

原 著

ラット胎仔動脈管における ATP 感受性カリウムチャンネル

東京女子医科大学 附属日本心臓血圧研究所 循環器小児科

シエン 沈 ジン ナカニシ トシ オ ナカザワ マコト
 菁・中西 敏雄・中澤 誠

ATP-sensitive Potassium Channel in the Ductus Arteriosus of Fetal Rat

Jing SHEN, Toshio NAKANISHI and Makoto NAKAZAWA

Pediatric Cardiology, Heart Institute of Japan,
Tokyo Women's Medical University, School of Medicine

The O₂-sensing mechanism may be underdeveloped in the ductus arteriosus of the premature fetus. The ATP-sensitive K channel may be one of the O₂-sensors. This study was designed to investigate developmental changes in the ATP-sensitive K channel in smooth muscle cells of the ductus arteriosus in the rat fetus. The ductus arteriosus was isolated from fetal rats at 19 and 21 days of gestation (term; 21.5 days). The fetus at 19 days served as a model of the premature fetus. The effect of glybenclamide, an inhibitor of the ATP-sensitive K channel, on ductal contraction was studied. Glybenclamide caused significant contraction in the 21-days fetus, but not in the 19-day fetus. Whole-cell K currents were measured in single smooth muscle cells isolated from the ductus arteriosus using voltage-clamp techniques. The K current density activated by pinacidil, an opener of the ATP-sensitive K channel, and that inhibited by glybenclamide were significantly greater in the fetus at 21 days than in the fetus at 19 days of gestation. Glybenclamide depolarized the membrane potential in the two age groups, but the degree of depolarization in the 21-day fetus was significantly greater than in the 19-day fetus. These data suggest that K_{ATP} is underdeveloped in the premature fetus and support the hypothesis that K_{ATP} is one of the O₂ sensors in the DA and that O₂-induced contraction of the DA may not occur because K_{ATP} is underdeveloped in the premature fetus.

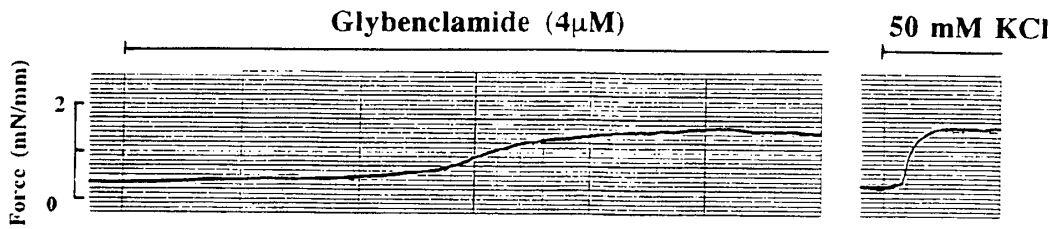
緒 言

動脈管は胎生期には開存しているが、生後閉鎖し、やがて消失する血管で、臨床的に重要であることはもちろん、生物学的にも興味ある血管である¹⁾。出生後の動脈管の閉鎖機序は、血中の酸素濃度の上昇が関与していることはわかっているが、それ以上の詳しい機序については不明の点が多い^{2)~4)}。一般に血管のトーンは静止膜電位に依存するが、その膜電位は主にカリウムチャンネル(Kチャンネル)によって制御されている。Kチャンネルが開けば過分極となり血管は弛緩し、K

チャンネルが閉じれば脱分極となり血管は収縮する。

我々は以前に、酸素による動脈管の収縮機序を調べ、低酸素は動脈管平滑筋のKチャンネルを開き、膜を過分極させ動脈管を弛緩させ、酸素はKチャンネルを閉じ膜を脱分極させ、Caチャンネルを開き細胞外から内へのCa流入を増加させ収縮を起こすことを示した⁵⁾。我々は酸素で閉じるKチャンネルはATP感受性Kチャンネルであると推測したが⁵⁾、他の研究者はATP感受性Kチャンネルではなく膜電位依存性Kチャンネルであ

