

第4回小児心血管分子医学研究会 宿題報告

未熟心筋の虚血抵抗性機序の解明
ATP感受性Kチャネルの役割勝部 康弘, 初鹿野見春, 渡辺 美紀, 池上 英
上砂 光裕, 深澤 隆治, 小川 俊一

日本医科大学小児科

Key words :

心筋虚血, 未熟心筋, 虚血抵抗性, ATP感受性Kチャネル

Elucidation of the Mechanism of Ischemic Tolerance in the Immature Heart:
Role of the K_{ATP} ChannelYasuhiro Katsube, Miharu Hajikano, Miki Watanabe, Ei Ikegami,
Mitsuhiro Kamisago, Ryuji Fukazawa, and Shunichi Ogawa

Department of Pediatrics, Nippon Medical School, Tokyo, Japan

The immature heart has greater tolerance to hypoxia and ischemia than the mature heart. The ATP-sensitive K channel (K_{ATP}), which may be activated under hypoxic or ischemic conditions, hyperpolarizes muscle cells, resulting in cardioprotective action. This channel may play a role in the greater tolerance of the immature heart to hypoxia and/or ischemia. The purpose of this study was to investigate developmental change in this channel using rat ventricular myocytes. K_{ATP} currents were recorded in newborn and adult rat ventricular myocytes using the whole-cell voltage clamp technique. Pinacidil, a K_{ATP} channel opener of cardiac (SUR2A/Kir6.2) and vascular smooth muscle (SUR2B/Kir6.1), increased the outward currents in both newborn and adult myocytes. The increased current was completely inhibited by glibenclamide. K_{ATP} current densities at 0 mV were 52 ± 10 pA/pF in newborn and 18 ± 6 pA/pF in adult myocytes ($p < 0.05$). NaCN, a mitochondrial respiratory inhibitor, stimulated K_{ATP} current by 93 ± 11 pA/pF in newborn and 70 ± 11 pA/pF in adult myocytes. Further, diazoxide, a K_{ATP} opener in the pancreas (SUR1/Kir6.2) and vascular smooth muscle (SUR/Kir6.1), increased the K_{ATP} current by 43 ± 7 pA/pF in newborn myocytes. However, the activation of K_{ATP} current by diazoxide was not observed in adult myocytes. These data suggest that K_{ATP} current density in the newborn cardiomyocyte is greater than in the adult, and the channel structure in the newborn may be different from that in the adult.

要 旨

未熟心筋は成熟心筋と比較し虚血に対し抵抗性を有している。ATP感受性Kチャネル(K_{ATP})は虚血時に活性化され、細胞を過分極し、その結果心臓を保護する。この K_{ATP} チャネルが未熟な心臓の虚血抵抗性に重要な役割を演じる可能性がある。そこで、本研究ではラット心室筋細胞を用い、 K_{ATP} チャネルの発達に伴う変化を調べることを目的とする。パッチクランプ法(whole cell voltage-clamp)により新生仔ならびに成獣ラット心室筋細胞から K_{ATP} チャネル電流を測定した。pinacidil(心臓型 SUR2A/Kir6.2)ならびに血管平滑筋型(SUR2B/Kir6.1) K_{ATP} チャネル開口薬により新生仔ならびに成獣ともに外向きK電流が増加した。この増加した電流はglibenclamide(K_{ATP} チャネル阻害薬)で完全に抑制された。誘発された K_{ATP} チャネル電流の電流密度は新生仔, 成獣でそれぞれ 52 ± 10 pA/pF, 18 ± 6 pA/pF ($p < 0.05$)であった。また、NaCN(ミトコンドリアの代謝阻害薬)により誘発された電流は新生仔, 成獣でそれぞれ 93 ± 11 pA/pF, 70 ± 11 pA/pF ($p < 0.05$)であった。さらに、diazoxide(膵臓型 SUR1/Kir6.2)ならびに血管平滑筋型(SUR2B/Kir6.1) K_{ATP} チャネル開口薬により新生仔では K_{ATP} チャネル電流が誘発された(43 ± 7 pA/pF)が、成獣では全く誘発されなかった。新生仔では成獣より心筋保護効果を有する K_{ATP} チャネル電流が大きかった。その理由として新生仔の K_{ATP} チャネルは成獣と構造が異なっている可能性がある。未熟心筋における大きな K_{ATP} チャネル電流の存在は、未熟心が成熟心に比較し虚血抵抗性を有する一つの機序となる可能性がある。

