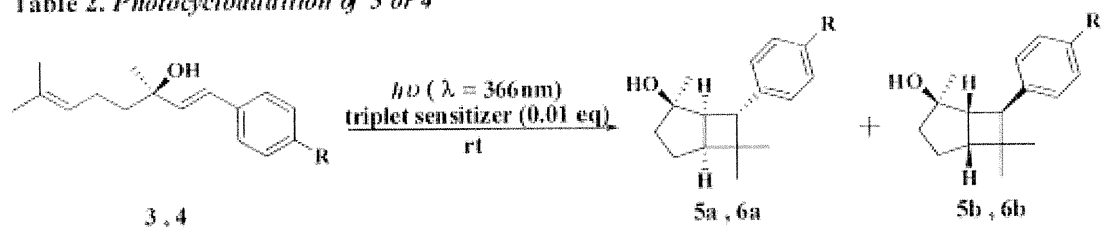


Table 2. Photocycloaddition of 3 or 4



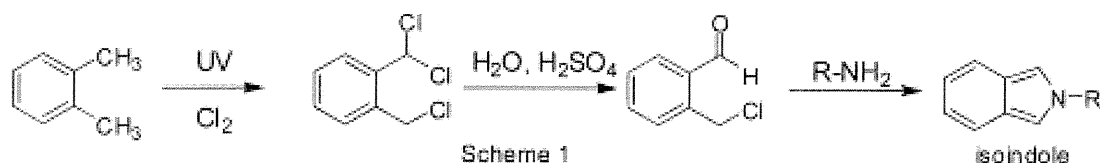
entry	R	triplet sensitizer	solvent	time [h]	yield [%]	5a : 5b	6a : 6b
1	H	benzophenone	CH ₃ CN	3	18	1 : 1	—
2	H	benzophenone	hexane	6	38	1 : 1.1	—
3	COOEt	benzophenone	CH ₃ CN	5	89	—	1 : 1.1
4	COOEt	NAN	CH ₃ CN	8	64	—	1 : 1.5
5	COOEt	NAN	hexane	4	54	—	1 : 1.7

いずれの基質1-3においても *exo*型の目的生成物のみが得られた。今後はこの反応を利用して天然物への合成を行っていく予定である。

1) 本田 清、須田直樹、星野雄
 二郎、井上誠一 日本化学会第 88
 春季年会 1J3-50 (2008)

【参考文献】

イソインドール誘導体の環化付加化合物の合成とその反応性



【緒言】インドールの異性体イソインドールは、2005年に伊藤、小野川らによって、入手容易かつ安価な α -キシレンを出発原料として合成する方法が見出された¹⁾ (Scheme 1)。

イソインドールの反応として、ジエノフィルとのDiels-Alder反応が知られている。しかし、その反応性やイソインドールの窒素上置換基による影響はあまり検討されていない。

【結果及び考察】 Scheme 1の方法で2-クロロメチルベンズアルデヒドに6種類のアミンを反応させ、イソインドール(1a-1f)

そこで、本研究では、窒素上置換基を変えたイソインドールと様々なジエノフィルのDiels-Alder反応性について調べるとともに、Diels-Alder型付加体から多置換ナフタレンへ誘導する反応について検討した。

を得た。イソインドール1は不安定のため単離せず、ジエノフィルとの反応でDiels-Alder環化付加体2, 3を生成した。(Table 1)。

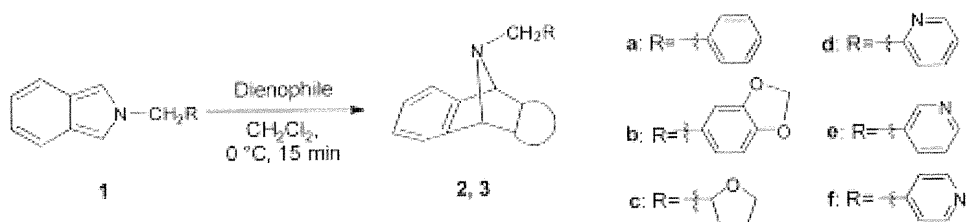


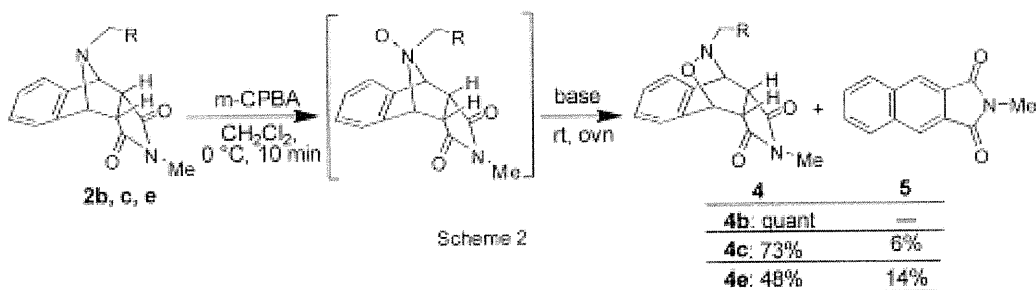
Table 1. Synthesis of Diels-Alder adducts

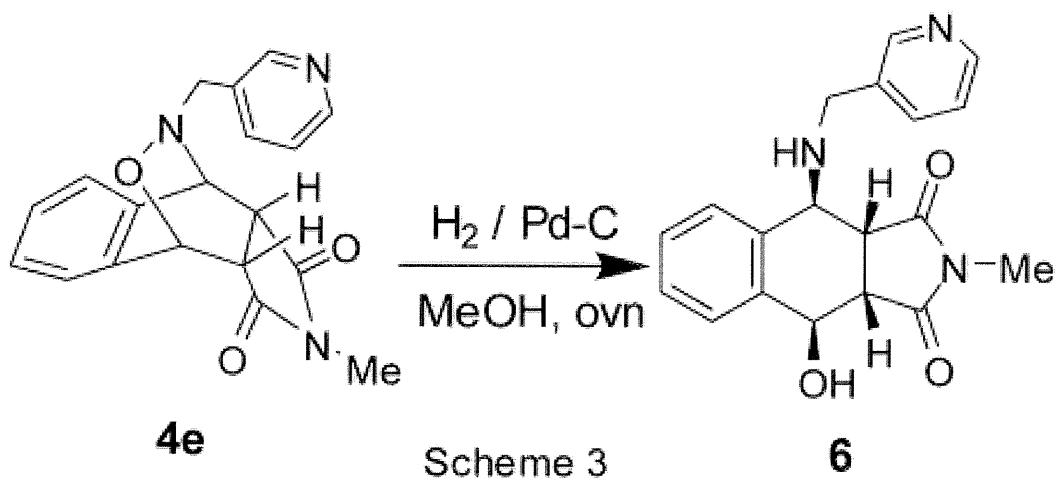
entry	dienophile	adduct	yield(%)	entry	dienophile	adduct	yield(%)	exo/endo
1		2a	86	7		3a	36	53:47
2		2b	77	8		3c	59	60:40
3		2c	61	9		3d	73	65:35
4		2d	22	10		3e	45	57:43
5		2e	44	11		3f	47	53:47
6		2f	39					

N-メチルマレイミドとの付加体 (**2a-2f**) は選択的に *endo* 型、一方でマレイン酸ジメチルでは *exo* 型と *endo* 型の混合物となった。

以上のようにして得られた Diels-Alder 型付加体 **2b** に酸化剤を作用させ、*N*-オキシドにし、塩基で処理したところ、

Meisenheimer 転位²⁾で化合物 **4b** を得た。しかし、**2c**、**2e** では、**4c**、**4e** とともに二置換ナフタレン **5** がそれぞれ 6%、14% で得られた (Scheme 2)。





