

心肺の内科

イオンチャネルと病態

洞結節細胞における伸展活性化チャネルの役割

東京女子医科大学 循環器内科学

ハギワラ	ノブヒサ	タムラ	コウジ	シヨウダ	モリオ	マツダ	ナオキ
萩原	誠久	田村	光司	庄田	守男	松田	直樹
カジモト	カツヤ	サカイ	リエコ	カサヌキ	ヒロシ	ホソダ	サイチ
梶本	克也	坂井	理映子	笠貫	宏	細田	瑛一

(受付 平成8年11月29日)

Stretch-activated Current in Rabbit Sino-atrial Node Cells

Nobuhisa HAGIWARA, Koji TAMURA, Morio SHODA, Naoki MATSUDA,
Katsuya KAJIMOTO, Rieko SAKAI, Hiroshi KASANUKI
and Saichi HOSODA

Department of Cardiology, The Heart Institute of Japan, Tokyo Women's Medical College

Stretch-activated current was studied in rabbit sino-atrial node cells using the whole-cell patch clamp method. With continuous application of positive pressure through the patch electrode, the cell was inflated and the membrane conductance was increased. The stretch-activated current showed time-independent and outward rectifying properties and the current was sensitively reduced by the C1 channel blockers, such as SITS, DNDS or 9-AC. The reversal potential of stretch-activated current was well explained by the equilibrium potential of C1. These findings indicate that the stretch-activated current is C1 selective, and the results suggested that the stretch-activated C1 current may contribute to the positive chronotropic effect during mechanical stimulation in sino-atrial node cells.

緒言

洞結節細胞は機械的伸展刺激によって、陽性変時作用を示すことが古くから知られている¹⁾。洞結節細胞の活動電位を構成する膜イオン電流系はCa, K および過分極誘発電流等の時間依存性および担体輸送電流, 背景電流等の時間非依存性電流により構成されている^{2)~5)}。自動能を司るペースメーカー電位(-65~-40mV)はこれら全ての膜電流系の総和によって形成されているが, この領域における膜抵抗は非常に高い値を示すため, 僅かな電流変化であっても, ペースメーカー電位は大きく影響されることが考えられる⁶⁾。従って, 膜

伸展により誘発されるイオンチャネル (stretch-activated channel, SA-channel)⁷⁾⁸⁾が洞結節細胞に存在する場合には, その活性化により心拍数は大きく変動することが予測される。今回は洞結節細胞における伸展活性化チャネルの性質および役割について述べる。

方法

コラゲナーゼ処理によって得られた家兎単一洞結節細胞にガラスパッチ電極を用いて whole-cell voltage clamp 法を行い膜伸展に伴う膜電位および膜電流の変化を記録した。細胞膜の伸展法には, 電極内に直接陽圧を加える方法を用いた⁹⁾。

結 果

1. 正常洞結節細胞における膜電位, 膜イオン電流の特徴

図1は正常状態における単一洞結節細胞の活動電位および主な時間依存性膜電流を示している。洞結節細胞の活動電位の特徴は図1-Aのように自動能を示すことである。自動能の発現には約 -65mV の最大拡張期電位から -40mV までの領域で緩徐な脱分極相を示すペースメーカー電位の存在が重要である。このペースメーカー電位のイオン機序としては現在まで、時間依存性Ca電流の活性化(図1-C)、遅延整流性K電流の脱活性化(図1-B1)および過分極誘発電流の活性化(図1-B2)が主に関与していると考えられている。

ここで重要なことは、このペースメーカー電位を形成する総和のイオン電流は極く微量であるという事実である。即ち、ペースメーカー電位の領

域における総膜電流は細胞膜容量とペースメーカー電位の勾配で計算可能であるが、単一洞結節細胞の膜容量を 40pF 、電位勾配を $25\text{mV}/200\text{msec}$ と仮定すると、ペースメーカー電位を構成する総内向き電流は僅かに -5pA と算出される。これに加えて、洞結節細胞の膜抵抗は内向き整流性K電流が存在しないため、 $1\sim 5\text{G}\Omega$ と心房筋や心室筋に比較して極めて高い抵抗値を示すため⁹⁾、洞結節細胞においては僅かな電流変化であっても、膜電位の変化を来し易い。