別刷請求先: 〒211-8533 神奈川県川崎市中原区小杉町 1-396
日本医科大学付属第二病院小児科 勝部 康弘

背景

あらゆる臓器において発達に伴いその構造，代謝，機能は大きく変化する．これに関して心臓でもこれまでに多くの研究が報告されている．それによると，一般的に未熟な心筋ほど低酸素ならびに虚血に対して抵抗性を有しているといわれている¹⁻⁴．例えば，Oštládalováら⁵によるLangendorff実験では，新生仔ラット日齢1，4，7を40分間虚血にした後の張力の回復度は発達に伴い低下（虚血前の値と比較してそれぞれ48%，42%，33%）することを示している．同様に，Yanoら⁶も60～100分虚血後の張力回復は新生仔（3～5日）のほうが成獣（50～60日）より約20%ほど良いと報告している．

このように未熟心は成熟心に比較して低酸素あるいは虚血に対し抵抗性を有しているが，未熟心筋の虚血抵抗性獲得はどのような機序でもたらされるのか．それには細胞構築上の変化，代謝系の変化等が考えられる．われわれは細胞膜に存在するイオンチャネル，特に虚血時に開口し，心筋保護作用を示すといわれるATP感受性K_{ATP}チャネルの役割をパッチクランプ法により検討した．

方法

1. 細胞分離

Wisterラットの新生仔（3～5日齢）と成獣（2～3カ月）をpentobarbitalの腹腔内投与により麻酔したのち心臓を摘出し，コラゲナーゼにより単一心室筋細胞を作成．作成した単一細胞はKB液に入れ，実験に使用するまで4°Cで保存した．なお，ラットの取り扱いに関しては，日本医科大学動物実験指針に沿い，動物実験倫理委員会の許可を得て行った．

2. 液ならびに試薬

内液の組成は（単位mM）；KOH 120，KCl 20，MgCl₂ 2，EGTA 10，HEPES 5，Mg-ATP 1，ASP 60でpHは7.3にASPにて補正した．外液の組成は（単位mM）；NaCl 143，KCl 5.4，NaH₂PO₄ 0.33，HEPES 5，MgCl₂ 0.5，glucose 5.5，CaCl₂ 1.8でpHは7.4にNaOHで補正した．KB液の組成は（単位mM）；KOH 20，l-glutamic acid 50，KCl 40，taurine 20，KH₂PO₄ 20，MgCl₂ 3，glucose 10，HEPES 10，EGTA 0.5でpHは7.4にKOHで補正した．K_{ATP}チャネル電流測定の際，Ca²⁺電流を抑制するため外液にCdCl₂（0.2mM）を加えた．NaCN（ミトコンドリアの酸化的リン酸化阻害薬），pinacidil（K_{ATP}チャネル開口薬），diazoxide（K_{ATP}チャネル開口薬），glibenclamide（K_{ATP}チャネル阻害薬）は保存液を作成し，実験当日に目的濃度となるよう外液

