.7
RI	2/26	7.7
L	17/28	60.7
Total	69/84	46.4

表4 各肺静脈の各部位における自発活動発生率

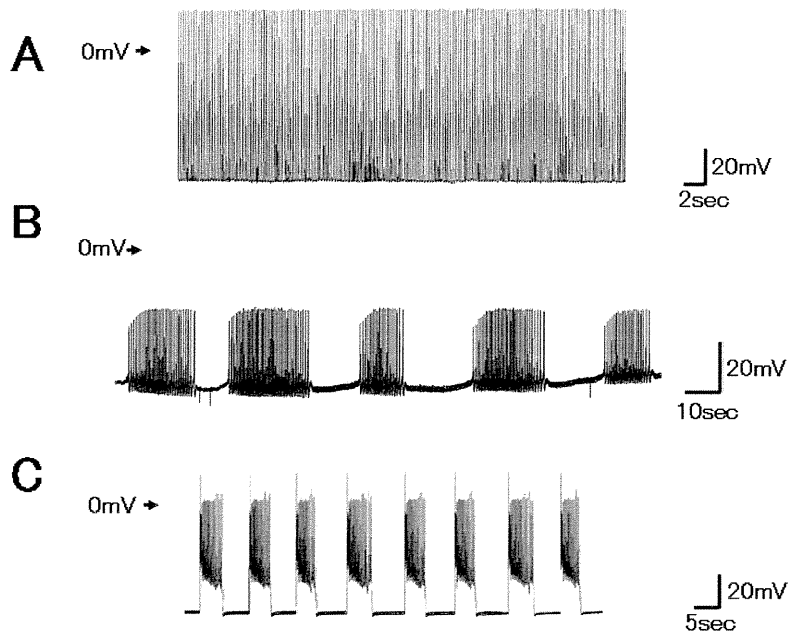


図5：マウス肺静脈心筋層で観測された自発的電気活動。  
 A：第1のパターンである反復興奮型、B：第2のパターンであるBurst型。C：第3のパターンであるEAD様の波形。

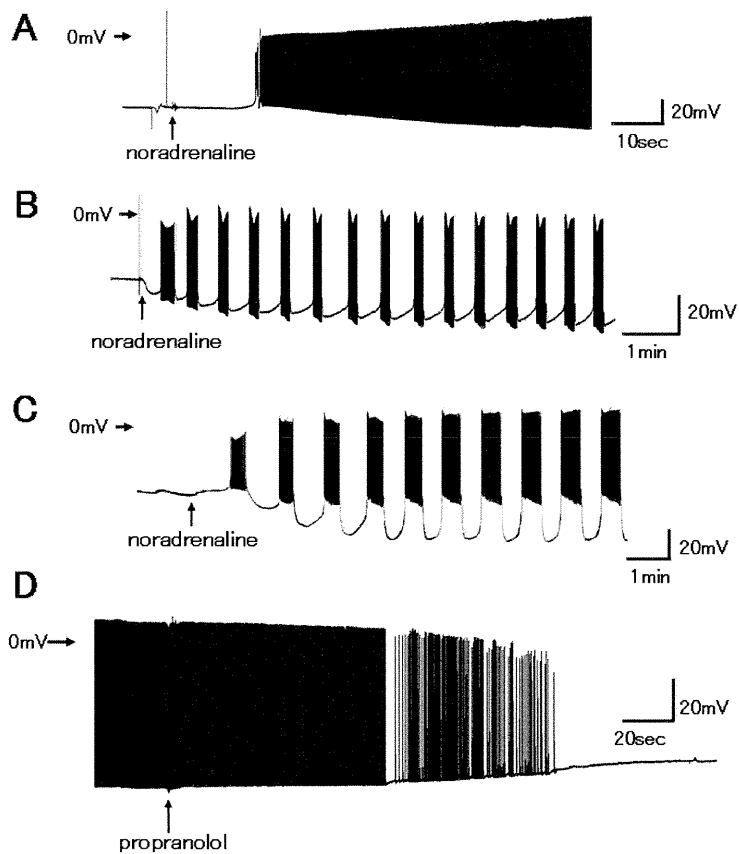


図6：マウス肺静脈心筋層でnoradrenalineにより誘発された電氣的自発活動。  
 A：第1のパターンである反復興奮型、B：第2のパターンであるBurst型、C：第3のパターンであ

るEAD様の波形がnoradrenaline(1  $\mu$ M)でそれぞれ誘発された。  
D: noradrenaline(1  $\mu$ M)で誘発された自発活動はpropranolol(1  $\mu$ M)によって抑制された。

## 2. 心筋の再分極機構に関する研究

### 2-1 肺静脈心筋の撃発活動と再分極力

肺静脈心筋は自発活動を生じやすい性質を有することが明らかになりつつあるが、その要因として再分極力の弱さが挙げられる。そこで、不整脈の誘因のひとつである撃発活動 (triggered activity: TA) に注目し、肺静脈におけるTAの誘発され易さと再分極力の関係を検討した。TAは興奮頻度の上昇により誘発される異所性自動能の発生機序のひとつと考えられている。心室筋にCa<sup>2+</sup>を負荷させるようなジギタリス、低K<sup>+</sup>/高Ca<sup>2+</sup>細胞外液などの処置を施すと、細胞内Ca<sup>2+</sup>量が増大し、再分極の直後に筋小胞

体からのCa<sup>2+</sup>放出が起こり、これが一過性の遅延後脱分極 (delayed afterdepolarization: DAD) を誘発する。このDADが閾値に達した際に惹起される活動電位がTAであると考えられている。

モルモット肺静脈心筋に高頻度電気刺激(100ms間隔で100連発)を加えると、45標本中の43標本でDADやTAが観測された(図7Aa)。同じ刺激を心房筋に加えた場合はDADやTAは誘発されなかった(図7Ab)。肺静脈心筋で見られたTAは、pilsicainide (10 μM)、verapamil (1 μM)またはryanodine (0.1 μM)の存在により著明に抑制された(図7B)。