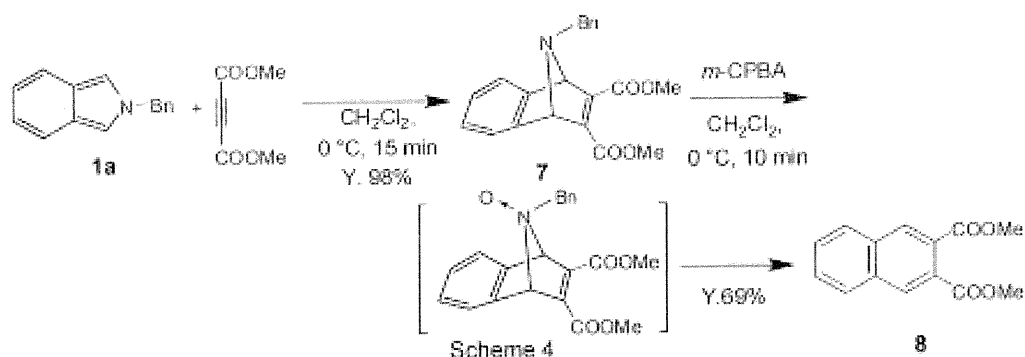
次に、Meisenheimer 転位化合物**4e**の還元反応を試みたところ、テトラリン誘導体**6**を定量的に得た (Scheme 3)。

また、イソインドール**1a**とアルキンの Diels-Alder 反応でも高収率で環化付加体**7**

を得ることが出来た。

そこで、環化付加体に酸化剤を作用させたところ、*N*-オキシド中間体は単離されず、直ちに二置換ナフタレン**8**を得た (Scheme

4)。



以上のように、イソインドールの窒素上の置換基Rまたはジェノフィルの種類を変えることで、イソインドールから効率良く、2,3-二置換ナフタレンまたは1,2,3,4-四置換テトラリン化合物を得ることが出来た。

タンデム型[3,3]シグマトロピー転位/求核付加反応を用いた炭素鎖伸長反応

イソプレン骨格で構成されるテルペン化合物は香料や医薬品などの多くの有用な化合物中に存在することが知られている。本研究は、これらの有用な連続するイソプレン骨格を効率的に構築することを目的としている。当研究室では、四級アリルアンモニウム塩からのエンアンモニウム塩の生成、続く[3,

【参考文献】

- 1) 伊藤和明、小野川善郎 JP 2006-335737
- 2) G. W. Gribble, R. W. Allen, *Tetrahedron Letters*, **41**, 3673 (1976)

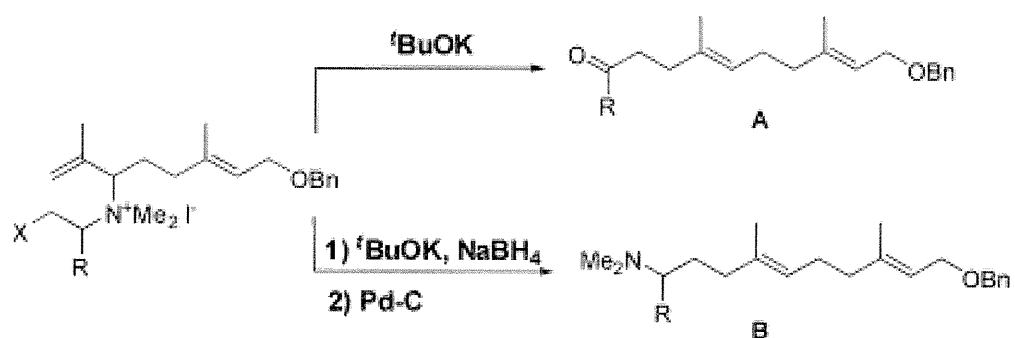
3)シグマトロピー転位反応の研究を行っている。この反応で新しく構築される二重結合はE選択的であることを特長とする。

今回、脱離基を有する種々の四級アンモニウム塩に塩基を作用させ、脱離を行わせ、続く[3,3]シグマトロピー転位反応により、生成するイミニウム塩の加水分解物であるアルデヒドAをE選択的に得た。また、水素化ホウ素ナトリウム存在下で塩基を作用させたところ、アミンボランが得られ、Pd-Cを作用

させることでアミンBを得た。更に、他のアミンBを得る。

ンモニウム塩基質 (R= isopropenyl) について

でも同様に反応検討を行ったので併せて報



Entry	R	X	Yield (%)	
			A	B
1 a)	H	PhO	58	29
2 a)	H	<i>p</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ O	89	39
3	H	AcO	81	20
4	H	F	81	36



a) 本田 清・高須典明・吉田真典・星野雄二郎・井上誠一, 2009, 日本化学会第89回春季大会.

南沢享（研究分担者）

A. 研究目的

高齢化の進む先進諸国においては、心血管障害による死因が常にトップクラスを占め、中でも心不全による死亡は年々増加している。心不全の治療には交換神経遮断剤やアンギオテンシン変換酵素阻害剤やなど有効な薬物治療があるものの、心不全患者の生命予後はいまだに極めて不良であり、心不全の新たな治療法を見いだすことは、現代の医療における重要課題のひとつとなっている。「心不全」は単一の病名ではなく、心臓がポンプとしての役割を果たせなくなるために生じた症候群である。この病態が形成される過程において、交感神経系や液性因子を含む多彩な要因が複合的に絡み合うため、病態が進行すればするほど、その治療が困難になる。従って、病初期に、心臓のポンプ機能を維持することが出来れば、心不全の進行を防ぐことが容易となるはずである。心臓のポンプ機能が低下すると、生体ではそれに適応するために交感神経系の活性化が生じる。しかし、交感神経系の活性化は一時的なポンプ機能の改善には役立つが、長期的にはむしろ心不全の病態を悪化させることが知られるようになった。故に、交感神経系ベータアドレナリン受容体遮断剤が慢性心不全の治療に用いられるようになった歴史的背景がある。

ベータアドレナリン受容体のサブタイプは少ないが、効果酵素であるアデニル酸シクラーゼには9つのサブタイプが知られており、5型あるいは心臓型とよばれるものは心臓に特異的に発現する。石川らの研究から、遺伝子的な心臓型の欠損は心機能低下を定常状態において引き起こさないが、各種のストレスに対する抵抗性を高め心筋保護作用があることが報告されている。このことから、心臓型サブタイプの選択阻害剤は、心不全治療薬として臨床応用が可

能となると思われる。

ヒトにむけた臨床試験を開始するに当たり、動物をもちいた前臨床試験においてPOCを確立する必要がある。とりわけマウスモデルにおいては、様々な心不全モデルが作製可能であり、さらに心エコーや心臓カテーテル検査による心機能測定など、ヒトにおいて行われている検査のほとんどが再現可能である。そこで、様々なマウスモデルの作製と共に、どのような心不全モデルにおいて心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果がもっとも顕著となるかの検討が必要である。我々は心臓のポンプ機能を調節する重要な因子である心筋細胞内 Ca^{2+} 、特に心筋筋小胞体における Ca^{2+} 調節機構に注目し、心不全の病態との関連や心筋筋小胞体における Ca^{2+} 調節について検討を行った。

心筋の中でカルシウムの調節を行う最も中心的な働きをしているのが、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵庫として発達した細胞内小器官である心筋筋小胞体である。心筋の収縮弛緩時における細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は、主に筋小胞体での Ca^{2+} の出入りによって制御されている。その制御に主役を演じる分子は、筋小胞体から Ca^{2+} を放出する心筋ライアノジン (ryanodine) 受容体と、筋小胞体へ Ca^{2+} を取り入れる心筋筋小胞体膜 Ca^{2+} ポンプ (筋小胞体 Ca^{2+} ATPase) である。さらに筋小胞体には、ライアノジン受容体や筋小胞体 Ca^{2+} ATPaseに相互作用する分子が多く存在し、それぞれの機能を巧みに調節している。心筋筋小胞体の機能低下や異常は、心不全の発症・進行に極めて深刻な影響を及ぼす。また、心筋筋小胞体分子の遺伝子変異は、心筋症や致死性不整脈の原因となることが分かっている。心不全や不整脈に対する本質的な治療法の開発を考えると、心筋筋小胞体蛋白は新たな標的として非常に重要である。我々はその中でも特に交感神経活性ならびにアデニル酸シクラーゼ活性、加齢や強度の運動負荷などの生理現象が筋小胞体 Ca^{2+} ATPaseを

