



Non-genomic effects of aldosterone on intracellular ion regulation and cell function in rat ventricular myocytes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松井, さおり メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/344

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 487号	学位授与年月日	平成19年 3月14日
氏 名	松 井 さおり		
論文題目	<p>Non-genomic effects of aldosterone on intracellular ion regulation and cell function in rat ventricular myocytes (ラット心室筋細胞における細胞内イオン調節および細胞機能に対するアルドステロンの非ゲノム作用)</p>		

博士(医学) 松 井 さおり

論文題目

Non-genomic effects of aldosterone on intracellular ion regulation and cell function in rat ventricular myocytes
(ラット心室筋細胞における細胞内イオン調節および細胞機能に対するアルドステロンの非ゲノム作用)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

アルドステロンの作用には、細胞内のミネラルコルチコイド受容体(MR)に結合し、核内移行して蛋白合成を促進するゲノム作用と、蛋白合成を介さず、数分以内に作用を発現する非ゲノム作用がある。非ゲノム作用は、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などで報告されており、細胞膜や小胞体に作用して細胞内ナトリウム、カルシウム、水素イオン濃度を短時間で変化させる。しかし、心筋細胞における非ゲノム作用の報告は少なく、細胞内イオン濃度や細胞収縮への影響に関しては不明な点が多い。我々は、心筋細胞におけるアルドステロン投与時の細胞内ナトリウム濃度($[Na^+]_i$)、カルシウムトランジェント(CaT)と心筋収縮、細胞容積を測定し、アルドステロンの非ゲノム作用の生理的意義を検討した。

〔材料ならびに方法〕

1. $[Na^+]_i$ 、細胞内カルシウム濃度($[Ca^{2+}]_i$)、細胞容積の測定

SDラット(雄、7~8週令、300~350g)の単離心室筋細胞に蛍光色素を負荷し、共焦点レーザー顕微鏡(LSM510; Carl Zeiss社)を用いて蛍光強度の変化を観察した。 $[Na^+]_i$ は、sodium greenの蛍光強度の相対的变化により評価し、 $[Ca^{2+}]_i$ は、fluo 3の蛍光強度の変化をpseudo-ratio methodを用いて $[Ca^{2+}]_i$ に変換した。細胞容積は、カルセインを負荷した細胞において、対物レンズを垂直軸方向に移動させて1 μm スライスで撮影し、各スライスの細胞面積を加算して算定した。

2. 左室乳頭筋張力、左室発生圧の測定

乳頭筋張力は、ラットの左室乳頭筋を0.5 Hzで電気刺激し、等尺性張力を測定した。左室発生圧は、ランゲンドルフ灌流心の左心室内にラテックスバルーンを挿入し、収縮期圧と拡張期圧の差より求めた。

〔結果〕

1. アルドステロンの非ゲノム作用による $[Na^+]_i$ 、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化

アルドステロンは、100 nMから10 μM までの濃度でsodium greenの蛍光強度を上昇させた。100 nMアルドステロンを5分間灌流後のsodium greenの蛍光強度は、灌流前の $107 \pm 2\%$ (平均 \pm 標準誤差、 $n=8$ 、 $p<0.05$)であった。0.5 Hz電気刺激下のCaTは、アルドステロン(10 μM)の灌流により、その振幅、減衰速度、拡張期 $[Ca^{2+}]_i$ に変化を認めなかった($n=10$)。

2. アルドステロンによる $[Na^+]_i$ 上昇の機序

心筋細胞におけるナトリウム流入経路には、 $Na^+-K^+-2Cl^-$ 共輸送体(NKCC1)および Na^+/H^+ 交換機構(NHE)がある。NKCC1阻害薬であるブメタナイド(10 μM の投与により、sodium greenの蛍光強度に変化を認めなかったが、アルドステロン灌流による $[Na^+]_i$ 上昇を有意に抑制した。また、NHE阻害薬である5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA: 100 μM の投与により、sodium greenの蛍光強度はcontrol.