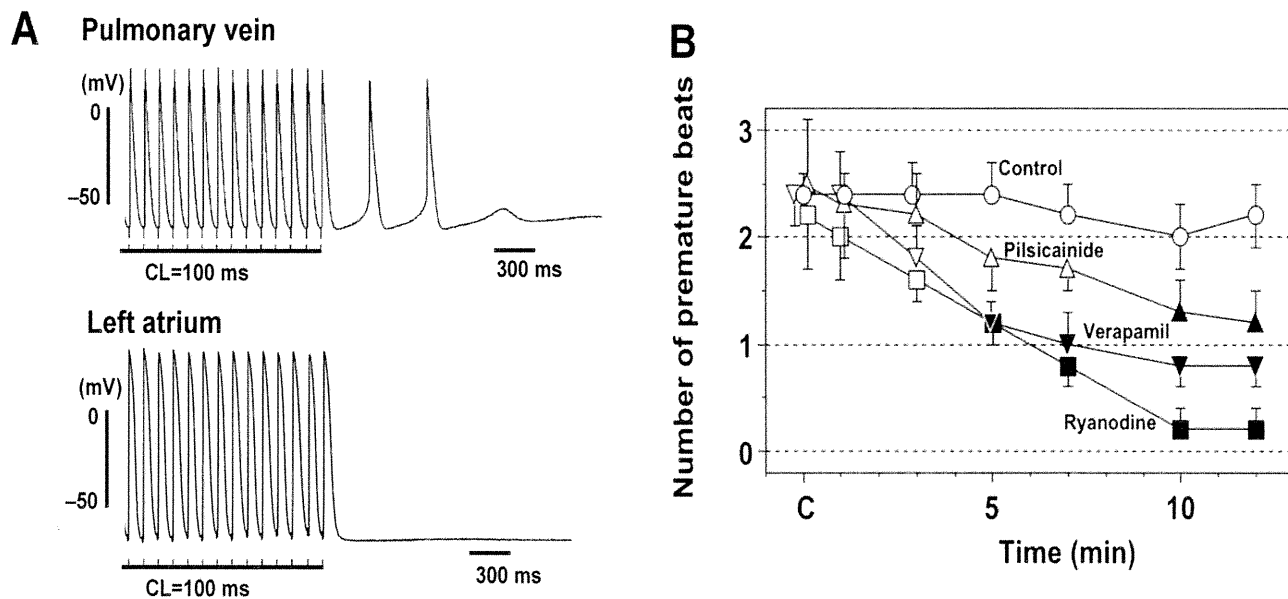


図7：モルモット肺静脈心筋層で観測された撃発活動 (triggered activity: TA)。

A：肺静脈心筋(a)および心房筋(b)に高頻度刺激を与えた際の膜電位変化の典型的なトレース。

B：肺静脈心筋で誘発されるTAに対するpilsicainide (10 μM)、verapamil (1 μM)、ryanodine (0.1 μM)の影響。

Muscarine受容体を刺激してacetylcholine 活性化K<sup>+</sup>チャンネルを開口させるcarbachol (0.3 μM)により、肺静脈心筋のDADおよびTAの発生が完全に抑制された(図8)。心房筋および肺静脈心筋を1 Hzの電気刺激により駆動して活動電位を発生させ、carbachol(0.3 μM)の影響を検討した(表5)。心房筋ではcarbacholにより

活動電位持続時間の短縮がみられたが、静止膜電位は影響されなかった。一方、肺静脈心筋においては、活動電位持続時間の短縮とともに、静止膜電位の陰性電位側(過分極側)への移動がみられた。すなわち、もともと心房筋に比べて浅かった肺静脈心筋の静止膜電位が、carbacholにより心房筋の値に近づいた。

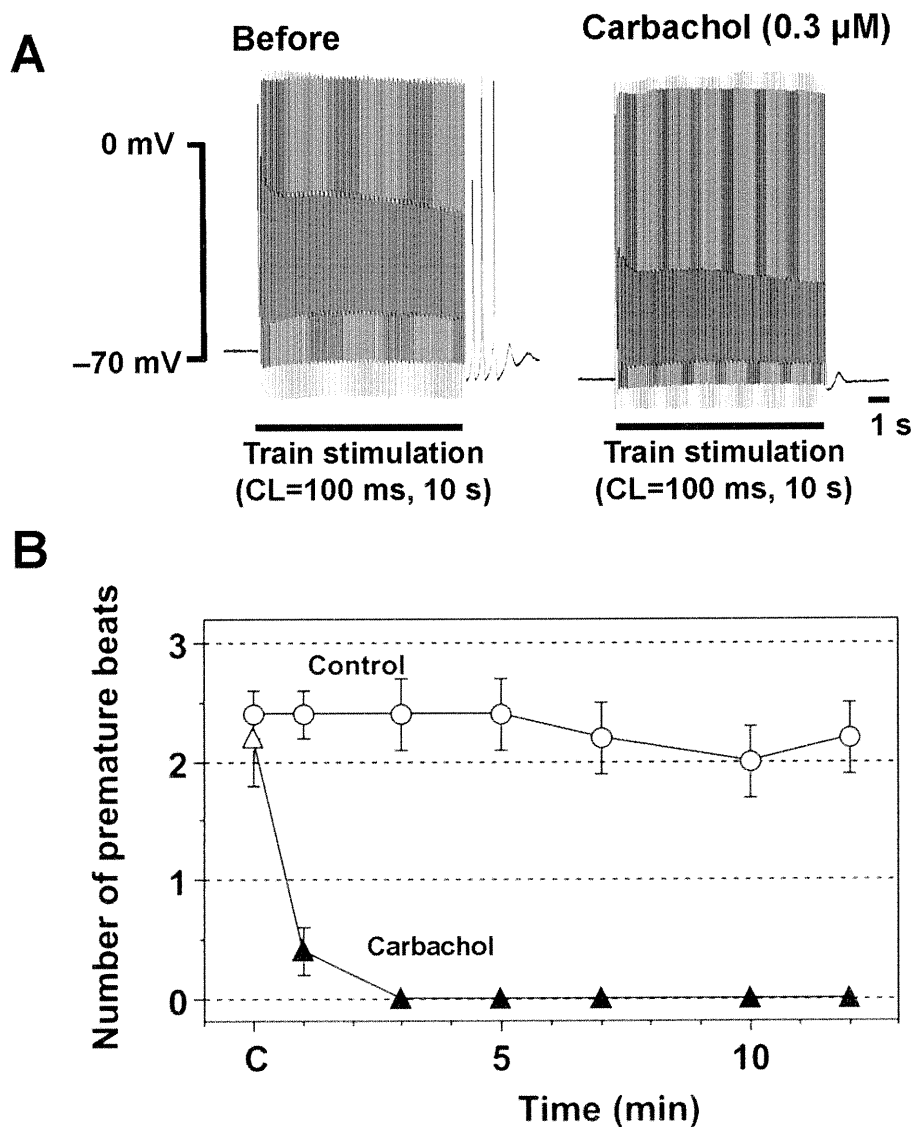


図8：モルモット肺静脈心筋層で観測された撃発活動に対するcarbacholの効果。  
A: Carbachol (0.3 μM)投与前(a)および後(b)に高頻度刺激を与えた際の膜電位変化の典型的なトレース。B: 肺静脈心筋で誘発されるTAに対するcarbachol (0.3 μM)の影響。値は5例の平均値と標準

準誤差を示す。

Effects of carbachol (0.3 $\mu$ M) on the action potential parameters of the pulmonary vein and left atrium				
	Pulmonary vein		Left atrium	
	Before	Carbachol	Before	Carbachol
RP (mV)	-70.3 $\pm$ 1.0	-75.4 $\pm$ 0.9*	-80.6 $\pm$ 1.1	-80.0 $\pm$ 0.6
OS (mV)	27.9 $\pm$ 2.3	26.4 $\pm$ 1.4	27.1 $\pm$ 0.8	18.2 $\pm$ 1.4*
APD <sub>20</sub> (ms)	13.2 $\pm$ 0.6	9.8 $\pm$ 0.5*	23.3 $\pm$ 1.2	12.7 $\pm$ 0.8*
APD <sub>50</sub> (ms)	28.0 $\pm$ 1.9	18.9 $\pm$ 1.1*	40.7 $\pm$ 1.6	21.3 $\pm$ 1.1*
APD <sub>90</sub> (ms)	75.5 $\pm$ 2.5	57.6 $\pm$ 3.5*	76.1 $\pm$ 2.7	45.5 $\pm$ 1.9*

Data are means  $\pm$  S.E.M. of 5 experiments. The preparations were electrically driven at 1 Hz. Resting potential (RP); overshoot (OS); action potential duration at 20% (APD<sub>20</sub>), 50% (APD<sub>50</sub>), and 90% (APD<sub>90</sub>) repolarization. \* $P$  < 0.05, compared with the corresponding control values (Before).