A. 21-day fetus



B. 19-day fetus

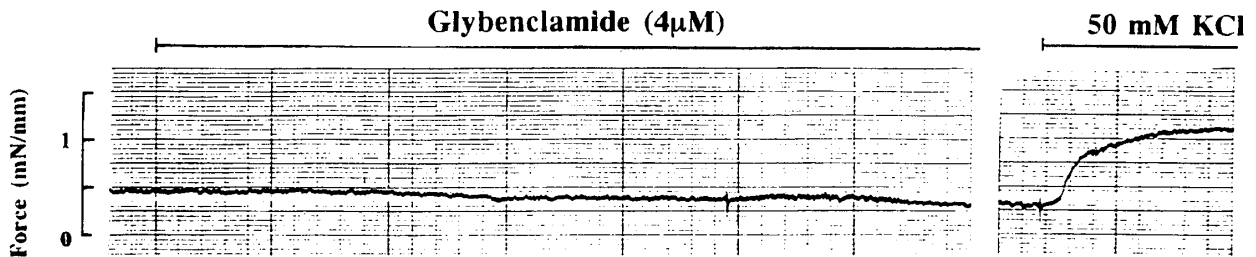


図1 摘出動脈管の収縮

ATP 感受性 K チャンネルの阻害剤である glybenclamide ($4\mu\text{M}$) を含む液で灌流すると、21 日胎仔動脈管 (A) は収縮したが、19 日胎仔動脈管 (B) は収縮しなかった。50 mM KCl では、21 日胎仔動脈管、19 日胎仔動脈管ともに収縮した。

るとの説を提唱した⁶⁾。

また我々は以前に、21 日胎仔ラットの動脈管は酸素で収縮し、19 日胎仔のラットは酸素で収縮しないことを示した⁷⁾。もし本当に ATP 感受性 K チャンネルが酸素による動脈管収縮に関与しているなら、19 日ラット胎仔では ATP 感受性 K チャンネルが未発達である可能性がある。

本研究の目的は、ラット胎仔動脈管において ATP 感受性 K チャンネルの発達に伴う変化を調べ、動脈管に存在する ATP 感受性 K チャンネルの生理的意義について研究することである。

対象および方法

1. 対象

妊娠ウイスターラットを埼玉実験動物供給所より購入し、その胎仔を用いた。

本実験は東京女子医科大学動物実験倫理委員会の認可を得たもので、動物の取り扱いに関しては、東京女子医科大学動物実験倫理委員会規程を遵守した。

2. 方法

1) 動脈管収縮の測定

妊娠ラットをペントバルビタール (50 mg/kg 腹腔内注射) で麻酔後、胎仔を帝切で分娩させた。胎生 21 日と胎生 19 日 (満期は 21.5 日) のラット胎仔から動脈管を摘出し、0.4~0.6mm の長さの動脈管のリング標本を作製した。2 本の針金を動脈管に通し、そのうち 1 本は固定し、他の 1 本で動脈管をひっぱった。その針金に張力トランスデューサーをつなぎ、動脈管が発生する張力を測定した^{7,8)}。

コントロールの灌流液は Krebs-Henseleit 液 (組成 (mM) : NaCl 118, KCl 5, CaCl₂ 1.5, glucose 6, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 24, NaH₂PO₄ 0.436) で、液には 95%N₂-5%CO₂ ガスの気泡を通した。PO₂ は 22~25mmHg, pH は 7.38~7.42, PCO₂ は 35~42 mmHg であった。高 KCl 液を時に用いたが、その場合には KCl 50mM, NaCl 73mM とした。

動脈管収縮を 3 つの方法、すなわち、① ATP 感受性 K チャンネルの阻害剤である glybenclamide ($4\mu\text{M}$) を含む液で灌流⁹⁾、②膜電位依存性