2. 洞結節細胞の膜伸展により活性化されるイオン電流

外液に種々のイオンチャネル抑制剤を用いることにより図1に示したような、既存の時間依存性、非依存性電流はすべて抑制され、僅かな背景電流のみが認められるようになる(図2-B1a)。このような実験条件で、電極を介して $5\sim 10\text{cmH}_2\text{O}$ 程度

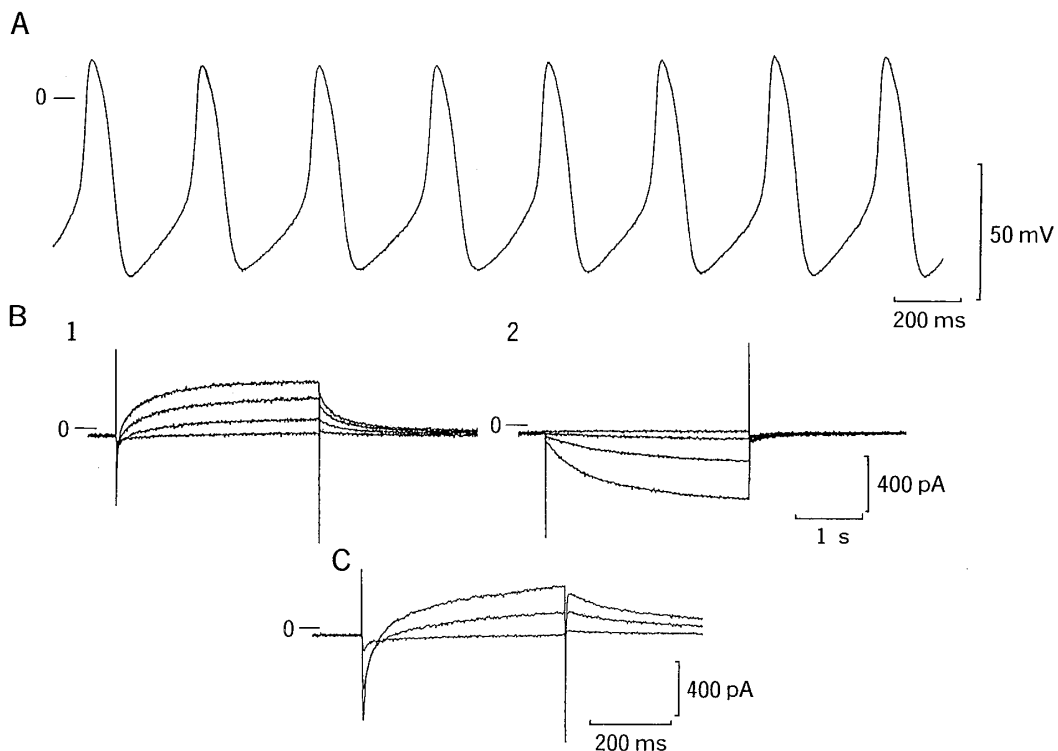


図1 洞結節細胞の活動電位とイオン電流

A: 単一洞結節細胞から得られた活動電位。約 -65mV の最大拡張期電位より -40mV まで引き続くペースメーカー電位が認められる。

B: 保持電位 -40mV から3秒間の脱分極刺激(B1)および過分極刺激(B2)を加えた状態で認められる、遅延整流性K電流(1)および過分極誘発電流(2)を示した。