表5：モルモット摘出心房筋および肺静脈心筋の活動電位パラメーターに対するcarbacholの影響。値は5例の平均値と標準誤差を示す。

今回の検討により、肺静脈心筋では心房筋に比べて高頻度刺激によりTAやDADが発生しやすいことが明らかになった。さらに、TAやDADの誘発され易さは、再分極力を増大させるcarbachol投与により解消することが明らかになった。TAやDADの主な誘因とされている細胞質内の異常なCa<sup>2+</sup>の動き(Ca<sup>2+</sup> sparkやCa<sup>2+</sup> transient)は肺静脈心筋のみならず、心房筋や心室筋でも誘発されることが知られている。従って、肺静脈心筋でTAやDADが誘発されやすい原因は細胞内Ca<sup>2+</sup>動態の特徴ではなく、主として細胞膜レベルの再分極力の弱さによるものであると考えられる。今回carbacholは肺静脈心筋のTAやDADを抑制したが、この方法すなわちacetylcholine活性化K<sup>+</sup>チャネルの開口により肺静脈心筋の自発活動を抑制し、心房細動を抑制できるか否かは未だ明らかではない。Carbacholは心房筋の活動電位を著明に短縮させており、心房筋不応期に対しても短縮効果を発揮する可能性がある。その場合には心房筋内の興奮リエントリーを助長して心房細動を悪化させてしまう

可能性も充分考えなければいけない。

## 2-2 マウス肺静脈心筋の自発活動に対するacetylcholineの影響

肺静脈心筋は自発活動を生じやすい性質を有しており、これが再分極力の弱さに起因することがモルモットなどを用いた検討により明らかになってきた。そこで、この図式がマウス肺静脈心筋についても成立するか否かを検討した。

Acetylcholine(0.3  $\mu$ M)は静止膜電位を陰性電位方向(過分極方向)に移動させ、この作用はatropine(0.1  $\mu$ M)により解除された(図9A)。Noradrenaline(1  $\mu$ M)により誘発した自発活動に対して、acetylcholine(0.3  $\mu$ M)は停止効果を示した(図9B)。この停止効果はatropine(0.1  $\mu$ M)により解除され、自発活動が復活した。この際、atropine投与後の自発活動の頻度は、同一標本でacetylcholine投与直前にみられた発火頻度を上回る傾向が見られた。Noradrenaline(1  $\mu$ M)により誘発した自発活動に対する停止効果はadenosine(10  $\mu$ M)でもみられた(図9C)。

Acetylcholineにより静止膜電位の陰性電位方向への移動がみられたことは、マウス肺静脈心筋においても、再分極を生じ、静止膜電位を維持する力が弱いことを示している。Noradrenalineにより誘発された電氣的自発活動がacetylcholineにより停止したことから、肺静脈心筋の再分極力の弱さが自発活動を許容していることが明らかになった。Acetylcholine活性化K<sup>+</sup>チャネルを開口させるadenosineによっても同様の停止効果が得られたこともこれを支持している。ただし、ここで注目すべきなのが、atropine投与後に自発活動が復活した際に、そ

の発火頻度がacetylcholine投与前よりも高まっていることである。この結果は、acetylcholineは必ず自発活動抑制に働くとは断定できず、場合によっては自発活動を促進する可能性を示唆している。生体内の肺静脈は自律神経支配に富んでおり、交感神経および副交感神経の両方の活動が活発であり、その緊張度は時々刻々と変化している。交感神経の緊張の下で副交感神経の緊張が増減する様な状況下では、肺静脈心筋の自発活動が顕在化し、心房細動が誘発されるというような図式も考えられる。

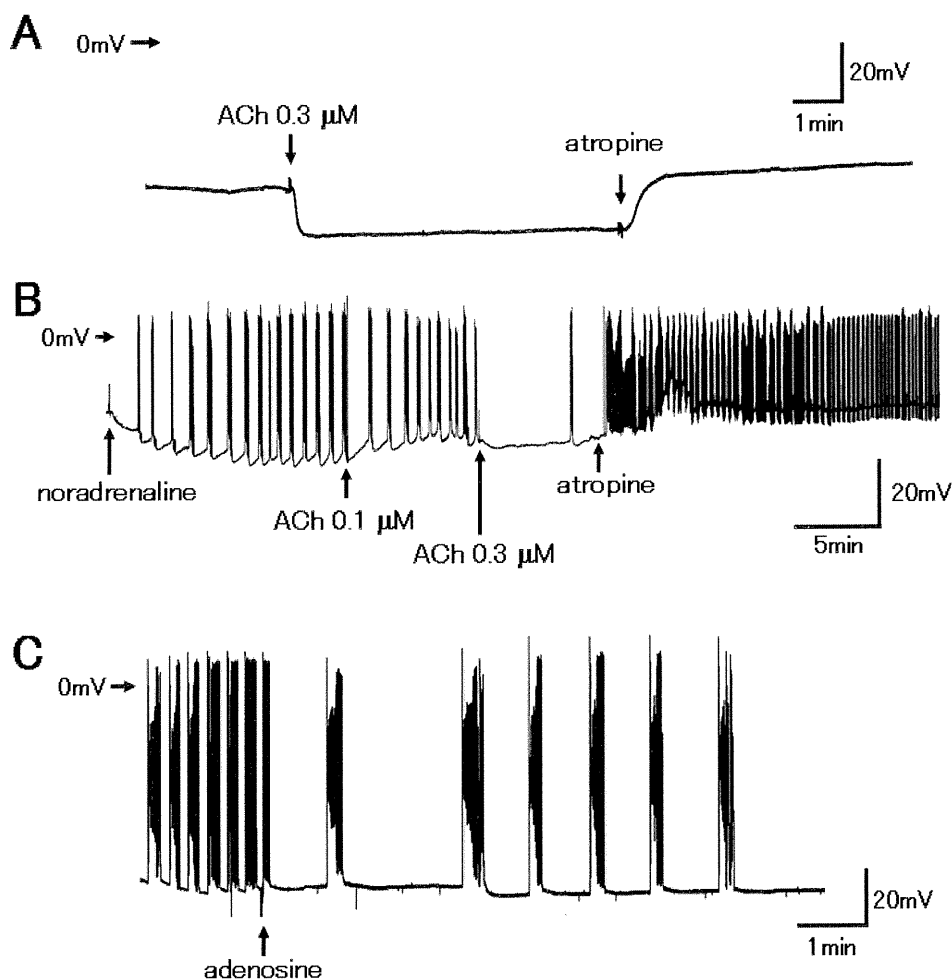


図9：マウス肺静脈心筋層で観測された自発的電気活動に対するacetylcholine等の影響。  
 A：自発活動を示さない標本に対するacetylcholine(0.3 μM)およびatropine(0.1 μM)の効果、  
 B：Noradrenaline(1 μM)により誘発した自発活動に対するacetylcholine(0.1-0.3 μM) およびa  
 tropine(0.1 μM)の効果、C：Noradrenaline(1 μM)により誘発した自発活動に対するadenosine(1