に加えた．

3. 電流の測定

電極は外径1.5mmのホウケイ酸ガラス毛管TW-150-3（World Precision Instruments，USA）より，微小電極作製器（Narishige PP-830，Japan）を用い作製し，内液を満たした時の電極抵抗が3～6MΩとなるように調節した．膜電流の測定は，Axopatch 200B電流固定用増幅器（Axon Instruments，USA）を用いwhole-cell patch clamp法により測定した．サンプルは10kHzで行い，AD-DA converter（Digidata 1200，Axon Instruments，USA）を通じてPC-AT compatible personal computerにデジタルデータとして保存した．データの測定・解析はpCLAMP software Ver. 6.04またはVer. 9.0（Axon Instruments，USA）を用い，フィルターのカットオフ周波数は2kHzとし実験を行った．また，すべての実験は室温で行った．

実験結果は平均値 ± 標準誤差で表示．統計解析はStudentのt検定で群間比較を行い，p < 0.05を統計的に有意とした．

結果

K_{ATP}チャネルの開口に伴い心室筋活動電位は著しく短縮した．Fig. 1にK_{ATP}チャネル開口薬pinacidilによる心室筋活動電位の変化と電流の変化を対比させた．Fig. 1に示すように，K_{ATP}チャネルはその開口に伴い，活動電位は著しく短縮し，その結果として細胞をCa²⁺過負荷より保護し，心筋保護効果を示すといわれている．

Fig. 2Aは新生仔ならびに成獣心室筋細胞におけるpinacidilの効果を示したものである．pinacidil（500μM）を外液から還流したところ，K_{ATP}チャネル阻害薬であるglibenclamideで完全に抑制される外向き電流が誘発された．誘発された外向き電流の平衡電位はK⁺電流の平衡電位近傍であることよりK_{ATP}チャネル電流であることが確認された．K_{ATP}チャネル電流の0mVでの電流密度は，新生仔では52 ± 10pA/pFで，成獣では18 ± 6pA/pFであり，新生仔のほうが成獣より有意に大きかった（p < 0.05）．また，NaCN（2mM）を外液から還流したところ，pinacidil同様に，glibenclamide感受性K_{ATP}チャネル電流が誘発され，同様に，新生仔のほうが成獣よりその電流密度は大きかった（Fig. 2B）．

さらに，新生仔心室筋のK_{ATP}が成獣より大きいことの機序解明のために，膵臓型K_{ATP}チャネル（SUR1/Kir6.2）に作用するが，心臓型K_{ATP}チャネル（SUR2A/Kir6.2）には作用しないdiazoxideを用い実験を行った．Fig. 3に示すように，新生仔では心室筋細胞には作用しないといわれているdiazoxideで著しいK_{ATP}チャネルの開口が認めら