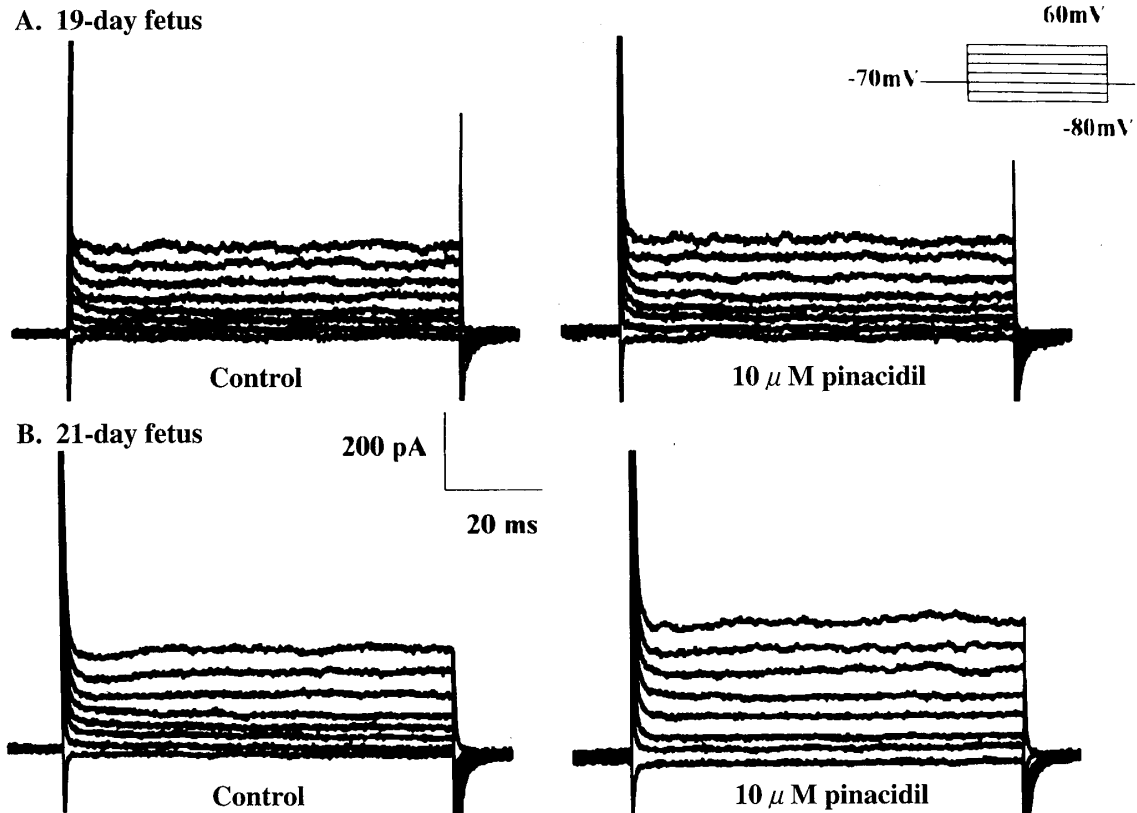


図2 動脈管平滑筋細胞でのカリウム電流の測定

保持電圧は -70 mV とし、矩形状に電圧を 200 ms の間、 -80 mV から $+60\text{ mV}$ まで 20 mV 間隔で変化させ、流れる電流を測定した。コントロールでの電流と pinacidil 存在下での電流を示す。19日胎仔(B)では pinacidil による K 電流の変化はわずかであったが、21日胎仔(A)では K 電流は増加した。

K チャンネルの阻害剤である 4-aminopyridine (4 AP, 10 mM) を含む液で灌流⁶⁾, ③ 50 mM KCl を含む液で灌流⁷⁾, での動脈管収縮の有無をみた。

2) 細胞単離

胎生 21 日と胎生 19 日のラット胎仔から動脈管を摘出し、以下の方法で動脈管平滑筋細胞を単離した。

摘出した動脈管を Ca-free Hanks 液 (組成 (mM) : NaCl 138.8, KCl 5.4, NaH_2PO_4 1.2, MgCl_2 0.5, HEPES 10, EGTA 0.1, pH 7.4) 中に入れた。次に papain (0.4 mg/ml , Sigma 社), dithiothreitol (0.19 mg/ml , Sigma), bovine serum albumin (0.2 mg/ml , Sigma) を含む Hanks 液中で動脈管を細切し、 37°C 5~8 分間インキュベートした。次に動脈管組織を collagenase (0.25 mg/ml , Yakult 社) を含む液で 37°C 5~7 分間インキュベートした後、酵素を含まない液に移し、保存した。組織片