0 μM)の効果。

### 3. 心筋細胞内Ca<sup>2+</sup>制御機構に関する研究

心不全は心臓が全身の需要を十分満たすだけの血液を循環させられなくなった状態である。心拍出量を増大させる目的で、従来よりdigitalisやβ-agonistなど心筋の収縮性を高める強心薬が用いられてきた。これらの薬物には催不整脈性という問題があり、また長期的には心臓を酷使することによりむしろ心不全を悪化させる場合が多いことも判ってきた。一方、近年心臓の収縮能よりもむしろ拡張能に異常のある心不全、いわゆる拡張機能不全が注目されている。心筋の拡張能が低下することにより心拍出量が低下する心不全であり、心筋の弛緩機能低下が主な原因と考えられているが、その詳細は未だ研究途上にある。心筋の弛緩能に影響する要因のひとつが細胞内Ca<sup>2+</sup>動態である。心筋収縮に使われたCa<sup>2+</sup>が筋小胞体内に再び取り込まれることで心筋が弛緩するが、この取り込みを行う筋小胞体のCa<sup>2+</sup>ポンプ (SERCA) の機能が低下するとCa<sup>2+</sup>濃度の低下が遅れ、心筋の弛緩も遅れると考えられる。これが正しければ、

SERCA機能を増大させる薬物により心筋の弛緩機能を改善できるはずである。そこで我々は糖尿病性心筋傷害に注目し、心筋に弛緩不全がみられることを確認した。次にSERCA機能を増大させる化合物を探索した結果、ellagic acidおよびgingerolの2つの化合物に到達した。

マウスにstreptozotocin (STZ)を投与すると、血糖値の上昇が観測され、糖尿病を発症していることが確認されたが、その際に心重量/体重比の増大もみられた(表6)。摘出右心室筋標本の収縮力測定によって、STZ群では心収縮力の顕著な低下や、拡張能の指標である心筋の弛緩に必要な時間time for 90% relaxation (TR<sub>90</sub>)が有意に延長していた(図10A;表7)。心室筋細胞を単離し、電気刺激(1 Hz)によりCa<sup>2+</sup> transient発生させ、Ca<sup>2+</sup>動態を両群で比較した(図10B;表8)。STZ群ではbasalのCa<sup>2+</sup>濃度が有意に上昇しており、Ca<sup>2+</sup> transientのamplitudeが有意に減少していた。Ca<sup>2+</sup>濃度がpeakの半分にまで減衰するのに必要な時間t<sub>1/2</sub>や減衰の時間定数τはSTZ群で有意に延長していた。

General effects of streptozotocin (STZ) treatment.

	Normal mice	Diabetic mice
Serum glucose levels (mg/dl)		
Fasted-condition	105.0 ± 2.6	387.3 ± 47.2*
Non- fasted condition	135.4 ± 8.9	774.5 ± 14.5*
Body weight (g)	44.2 ± 0.8	27.9 ± 1.2*
Heart weight (mg)	189.8 ± 3.4	151.1 ± 4.1*
Heart weight /Body weight (mg/g)	4.30 ± 0.1	5.49 ± 0.4*

表6 : Streptozotocin投与の血糖値、心重量、体重に対する影響。

正常マウスおよびstreptozotocin単回投与(200mg/kg, ip)の後4-6週間で糖尿病を発症したマウス(diabetic mouse)各5例より得られた平均値と標準誤差を示す。Streptozotocin投与により、血糖値上昇、心重量/体重比の増大が起きている。\*は正常マウスの値と統計的有意差(P<0.05)があることを示す。



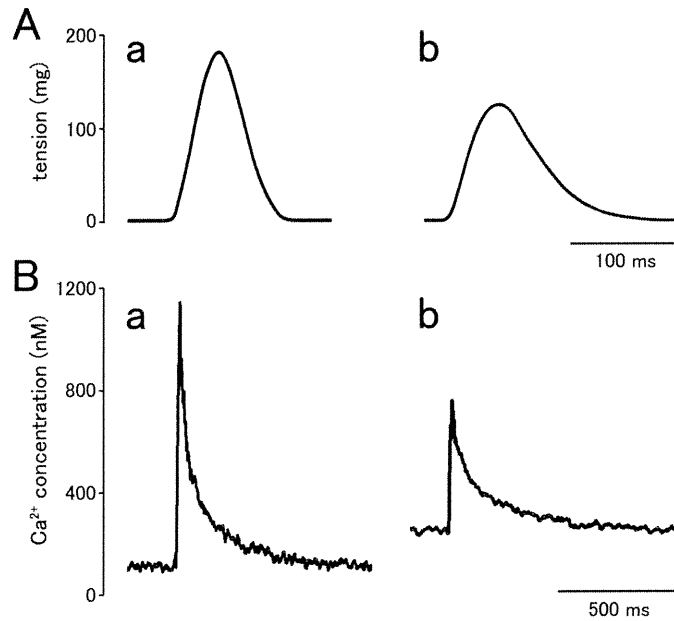


図10：糖尿病による心筋拡張機能の低下。

正常マウス(a)および糖尿病マウス(b)の収縮波形(A)およびCa<sup>2+</sup>transient波形(B)。糖尿病マウスでは収縮およびCa<sup>2+</sup>transientのamplitudeが減少しており、収縮力およびCa<sup>2+</sup>濃度の減少速度は低下している。

	Normal	Diabetic
contractile force (mg/mm <sup>2</sup> )	11.11 ± 0.34	10.01 ± 0.24*
TTP (msec)	49.17 ± 1.03	55.04 ± 1.87*
TR <sub>90</sub> (msec)	54.07 ± 1.17	77.00 ± 2.19*

表7：糖尿病マウスにおける弛緩機能の低下

正常マウスおよび糖尿病マウスにおける心収縮力、収縮弛緩パラメーター。糖尿病マウスで収縮力および弛緩機能の低下が起きている。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*は正常マウスの値と統計的有意差(P<0.05)があることを示す。TTP: Time to peak tension、TR<sub>90</sub>: time for 90% relaxation。

	Normal	Diabetic
Basal (nM)	135.0 ± 6.0	228.2 ± 9.4*
Peak (nM)	1144 ± 30.0	774.9 ± 19.8*
Amplitude (nM)	1009 ± 33.5	546.7 ± 18.0*
T <sub>1/2</sub> (ms)	61.3 ± 2.6	105.2 ± 2.4*
τ (ms)	88.4 ± 3.7	151.7 ± 3.5*

表8：正常マウスと糖尿病マウスCa<sup>2+</sup>動態の比較

正常マウスおよび糖尿病マウスにおけるCa<sup>2+</sup>動態パラメーター。糖尿病マウスではCa<sup>2+</sup>transientの全パラメーターが低下している。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*は正常マウスの値と統計的有意差(P

<0.05)があることを示す。

SERCA阻害薬のcyclopiazonic acid (CPA;10  $\mu\text{M}$ )によりnormal群、STZ群ともに $\text{TR}_{90}$ が延長したが、延長の程度はnormal群で有意に大きかった(図11A;表9)。CPAによりnormal群、STZ群ともに $\text{Ca}^{2+}$  transientが延長し、 $t_{1/2}$ や $\tau$ が増大し

たが、それらの程度はnormal群で有意に大きかった(図11B;表10)。CPAにより収縮および $\text{Ca}^{2+}$  transientのamplitudeに減少がみられ、それらの程度はnormal群で有意に大きかった。

CPA decreased the developed tension both in the normal and diabetic mice.

		Normal mice	Diabetic mice
TTP (msec)	before	49.2 $\pm$ 1.5	53.3 $\pm$ 1.7
	after	54.5 $\pm$ 1.0	59.6 $\pm$ 3.6
$\text{TR}_{90}$ (msec)	before	57.7 $\pm$ 2.3	77.1 $\pm$ 2.7
	after	90.5 $\pm$ 4.0*	96.9 $\pm$ 1.2*
	prolongation	36.0 $\pm$ 4.4	19.8 $\pm$ 3.2 <sup>†</sup>

表9：CPAによる弛緩機能の低下

正常マウスおよび糖尿病マウスにおける収縮弛緩パラメーター。CPAにより弛緩機能の低下が起きている。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*はCPA投与前の値と、<sup>†</sup>は正常マウスの値と統計的有意差( $P < 0.05$ )があることを示す。

CPA prolonged the  $\text{Ca}^{2+}$  transient decay and increased the basal  $\text{Ca}^{2+}$  concentration.