C: 同じ洞結節細胞に保持電位 -40mV より300msecの脱分極刺激を加えた状態で活性化されたL型Ca電流を示した。

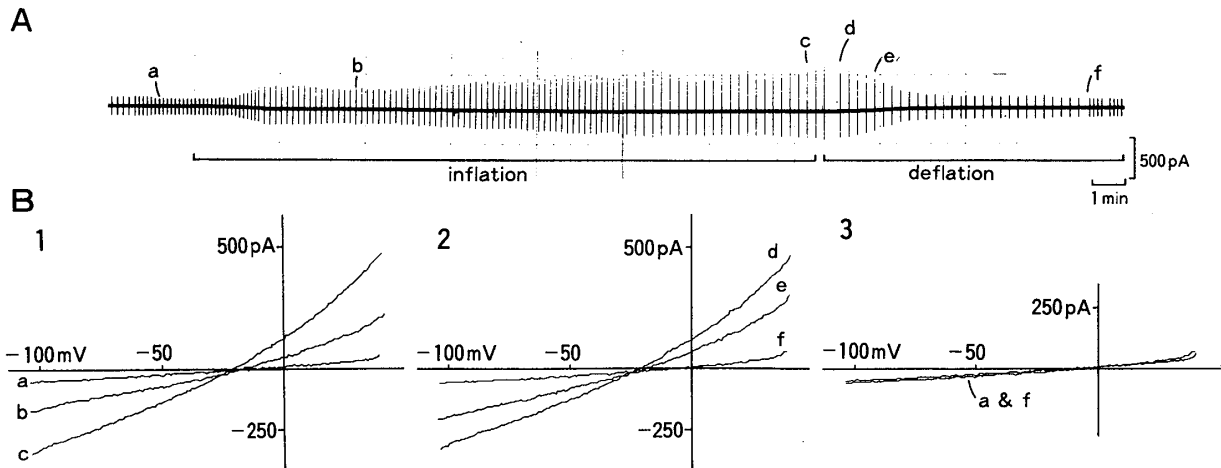


図2 洞結節細胞の膜伸展刺激によって活性化される電流

A: この電流トレースでは、保持電位 -30mV より $\pm 70\text{mV}$ の三角波を用いて記録している。下線で示す部分で約 10cm 水中の陽圧刺激を細胞に加えている (inflation)。また、deflationの部分では $-30\text{cmH}_2\text{O}$ の陰圧を加えて伸展刺激を解除している。

B-1~3: 陽圧刺激により、電流はa-cのように増大し、陰圧により電流はcontrolの状態に完全に戻っている (d-f)。この実験条件での逆転電位は -25mV を示している。

の陽圧を加えて膜を伸展することにより、膜のコンダクタンスは、内向き、外向きともに増大した (図2-Bb~d)。矩形波刺激による膜電流の変化を検討すると、陽圧負荷により増大した電流は時間非依存性を示すとともに著明な外向き整流特性を示した。これらの膜電流の変化は可逆的であり、電極を介した陰圧により膜伸展を解除することによりcontrolの状態に戻った (図2-B3f)。伸展により誘発される電流は脱分極刺激に伴って外向き電流が著明になる、外向き整流特性を示したが、電極内液には分子量の大きいN-methyl-d-glucamineが含まれており、他の陽イオンは含まれていない。この事実よりここで認められた電流は陰イオンによって運ばれている可能性が考えられた。伸展誘発電流の逆転電位は図2-Bに示すごとく約 -25mV であるが、この実験条件では外液Cl濃度は 150mM で内液Cl濃度は 50mM である。この値はNernstの計算式より求めたClの平衡電位 -28mV と極めて良く一致した。

また、Clチャンネルブロッカーとして知られているSITS, DNDSおよび9-ACにより、伸展誘発電流は著明に抑制された (図3)。

以上の事実より陽圧負荷により活性化される電流はCl電流であることが確認された。

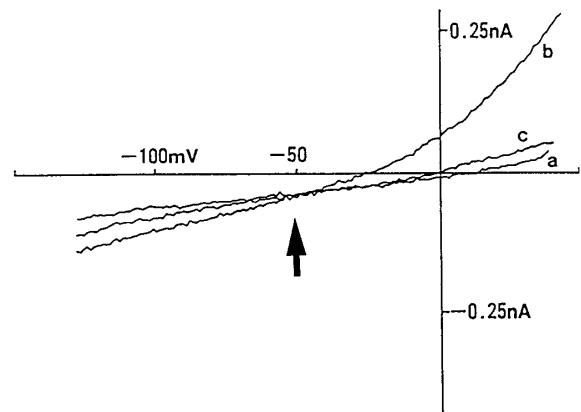


図3 家兎洞結節細胞における伸展活性化Cl電流
家兎単洞結節細胞にパッチ電極を介する陽圧負荷を加えた。陽圧負荷に伴って細胞膜は伸展されると共に、電流は内向き、外向き共に増大している。aはcontrolの電流、bは伸展によって活性化された電流であるが、その電流変化は約 -50mV で交差している (矢印)。この実験条件では細胞外が 150mM Cl、細胞内が 24mM Clであるため、Clの平衡電位は -48mV となり、上記の逆転電位と良く一致する。また、この電流はClチャンネルブロッカーである、 5mM のDNDSにより著明に抑制されている (c)。