を液中で振ることで単離平滑筋細胞を得ることができた。細胞は単離当日のみ用いた。

3) パッチクランプ法

単離細胞を顕微鏡上のバスの底に付着させた後、バスを灌流した。灌流液の PO_2 は $30\sim 35\text{ mmHg}$ であった。1 個の細胞を用いた whole-cell パッチクランプ法を用いて、膜電位固定法で、カリウム電流 (K 電流) を測定した¹⁰⁾。ピペット内の液の組成 (mM) は KCl 20, KOH 120, MgCl_2 2, EGTA 10, HEPES 5, Mg-ATP 5, aspartate 60, pH 7.4 であった。バスの灌流液の組成 (mM) は NaCl 143, KCl 5.4, NaH_2PO_4 0.33, MgCl_2 0.5, HEPES 5, pH 7.4 であった。灌流液を pinacidil ($4\mu\text{M}$) または glybenclamide ($10\mu\text{M}$) を含む液に変え、pinacidil で活性化される K 電流と、glybenclamide で抑制される K 電流を ATP 感受性 K 電流とした^{11)~13)}。電流はアンプ Axopatch 200B (Axon

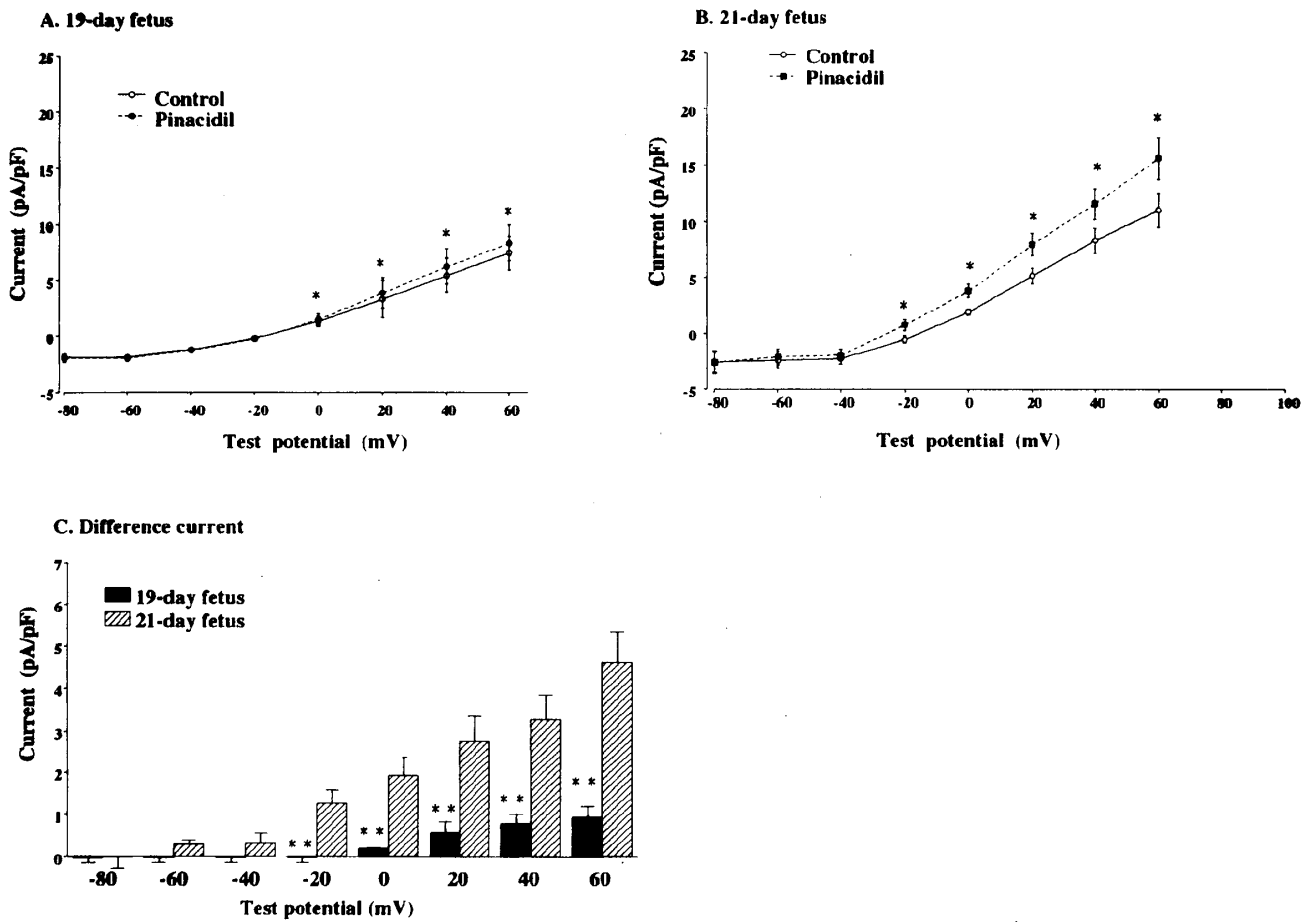


図3 動脈管平滑筋細胞でのカリウム電流-電圧関係
 コントロールでの電流と pinacidil 存在下での電流を示す。19日胎仔 (A), 21日胎仔 (B) とともに K 電流は増加した。K 電流の増加 (C) は 21日胎仔に比べ, 19日胎仔で有意に少なかった。
 * : vs コントロール $p < 0.05$, ** : vs 21日胎仔 ($n = 6$) $p < 0.05$.