		Normal	Diabetic
Basal (nM)	before	125.4 $\pm$ 8.9	210.4 $\pm$ 12.5
	after	219.8 $\pm$ 7.1*	253.5 $\pm$ 18.9*
Peak (nM)	before	1130 $\pm$ 49.	776.3 $\pm$ 51.6
	after	781 $\pm$ 15.2*	689.5 $\pm$ 47.9
Amplitude (nM)	before	1004.6 $\pm$ 52.3	565.9 $\pm$ 63.1
	after	561.2 $\pm$ 21.5*	436 $\pm$ 56.8
$T_{1/2}$ (ms)	before	61.5 $\pm$ 2.7	101.3 $\pm$ 3.9
	after	120 $\pm$ 8.2*	153.5 $\pm$ 7.5*
$\tau$ (ms)	before	98.2 $\pm$ 7.1	151.1 $\pm$ 8.7
	after	181 $\pm$ 11.5*	203.7 $\pm$ 11.5*

表10：CPAの $\text{Ca}^{2+}$ 動態への影響

正常マウスおよび糖尿病マウスにおける $\text{Ca}^{2+}$ 動態パラメーター。CPAにより $\text{Ca}^{2+}$ transient後半の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度減少速度が低下している。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*はCPA投与前の値と統計的有意差( $P < 0.05$ )があることを示す。

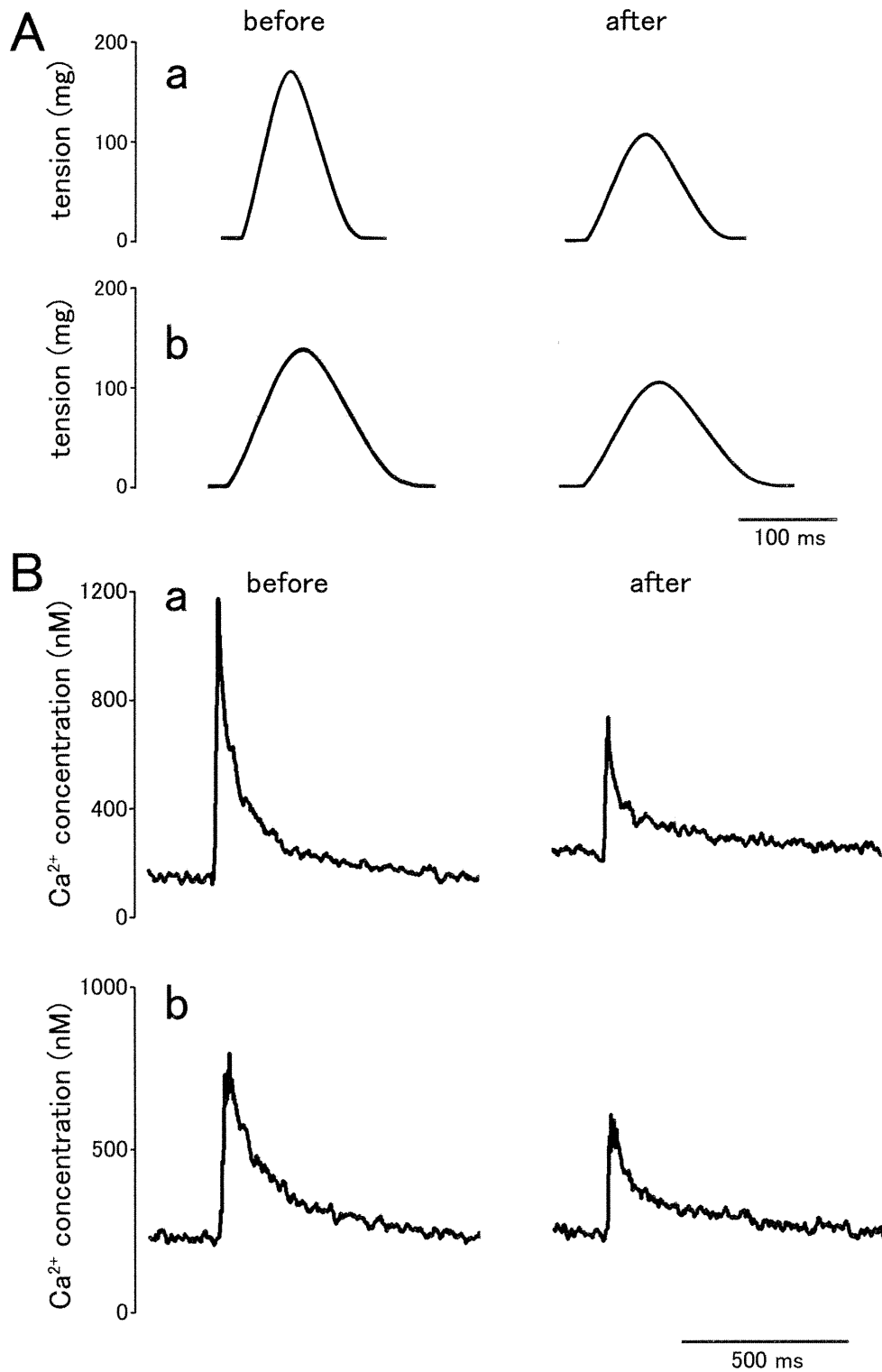


図11：心筋弛緩機能に対するCPAの影響。

CPA (10  $\mu$ M) 投与前後の正常マウス (a) および糖尿病マウス (b) の収縮波形 (A) および  $\text{Ca}^{2+}$  transient 波形 (B)。CPA により収縮および  $\text{Ca}^{2+}$  transient の amplitude が減少し、弛緩速度および  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の減少速度が低下した。これらの変化はいずれも糖尿病マウスよりも正常マウスで顕著であった。

Ellagic acid(10  $\mu$ M)によりnormal群、STZ群ともにTR<sub>90</sub>が短縮したが、短縮の程度はSTZ群で有意に大きかった(図12A;表11)。Ellagic acidによりnormal群、STZ群ともにCa<sup>2+</sup> transient後半でのCa<sup>2+</sup>濃度の低下が加速され、t<sub>1/2</sub>や

$\tau$ が減少したが、それらの程度はSTZ群で有意に大きかった(図12B;表12)。Ellagic acidはnormal群、STZ群ともに収縮力やCa<sup>2+</sup> transientのamplitudeには影響を与えなかった。

Ellagic acid decreased time to peak tension (TTP) and time to 90% relaxation (TR<sub>90</sub>) without significant effect on developed tension.

		Normal mice	Diabetic mice
TTP (msec)	before	56.4±1.52	62.4±1.97
	after	53.0±1.46	57.7±1.67
TR <sub>90</sub> (msec)	before	63.5±2.12	75.1±3.04
	after	59.7±1.79*	65.1±2.31*
	shortening	7.8±1.8	14.2±2.0 <sup>†</sup>

表11 : Ellagic acidによる弛緩機能の改善

正常マウスおよび糖尿病マウスにおける収縮弛緩パラメーター。Ellagic acidにより弛緩機能の改善が起きており、特に糖尿病マウスで顕著である。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*はellagic acid投与前の値と、<sup>†</sup>は正常マウスの値と統計的有意差(P<0.05)があることを示す。

Ellagic acid accelerated the Ca<sup>2+</sup> transient decay and reduced the basal Ca<sup>2+</sup> concentration.