制御する分子機構について検討を行った。

B. 研究方法

これまでに研究開発した様々なマウス心不全モデルにおいて、心機能変化の特性を比較検討し、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果を見るのに適切なモデルを考案した。

いわゆるTACモデルは、胸部大動脈レベルで動脈を結索し、そのため動脈圧が上昇する。そのため心臓に対する後負荷が上昇することによって、圧負荷モデルとしての利用が可能である。これはヒトモデルにおいては重度の高血圧症患者と類似する。

また慢性カテコラミン負荷モデルは、イソプロテレノールを植え込み式の浸透圧ポンプを利用して、マウス皮下に植え込み、1-3週間程度のカテコラミン負荷を行うモデルである。イソプロテレノール負荷により、慢性的な交感神経活動の上昇をきたしたモデルとして利用できる。このため交感神経活動の上昇により、慢性的に心拍数が上昇し、心新機能活動を活性化することとなる。この異常な交感神経活動の亢進による心機能低下が、1-3週間後に心不全として完成される。これは慢性交感神経亢進モデルであり、ヒト心不全患者に類似する。

心臓がポンプとしての役割を十分に果たせなくなると、生体が恒常性を保てなくなり、全身の器官・組織の機能に異常が生じる。これが慢性化すると、それぞれの器官の機能異常が相互に作用し、さらなる機能異常や器質的変化をもたらす。それは心臓自体にも悪影響を及ぼし、心機能はさらに低下する。その結果、全身の器官が機能異常をおこす悪循環は一層加速し、全身に様々な症状が現れる。この状態を心不全と呼ぶ。従って、「心不全」は単一の病名ではなく、心臓がポンプとしての役割を果たせなくなったために生じた症候群としてとらえられる。これまでの研究では、心不全をきたす原因の違いにか

かわらず、心不全時には心筋筋小胞体の機能低下がほぼ共通に認められることから、心不全の発症機転及び進行に極めて重要であることがわかってきている。そこで本研究では遺伝子操作技術によって、心筋筋小胞体膜Ca²⁺ポンプ（筋小胞体Ca²⁺ATPase）の活性を調節するサルカルメニン(sarcolumenin)と呼ばれるカルシウム結合蛋白を欠損させたサルカルメニンノックアウトマウスを作成した。このマウスでは心筋筋小胞体機能が低下しているため、負荷をかけることで心機能が如何に変化するかを検討した。また、熱ショックタンパク質のひとつである $\alpha\beta$ クリスタリンの遺伝子変異型マウスはヒト拘束性心筋症様の病態を呈し、筋小胞体機能が低下することを見出し、本マウスに関してもモデルとしての検討を行った。

次に、交感神経緊張による不整脈の出現も心不全を悪化させる重要な要因であるため、拘束ストレスにより不整脈を誘発するモデルの確立を行った。

さらにアデニル酸シクラーゼ阻害剤を用いた際に全身に及ぼす影響を検討するため、血管細胞でのアデニル酸シクラーゼサブタイプの働きの相違について、検討を行った。

C. 研究結果

これまでの研究論文によれば、TACによる圧負荷モデルおよびイソプロテレノール慢性投与モデルの両者において、心臓型アデニル酸シクラーゼの遺伝子欠損は心筋保護作用を示している。そこでどちらのモデルが、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果判定を行うのに適当であるかを検討したところ、3週間のカテコラミン負荷によって、コントロール群では心筋肥大とともに心機能の顕著な低下がみられたが、同阻害剤群では心機能の低下はみられなかった。さらに心機能に加えて心筋細胞の形態的変化および細胞死の程度を検討したところ、同阻害剤投与

群において顕著な心筋細胞死の減少と、心筋繊維化の抑制が見られた。

サルカルメニンノックアウトマウスでは、加齢や強度の運動負荷をかけると筋小胞体機能低下が進行し、心機能が顕著に悪化することが判明した。さらにTACによる圧負荷をかけると一層、心機能は低下し、死亡率が上昇した。これらのマウスでは交感神経活性が亢進していた。以上のことから本モデルは、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果判定を行うのに適当であると考えられた。

$\alpha\beta$ クリスタリンの遺伝子変異型マウスはヒト拘束性心筋症様の病態を呈し、生後23週を過ぎることから急速に死亡した。死亡の原因を調べるために持続的心電図検査を行ったところ、心筋内刺激伝導障害などの不整脈を頻回に認めた。また交感神経・迷走神経系の異常が認められ、自律神経機能異常があることがわかった。さらに筋小胞体機能が低下し、小胞体ストレスが認められた。以上のことから本モデルは、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果判定を行うのに適当であると考えられた。

次に、拘束ストレスにより交感神経緊張による不整脈の誘発をラットに対して行ったところ、心室性頻拍をはじめとする不整脈の出現頻度・重症度ともに増加した。交換神経活性を低下させるためにchewing（木を噛ませる）処置を施したラットでは有意に不整脈の出現頻度・重症度ともに低下した。以上のことから本モデルは、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果判定を行うのに適当であると考えられた。

さらに胎生期にみられる動脈管は生理学的に内膜肥厚があり、動脈硬化や傷害血管の良いモデルとなるが、動脈管ではアデニル酸シクラーゼ6型が内膜肥厚を促進させる働きがあることを見出した。アデニル酸シクラーゼ5型は内膜肥厚に関与せず、アデニル酸シクラーゼ2型は内膜肥厚を抑制させる働き

があることを見出した。

E. 結論

イソプロテレノール持続注入モデルは、心臓型サブタイプの阻害剤の心不全予防効果を判定するのに適切なモデルであることがわかった。心機能を維持することが出来るのみならず、心筋の繊維化を抑制することが出来たことから、いわゆる過剰な交感神経刺激によって引き起こされる心筋細胞死をブロックする機能を持つことが考えられた。

アデニル酸シクラーゼ欠損動物からの治験では、心筋細胞内のMEK系統のシグナル変化を起すという予想がある。本例においても同様の防御メカニズムが働いている可能性がある。更に異なったマウスモデルに対する予防効果を今後検討していきたい。

F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sato M, Jiao Q, Honda T, Kurotani R, Toyota E, Okumura S, Takeya T, **Minamisawa S**, Lanier SM, Ishikawa Y. Activator of G protein signaling 8 (AGS8) is required for hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes: Role of gbetagamma and connexin43 (CX43). *J Biol Chem.* 284 (45):31431-40, 2009.

Akaike T, Jin MH, Yokoyama U, Izumi-Nakaseko H, Jiao Q, Iwasaki S, Iwamoto M, Nishimaki S, Sato M, Yokota S, Kamiya Y, Adachi-Akahane S, Ishikawa Y and **Minamisawa S**: T-type Ca^{2+} channels promote oxygenation-induced closure of the rat ductus arteriosus not only by vasoconstriction but also by neointima formation. *J. Biol. Chem.* 284: 24025-34 2009

Jiao Q, Bai Y, Akaike T, Takeshima H, Ishikawa Y, **Minamisawa S**. Sarcalumenin is essential for maintaining cardiac function during endurance exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 297(2):H576-82, 2009.

南沢享. 心臓の中のカルシウム:旧友の新たな役目. 日本小児循環器学会雑誌 25(2): 22-29, 2009.

Yokoyama U, **Minamisawa S**, Katayama A, Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, Iwasaki S, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Yokota S, Hammond HK, Ishikawa Y. Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. *Circ Res* 106 (12): 1882-92, 2010.

