

学 位 論 文 要 旨

氏名 馬 芳 芳

論 文 題 目

Short- and long-term inhibition of cardiac inward-rectifier potassium channel current by an antiarrhythmic drug bepridil

(内向き整流カリウムチャンネルに対する抗不整脈薬ベプリジルの短期および長期抑制作用)

要 旨

[背景と目的] ベプリジルは上室および心室頻脈性不整脈等の広範囲な使用適応を持つ抗不整脈薬である。最近の研究により、ベプリジルは短期的服用と長期的服用により異なる時間経過をもって抗不整脈作用が発揮されることが知られるようになった。持続性心房細動に対してベプリジルを長期間使用した研究では (J-BAF study) ベプリジルの短期作用では説明されない何らかの付加的作用によって心房細動を終止することが示された。このことはベプリジルが心臓電気薬理学上、未知の慢性効果を有することを示唆する。以上の背景に基づき、本研究ではベプリジルが抗不整脈薬として心筋細胞の膜電流に対して長期的な電気生理学的修飾作用を発揮するという仮説を立てた。内向き整流カリウムイオン (K^+) チャンネルは、心房細動心筋における電気的リモデリングの中で主要なイオンチャンネルであるため、新生ラット心筋細胞の同イオンチャンネル電流 (I_{K1}) に対するベプリジルの短期的作用と長期的作用を比較し、ベプリジルがいかにして長期間持続する心房細動を洞調律化するかに関する電気薬理学的機序を明らかにすることを本研究の目的とした。

[方法] 新生ラット心筋細胞は生後 1~3 日齢の Wistar ラット心より酵素法によって単離した。単離された心筋細胞は、95% O₂-5% CO₂ インキュベーター (37°C) 内で 10% FBS、100 units/ml ペニシリンおよび 100 μg/ml ストレプトマイシン加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。全細胞パッチクランプ法によって I_{K1} 電流を記録した。また、ベプリジルの長期作用は同培養液中にベプリジルを 24 時間添加した心筋細胞を用いて評価した。

[結果] 1) ベプリジルは短期的効果として用量依存的に I_{K1} を抑制した (IC₅₀: 17 μM)。2) カルモジュリン阻害剤 (W-7) およびカルモジュリンキナーゼ II 阻害薬 (KN93) は I_{K1} に対し短期効果として何らかの作用も及ぼさなかった。3) ベプリジル加培養液で 24 時間培養した心筋細胞の I_{K1} はベプリジルの用量に依存して減少した (IC₅₀: 2.7 μM) 4) W-7 および KN93 は長期作用として心筋細胞の I_{K1} を減少させた。5) ベプリジル (1 μM)、W-7 (10 μM)、及びベプリジル (1 μM) 加 W-7 (10 μM) の 3 群の心筋細胞の I_{K1} は対照群に比べ 24 時間で同等に減少した。

[考察] 抗不整脈薬ベプリジルは短期的作用 (5 min) を持って I_{K1} を阻害するのみならず、長期的作用 (24 h) により I_{K1} 密度を抑制することを本研究は明らかにした。また I_{K1} を阻害する薬剤の効力は、50%抑制濃度を用いて比較した場合では長期的効果は短期的効果よりも約 6 倍強いことも明らかにした。カルモジュリン阻害剤 (W-7)、及びカルモジュリンキナーゼ型 II の阻害剤 (KN93) を併用した検討により、心筋細胞での I_{K1} の発現制御にカルモジュリンキナーゼが何らかの機能を担うことが示された。更に、ベプリジルの長期的な薬理作用の機序としてそのカルモジュリン拮抗作用がその主体であることを示した。心房細動心房筋細胞では I_{K1} 電流が過剰発現し、その結果として不応期の短縮が生じているが (電氣的リモデリング)、ベプリジルは長期的に I_{K1} を抑制し心房細動心筋の不整脈基質を改善することで持続性心房細動の洞調律化に寄与するという、ベプリジルの新規薬理作用を本研究は明らかにした。