		Normal	Diabetic
Basal (nM)	before	128.3±5.5	209.9±13.3
	after	105.9±6.9*	148.3±9.8*
Peak (nM)	before	1160±34.0	743.5±21.7
	after	1164±35.0	765.4±19.4
Amplitude (nM)	before	1032±31.9	533.6±9.9
	after	1058±40.7	617.1±14.5
T <sub>1/2</sub> (ms)	before	66.9±3.7	104.8±3.0
	after	42.4±2.4*	66.9±4.9*
$\tau$ (ms)	before	96.5±5.3	151.1±4.4
	after	61.2±3.4*	96.6±7.0*

表12 : Ellagic acidのCa<sup>2+</sup>動態への影響

正常マウスおよび糖尿病マウスにおけるCa<sup>2+</sup>動態パラメーター。Ellagic acidによりCa<sup>2+</sup>transient後半のCa<sup>2+</sup>濃度減少が速くなっている。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*はellagic acid投与前の値と統計的有意差(P<0.05)があることを示す。

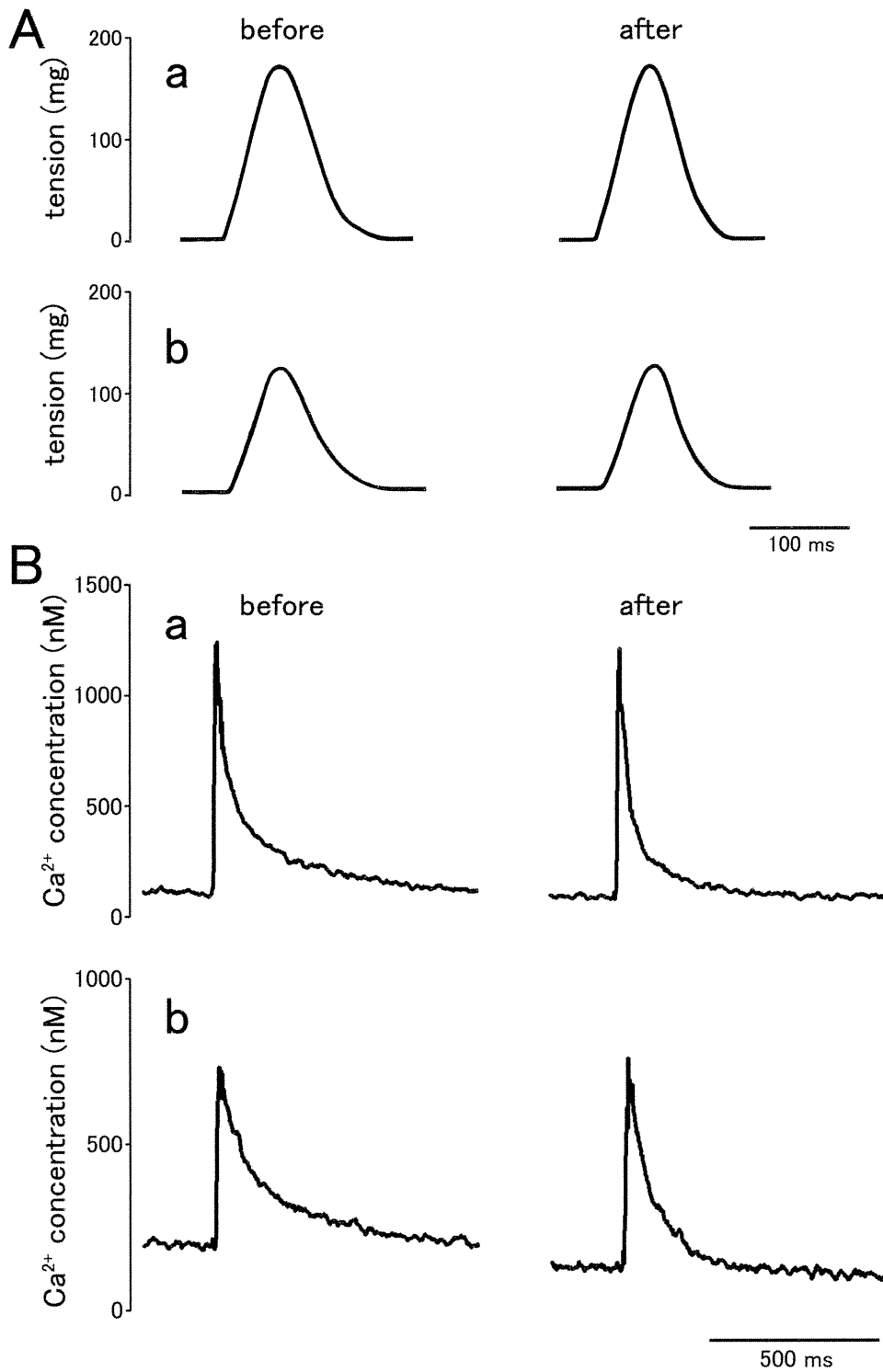


図12：心筋弛緩機能に対するellagic acidの影響。

Ellagic acid (10  $\mu\text{M}$ ) 投与前後の正常マウス (a) および糖尿病マウス (b) の収縮波形 (A) および  $\text{Ca}^{2+}$  transient 波形 (B)。Ellagic acid により弛緩速度および  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の減少速度が増大した。この変化は正常マウスよりも糖尿病マウスで顕著であった。

Gingerol (10  $\mu$ M)によりnormal群、STZ群ともにTR<sub>90</sub>が短縮したが、短縮の程度はSTZ群で有意に大きかった(図13A;表13)。Gingerolによりnormal群、STZ群ともにCa<sup>2+</sup> transient後半でのCa<sup>2+</sup>濃度の低下が加速され、t<sub>1/2</sub>や $\tau$ が減少したが、それらの程度はSTZ群で有意に大きかった

(図13B;表14)。Gingerol はnormal群、STZ群ともに収縮力やCa<sup>2+</sup> transientのamplitudeには影響を与えなかった。なお、ellagic acidおよびgingerolのこれらの作用はCPA前処置により消失した(表15)。

Gingerol decreased time to peak tension (TTP) and time to 90% relaxation (TR<sub>90</sub>) without significant effect on developed tension.

		Normal mice	Diabetic mice
TTP (msec)	before	48.6±1.62	56.7±0.89
	after	46.8±2.14	55.7±1.24
TR <sub>90</sub> (msec)	before	58.8±1.65	75.8±1.60
	after	51.4±1.32*	63.9±1.56*
	shortening	7.4±1.0	11.8±1.0 <sup>†</sup>

表13 : Gingerolによる弛緩機能の改善

正常マウスおよび糖尿病マウスにおける収縮弛緩パラメーター。Gingerolにより弛緩機能の改善が起きており、特に糖尿病マウスで顕著である。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*はgingerol投与前の値と、<sup>†</sup>は正常マウスの値と統計的有意差(P<0.05)があることを示す。

Gingerol accelerated the Ca<sup>2+</sup> transient decay and reduced the basal Ca<sup>2+</sup> concentration.