Yokoyama U, **Minamisawa S**, Ishikawa Y. Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. *J Smooth Muscle Res*. 46 (2): 77-87, 2010.

横山詩子, **南沢享**, 中澤誠. 出生に関わる循環アダプテーション③動脈管の分子生物学. *Fetal & Neonatal Medicine* 2 (2): 12-15, 2010. 82. Koizumi S, **Minamisawa S**, Sasaguri K, Onozuka M, Sato S, Ono Y. Chewing reduces sympathetic nervous response to stress and prevents post-stress arrhythmias in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 301(4):H1551-8, 2011.

Jiao Q, Takeshima H, Ishikawa Y, **Minamisawa S** (correspondence). Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity. *Cell Calcium* (in press) 2011.

1. 学会発表

南沢 享、横山 詩子. 動脈管閉鎖の分子機序: プロスタグランジンの予期せぬ役割. (ワークショップ: 1W15 心臓大血管形成における器官形成メカニズムの普遍性と独自性): 第32回日本分子生物学会. 横浜、パシフィコ横浜、2009年 12 月 9-12日.

Minamisawa S, Akaike T, Yokoyama U, Ozawa M, Iwasaki S, Ishikawa Y. Oxygenation Promotes Smooth Muscle Cell Migration in the Rat Ductus Arteriosus. BCVS Conference-Molecular Mechanisms of Cardiovascular Diseases. Lake Las Vegas, Nevada. July 20-23, 2009.

片山綾子、横山詩子、赤池徹、**南沢享**、石川義弘. ラット動脈管における6型アデニル酸シクラーゼの内膜肥厚形成作用. 第13回 Molecular Cardiovascular Conference. 北海道、キロロ”ホテルピアノ”、2009年 9 月 4-6 日

横田知大、中野敦、中野治子、金美花、小沢基、赤池徹、横山詩子、石川義弘、星島正彦、Kenneth R. Chien、**南沢享**. 心房特異的発現を制御するサルコリン-Creノックインマウス. 第13回Molecular Cardiovascular Conference. 北海道、キロロ”ホテルピアノ”、2009年9月4-6日

Katayama A, Yokoyama U, Tang T, Akaike T, Hammond KH, **Minamisawa S**, Ishikawa Y. ADENYLYL CYCLASE TYPE 2 AND 6 DIFFERENTIALLY PROMOTE VASCULAR TONE AND REMODELING IN THE DUCTUS ARTERIOSUS. 36th International Congress of Physiological Sciences. Kyoto. July 31. 2009.

Minamisawa S, A new role of prostaglandin E-cAMP pathway in neointima formation of the ductus arteriosus. Department of Anesthesiology Division of Molecular Medicine Special Seminar, March. 4th, 2010.

南沢 享. プロスタグランジンEの新たな作用—動

脈管リモデリングへの多面的関与:第8回京都心血管代謝セミナー. 京都、杉浦ホール、2010年6月4日.

Minamisawa S, Akaike T, Yokoyama U, wasaki S, Ishikawa Y. Oxygenation Promotes Migration of Smooth Muscle Cell in the Rat Ductus Arteriosus. Developmental Vascular Biology Workshop IV - February 10-13, 2010 at the Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, Monterey, California.

Minamisawa S, Yokoyama U, Akaike T, Hammond K, Ishikawa Y. Counteracting regulation of vascular remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. The 16th International Vascular Biology Meeting (2010. 6. 20-24, Los Angeles)

Minamisawa S (シンポジスト). A comprehensive approach to understand the formation of the cardiovascular network (Overview). The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011. 3. 28-30, Yokohama) J Physiol Sci. 61(Suppl. 1):S25, 2011.

Jiao Q, Akaike T, Takeshima H, Ishikawa Y, **Minamisawa S**. Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2011. 3. 28-30, Yokohama) J Physiol Sci. 61(Suppl. 1):S200, 2011.

Jiao Q, Takeshima H, **Minamisawa S**. Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decrease in SERCA2A expression and activity. The 7th Congress of the Federations of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS). (2011. 9. 14. Taipei, Taiwan).

Jiao Q, Sanbe A, **Minamisawa S**. Overexpression of

R120g $\alpha\beta$ -Crystallin Causes Cardiac Arrhythmias, Reduced Heart Rate Variability, Alteration in the Expression Of Ca²⁺ Handling Proteins and Er Stress in Mice. The 85th Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2011. 11. 16, Orlando, USA) Circulation. Oct. suppl. II; 2011 (Abstract)

Kato Y, Yokoyama U, Okumura S, **Minamisawa S**, Sata M, Miyajima E, Ishikawa Y. Epac1 Deficiency Inhibit Neointima Formation After Vascular Injury in vivo The 85th Scientific Session, American Heart Association (AHA) (2011. 11. 16, Orlando, USA) Circulation. Oct. suppl. II; 2011 (Abstract)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
検討中
2. 実用新案登録
なし
3. その他

高齢者に向けた心不全治療薬の開発:細胞機能測定

研究分担者 田中 光 東邦大学薬学部教授

研究要旨

心臓の興奮収縮機構を脱分極、再分極、細胞内Ca²⁺制御の3つの観点から詳細に検討し、新たな治療薬開発への基盤を築くことを目的とした。主に摘出心筋標本を用いて、電気生理学的解析・薬理学的解析を行った。ペースメーカーの本質である緩徐脱分極機構に関しては、洞房結節の正所性自動能ではL型Ca²⁺チャネルのCa_v1.3およびT型Ca²⁺チャネルのCa_v3.1にコードされるタイプの寄与があり、efonidipine等これらの電流系を遮断する作用を有する薬物から徐脈薬が開発できる可能性が示された。肺静脈心筋層の自動能に関しては、細胞内で高まったCa²⁺をNa⁺-Ca²⁺交換機構が細胞外にくみ出すことで生じる脱分極が引き金になっていることが判明した。この肺静脈心筋層の異所性自動能は、自律神経により影響されることが判明した。再分極に関しては、肺静脈心筋では再分極力が弱いことで高頻度電気刺激により撃発活動が誘発されやすいことや、アセチルコリン活性化K⁺チャネルの開口により自発活動を抑制できることを示した。細胞内Ca²⁺制御に関しては筋小胞体のポンプ(SERCA)について検討し、糖尿病マウス心筋では心室筋の拡張能が低下していること、それが主としてSERCA機能の低下に起因すること、SERCA活性化作用を有する薬物により拡張能が改善されることを見出した。以上のように、徐脈薬、抗不整脈薬の開発の出発点となる新たな治療標的蛋白質および治療薬開発の出発点となる化合物が見出されるとともに、心筋拡張不全の発症機序と治療薬に関連する知見が得られた。

A. 研究目的

近年、副交感神経興奮により誘発される心房細動や心室性不整脈による突然死など従来にないタイプの循環器系の障害が増加している。これらの循環器系疾患は働き盛りの成人のQOLを著しく損なうことから、有効な予防法・治療

法の確立が社会的急務である。これらの疾患が多発する機序として、社会環境の変化によるストレスが神経系を介してイオンチャネルやトランスporterなどに悪影響を及ぼし、心臓の興奮収縮機構に異常を生じさせていると考えられる。このような現状をふまえ、本研究では心臓の興奮収縮機構を脱分極、再分極、細胞内

