

氏名	あか 赤	お 尾	まさ 昌	はる 治
学位(専攻分野)	博士(医学)			
学位記番号	医博第2096号			
学位授与の日付	平成11年3月23日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻			
学位論文題目	Myocardial ischemia induces differential regulation of $K_{ATP}$ channel gene expression in rat hearts (ラット心において心筋虚血は $K_{ATP}$ チャンネル遺伝子の特異的発現を誘導する)			
	(主査)			
論文調査委員	教授 大森治紀	教授 野間昭典	教授 篠山重威	

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】心筋ATP感受性Kチャンネル( $K_{ATP}$ チャンネル)は内向き整流性Kチャンネル分子(Kir6.1, Kir6.2)とスルフォニルウレア受容体分子(SUR2)から構成される異種複合体であると考えられている。このチャンネルは心筋虚血に際して開口し、心筋保護作用を有することが知られている。本研究ではラット心筋虚血再灌流モデルを用いてKir6.1, Kir6.2, SUR2の転写発現を検討した。

【方法】雄ウィスターラット(体重250~300g)を麻酔, 気管内挿管下に開胸して心臓を露出し, 左冠動脈を絹糸にて結紮して虚血を作成した後に再灌流を行った。同様の外科的手技を施して冠動脈を結紮しない動物群を作成し, sham群とした。その後閉胸して麻酔の覚醒を待って抜管し, 通常の飼育条件下においた。プロトコールの終了時点で再び麻酔, 挿管下に開胸し, 左室内に22G注射針を刺入して血行動態を記録した後に, 心臓を取り出して左室を虚血, 非虚血域に切り分けた。このサンプルをホモジェナイズした後AGPC法にてtotal RNAを抽出し, Kir6.1, Kir6.2, SUR2のmRNA発現経過をノザンプロット法にて検討した。また, 別の動物群を作成して, 同様に左室を虚血, 非虚血域に切り分けたサンプルから膜蛋白分画を調整しウェスタンプロット法にてKir6.1蛋白の変化を検討した。

【結果】まずノザンプロット法にて $K_{ATP}$ チャンネル構成蛋白遺伝子(Kir6.1, Kir6.2, SUR2)の発現動態を解析した。60分虚血の後3-6時間再灌流の時点ではいずれのmRNAの発現にも変化がみられなかったが, 24時間再灌流群では, sham群に比して, 虚血, 非虚血域の両方においてKir6.1 mRNAのみが特異的に増加しており(虚血域3.1倍, 非虚血域2.6倍), この変化は72時間後でも持続していた(虚血域2.7倍, 非虚血域2.0倍)。一方, 虚血時間を15分または30分に短縮して24時間再灌流を行うとKir6.1 mRNAは増加しなかった。次に再灌流を行わない連続虚血の動物群を作成して検討したところ, 24時間連続虚血群では虚血域, 非虚血域の両方でKir6.1 mRNAが同様に増加したが, 3-6時間連続虚血群では増加していなかった。こうしたKir6.1 mRNAとは対照的に, Kir6.2, SUR2 mRNAはどの群においても有意の変化が見られなかった。同様の変化が蛋白レベルでも起こっているかを検討するために, Kir6.1アミノ酸配列のC末端のペプチドに対して作成したKir6.1に特異的な抗血清を用いてウェスタンプロット解析を行ったところ, Kir6.1 mRNAの増加に並行して, 60分虚血24時間再灌流群ではKir6.1蛋白レベルはsham群より増加していた(虚血域2.4倍, 非虚血域2.2倍)。60分虚血を施したラットは再灌流直後から血圧の低下, LVEDPの上昇を認めた。

【総括】再灌流の有無に関わらず, 60分以上の比較的長時間の心筋虚血により, 24時間以降にKir6.1 mRNAの発現が増

強し、同様の変化はKir6.1蛋白レベルでも観察された。さらに興味深いことに、このKir6.1 mRNAと蛋白の増加は虚血域のみならず非虚血域でも見られることが明らかとなった。このことは、Kir6.1 mRNAと蛋白の増加が虚血そのものの直接作用ではなく、機械的負荷あるいは液性因子の作用により惹起される可能性を強く示唆する。一方、Kir6.2, SUR 2 mRNAは変化が見られなかった。従ってK-チャンネル構成蛋白遺伝子は異なる転写調節を受け、蛋白レベルの発現においてはサブユニット構造の分子構成比を変えることによりチャンネル機能を修飾することを示唆した。

#### 論文審査の結果の要旨

心筋ATP感受性Kチャンネル ( $K_{ATP}$ チャンネル) は虚血に対して心筋保護作用を有し、膜2回貫通型Kチャンネル (Kir6.1, Kir6.2) とsulfonylurea receptor (SUR 2) から構成される。本研究ではラットの左冠動脈を結紮して作成した心筋虚血再灌流モデルを用いて、左室を虚血、非虚血域に分け、Kir6.1, Kir6.2, SUR 2の発現経過をノザンブロット法、ウェスタンブロット法にて検討した。60分虚血24-72時間再灌流群では、sham群に比して、虚血、非虚血域の両方においてKir6.1 mRNAのみが特異的に増加しており、24時間連続虚血群でもKir6.1が同様に増加したが、60分虚血3-6時間再灌流群や3-6時間連続虚血群では増加していなかった。15-30分間虚血では24時間再灌流後でも増加が見られなかった。一方、Kir6.2, SUR 2 mRNAはどの群においても有意の変化が見られなかった。60分虚血24時間再灌流群ではKir6.1蛋白レベルはsham群より増加していた。以上より、60分以上の比較的長時間の心筋虚血により、心筋 $K_{ATP}$ チャンネル構成遺伝子は異なる転写調節を受け、Kir6.1のみが選択的に発現増強し、この変化は非虚血域にも見られることが明らかとなった。

以上の研究は、心筋虚血時のイオンチャンネル遺伝子発現動態の解明に貢献し、心筋細胞の虚血に対する保護機構の解明や新たな心筋保護治療戦略の確立に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成11年2月5日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。