		Normal	Diabetic
Basal (nM)	before	141.8±10.5	246.5 ±8.7
	after	102.6±8.9*	179.9±9.6*
Peak (nM)	before	1128±52.1	806.2±29.4
	after	1185±54.2	808.4±29.2
Amplitude (nM)	before	986.1±61.0	559.7±35.4
	after	1083±50.0	628.5±35.5
T <sub>1/2</sub> (ms)	before	55.6 ±1.7	105.6±4.1
	after	39.6±2.5*	78.2 ±4.5*
$\tau$ (ms)	before	80.3 ±2.4	152.3±5.9
	after	57.2±3.6*	112.9±6.5*

表14 : GingerolのCa<sup>2+</sup>動態への影響

正常マウスおよび糖尿病マウスにおけるCa<sup>2+</sup>動態パラメーター。GingerolによりCa<sup>2+</sup>transient後半のCa<sup>2+</sup>濃度減少が速くなっている。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*はgingerol投与前の値と統計的有意差(P<0.05)があることを示す。

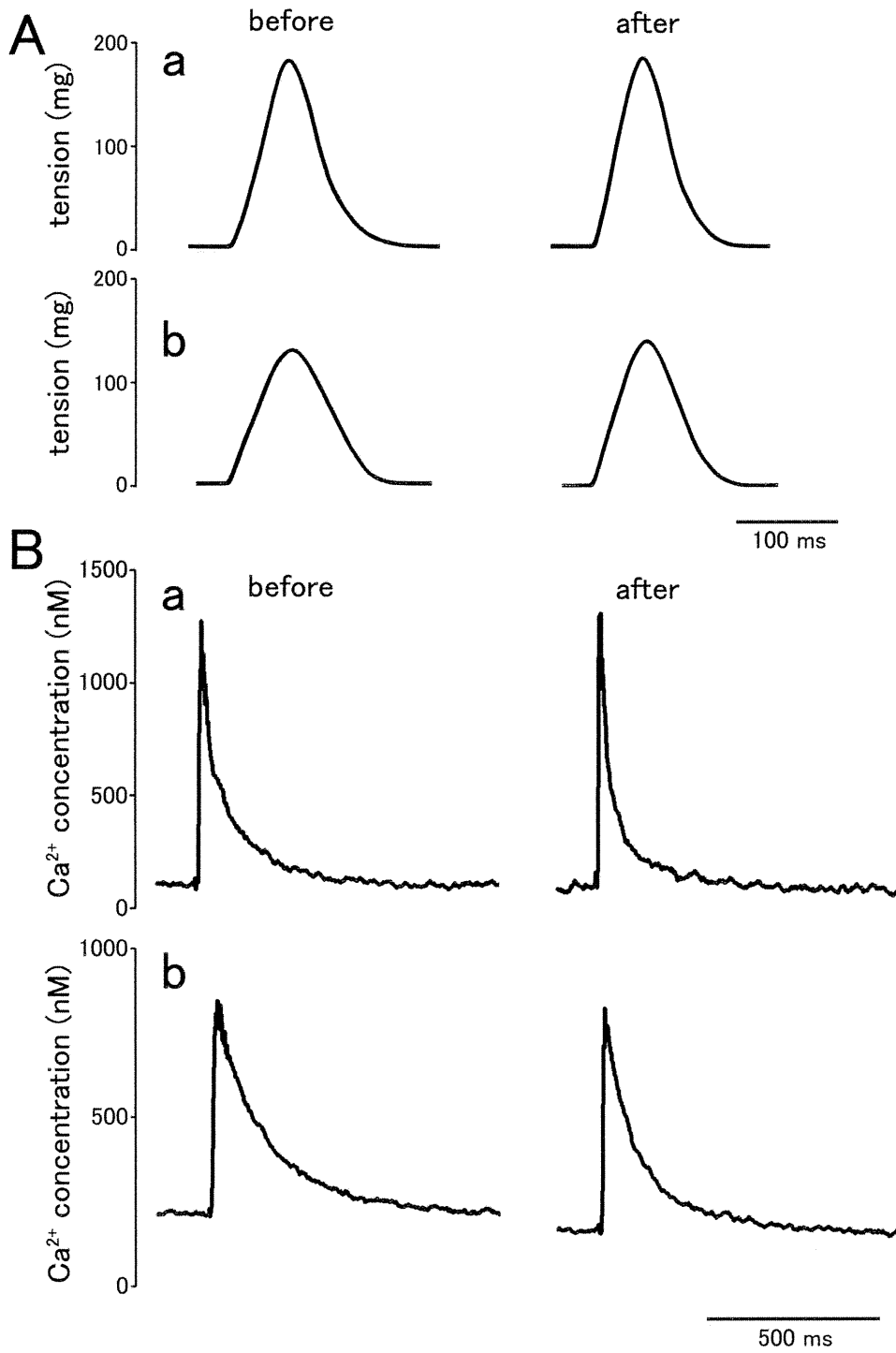


図13：心筋弛緩機能に対するgingerolの影響。

Gingerol (10  $\mu$ M) 投与前後の正常マウス(a)および糖尿病マウス(b)の収縮波形(A)およびCa<sup>2+</sup> transient 波形(B)。Gingerolにより弛緩速度およびCa<sup>2+</sup>濃度の減少速度が増大した。この変化は正常マウスよりも糖尿病マウスで顕著であった。



Effect of SERCA activators, Ellagic acid and Gingerol on time to peak tension (TTP) and time to 90% relaxation (TR<sub>90</sub>) in the presence of cyclopiazonic acid (CPA).

		CPA + Ellagic acid		CPA+ Gingerol	
		Normal mice	Diabetic mice	Normal mice	Diabetic mice
TTP (m sec)	before	66.6±0.6	68.0±1.7	65.8±1.1	67.6±1.8
	after	66.5±0.8	68.0±1.7	65.5±1.2	66.5±1.7
TR <sub>90</sub> (m sec)	before	100.7±2.9	103.4±2.6	101.6±2.3	95.8±2.0
	after	102.2±2.5	104.4±2.6	104.1±2.4	95.4±2.0
	shortening	-1.5±1.5	-1.1±1.3	-2.5±2.5	0.3±0.1

表15: CPA存在下でのEllagic acidおよびGingerolのCa<sup>2+</sup>動態への影響

正常マウスおよび糖尿病マウスにおけるCa<sup>2+</sup>動態パラメーター。CPA存在下ではEllagic acid, gingerolともに作用を示さない。値は6例の平均値と標準誤差を示す。\*はgingerol投与前の値と統計的有意差(P<0.05)があることを示す。

今回の研究では、拡張機能不全のモデル心筋を確立し、拡張機能改善薬の探索と機序解明を目指した。STZ群では血糖値の上昇や心重量/体重比の増大が起きており、いわゆる糖尿病性心筋傷害が発症した状態にあったと考えられる(表6)。STZ群ではCa<sup>2+</sup> transientの減衰が遅れており、弛緩機能も低下していたことから、糖尿病性心筋傷害にともなう心臓拡張機能不全の状態にあることが明らかになった(図10; 表7, 8)。Normal群、STZ群ともに、心筋の収縮力およびCa<sup>2+</sup> transientの減衰がCPAにより遅延したことから、拡張機能がSERCAの働きに依存していることが確認された(図11; 表9, 10)。なお、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換機構阻害薬は拡張機能に大きな影響は与えないことは確認済みである。これらのことから、STZ群でみられた心筋拡張機能障害はSERCA機能の低下が主な原因であることが判明し、SERCA機能を増大させる化合物の探索が可能になった。