Ca²⁺制御の3つの観点から詳細に検討し、心房細動や心不全に対する新たな治療戦略確立への基盤を築くことを目的とした。

B. 研究方法

1. 心室筋の収縮力の測定

マウスを頸椎脱臼させ、直ちに開胸、心臓を摘出した後、右心室遊離壁を短冊状に切り離して実験に用いた。またモルモットを頸部より放血致死後、開胸して直ちに心臓を摘出し、右心室乳頭筋を標本として測定を行った。標本の一端を、20 mlの栄養液 (NaCl 113.1, KCl 4.6, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 22, glucose 10 mM, pH 7.4, 36-37 °C) を満たしたorgan bathの底のシリコンブロックに、電気刺激用の白金双極電極で固定し、他端を歪みトランスデューサー (TB-611T、日本光電) の先端に固定したステンレス製ピンで刺した。標本を水平に保持して、刺激装置 (DPS-07、ダイヤモンドカル) からのfield刺激 (持続時間3 ms、閾値の約1.5倍の電圧) により1 Hzで駆動し、等尺性に収縮力を測定した。発生張力はトランスデューサーを介して歪応力用アンプ (AP-621G、日本光電) で増幅し、インク書きレコーダー (CP-600G、日本光電) に記録した。静止時張力は各標本で最大の張力を発生するように設定した。即ち、静止時張力の状態から徐々に標本を伸張してゆき、刺激によって発生する収縮の張力変化がそれ以上大きくならない状態に達するまで伸張を続けた。

2. 微小電極法による活動電位の測定

ウサギ、モルモット、マウスの右心房筋標本、およびモルモット、マウスの肺静脈標本の活動

電位の記録を行った。肺静脈標本は実体顕微鏡下で肺組織と丁寧に分離して作製した。標本を20 mlの栄養液に満たしたorgan bath底のシリコンブロック上にステンレス製ピンで水平に固定した。自動能を有していない標本は、刺激装置 (SEN-3201、日本光電)、アイソレーター (SS-302J、日本光電) から白金双極電極を用いて、1 Hz、幅3 msの短波長 (閾値の1.2倍の電圧) で駆動した。Organ bath中の栄養液の温度は36±0.5 °Cに保った。細胞内活動電位は定法に従い3 M KClで満たして細胞内に刺入したガラス微小電極 (GD-2、成茂科学) から導出し、高インピーダンス型アンプ (MEZ-8201、日本光電) で増幅後、陰極線オシロスコープ (VC-10、日本光電) でモニターしつつアナログ・デジタルコンバーター (ANALOG-PRO DMA、カノーパス電子) を介してパーソナルコンピュータ (PC9801 FA、日本電気) に取り込んで記録、解析した。

活動電位のパラメーターとして、静止膜電位 (Resting potential, RP)、Overshoot (OS)、Action Potential Amplitude (APA)、90%再分極時の活動電位持続時間 (APD₉₀)、最大立ち上がり速度 (+Vmax) をANALYSIS (沢田&平野 1988) で解析した。

3. 心筋単離細胞の調製

マウスおよびモルモットの心臓からLangendorff灌流法により心室筋細胞および肺静脈心筋細胞を単離した。マウスでは、素早く心臓を摘出後、大動脈内を大動脈弁方向に逆行性にカニューレを挿入し、Langendorff灌流標本作製した。またモルモットおよびラットは*in situ*で大動脈内にカニューレを挿入し、Langendor

ff灌流標本を作製した。正常Tyrode液を3~5分間、次いでCa²⁺除去Tyrode液を20分間、更にCa²⁺除去Tyrode液に0.2 mg/ml collagenase (ヤクルトYK101) を添加した酵素溶液を約10分間灌流した。最後に、collagenaseを洗い流すために、Ca²⁺除去Tyrode液を約20分間、高K⁺溶液を約20分間灌流した。灌流を止め、心臓を高K⁺溶液を含む容器に移し、心房を取り除いた後、眼科バサミで心室を粗くミンスし、軽く振って心筋細胞を遊離させ単離心筋細胞を得た。灌流液はすべて100% O₂で十分に通気し、35~36 °Cに保った。また、単離した心筋細胞は、実験に用いるまで室温放置し、高K⁺溶液中に保存した。細胞単離に用いた溶液の組成(mM)を以下の通りである。

正常Tyrode液: NaCl 143, KCl 5.6, MgCl₂ 1.0, CaCl₂ 1.8, glucose 5.5, HEPES 5, NaH₂PO₄ 0.33 (pH 7.4 with NaOH)

Ca²⁺除去Tyrode液: NaCl 143, KCl 5.6, MgCl₂ 1.0, glucose 5.5, HEPES 5, NaH₂PO₄ 0.33 (pH 7.4 with NaOH)

高K⁺溶液: glutamic acid 70, taurine 15, KCl 30, KH₂PO₄ 10, MgCl₂ 0.5, glucose 11, HEPES 10, EGTA 0.5 (pH 7.3 with KOH)

4. 細胞内カルシウム濃度の測定

4-1) 落射蛍光画像取り込み・解析システムを用いた細胞内カルシウム濃度の測定

落射蛍光顕微鏡 (Olympus, IX70) のステージ上に蛍光プローブを取り込ませた細胞を置き測定を行った。モノクロメーターのグレーティングシステムによりキセノンランプ光のうちプローブに合った励起光のみを取り出し、ダイクロイックミラーで励起光と蛍光を分離した。蛍光はさらにバリアフィルターを通し、この蛍

光像を高速冷却CCDカメラ (HISKA CCD CAMERA C6790、浜松ホトニクス) で取り込み、コンピュータ (Endeavor、エプソン) 上で解析ソフトウェア (アクアコスモス Ver2.5、浜松ホトニクス) を用いて解析を行った。蛍光レシオ画像を随時取得し、細胞質領域内の平均蛍光強度の経時変化をグラフ化した。マウス単離心室筋細胞においてカルシウムイオンの蛍光プローブであるIndo-1のアセトキシメチル体を用いて実験を行った。351±20 nmの光を励起光とし、蛍光は405±10 nmおよび480±10の波長域のratioとして画像化した。

4-2) 共焦点顕微鏡を用いた細胞内カルシウム動態の解析

モルモット、ラット単離肺静脈心筋細胞および組織標本にアセトキシメチル体5 μM処置によりFluo-4を取り込ませ、LSM510 META (Carl Zeiss社) を用いて、細胞内Ca²⁺動態を画像化した。488 nmで細胞を励起し、505 nm以上の蛍光を検出した。スキャンスピードをline/960 μsecに設定して蛍光画像を取得し、長さ2 μmの領域を設定して蛍光強度の経時変化を解析した。

4-3) 細胞内カルシウム濃度のキャリブレーション法

それぞれの細胞において、*in situ*にて細胞内カルシウムのキャリブレーションを行った。測定終了後、細胞外液を10 mM EGTA、10 μM ionomycin、5 μM FCCP、5 μM rotenoneを含んだCa²⁺ free溶液に変え、10~20分後のratio値をR_{min}とした。その後細胞外液を10 μM ionomycin、5 μM FCCP、5 μM rotenoneを含んだ正常Tyrode液に交換し、1~2分後のratio値をR_{max}とした。細胞内Ca²⁺はこれら測定したR_{min}、R_{max}とカ

ルシウム蛍光プローブのKd値 (indo-1; 250 nM) から以下の式で算出した。なお、 F_{free} は Ca^{2+} 非存在下での蛍光強度 (indo-1; 480 nmでの値)、 F_{bound} は過剰 Ca^{2+} 存在下での蛍光強度(indo-1; 480 nmでの値) で算出した。

$$[Ca^{2+}] = Kd \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times F_{free} / F_{bound}$$

5. 肺静脈組織染色標本の作製

マウス肺静脈標本を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。その後標本をパラフィン包埋し、4 μ mの厚さで亜連続切片を作用し、スライドガラスに標本を貼り付けた。スライドガラス上の標本の筋組織と結合組織を染めるためにMasson-trichrome染色を行い、それに連続する標本は抗アクチン(α -SMA) モノクローナル抗体で染色し平滑筋の分布を調べた。