3. 伸展活性化Cl電流の細胞内調節機構

心筋のCl電流としては、既に β -agonistにより誘発されるc-AMP依存性Cl電流および細胞内Ca誘発性Cl電流が知られている^{10)~13)}。今回の膜

伸展により活性化されたCl電流が細胞内c-AMP依存性protein kinaseを介しているか否かを検討したが、電極内に特異的c-AMP依存性protein kinase inhibitorが存在する状態でもこの電流は影響を受けなかった。また、今回の伸展活性化Cl電流は無Ca細胞外液でかつ、細胞内Caを10mM EGTAでキレートした状態でも活性化された。以上のことから伸展活性化Cl電流の発現にprotein kinaseおよび細胞内Caは関与していないことが示唆され、現在まで報告されている β -agonistにより誘発されるc-AMP依存性Cl電流やCa誘発性Clともまったく異なる電流であることが明らかとなった。

4. 伸展活性化Cl電流の洞結節細胞活動電位に対する影響

図4には、単一洞結節細胞に伸展刺激を加えた状態での活動電位変化を示した。controlと比較して、伸展刺激後には最大拡張期電位が約5mV脱分極すると共に、心拍数が12%増大した(図4-1)。また、伸展前後の電流変化は、その逆転電位が約-

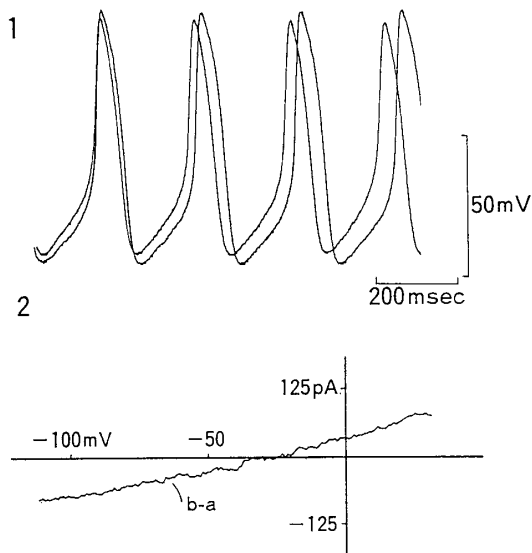


図4 洞結節細胞の膜伸展刺激に伴う活動電位と膜電流の変化

1: 洞結節細胞膜の伸展刺激により、最大拡張期電位は約5mV脱分極し、自発心拍数も約12%増大している。

2: 同じ細胞から記録された伸展活性化電流(差電流, b-a)の逆転電位は-28mVであり、Clの平衡電位とよく一致している。

28mVであり(図4-2)、Clの平衡電位と良く一致した。これらの実験から、伸展刺激によって活性化されるCl電流は洞結節細胞の細胞膜伸展刺激に伴う陽性変時作用の一つの機序として生理的に関与する可能性が考えられた。

考 察

1. 心筋における他のCl電流との関係

現在までに心筋のCl電流としてはc-AMP依存性Cl電流とCa-activated Cl電流が知られている。他の種々の細胞でもCl電流が報告されているが、その多くはc-AMP依存性protein kinaseまたはC-kinaseおよび細胞内Caに依存する電流である¹⁴⁾。今回の伸展活性化Cl電流はprotein kinaseを抑制した状態や細胞内Caをキレートした状態でも活性化されたため、心筋細胞において報告されているCl電流とは全く異なる新しい電流であることが示唆された。この伸展活性化Cl電流の発現機序についての詳細は不明であるが、伸展に伴う機械的な細胞骨格の変化がCl電流を活性化している可能性も示唆された。