Ellagic acidはブルーベリーなどの果実に含まれるポリフェノール類の一種、gingerolは生姜の成分のひとつである。これまでに両化合物がSERCA機能を増大させることを示す生化学的検討の結果は報告されているが、心筋組

織・細胞標本の収縮力およびCa<sup>2+</sup> transientを用いた検討はなされていなかった。今回の結果から、ellagic acidおよびgingerolがSERCA機能を増大させることによりCa<sup>2+</sup> transientの減衰および心筋の弛緩を促進することが明らかになった(図12, 13; 表11-14)。SERCA機能増大の詳細な分子機序は今後解明されなければならないが、SERCAそのものに作用している可能性や、SERCAの調節蛋白であるphospholambanを介して作用している可能性などが考えられる。

Ellagic acid, gingerolともに収縮力やCa<sup>2+</sup> transientのamplitudeを増大させる作用は示さなかった。これらの点はcAMP量の増大を介して奏効するβ受容体刺激薬やphosphodiesterase阻害薬とは異なっている。Ellagic acidに関しては心拍数にほとんど影響しないことも確認されている。cAMPを増大させる効果は頻脈や催不整脈などの好ましくない結果につながり得ることが知られているが、ellagic acidやgingerolにはこのような問題が無いことが期待される。

心不全の薬物治療では、心筋そのものの収縮性を改善するというよりはむしろangiotensin

系阻害薬等を用いて循環系全体の特性を長期的に改善する治療を目指す傾向にあるのが現状である。SERCA機能を増大させる薬物により心臓の拡張機能を直接改善させることが出来れば、拡張機能不全を原因とする心不全に対する新たな治療戦略を構築することが可能となる。今回の研究で見出されたellagic acidやgingerol等の化合物がそのための出発点になることを期待する。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

Akira Takahara, Takahiko Sugimoto, Takuma Kitamura, Kiyoshi Takeda, Yayoi Tsunooka, Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka. Electrophysiological and pharmacological characteristics of triggered activity elicited in guinea-pig pulmonary vein myocardium. *Journal of Pharmacological Sciences*. 115:176-181 (2011)

Hideaki Nouchi, Naoaki Kiryu, Mikio Kimata, Yayoi Tsunooka, Shogo Hamaguchi, Iyuki Namekata, Akira Takahara, Koki Shigenobu, Hikaru Tanaka. Developmental changes in action potential prolongation by  $K^+$  channel blockers in chick myocardium. *Journal of Pharmacological Sciences*. 115:235-238 (2011)

Iyuki Namekata, Noriko Tsuruoka, Yayoi Tsunooka, Tomoyuki Matsuda, Akira Takahara, Yoshio Tanaka, Takeshi Suzuki, Tetsuo Takahashi, Naoko Iida-Tanaka, Hikaru Tanaka. Blocking effect of NIP-142 on the KCNQ1/KCNE1 channel current exp

ressed in HEK293 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 34:153-155 (2011)

Hikaru Tanaka, Yayoi Tsunooka, Iyuki Namekata. Electropharmacological properties of the pulmonary vein myocardium. *Current Topics in Pharmacology. in press*.

Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka. Cardioprotective effects of  $Na^+-Ca^{2+}$  exchanger inhibition. *Recent Research Developments in Pharmacology. in press*.

### 2. 学会発表

藤原香織、岡貴之、大槻篤史、行方衣由紀、田中光、高原章  
ハロセン麻酔モルモットモデルにおけるジフェンヒドラミンおよびクロペラスチンの心臓電気薬理学的作用  
第124回日本薬理学会 関東部会 東京  
平成23年 6月

濱口正悟、廣田佳孝、大原皆人、川西徹、行方衣由紀、田中光  
SERCA 活性化薬はstreptozotocin 誘発糖尿病マウス心筋の弛緩機能を改善する  
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2011 北里大学 平成23年 8月

秋葉明子、恒岡弥生、行方衣由紀、田中光  
モルモットおよびラット肺静脈心筋の自発活動における細胞内 $Ca^{2+}$ の役割  
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2011 北里大学 平成23年 8月

金澤温子、行方衣由紀、田中光  
Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP)開閉観察系の構築  
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2011 北里大学 平成23年 8月 最優秀ポスター受賞

疋田康、恒岡弥生、行方衣由紀、田中光  
モルモット肺静脈心筋の自発活動に対する伸展刺激の影響  
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2011 北里大学 平成23年 8月

本多頼子、濱口正悟、行方衣由紀、田中光  
マウス心室筋活動電位波形の発達変化

次

世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2011 北里大学 平成23年 8月

田中光、濱口正悟、川上悠子、本多頼子、行方衣由紀

こどもの心臓からおとなの心臓へ-心筋興奮収縮機構の発達変化-

生体機能と創薬シンポジウム2011 日本薬学会 会長井記念館 渋谷 平成23年 9月

行方衣由紀、恒岡弥生、小川亨、中瀬古寛子、赤羽悟美、田中光

Efonidipine光学異性体を用いた洞房結節緩徐脱分極に関するCa<sup>2+</sup>チャンネル分子種

(Cav1.2、Cav1.3、Cav3.1)の薬理的検討

生体機能と創薬シンポジウム2011 日本薬学会 会長井記念館 渋谷 平成23年 9月

伊香賀玲奈、行方衣由紀、田中光、田中直子  
アクアポリン8ノックダウン脂肪細胞を用いた  
ミトコンドリア機能の可視化

第20回日本バイオイメーキング学会学術集会  
千歳科学技術大学 北海道千歳市  
平成23年 9月

疋田康、恒岡弥生、行方衣由紀、田中光

伸展刺激に起因するモルモット肺静脈心筋の  
高頻度自発活動について

第55回日本薬学会関東支部大会 東邦大学薬学部 平成23年 10月

本間邦恵、田中光、高原章

マウス心筋の再分極過程の特徴：心電図と単相性活動電位を用いた評価

第55回日本薬学会関東支部大会 東邦大学薬学部 平成23年 10月

恒岡弥生、行方衣由紀、川西徹、田中光

モルモット肺静脈心筋自発活動における細胞内Ca<sup>2+</sup>動態と電気生理学的性質

第125回日本薬理学会関東部会 日本大学薬学部 平成23年 10月

Iyuki Namekata, Yayoi Tsuneoka, Akiko Akiba,  
Hideki Nakamura, Hideaki Shimada, Hikaru Tanaka.

Membrane potential and intracellular calcium oscillations in the guinea-pig and rat pulmonary vein myocardium. The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section.

Tokyo, Japan 平成23年 12月

恒岡弥生、小林由佳、杉本貴彦、行方衣由紀、田中光  
モルモット肺静脈心筋の電氣的自発活動とカリウム電流

第85回日本薬理学会年会 京都 平成24年3月

濱口正悟、本多頼子、行方衣由紀、田中光

新生仔および成体マウス心室筋における興奮

収縮メカニズムに対する $\alpha$ 受容体刺激の影響  
第85回日本薬理学会年会 京都 平成24年3月  
岡貴之、大槻篤史、高橋由紀子、行方衣由紀、田中光

hERG チャンネルの電流及び細胞内移動に対する  
terfenadine および pentamidine の作用

第85回日本薬理学会年会 京都 平成24年3月  
行方衣由紀、恒岡弥生、田中光

肺静脈心筋の電氣的自発活動の発生機序：  
心房細動治療標的としての可能性

日本薬学会第132年会 特別シンポジウム：次世代創薬に向けた新たなストラテジー

札幌 平成24年3月

[III]

研究成果の刊行に関する一覧表