6. 哺乳動物培養細胞の調整

各種イオンチャネル蛋白質を発現させる哺乳動物の細胞系としてHEK293細胞を用いた。セルバンカー (血清入り、BLC-1) で-80 $^{\circ}$ Cに凍結保存してあるHEK293細胞を溶解し、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium、FBS入り、GibcoTM) 中に分散させ、36 $^{\circ}$ C、5% CO_2 環境下で培養した。増殖したHEK293細胞はPBS (Phosphate Buffered Saline 7.2、GibcoTM) で浮遊させ軽く攪拌したのち、DMEM (10% FBS入り) にその細胞懸濁液を2, 3滴入れ、継代培養した。凍結保存方法は3001 (Falcon) のdishに $3 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 個程度のcell数を用い、これらの細胞を500 μ LのPBSで浮遊し軽く攪拌させ4.5 mLのセルバンカー (血清入り、BLC-1) を加え攪拌し、直ちにチューブに移し-80 $^{\circ}$ Cに保存した。

7. イオンチャネル安定発現細胞株の樹立

各種 Ca^{2+} チャネルおよび K^+ チャネルのcDNAをヒトライブラリーよりPCR法で増幅し、全長をpIRES2-EGFPベクターのマルチクローニングサイトに挿入した。これをリポフェクタミン (Gibco BRL) を用いたリポフェクション法によりHEK293細胞に導入した。このベクターは、外来遺伝子を挿入できるCMVプロモーターと、internal ribosome-entry siteであるIRESを持っている。このベクターを使用することで、遺伝子が導入された細胞は必ずGFPも発現していることになる。そのため488 nmの励起光照射によるGFPの蛍光を遺伝子導入の指標とした。更に遺伝子発現を確実にするためにはベクター上に存在するneomycin resistance geneを発現させ、発現株を選別することが重要である。そのため、培養液DMEM中に400~500 μ g/mlのG418 (Geneticine、Gibco BRL) を含有させた。

8. 膜電流の記録

各イオンチャネルを安定発現したHEK293細胞にパッチ電極を装着し、パッチクランプ用増幅器 Axopatch 1Dを用いて膜電位を制御して膜電流を検出し、ADコンバータを介してコンピュータで記録、解析した。用いた栄養液は以下の通りである。

細胞外液正常Tyrode液: NaCl 143, KCl 5.6, $MgCl_2$ 1.0, $CaCl_2$ 1.8, glucose 5.5, HEPES 5, NaH_2PO_4 0.33 (pH 7.4 with NaOH)

パッチ電極内液: KOH 143, KCl 40, aspartic acid 70, $MgCl_2$ 2.0, ATP- K_2 5.0, creatine phosphate- K_2 5.0, HEPES 5.0, EGTA 10.0 (pH 7.2 with KOH)。

9. 統計処理

実験結果に示した値は、平均値 \pm 標準誤差で

表した。また、有意差検定は、Student's unpaired t-test、t-test、 χ^2 検定、Fisherの正確確立検定またはDunnettの多群検定を行った。

10. 倫理面への配慮

すべての実験は日本薬理学会の定めるGuiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animalsに従って行った。哺乳動物からの心臓摘出は動物に苦痛を与えないようにすべてペントバルビタールによる過剰麻酔下に行った。

C. 研究成果

1. 心筋の脱分極機構に関する研究

1-1 洞房結節の緩徐脱分極機構へのCa_v1.3チャンネル電流の寄与

心臓本来の(正所性の)ペースメーカーは洞房結節の自動能である。ここでは先行する活動電位が終了し、膜電位が最も過分極した時点から緩徐な脱分極が見られ、これが次の活動電位発生の閾値に達すると急速な脱分極、すなわち活動電位の発生に至る。従って自発活動の本質はこの緩徐脱分極相であるといえる。洞房結節の急速脱分極相は主としてL型Ca²⁺チャンネルの中でも最も一般的なCa_v1.2にコードされるタイプからのCa²⁺流入により生じることが知られているが、緩徐脱分極を起こしているイオンチャンネルの詳細は明らかにされていない。そこで我々は洞房結節の緩徐脱分極に関与するチャンネル分子種の解明を目指した。薬理的ツールとしてはefonidipineを用いた。Efonidipineはdihydropyridine構造を有する高血圧症・狭心症治療薬であり、緩徐で持続性の降圧作用を有する。Efonidipineは穏やかな徐脈作用や腎臓

保護作用など、臨床的に優れた特徴を有することが知られているが、これらは当初efonidipineの作用発現が緩徐であることに起因すると考えられていた。ところが、我々は摘出心筋標本を用いた検討により、efonidipineが心筋のL型およびT型両Ca²⁺チャンネルを遮断して緩徐脱分極を抑制し、徐脈作用を示すことを明らかにした。本研究ではさらにefonidipineの2つの光学異性体およびnifedipineの摘出洞房結節組織標本に対する作用を検討するとともに、細胞系に発現させたCa²⁺チャンネル電流に対する作用と比較して緩徐脱分極相に寄与するCa²⁺チャンネル分子種を検討した。

ウサギ摘出洞房結節組織標本にガラス微小電極法を適用して測定したところ(図1;表1)、S(+)-efonidipine(1 μ M)は緩徐脱分極相および急速脱分極相の傾きを有意に減少させた。nifedipine(1 μ M)は急速脱分極相を有意に減少させたが、緩徐脱分極はわずかに減少させた。R(-)-efonidipine(1 μ M)はこれらの傾きにはほとんど影響を与えなかった。

次にこれらの化合物の各種Ca²⁺チャンネル電流に対する作用をwhole cell voltage clamp法を用いて検討した(図2)。

S(+)-efonidipineはCa_v1.2チャンネル電流、Ca_v1.3チャンネル電流、Ca_v3.1チャンネル電流のすべてを濃度依存的に遮断した。遮断の効力は3種のチャンネルに対して同程度であり、S(+)-efonidipine(1 μ M)により遮断された割合およびEC₅₀値は、Ca_v1.2チャンネル電流が75.7%および0.46 μ M、Ca_v1.3チャンネル電流が75.3%および0.32 μ M、Ca_v3.1チャンネル電流が94%および0.11 μ Mであった。

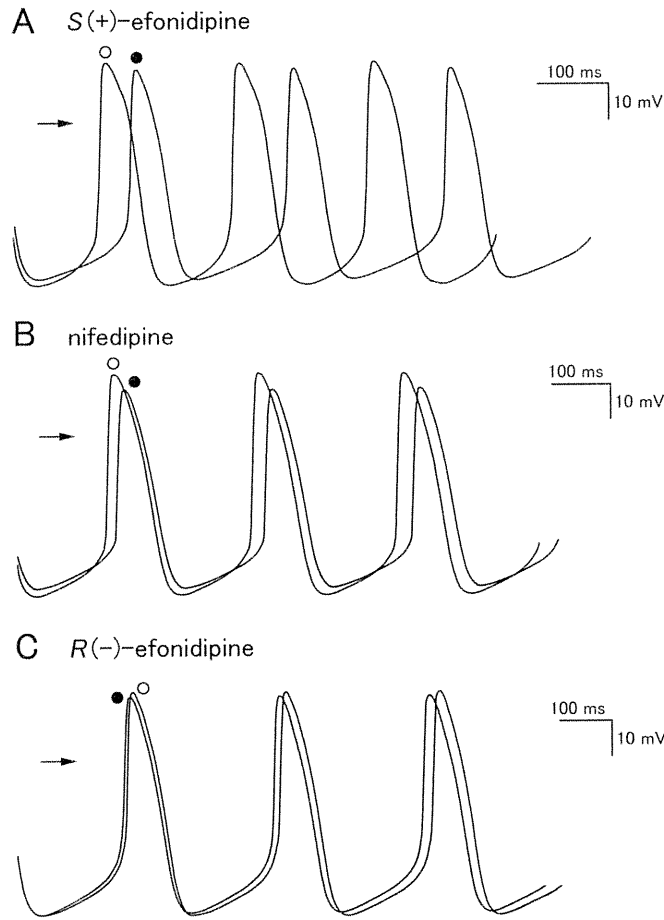


図1 : ウサギ洞房結節活動電位に対する*S(+)*-efonidipine, nifedipine, *R(-)*-efonidipineの作用。1 μM 投与前(○)および投与後(●)の典型的トレース。矢印は0 mVを示す。