Instruments, Foster City, CA, USA) を用いて増幅した。データ解析用のソフトは pClamp 8.2 (Axon Instruments) を用いた。

保持電圧は -70mV とし, 矩形状に電圧を 200 ms の間, -80mV から $+60\text{mV}$ まで 20mV 間隔で変化させ, 流れる電流を測定した。

保持電圧 0mV から 10mV に脱分極させたときの capacitance transient から, 膜容量 membrane capacitance を求めた。動脈管平滑筋単離細胞の膜容量は 21日胎仔では $11.8 \pm 0.4\text{pF}$ ($n = 40$), 19日胎仔では $11.4 \pm 0.5\text{pF}$ ($n = 42$) と有意差はなかった。電流密度 current density は電流を膜容量で除して表した (pA/pF)。

膜電位はアンプの電流固定モードを用いて測定

した。

4) 統計

結果は平均 \pm 標準誤差で表した。2群の平均値の比較には Student の t 検定を用いた¹⁴⁾。薬物に対する反応の有意性を検定するには, 対応のある t 検定ないし分散分析 repeated measurements of analysis of variance で検討した。p 値が 0.05 未満の場合を有意とした。

結 果

1. 動脈管収縮

50mM KCl によって, 21日胎仔動脈管 ($n = 6$), 19日胎仔動脈管 ($n = 6$) とともに収縮した。ATP 感受性 K チャンネルの阻害剤である $4\mu\text{M}$ glibenclamide を含む液で灌流すると, 21日胎仔動

