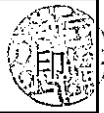







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第 546 号	氏 名	嶋 岡 徹
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	宮 崎 吳 士	
	副査氏名	岸 田 哲 子	
	副査氏名	伊 奈 啓 輔	
論文題目 Hypomagnesemic down-regulation of L-type Ca ²⁺ channel in cardiomyocyte as an arrhythmogenic substrate in rats (低マグネシウム血症におけるラット心筋細胞の L 型 Ca ²⁺ チャネルの低下に起因する心臓不整脈基質の形成)			
論文掲載雑誌名 Pathophysiology			
論文要旨： 【目的】：細胞内 Mg の低下がイオンチャネルの発現を低下させるという仮説を立て、低 Mg 食を与えたラットの心電図記録、低 Mg ラット単離心筋細胞の細胞膜電流、更に心筋細胞のイオンチャネル mRNA を定量して対照ラットと比較することで細胞内 Mg 濃度によって規定されるイオンチャネルの発現機構の分子メカニズムの解明を試みた【方法】：8 週齢の雄性 Wistar ラットに対照食 (Mg 含量 0.26g/100g) と無 Mg 食を連日投与して、低 Mg ラットを作成した。ラット体内にテレメトリー方式心電図送信器を装着して、無麻酔・無拘束下で心電図を 10 分毎に 1kHz にて連続記録した。心電図のパラメータは測定ソフトウェア (Fluclet WT) によって自動計測した。次に心室筋細胞を酵素法によって単離し、パッチクランプ法によって心筋細胞膜カルシウム (Ca) 電流を記録した。更に、RT-PCR 法を用いて心筋細胞の Ca ²⁺ チャネルの発現を定量した。【結果】：無 Mg 食の長期 (12 週間) 摂取によって血清 Mg 濃度、及び心筋細胞内 Mg 濃度の低下した低 Mg ラットが作成された。細胞外 (血清) Mg 濃度の低下に伴って心電図波形の変化が生じた。低 Mg ラットの心拍数は次第に増加したが、第 6 週目以降は対照食ラットで観察されることのない (0 匹/7 匹)、徐脈性不整脈が高頻度に観察された (7 匹/7 匹)。無 Mg ラット心室筋細胞の電位依存性 Ca ²⁺ チャネル電流は対照ラットと比較すると有意な減少が認められた (-40.1±9.1%)。電位依存性 L 型 Ca ²⁺ チャネルの 2 つの isoform のうち、CACNA1D の変化は認められず CACNA1C は有意な減少を示した (36.0±8.0%)。一方、電位依存型 T 型 Ca ²⁺ チャネルの 2 つの isoform (CACNA1G, CACNA1H) の発現は低 Mg ラット心筋で変化が認められなかった。【考察】：無 Mg 食の長期摂取によってラット心筋に発現する CACNA1C-L 型 Ca ²⁺ チャネルの発現は減少し、Ca 電流も低下した。Ca 電流の低下は低 Mg ラットで観察された徐脈性不整脈と房室ブロックの原因であることが示唆される。Mg は生体における内因性 Ca チャネル遮断薬であり、その欠乏は Ca 電流の増加を惹起する一方、細胞内低 Mg 環境が L 型 Ca ²⁺ チャネルの発現を長期的に抑制するという Mg の Ca ²⁺ チャネルに対する新規の長期制御機構が明らかになった 本研究は、細胞内 Mg の低下が Ca ²⁺ チャネルの発現を長期的に抑制するという新しい知見を明らかにしたもので、低 Mg によるイオンチャネル発現機構の分子メカニズムの解明に向けた意義ある研究と考えられるため、審査委員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 ①・論	第546号	氏名	嶋岡 徹
審査委員会委員		主査氏名	皇崎 英士 
		副査氏名	岸田 哲子 
		副査氏名	伊奈 啓輔 
<ol style="list-style-type: none"> 1. 今回の Patch clamp 法で内向き電流がなぜ Ca によるものとわかるのか 2. Patch clamp 法の再現性はいかがなものか 3. in vitro の実験では作業心筋を用いているが、その結果から房室ブロックのことを論じてよいのか 4. QT 延長のタイプは低 K の形ではないのか 5. Mg イオノフォアではなく、Ca イオノフォアを作用させるとどうなるのか 6. Mg 含量 0.26g/100g を使っているが、通常のラットの餌もこれくらいの濃度か 7. 無 Mg 食を続けても血清 Mg 濃度は一定以上には下がらない。その原因は何か 8. 心筋中の Mg 濃度を測定するのに右室を使った理由は 9. 無 Mg 食で心肥大が起こるメカニズムは 10. 複数の転写因子の発現を調べる際、成人ラットと新生ラットの心筋を使い分けているが、結果は異なったのか 11. 研究を開始する以前に、低 Mg が Ca チャネルへ関与することはどの程度検討されており、どのような知見が蓄積されているのか 12. CaV1.2 と CaV1.3 は機能的にどのような違いがあるのか 13. MgCl 添加をさらに増量すると CaV1.2 の発現はどうなるのか 14. Kambayashi らの方法とはどのようなものか 15. 心臓以外では低 Mg による臓器障害のメカニズムは異なるのか 16. 想定していた結果と異なる結果であったとのことだが、エディターや他の研究者の反応はどうであったか <p style="margin-top: 20px;">これらの質疑に対し、申請者は概ね適切に回答した。よって、審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者であると認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 嶋 岡 徹

