

氏名	くらとみしのぶ 倉 富 忍
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2770 号
学位授与の日付	平成 16 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	医学研究科生理系専攻
学位論文題目	Involvement of Ca^{2+} buffering and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in the positive staircase of contraction in guinea-pig ventricular myocytes. (モルモット心室筋細胞の収縮陽性階段現象における Ca^{2+} バッファーと $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機転の関与について)
論文調査委員	(主 査) 教授 米田正始 教授 北 徹 教授 野間昭典

論 文 内 容 の 要 旨

Ca^{2+} は細胞内における最も重要な生理活性物質のひとつである。心筋収縮を決定する収縮蛋白の反応は、筋小胞体 (SR) からの Ca^{2+} 放出による細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性上昇によって調節されている。しかし、放出された Ca^{2+} の 99% 以上は細胞内 Ca^{2+} バッファーに捕捉されており、 Ca^{2+} 動態の理解には、 Ca^{2+} バッファー能を正確に測定することが重要である。 Ca^{2+} バッファー能の測定を目的として、細胞内遊離 Ca 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定に Ca^{2+} 指示薬を用いた数多くの報告がある。しかし、 Ca^{2+} 指示薬自身が Ca^{2+} バッファーとして機能するにもかかわらず、細胞に負荷された Ca^{2+} 指示薬の濃度測定は困難で、 Ca^{2+} バッファー能の測定は概算の域を出ていない。そこで、 Ca^{2+} 指示薬を使用せず $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定するため、筋節長 (SL) と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の関係を用いることとし、モルモットの単離心筋細胞の顕微鏡像をリアイメージセンサーに投影し、その出力に見られる筋節パターンから平均筋節長を決定する方法を開発した。

Ca^{2+} バッファー能の測定には、更に細胞内総 Ca 量 ($[\text{Ca}]_{\text{total}}$) の変化を知る必要がある。そのために、nicardipine で L 型 Ca^{2+} チャネルを阻害し、主たる細胞の Ca 流入経路を $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換電流 (I_{NCX}) に限定した。また、SR の機能を完全に抑制し、実験系を単純化した。 I_{NCX} は Ni^{2+} 感受性電流として記録した。

まず、パッチクランプ実験により、脱分極パルスで SR からの Ca^{2+} 放出による一過性収縮が消失していること、膜 Ca^{2+} 電流が抑制されていることを確認した。このような条件下で、+60mV 以上の強い脱分極パルスを与えると、パルス中持続する外向き電流とゆっくりと増大する収縮が観測された。これは、 I_{NCX} の逆モードを介した Ca^{2+} 流入によるものである。連続パルスを与えると、パルスごとに収縮が増強した (陽性階段現象)。この結果は、連続パルスでは、パルス間における I_{NCX} の順モードによる Ca^{2+} 排出が追いつかず、細胞内に Ca が蓄積し、 Ca^{2+} バッファーの飽和が起きていると説明できる。階段現象中の SL と I_{NCX} との関係を定量的に解析した結果、 Ca^{2+} バッファー能を、解離定数 613nM、最大結合濃度 $200\mu\text{M}$ と導き出すことに成功した。また、階段現象に伴い、外向き I_{NCX} の増大が観察された。この間、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は上昇しているので Ca^{2+} の内向きへの駆動力は減少しており、この現象は I_{NCX} の Ca^{2+} による活性化を反映したものと結論された。

以上の Ca バッファー能と I_{NCX} 動態を組み入れた細胞コンピュータモデルを構築したところ、実験結果を良く再現できた。そのシミュレーション結果によると、階段現象を通じて Ca^{2+} バッファーが 30% 程飽和されて初めて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が著明となる。さらに $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇により、より一層 I_{NCX} が活性化される正帰還を形成することが明らかになった。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇により $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機転が活性化することは良く知られているが、 I_{NCX} が対初期値で約 150 倍活性化されることは、この研究によって初めて明らかになった。これにより、 I_{NCX} は Ca^{2+} が高濃度の際 (600nM 以上) には積極的な Ca^{2+} 汲み出しを行うが、逆に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が非常に低い状態 (100nM 以下) では殆ど不活性化しており、 Ca^{2+} の極度な枯渇を防ぐという $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機転の生理学的意義が明らかになった。

論文審査の結果の要旨

心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度は常に変動し、収縮など機能調節に重要な役割を果たしている。しかし、細胞内 Ca^{2+} の99%以上は多種類の Ca^{2+} 結合分子(Ca^{2+} バッファー)に捕捉されており、 Ca^{2+} バッファーの定量化が細胞機能発現の理解に必須である。

Ca^{2+} バッファー能の算出には $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と $[\text{Ca}]_{\text{total}}$ 変化の双方を同時測定する必要があるが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は筋節長の光学的測定から、 $[\text{Ca}]_{\text{total}}$ の変化は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換電流(I_{NCX})のバッチクランプ法記録から決定した。筋小胞体機能と Ca^{2+} チャネル電流を阻害したモルモット単離心筋細胞に、強い連続脱分極パルスを与えると収縮が次第に増強し(陽性階段現象)、同時に、外向き I_{NCX} が増大した。解析によって Ca^{2+} バッファー能は解離定数613nM、最大結合濃度200 μM で説明できた。この結果をもとにコンピュータ細胞モデルを構築すると、収縮と膜電流の実験結果を良く再現でき、陽性階段現象に細胞内 Ca^{2+} バッファーの飽和が大きく関与していることが結論された。更に、細胞内 Ca^{2+} の増加は I_{NCX} 活性を百倍以上に増強し、陽性階段現象を更に加速することが示された。

以上の研究は、心筋 Ca^{2+} ホメオスタシスの定量的解明に貢献し、心臓機能の総合的な理解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15年10月27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。