	<i>S(+)</i> -efonidipine (n=5)		nifedipine (n=5)		<i>R(-)</i> -efonidipine (n=5)		vehicle (DMSO) (n=5)	
	before	after	before	after	before	after	before	after
cycle length (ms)	296 \pm 27	322 \pm 26 ^a	304 \pm 15	314 \pm 15 ^a	325 \pm 37	318 \pm 33	316 \pm 19	312 \pm 21
maximum diastolic potential (mV)	-60.5 \pm 0.3	-56.6 \pm 0.8 ^a	-61.0 \pm 2.0	-58.7 \pm 2.2 ^a	-59.8 \pm 0.8	-57.1 \pm 1.6	-59.6 \pm 3.0	-58.2 \pm 2.7
slope (mV/s)	89.1 \pm 11.1	71.3 \pm 7.3 ^a	90.1 \pm 5.1	82.0 \pm 3.4	79.8 \pm 12.1	78.3 \pm 3.1	88.3 \pm 6.7	89.3 \pm 6.8
threshold potential (mV)	-47.9 \pm 1.4	-43.2 \pm 0.8 ^a	-47.6 \pm 2.0	-45.8 \pm 1.8 ^a	-38.1 \pm 3.0	-36.4 \pm 2.4	-45.7 \pm 2.9	-44.0 \pm 2.7
maximum rate of rise (V/s)	13.2 \pm 2.3	10.3 \pm 2.4 ^a	14.2 \pm 2.7	11.2 \pm 1.9 ^a	14.4 \pm 3.1	12.1 \pm 2.6	10.7 \pm 1.6	9.7 \pm 1.5
overshoot (mV)	20.6 \pm 2.5	17.3 \pm 4.3	17.7 \pm 2.2	14.4 \pm 2.3 ^a	21.1 \pm 2.5	20.2 \pm 2.6	22.0 \pm 1.5	22.5 \pm 1.7
duration at 50% repolarization (ms)	60.6 \pm 3.5	56.5 \pm 4.1 ^a	67.1 \pm 6.0	62.5 \pm 5.7 ^a	69.5 \pm 2.7	68.1 \pm 2.9 ^a	68.5 \pm 6.0	67.8 \pm 6.0

表1 : ウサギ洞房結節活動電位波形に対する*S(+)*-efonidipine、nifedipineおよび*R(-)*-efonidipineの作用。薬物1 μM 投与前および投与30分後の値を示す。aは薬物投与前との統計的有意差($P < 0.05$)が有ることを示す。

NifedipineはCa_v1.2チャンネル電流、Ca_v1.3チャンネル電流、Ca_v3.1チャンネル電流のすべてを遮断し、その作用の強さはCa_v1.2チャンネル電流 > Ca_v1.3チャンネル電流 > Ca_v3.1チャンネル電流の順であった。遮断は濃度依存的であり、nifedipi

ne (1 μM) により遮断された割合およびEC₅₀値は、Ca_v1.2チャンネル電流が84.0%および0.19 μM、Ca_v1.3チャンネル電流が43.2%および2.82 μMであった。Ca_v3.1チャンネル電流が遮断された割合は14.9%であった。

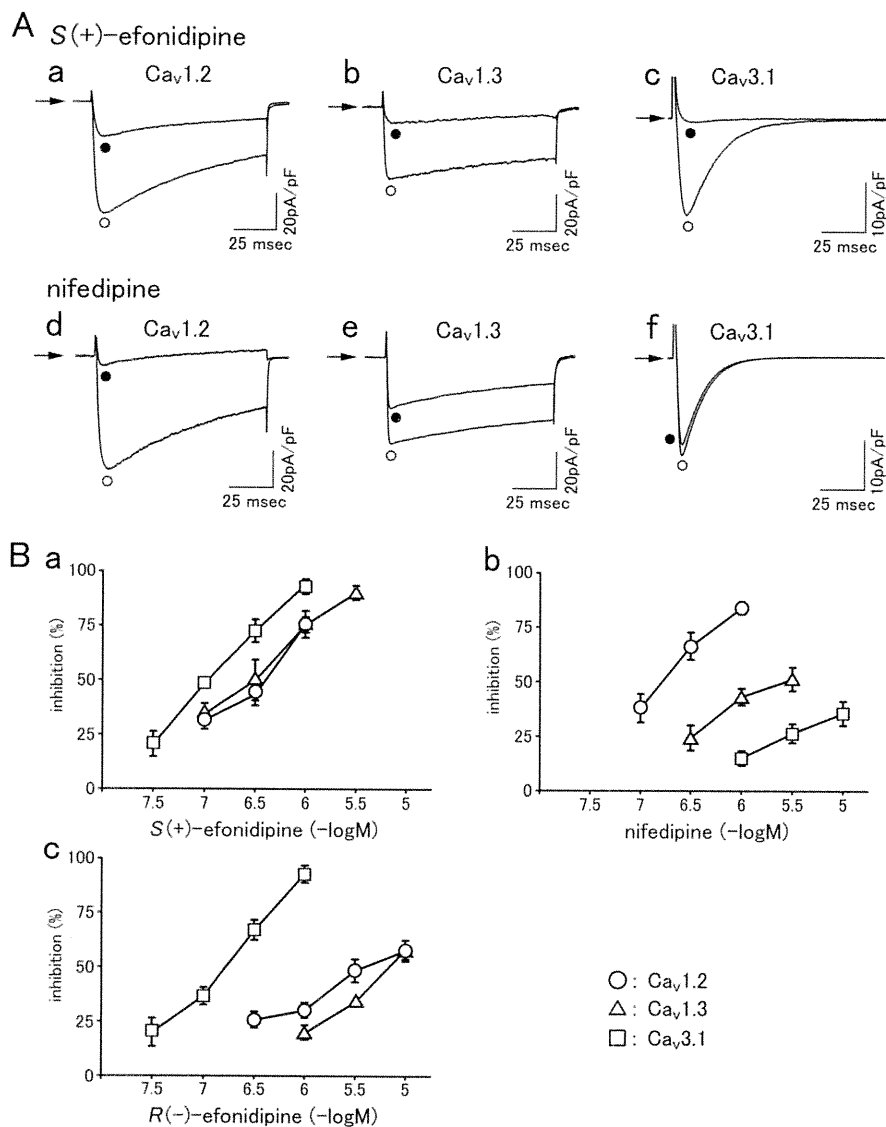


図2 : Ca²⁺チャンネルαサブユニットCa_v1.2、Ca_v1.3、Ca_v3.1各電流に対するS(+)-efonidipine、nifedipine、R(-)-efonidipineの作用。

A: S(+)-efonidipine (1 μM) 投与前(○)および投与後(●)のCa_v1.2(a)、Ca_v1.3(b)、Ca_v3.1(c)各チャンネル電流の典型的トレースおよびnifedipine (1 μM) 投与前(○)および投与後(●)のCa_v1.2(d)、Ca_v1.3(e)、Ca_v3.1(f)各チャンネル電流の典型的トレース。

B: Ca_v1.2(○)、Ca_v1.3(△)、Ca_v3.1(□)各チャンネル電流に対するS(+)-efonidipine (a)、nifedipine (b)、R(-)-efonidipine (c)の遮断作用の濃度反応関係。シンボルとバーは5~8例の平均と標

準誤差を示す。

$R(-)$ -efonidipineは $Ca_v1.2$ チャネル電流、 $Ca_v1.3$ チャネル電流、 $Ca_v3.1$ チャネル電流のすべてを濃度依存的に遮断したが、その効力は弱いものであった。遮断の強さは $Ca_v3.1$ チャネル電流 $>$ $Ca_v1.2$ チャネル電流 $=Ca_v1.3$ チャネル電流の順であった。 $R(-)$ -efonidipine(1 μ M)により遮断された割合は、 $Ca_v1.2$ チャネル電流が30.0%、 $Ca_v1.3$ チャネル電流が19.6%、 $Ca_v3.1$ チャネル電流が92.8%であった。 $Ca_v3.1$ チャネル電流に対する抑制の EC_{50} 値は0.20 μ Mであった。