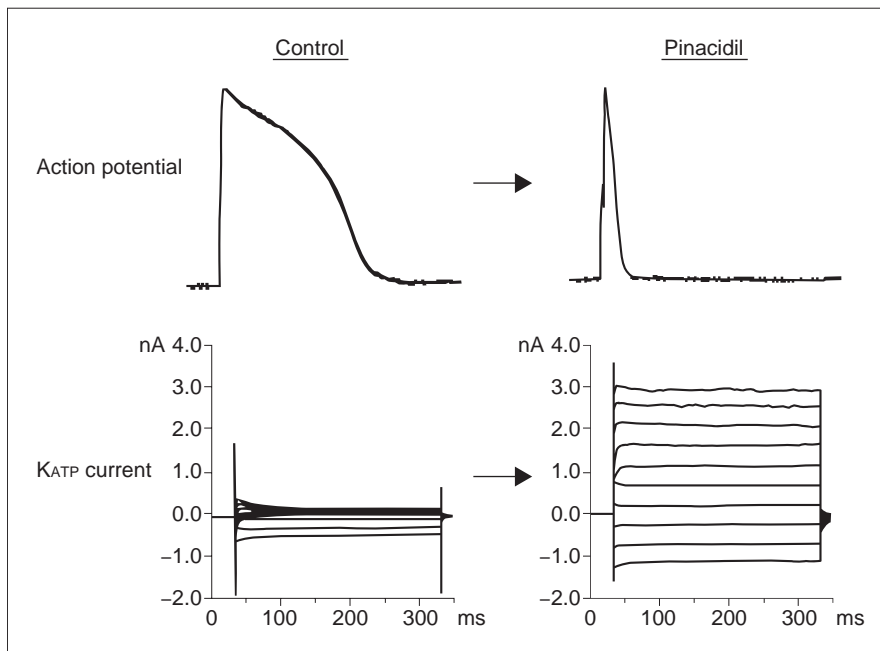


Fig. 1 Effect of K_{ATP} channel opener, pinacidil, on action potential and K^+ current of rat ventricular myocytes. After application of pinacidil ($100\mu M$), the action potential was dramatically shortened. The shortening of action potentials was initiated according to the increase of glibenclamide-sensitive K^+ currents (K_{ATP}).

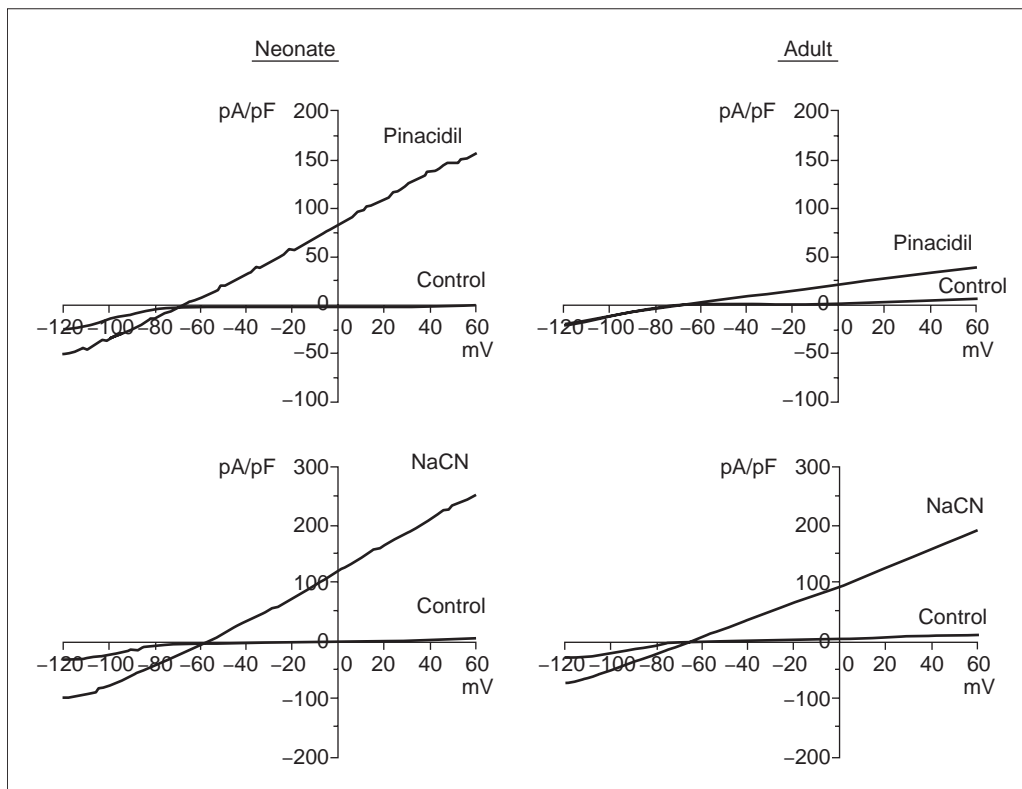


Fig. 2 Developmental changes in K_{ATP} currents initiated by NaCN and pinacidil. Current traces evoked by voltage-clamp ramps between -120 and $+60$ mV are given in neonatal and adult rat ventricular myocytes (A). Both pinacidil- and NaCN-induced currents are greater in neonate than in adult myocytes (B).