2. 伸展活性化Cl電流の生理的意義

前述のごとく、洞結節細胞では内向き整流性K電流が存在しないため、膜抵抗は非常に高い値を示している。従って伸展刺激によって活性化される電流変化は、たとえ僅かであっても、心拍数は大きく変動することが考えられる。今回の単一洞結節細胞における実験からも陽圧負荷によって、心拍数の増大が認められたことより、洞結節細胞の伸展刺激に伴う陽性変時作用に今回の伸展活性化Cl電流が一つの機序として関与している可能性が考えられた。

また、病態時、特に心筋虚血や心不全時には細胞の膨化(細胞浮腫)を来することが知られている。伸展活性化Cl電流は低浸透圧に伴う細胞の膨化時にも活性化されるため、他の可能性としては、細胞容積を正常化させる際にも容積調節性イオン電流として関与すると共に、病態に伴う不整脈の発生にも関与する可能性が示唆された¹⁵⁾。

結 論

今回のCl電流は、心筋細胞の機械的伸展刺激によって活性化される電流であり、このCl電流の活

性化は伸展刺激に伴う陽性交時作用や催不整脈作用としても重要であると考えられた。これらの電流は膜の伸展刺激存在下で初めて活性化されるが、最近の我々の研究では心筋細胞の伸展刺激によってCl電流のみならず、既存のL型Ca電流も活性化されることが確認されたため¹⁶⁾、様々な電流系が心筋細胞膜の伸展刺激に関与する可能性が考えられた。従って、今後は、これらの膜イオンチャネルの変化をモデル実験を用いて定量的に検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) **McBrooks G, Lu HH, Lange G et al**: Effects of localized stretch of the sinoatrial node region of the dog heart. *Am J Physiol* 211 : 1197-1201, 1966
- 2) **Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M**: Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sinoatrial node cells. *J Physiol* 395 : 233-253, 1988
- 3) **Hagiwara N, Irisawa H**: Modulation by intracellular Ca^{2+} of the hyperpolarization—Activated inward current in rabbit single sinoatrial node cells. *J Physiol* 409 : 121-141, 1989
- 4) **Hagiwara N, Irisawa H, Kasanuki H et al**: Background current in the sino-atrial node cells of the rabbit heart. *J Physiol* 448 : 53-72, 1992
- 5) **Sakai R, Hagiwara N, Matsuda N et al**: Sodium-potassium pump current in rabbit sinoatrial node cells. *J Physiol* 490(1) : 51-62, 1996
- 6) **Irisawa H, Brown HF, Giles W**: Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev* 73 : 197-227, 1993
- 7) **Morris CE**: Mechanosensitive ion channels. *J Memb Biol* 113 : 93-107, 1990
- 8) **Bustamante JO, Ruknudin A, Sachs F**: Stretch-activated channels in heart cells: Relevance to cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 : S110-113, 1991
- 9) **Hagiwara N, Irisawa H, Masuda H et al**: Stretch-activated anion currents of rabbit cardiac myocytes. *J Physiol* 456 : 285-302, 1992
- 10) **Bahinski A, Nairn AC, Greengard P et al**: Chloride conductance regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase in cardiac myocytes. *Nature* 340 : 718-721, 1989
- 11) **Harvey RD, Clark CD, Hume JR**: Chloride current in mammalian cardiac myocytes. Novel mechanism for autonomic regulation of action potential duration and resting membrane potential. *J Gen Physiol* 95 : 1077-1102, 1990
- 12) **Matsuoka S, Ehara T, Noma A**: Chloride-sensitive nature of the adrenaline induced current in guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol* 425 : 579-598, 1990
- 13) **Zygmunt AC, Gibbons WR**: Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 68 : 424-437, 1991
- 14) **McCann JD, Li M, Welsh J**: Identification and regulation of whole-cell currents in airway epitheliums. *J Gen Physiol* 94 : 1015-1036, 1989
- 15) **Sakai R, Hagiwara N, Kasanuki H et al**: Chloride conductance in human atrial cells. *J Mol Cell Cardiol* 27 : 2403-2408, 1995
- 16) **Matsuda N, Hagiwara N, Shoda M et al**: Enhancement of the L-type Ca^{2+} current by mechanical stimulation in single rabbit cardiac myocytes. *Circ Res* 78 : 650-659, 1996