の $72.6 \pm 7.0\%$ ($n=8, p<0.05$) まで低下したが、アルドステロンの投与による蛍光強度の上昇は抑制された。

3. アルドステロンの非ゲノム作用による心筋収縮の変化

アルドステロン ($10\ \mu\text{M}$) の灌流は、細胞収縮、乳頭筋張力、左室発生圧のいずれも変化させなかった ($n=4\sim 10$)。

4. アルドステロンの非ゲノム作用による細胞容積の変化

アルドステロン ($100\ \text{nM}$) の灌流により、細胞容積は5分間で $47.5 \pm 3.6\ \text{pL}$ から $49.8 \pm 3.7\ \text{pL}$ まで増大した ($n=6, p<0.05$)。また、アルドステロンによる細胞容積の増大は、 $100\ \text{nM}$ から $10\ \mu\text{M}$ までの濃度で認められ、ブメタナイドおよびEIPAにより抑制された。

5. アルドステロンの非ゲノム作用におけるMRの関与

MRの阻害薬であるスピロノラクトン ($10\ \mu\text{M}$) の灌流により、アルドステロンの $[\text{Na}^+]_i$ 、細胞容積への作用は抑制されたが、スピロノラクトンの単独投与によっても sodium green の蛍光強度および細胞容積は増大した。

〔考察〕

今回の実験では $100\ \text{nM}$ 以上の濃度で $[\text{Na}^+]_i$ と細胞容積の変化に有意差が確認された。生理的状态では、アルドステロンの血中濃度は $10\ \text{nM}$ 以下である。しかし、心不全患者ではアルドステロンの血中濃度は $100\ \text{nM}$ 程度に上昇すると報告されており、また心筋局所でのアルドステロン産生を考慮すると、我々の実験で使用したアルドステロン濃度は妥当であると考えられる。

これまでの研究では、アルドステロンの非ゲノム作用により細胞収縮は増強し、この増強は、NHEが活性化されて $[\text{Na}^+]$ が上昇すること、また細胞質をアルカリ化して収縮蛋白のカルシウム感受性が増加することによると報告されている。しかし、我々の実験では、細胞収縮、乳頭筋張力、左室発生圧のいずれにおいても変化を認めなかった。 $[\text{Na}^+]_i$ の上昇にもかかわらず心筋収縮が変化しなかった理由として、(1) $[\text{Na}^+]_i$ の上昇が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ や収縮に影響しない程度の微小なものであった、(2) 細胞容積の増大により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が軽減された、(3) 非ゲノム作用による細胞内経路を介して、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇と収縮張力の増強が打ち消された、などが考えられる。

また、今回の研究で認められた細胞容積増大の病態生理学的意義は不明であるが、心肥大の進展や浸透圧性ストレスに対する保護に関与する可能性が考えられる。

今回、MR阻害薬としてスピロノラクトンを使用した。スピロノラクトン自体に $[\text{Na}^+]_i$ と細胞容積を増加させる作用を認めたため、MRの関与について言及できなかった。スピロノラクトンについては、拡張期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させて細胞収縮を増加させる作用が報告されており、スピロノラクトンをMRの阻害薬として用いることには限界があると考えられるため、より選択的阻害薬による検討が必要と思われた。

〔結論〕

ラット心筋細胞において、アルドステロンは、非ゲノム作用により $[\text{Na}^+]_i$ と細胞容積を上昇させるが細胞収縮には影響を与えなかった。アルドステロンの非ゲノム作用は、細胞収縮より、むしろ細胞容積の増大に関与することが示された。

論文審査の結果の要旨

アルドステロンは、生体内で二種類の作用を発揮する。一つは細胞内のミネラルコルチコイド受容体(MR)に結合し、核内移行して蛋白合成を促進するゲノム作用であり、他は、蛋白合成を介さず数分以内に作用を発現する非ゲノム作用である。アルドステロンの非ゲノム作用は、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などで報告されており、細胞膜や小胞体を介するイオン流入により細胞内ナトリウム、カルシウム、水素イオン濃度を短期間に変化させる。しかし、心筋細胞での非ゲノム作用の報告は少なく、細胞内イオン濃度や細胞収縮への影響は不明である。申請者は、心筋細胞におけるアルドステロンの非ゲノム作用を明らかにするために、Sprague-Dawleyラット(オス、7~8週齢、300~350 g)を用い、アルドステロン投与時の細胞内ナトリウム濃度($[Na^+]_i$)、カルシウムトランジェント(CaT)、心筋収縮及び細胞容積の変化を評価した。

結果の概要を以下に示す。

1. アルドステロンの非ゲノム作用による $[Na^+]_i$ 、CaTの変化

100 nmol/Lのアルドステロンの灌流により、 $[Na^+]_i$ は5分間で 107 ± 2 %まで上昇した(平均±標準誤差、 $n=8$ 、 $p<0.05$)。また、 $[Na^+]_i$ の上昇は100 nmol/Lから10 μ mol/Lの範囲で認められた。一方、アルドステロンは、10 μ mol/Lの高濃度でも0.5 Hzで刺激下のCaTに変化を及ぼさなかった。