A

B

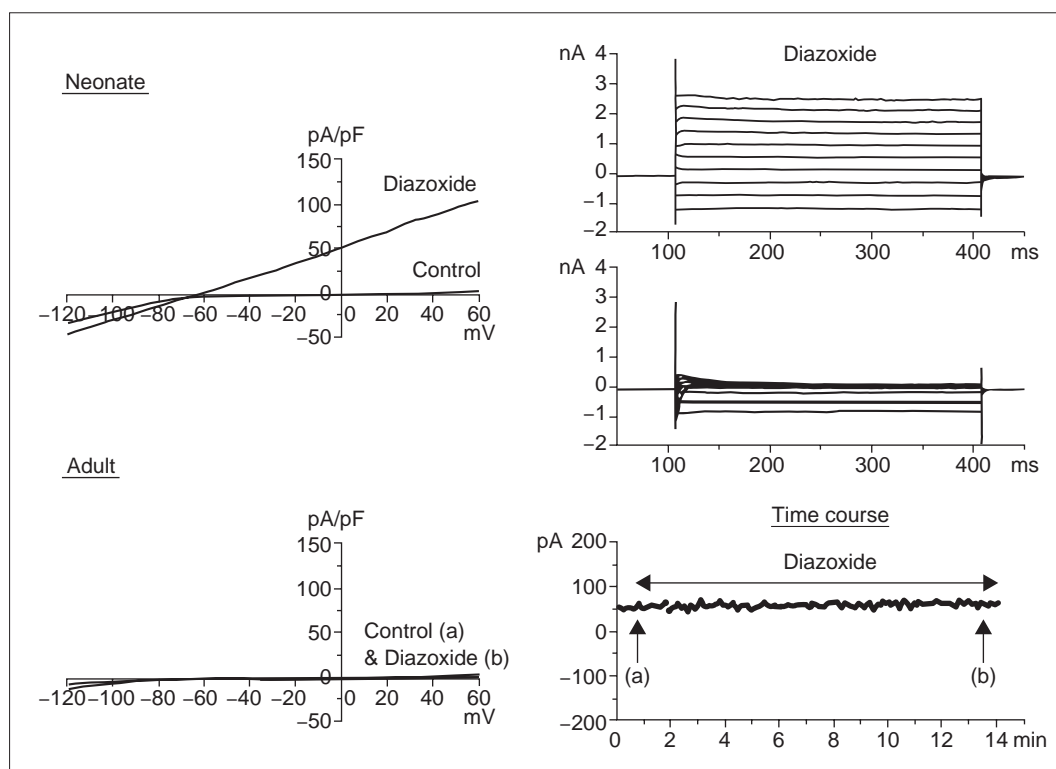


Fig. 3 Diazoxide increases K_{ATP} current in neonate myocytes, but not in adult myocytes. Superimposed current traces evoked by ramp pulses in neonate and adult myocytes are shown. Diazoxide, an opener of pancreatic and vascular smooth muscle cell-type K_{ATP} channels, opened K_{ATP} channels in neonatal, but not in adult rat ventricular myocytes. The time course of the effect of diazoxide on K^+ currents (at 0 mV) of adult myocytes is shown in the right lower panel. Diazoxide did not activate the K_{ATP} current over 12 minutes.

れたが、成獣ではdiazoxideは全く無効であった。

考 察

K_{ATP} チャンネルはNoma⁷⁾により初めて報告されたチャンネルで、細胞内ATPの減少により開口するチャンネルである。心筋細胞における K_{ATP} チャンネルの構造は4個の心筋タイプのスルフォニルウレア(SUR2A)と4個の内向き整流性 K^+ チャンネル(Kir6.2)からなる8量体である⁸⁾。 K_{ATP} チャンネル開口薬はSURに結合しチャンネルを開口し、ATPは直接チャンネルサブユニットに作用しチャンネルを開口する(Fig. 4)。