[結語] ラット心筋細胞を用いた電気薬理的検討で、抗不整脈薬ベプリジルは短期的作用よりも強力な長期的作用で I_{K1} を阻害することを明らかにした。また心筋細胞における I_{K1} チャネルの発現制御にカルモジュリンキナーゼ II 経路に関わることも示した。本研究によりベプリジルのこれまで未知の抗不整脈薬理作用が解明され、この結果は心房細動の発症と持続の機序の一端を明らかにすると共に心房細動の長期的治療戦略に有益な情報となると考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 557 号	氏名	馬 芳 芳
審査委員会委員	主査氏名	高橋尚彦	
	副査氏名	重光修	
	副査氏名	和田朋之	
論文題目 Short- and long-term inhibition of cardiac inward-rectifier potassium channel current by an antiarrhythmic drug bepridil (内向き整流カリウムチャネルに対する抗不整脈薬ベプリジルの短期および長期抑制作用)			
論文掲載雑誌名 Heart and Vessels			
論文要旨: 本研究ではベプリジルが抗不整脈薬として心筋細胞の膜電流に対して長期的な電気生理学的修飾作用を発揮するという仮説を立てた。新生ラット心筋細胞の同イオンチャネル電流 (IK1) に対するベプリジルの短期的作用と長期的作用を比較し、ベプリジルがいかにして長期間持続する心房細動を洞調律化するかに関する電気薬理学的機序を明らかにすることを本研究の目的とした。 新生ラット心筋細胞は生後 1~3 日齢の Wistar ラット心より酵素法によって単離した。単離された心筋細胞は、95% O ₂ -5% CO ₂ インキュベーター (37°C) 内で 10%FBS、100 units/ml ペニシリンおよび 100 μg/ml ストレプトマイシン加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。全細胞パッチクランプ法によって IK1 電流を記録した。また、ベプリジルの長期作用は同培養液中にベプリジルを 24 時間添加した心筋細胞を用いて評価した 1)ベプリジルは短期的効果として用量依存的に IK1 を抑制した (IC ₅₀ : 17 μM)。2)カルモジュリン阻害剤 (W-7) およびカルモジュリンキナーゼ II 阻害薬 (KN93) は IK1 に対し短期効果として何ら作用を及ぼさなかった。3)ベプリジル加培養液で 24 時間培養した心筋細胞の IK1 はベプリジルの用量に依存して減少した (IC ₅₀ : 2.7 μM) 4)W-7 および KN93 は長期作用として心筋細胞の IK1 を減少させた。5)ベプリジル (1 μM)、W-7 (10 μM)、及びベプリジル (1 μM) 加 W-7 (10 μM) の 3 群の心筋細胞の IK1 は対照群に比べ 24 時間で同等に減少した。 抗不整脈薬ベプリジルは短期的作用 (5 min) を持って IK1 を阻害するのみならず、長期的作用 (24 h) により IK1 密度を抑制することを本研究は明らかにした。また IK1 を阻害する薬剤の効力は、50%抑制濃度を用いて比較した場合では長期的効果は短期的効果よりも約 6 倍強いことも明らかにした。カルモジュリン阻害剤 (W-7)、及びカルモジュリンキナーゼ II 型の阻害剤 (KN93) を併用した検討により、心筋細胞での IK1 の発現制御にカルモジュリンキナーゼが何らかの機能を担うことが示された。更に、ベプリジルの長期的な薬理作用の機序としてそのカルモジュリン拮抗作用がその主体であることを示した。 本研究によりベプリジルのこれまで未知の抗不整脈薬理作用が解明され、この結果は心房細動の発症と持続の機序の一端を明らかにすると共に心房細動の長期的治療戦略に有益な情報となると考えられる。 本研究は、学術上のみならず、临床上においても意義あるものと考えられ、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 課・論	第557号	氏名	馬 芳 芳
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	高橋 尚秀	
	副査氏名	重光 修	
	副査氏名	和田 朋之	
<p>学位審査申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. IK1 チャンネルが増加すると、なぜ心房細動が起きやすくなるのか 2. 今回用いたベプリジル濃度(1~30 μM)は、どのように設定したか。 3. ベプリジル短期および長期投与の活動電位への効果は検討しなかったのか。 4. 長期効果をみるために、生体に長期間ベプリジルを内服させ、その後、心筋を単離して実験を行うという手法は考えなかったのか。 5. 長期投与ではIK1 の遺伝子発現が減っている可能性はあるのではないか。遺伝子発現はチェックしなかったのか。 6. 文献 16, 北里大学の論文は生体心で実験を行っている。この論文ではどのような実験を行いどのような結果が得られたのか。 7. 今回、ベプリジルの電氣的リモデリングへの効果を観察しているが、構造的リモデリングへの効果はないのか。例えば炎症性線維化を抑制するなど。 8. IK1, IKACH および IKATP はいずれも 2 回膜貫通型の K チャンネルで分子構造が比較的似ている。ベプリジルは、IKACH および IKATP も抑制するとのことだが、IKACH や IKATP の抑制機序も、今回の IK1 抑制機序と共通すると考えられるのか。すなわちカルモジュリン、CaMKII キナーゼ依存性であるのか。 9. 今後、どのような実験を計画しているか。 10. それぞれの測定の例数nは、パッチクランプした細胞数なのか、動物の個体数なのか。おそらくは細胞数であると思われるが、Fig1~4 の Control の電流の大きさが異なっているのはなぜか。 11. 細胞分離後24時間経過した時点での、Whole Cell patch clamp は、困難ではなかったか？ 細胞がすぐ死んだりしなかったか。24 時間経過していることの影響は何か考えられないか。 12. W-7 とベプリジルの、Ik1 抑制効果が同等であるため、ベプリジルの Ik1 抑制効果はカルモジュリン阻害に関連しているという結論はよく理解できるが、KN-93 はさらなる電流抑制を見せており、これとベプリジルの効果との差異のメカニズムをどのように考えるか。 13. IVカーブでは、ベプリジル 30 μM のデータがグラフに示されているが、代表例にて維持されていないことに何か理由があるか。 14. Fig. 4 C において、ベプリジル 1 μM を加えたもの、W-7 10 μM を加えたもの、ベプリジル 1 μM に W-7 10 μM の 3 者で値がすべてほぼ同じである理由は何が考えられるか？ <p>これらの質疑に対して、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と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。