論 文 題 目

Hypomagnesemic down-regulation of L-type Ca^{2+} channel in cardiomyocyte as an arrhythmogenic substrate in rats

(低マグネシウム血症におけるラット心筋細胞の L 型 Ca^{2+} チャンネルの低下に起因する心臓催不整脈基質の形成)

要 旨

【緒言】

成人体内には約 2000mg のマグネシウム (Mg) が蓄えられている。ヒトは一日におおよそ 200mg の Mg を摂取することでその 30-50% を小腸から吸収して細胞外液に移行させるが、慢性アルコール中毒や原発性アルドステロン症等のさまざまな原因によって Mg 欠乏状態に陥る。低 Mg 血症では特に器質的心疾患を伴う場合に不整脈の多発することが報告されている。例えば鬱血性心不全では低 Mg 血症で不整脈が誘発されることが多く、低 Mg 症に起因する心房細動の症例も知られている。また心電図で QT 時間の延長、T 波の平低下、及び U 波の出現が認められ、低 K^{+} 血症と共通点が多いことも注目される。一方、Mg の投与は実験的 QT 延長症候群モデルにおける早期後脱分極を抑制することが認められており、臨床でも torsade de pointes 型心室頻拍に対する Mg 製剤の有効性が広く知られている。しかしながら、細胞内外の Mg の低下がどのような機序で不整脈を誘発するかは明らかではなく、その細胞電

気生理学的変化も解明されていない。本研究では細胞内 Mg の低下がイオンチャネルの発現を低下させるという仮説を立て、低 Mg 食を与えたラットの心電図記録、低 Mg ラット単離心筋細胞の細胞膜電流、更に心筋細胞のイオンチャネル mRNA を定量して対照ラットと比較することで細胞内 Mg 濃度によって規定されるイオンチャネルの発現機構の分子メカニズムの解明を試みた。

【方法】

8週齢の雄性 Wistar ラットに対照食 (Mg 含量 0.26g/100g) と無 Mg 食を連日投与して、低 Mg ラットを作成した。ラット体内にテレメトリー方式心電図送信器を装着して、無麻酔・無拘束下で心電図を 10 分毎に 1kHz にて連続記録した。心電図のパラメータは測定ソフトウェア (Fluclet WT) によって自動計測した。次に心室筋細胞を酵素法によって単離し、パッチクランプ法によって心筋細胞膜カルシウム(Ca)電流を記録した。更に、RT-PCR 法を用いて心筋細胞の Ca²⁺チャネルの発現を定量した。

【結果】

無 Mg 食の長期 (12 週間) 摂取によって血清 Mg 濃度、及び心筋細胞内 Mg 濃度の低下した低 Mg ラットが作成された。細胞外 (血清) Mg 濃度の低下に伴って心電図波形の変化が生じた。低 Mg ラットの心拍数は次第に増加したが、第 6 週目以降は対照食ラットで観察されることのない (0 匹/7 匹)、徐脈性不整脈が高頻度に観察された (7 匹/7 匹)。無 Mg ラット心室筋細胞の電位依存性 Ca²⁺チャネル電流は対照ラットと比較すると有意な減少が認められた(-40.1±9.1%)。電位依存性 L 型 Ca²⁺チャネルの 2 つの isoform のうち、CACNA1D の変化は認められず CACNA1C は有意な減少を示した(36.0±8.0%)。一方、電位依存性 T 型 Ca²⁺チャネルの 2 つの isoform (CACNA1G, CACNA1H) の発現は低 Mg ラット心筋で変化が認められなかった。

【結果】

無 Mg 食の長期摂取によってラット心筋に発現する CACNA1C-L 型 Ca²⁺チャネルの発現は減少し、Ca 電流も低下した。Ca 電流の低下は低 Mg ラットで観察された徐脈性不整脈と房室ブロックの原因であることが示唆される。Mg は生体における内因性 Ca チャネル遮断薬であり、その欠乏は Ca 電流の増加を惹起する一方、細胞内低 Mg 環境が L 型 Ca²⁺チャネルの発現を長期的に抑制するという Mg の Ca²⁺チャネルに対する新規の長期制御機構が明らかになった。