Table 1は各種薬剤と各種 K_{ATP} チャンネルサブタイプに対する効果を示している⁹⁾。ATPによるチャンネル抑制作用を感知する部位は、SURではなく、チャンネルを形成する内向き整流 K^+ チャンネルサブユニット(Kir)であると報告されている。SURはKirのATP感受性を調節する作用もある。3種類のうちで、SUR1がATP感受性を増大させる作用が最も大きく、SURのサブタイプが異なることにより、チャンネルのATP感受性が変化し得る。本実験により未熟心筋が成熟心筋と比較して虚血抵抗性の機序

の一つとして K_{ATP} チャンネル、特にその構造に違いがある可能性が示唆された。

われわれの実験結果を支持する報告として、Yokoshikiらによる報告がある¹⁰⁾。彼らはSUR1ならびにSUR2に対するアンチセンスオリゴを培地に入れ6日間培養したラット心室筋細胞の K_{ATP} チャンネル電流をパッチクランプ法で測定し、未熟心筋には成熟心筋に存在しないSUR1が存在することを示唆している。実際、生体での状況はより複雑で、心臓の K_{ATP} チャンネルはSUR2A/Kir6.2と単純にはいえず、Inagakiら⁸⁾の報告によると、成獣ラットの心臓にSUR1のmRNAは発現していないか、あるいはごくわずかなレベルの発現があると報告している。未熟心筋では成熟心筋より豊富にSUR1が発現している可能性があり、成熟心筋では作用しない薬物が、未熟心筋では作用する可能性があることを示唆するものである。

Xieら¹¹⁾によると、 K_{ATP} チャンネル電流は胎児期より観察され、日齢1~20日にかけてピークを示し、その後は発達とともに減少し、成獣は日齢5の約57%であったと報告している。また、single-channel(inside-out)で K_{ATP} チャンネルのATPに対する感受性を検討しており、それによる

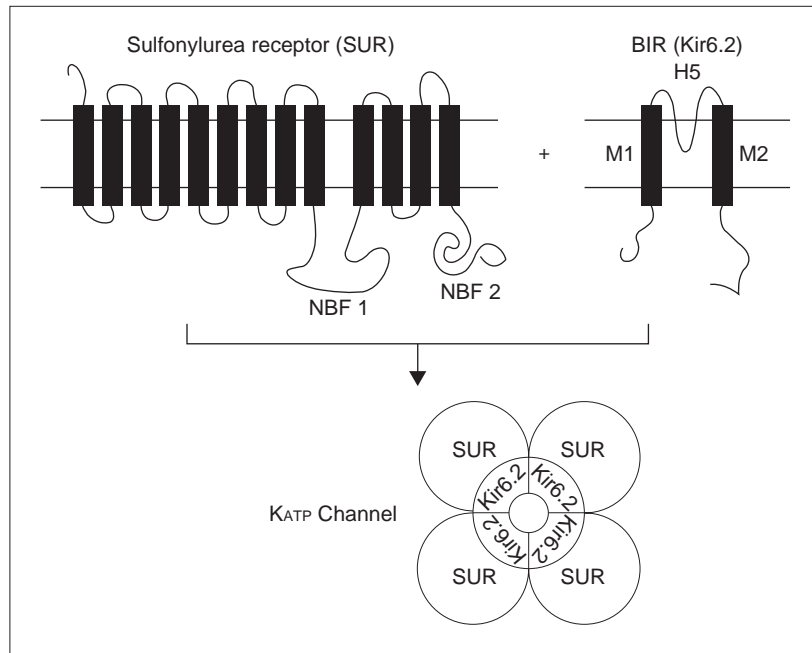


Fig. 4 K_{ATP} channel as a complex of SUR and Kir channel subunits. K_{ATP} channels are hetero-octamers composed of an ATP-binding cassette, the sulfonylurea receptor (SUR), and an inwardly rectifying K^+ channel (Kir) subunit.