2. アルドステロンによる $[Na^+]_i$ 上昇の機序

心筋細胞の Na^+ 流入経路として推定される、 $Na^+-K^+-2Cl^-$ 共輸送体(NKCC1)、 Na^+/H^+ 交換機構(NHE)の阻害薬であるbumetanide、5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA) 及びMRの阻害薬であるspironolactoneを30分投与後に10 μ mol/Lアルドステロンを灌流させた。10 μ mol/L bumetanide単独投与では、 $[Na^+]_i$ は変化せず、アルドステロンの追加投与で $[Na^+]_i$ は上昇しなかった。100 μ mol/L EIPAの単独投与で $[Na^+]_i$ は 72.6 ± 7.0 %まで低下したが、アルドステロンの追加投与で $[Na^+]_i$ は上昇しなかった。10 μ mol/L spironolactoneの単独投与では、 $[Na^+]_i$ は 132.7 ± 10.8 %まで上昇し、アルドステロンの追加投与で更なる上昇は認められなかった($n=6\sim9$)。

3. アルドステロンの非ゲノム作用による心筋収縮の変化

10 μ mol/Lアルドステロンの灌流において、細胞収縮、右室乳頭筋の発生張力、Langendorff灌流心の左室発生圧のいずれも変化しなかった($n=4\sim10$)。

4. アルドステロンの非ゲノム作用による細胞容積の変化

100 nmol/Lのアルドステロンの灌流により、細胞容積は5分間で 47.5 ± 3.6 pLから 49.8 ± 3.7 pLまで増大した。細胞容積の増大は、100 nmol/Lから10 μ mol/Lまでの範囲で認められた($n=6$)。Bumetanideは細胞容積を変化させず、アルドステロンの追加投与で細胞容積の増大は認められなかった。EIPAは 44.2 ± 6.9 pLから 42.2 ± 6.5 pLまで細胞容積を縮小させたが、アルドステロンの追加投与で細胞容積の増大は認められなかった。Spironolactoneは 43.3 ± 2.5 pLから 43.8 ± 2.6 pLまで細胞容積を増大させ、アルドステロンの追加投与で更なる増大は認められなかった($n=6$)。

以上より、アルドステロンが数分以内に $[Na^+]_i$ と細胞容積を上昇させ、その上昇にNKCC1とNHEが関与していることが明らかになった。しかし、アルドステロンはCaTと収縮には影響しなかった。今回の実験では、100 nmol/L以上の濃度でのみ $[Na^+]_i$ と細胞容積に有意な増大が確認されたが、アルドステロンの血漿中濃度は、心不全患者では100 nmol/L程度であり、心筋局所ではさらに上昇しているとの報告があるため、今回の実験での濃度は妥当と考えられる。MR阻害薬として使用したspironolactoneは、単独投与で $[Na^+]_i$ と細胞容積を増加させたため、今回の研究ではMRの関与については言及できなかった。Spironolac-

toneは、アルドステロンとは異なった経路で $[\text{Na}^+]_i$ と細胞容積を増加させると考えられる。

申請者は以上の知見より、心筋細胞におけるアルドステロンの非ゲノム作用は、 $[\text{Na}^+]_i$ と細胞容積を上昇させるが、CaTと細胞収縮には影響を与えず、収縮力の増大よりは細胞容積の増大に寄与していると報告した。審査委員会は、心筋細胞におけるアルドステロンの非ゲノム作用の生理的意義と、 $[\text{Na}^+]_i$ に加えて細胞容積の制御について明らかにした点を高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は、次のような質問を行った。

- 1) 細胞の単離および調製の方法について
- 2) 培養細胞を使用して $[\text{Na}^+]_i$ 、CaTを検討している他の研究について
- 3) Calceinを用いた細胞容積の測定法について(細胞質特異性、核のサイズ)
- 4) 使用したアルドステロンの濃度について
- 5) ラット心筋細胞の $[\text{Na}^+]_i$ の基礎値について
- 6) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に関する平滑筋細胞と心筋細胞での相違について
- 7) 心筋での $[\text{Na}^+]_i$ 調節機構について(Na channelの関与についての検討)
- 8) アルドステロンによる $[\text{Na}^+]_i$ 変化率の程度について(持続時間、可逆性、病態生理学的意義)
- 9) アルドステロン以外の心筋細胞のポジティブ・コントロールについて
- 10) 使用したMR阻害薬(spironolactone, eplerenone)の選択について
- 11) 統計解析(one way repeated ANOVA)について
- 12) 実験動物としてラットを使用した理由について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	川 上 純 一	
	副査	中 村 浩 淑	副査 近 藤 一 直