$S(+)$ -efonidipineはウサギ洞房結節組織標本活動電位の緩徐脱分極を著明に抑制したが、これは以前我々がラセミ体のefonidipineで観測した波形変化と同一のものであった。 $R(-)$ -efonidipineによってはこのような波形変化は見られなかった。従って、緩徐脱分極の抑制は2種の光学活性体のうちの $S(+)$ -efonidipineのみが有する作用であることが判明した。 $S(+)$ -efonidipineおよびnifedipineは最大拡張期電位をわずかに脱分極方向に移動させた。 $S(+)$ -efonidipineおよびnifedipineは、内向き整流性 K^+ チャネル電流や遅延整流性 K^+ チャネル電流に対する遮断作用をほとんど持たないことから、最大拡張期電位の移動はこれら以外の電流に対する作用の結果であることが推測される。

緩徐脱分極に関しては、 $S(+)$ -efonidipineは著明な抑制を示し、nifedipineはわずかな抑制を示し、 $R(-)$ -efonidipineは全く効果を示さなかった。これは3つの化合物が $Ca_v1.3$ チャネル電流を遮断する強さと相関した。これらの結果から、洞房結節の緩徐脱分極には $Ca_v1.3$ チャネル電流が寄与しており、 $S(+)$ -efonidipineはこれを遮断することにより緩徐脱分極を抑制し、

徐脈作用を示すことが明らかになった。この結論は Ca^{2+} チャネル電流活性化電位領域に関する情報とも整合性がとれている。 $Ca_v1.2$ チャネル電流の活性化閾値は約-30mVであるが、これは洞房結節活動電位が緩徐脱分極から急速な脱分極へと移行する-40mVよりも脱分極側にある。従って、 $Ca_v1.2$ チャネル電流は急速脱分極には寄与するが、緩徐脱分極には寄与し得ない。一方 $Ca_v1.3$ チャネル電流の活性化電位領域は-50 mV~-10 mVであり、5%活性化が起こる電位は-46 mVであることから、-60 mV~-40 mVの電位領域で生じる緩徐脱分極には十分寄与し得る。ただし、 $S(+)$ -efonidipineの存在下でも緩徐脱分極は見られたことから、緩徐脱分極の全てが $Ca_v1.3$ チャネル電流に起因するわけではなく、 $Ca_v1.3$ チャネル電流と他の電流系との協動的な働きによって緩徐脱分極が形成されていると考えられる。

以上の結果から、新たな徐脈薬の標的分子として $Ca_v1.3$ チャネルが注目に値することが判明した。 $Ca_v1.3$ チャネルは発現量が心房筋や心室筋に比べて洞房結節に多いことが知られており、これを選択的に遮断することにより心筋のポンプ機能を損なうことなく心拍数を低下させることが出来ると考えられる。また、このような機序に基づく徐脈薬開発の出発点となる化合物として $S(+)$ -efonidipineが見出されたが、今後さらなる探索により、高い効力と選択性を有する化合物が見出されると期待される。

1-2 肺静脈心筋の緩徐脱分極機構

正所性のペースメーカーの機能を担う洞房結節以外にも、心臓には自動能を有する組織がある。そのひとつはPurkinje線維であり、この部位の自動能は洞房結節からの刺激が何らかの伝導障害により心室にまで到達出来ない場合に活動電位を発生して心室を興奮させ、ポンプ機能の維持に貢献する予備のペースメーカーである。Purkinje線維の細胞で見られる緩徐脱分極は $-90\text{mV}\sim-65\text{mV}$ の電位領域でみられ、 Na^+ チャンネル電流により生じていることが知られている。最近注目されているのが肺静脈心筋の自動能である。肺静脈は肺から心臓に血液を戻す血管であるが、心房との接合部分から心房と連続して心筋層が肺静脈壁の内部にまで入り込んでいる。臨床的に観察される心房細動の90%以上がこの部位の心筋細胞から発せられた活動電位が心房筋に伝搬することにより発生していることが明らかになった。すなわち、肺静脈心筋の自動能は心臓のポンプ機能維持には寄与せず、むしろ心房細動などの不整脈を誘

発する好ましくない異所性自動能であるといえる。心房細動の治療では肺静脈と心房の接合部分を焼灼して肺静脈心筋と心房筋を電氣的に隔離するcatheter ablationが汎用されるが、焼灼による組織傷害や患者の負担が問題となっている。薬物療法としてはVaughn Williams分類の第I群または第III群の抗不整脈薬が用いられるが、心抑制や心室性不整脈誘発の危険を伴うため理想的な治療とは言い難い。有効性と安全性の高い心房細動治療薬を開発するには、肺静脈心筋の電氣的自発活動がいかなる機序で発生するのかを明らかにし、これを選択的に抑制する薬物を見出すことが必須である。我々はモルモットおよびラット肺静脈心筋に微小電極法を適用し、自発的活動電位を記録してその発生に関与する肺静脈心筋自動能に関与するイオンチャンネル・トランスポーターの検討を行ってきた。今回は蛍光イメージング法も導入し、細胞内 Ca^{2+} の役割も含めて検討した。

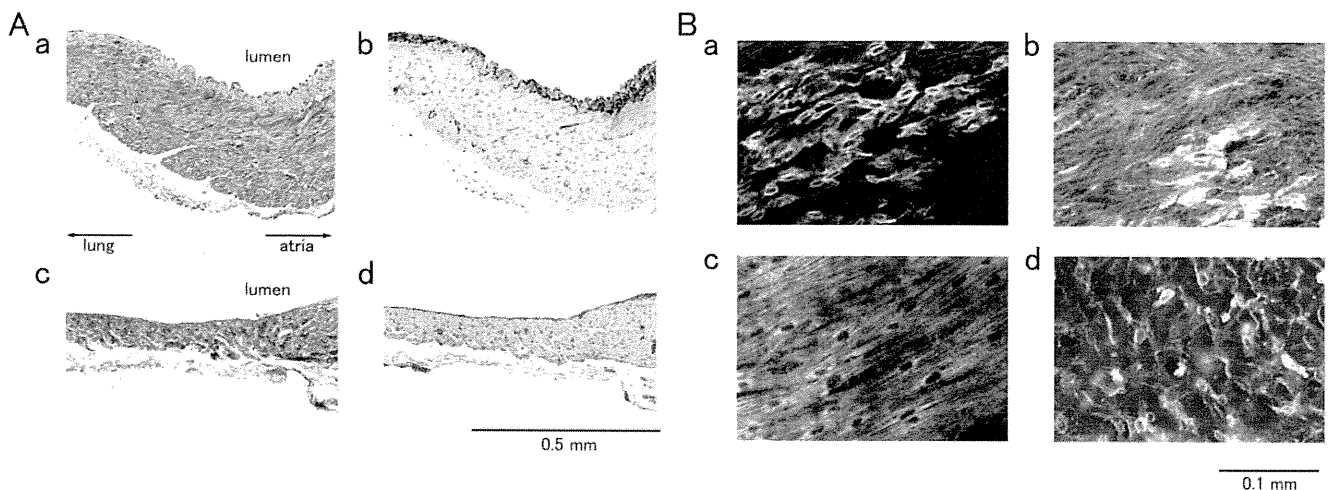


図3：モルモットおよびラット肺静脈における心筋層の存在。

A：モルモット(a, b)およびラット(c, d)肺静脈標本の長軸方向断面のMasson trichrome染色(a, c)および抗smooth muscle α -actin染色(b, d)。

B：細胞膜プローブdi-2-ANEPEQによる肺静脈内皮細胞層(a)、平滑筋層(b)、心筋層(c)および