Table 1 Subtypes of K_{ATP} channels and the effect of openers in various tissues

Type of cell	Subtypes	Diazoxide	Pinacidil
Pancreatic β cell	SUR1/Kir6.2	+++	-
Cardiomyocyte	SUR2A/Kir6.2	-	+++
Vascular smooth muscle cell	SUR2B/Kir6.1	++	+++

とKd値は成獣で $7.83\mu\text{M}$ と新生仔(日齢1; $0.24\mu\text{M}$)の約33倍であった。つまり、新生仔の K_{ATP} チャンネルは成獣のそれと比較し、約1/33倍の低濃度で開口することになる。

一方、SUR2A/Kir6.2はdiazoxideでは開口されないが、細胞内ADPが高い状態ではdiazoxideによりSUR2A/Kir6.2チャンネルは開口すると報告されている^{12, 13}。ADPは虚血時に上昇しており、また、ミトコンドリア K_{ATP} チャンネルの活性化も加わり、虚血時にはdiazoxideは心筋保護効果を示す。われわれのwhole-cell patch clamp法では細胞内は内液中にADPを含まない状態に保たれており、未熟心筋で細胞内ADPの上昇に伴って K_{ATP} チャンネルが開口したとは考えられない。

未熟心筋の虚血抵抗性にはさまざまな機序が考えられるが、今回の研究から K_{ATP} チャンネルの電流密度の差、さらにはそれをもたらすチャンネル構造の違いが関与し

ている可能性が示唆された。

本研究の一部は第20回Japanese Section of the International Society for Heart Research(2003年, 東京)にて発表した¹⁴。

【参考文献】

- 1) Tribulavá N, Okuruhlicová L, Mihalovičová BZ, et al: Myocardial ischemic tolerance: Differences between immature and adult rats, in Ošťádal B, Nagano M, Takeda N, et al (eds): The Developing Heart. New York, Lippincott-Raven Publishers, 1997, pp407-425
- 2) Baker EJ, Boerboom LE, Olinger GN, et al: Tolerance of the developing heart to ischemia: Impact of hypoxemia from birth. Am J Physiol 1995; 268: H1165-1173
- 3) Baker JE, Contney SJ, Gross GJ, et al: K_{ATP} channel activation in a rabbit model of chronic myocardial hypoxia. J Mol Cell Cardiol 1997; 29: 845-848

- 4 Baker JE, Curry BD, Olinger GN, et al: Increased tolerance of the chronically hypoxic immature heart to ischemia. Contribution of the K_{ATP} channel. *Circulation* 1997; 95: 1278–1285
- 5 Oštádalová I, Oštádal B, Kolář F, et al: Tolerance to ischaemia and ischaemic preconditioning in neonatal rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 857–865
- 6 Yano Y, Braimbridge MV, Hearse DJ: Protection of the pediatric myocardium. Differential susceptibility to ischemic injury of the neonatal rat heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 94: 887–896
- 7 Noma A: ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983; 305: 147–148
- 8 Nagaki N, Gono T, Clement IV JP, et al: Reconstitution of I_{KATP} : An inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 1995; 270: 1166–1170
- 9 Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, et al: ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998; 274: C25–37
- 10 Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, et al: Antisense oligodeoxynucleotides of sulfonylurea receptors inhibit ATP-sensitive K^+ channels in cultured neonatal rat ventricular cells. *Pflugers Arch* 1999; 437: 400–408
- 11 Xie LH, Takano M, Noma A: Development of inwardly rectifying K^+ channel family in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1997; 272: H1741–1750
- 12 D'ahan N, Moreau C, Prost AL, et al: Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 12162–12167
- 13 Matsuoka T, Matsushita K, Katayama Y, et al: C-terminal tails of sulfonylurea receptors control ADP-induced activation and diazoxide modulation of ATP-sensitive K^+ channels. *Circ Res* 2000; 87: 873–880
- 14 Hajikano M, Katsube Y, Watanabe M, et al: Diazoxide increases ATP-sensitive K^+ current of neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: A31