Current inhibited by glybenclamide after activation by pinacidil

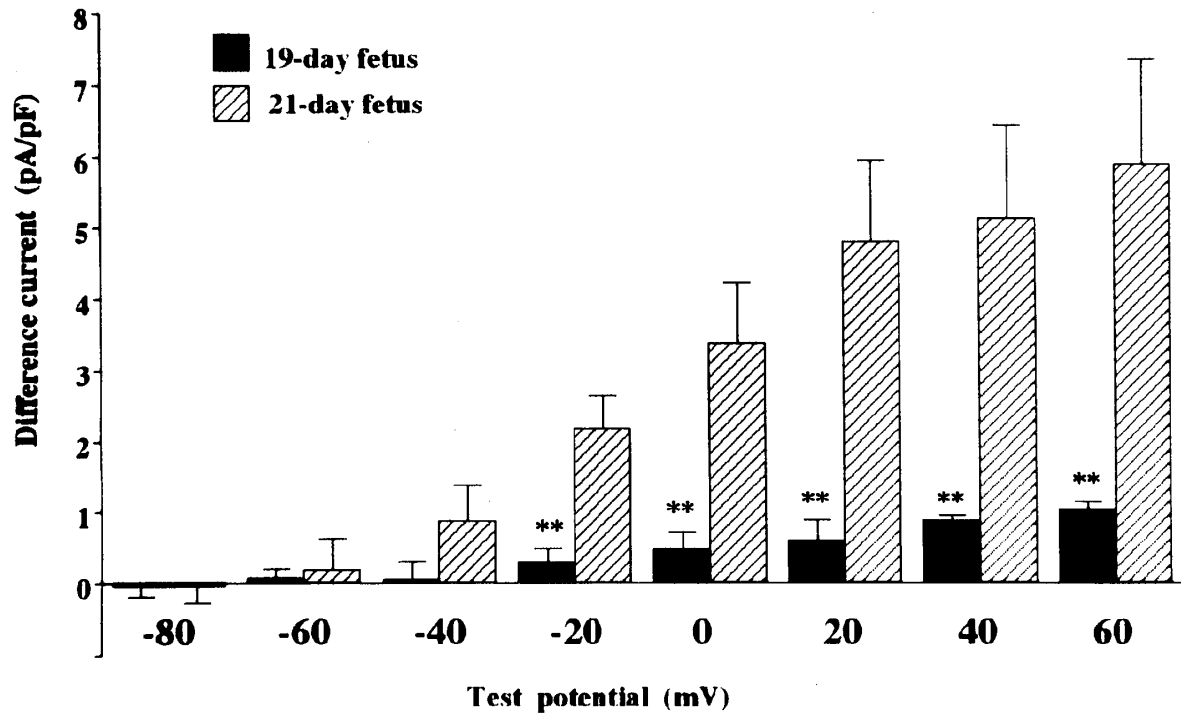


図4 動脈管平滑筋細胞において、pinacidil (4 μ M) で活性化された後、glybenclamide (10 μ M) で抑制されるカリウム電流
Glybenclamide で抑制される K 電流は、21 日胎仔に比べ、19 日胎仔で有意に少なかった。 ** : vs 21 日胎仔 (n=6) p<0.05.

脈管は収縮したが、19 日胎仔動脈管は収縮しなかった(図 1)。膜電位感受性 K チャンネルの阻害剤である 4-aminopyridine を含む液で灌流すると、21, 19 日胎仔動脈管ともに収縮した。

2. ATP 感受性 K チャンネル電流

動脈管から単離した平滑筋細胞で K チャンネル電流を測定すると、pinacidil で活性化される電流も、glybenclamide で抑制される電流も、21 日胎仔では 19 日胎仔に比べ大きかった(図 2, 3, 4)。

一方、膜電位感受性 K チャンネルの阻害剤である 4-aminopyridine の影響をみると、21 日胎仔と 19 日胎仔では、4-aminopyridine で抑制される K チャンネル電流には 2 群間で有意差はなかった(n=6)。

3. 膜電位

静止膜電位は 21 日胎仔 (-40.7 \pm 3.3 mV) と 19 日胎仔 (-41.5 \pm 4.0 mV) で有意差はなかった。Gly-

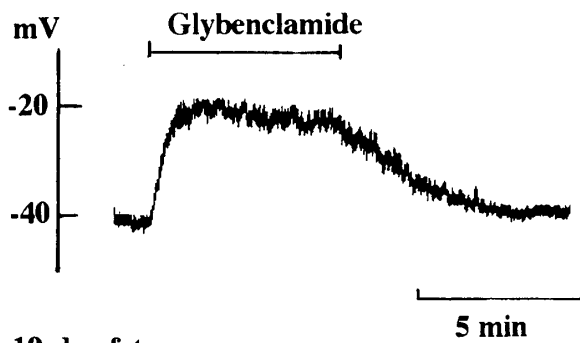
benclamide は両日齢群で脱分極を起こしたが、その脱分極の程度は 21 日胎仔 (33.3 \pm 3.3 mV, n=12) の方が 19 日胎仔 (8.2 \pm 2.8 mV, n=12) に比べて大きかった(図 5)。

考 察

ATP 感受性 K チャンネルは細胞内 ATP 濃度が下がると開く¹¹⁾。ATP 感受性 K チャンネルが開いた状態の細胞に glybenclamide が投与されると、ATP 感受性 K チャンネルは閉じる。ATP 感受性 K チャンネルが閉じて膜電位の脱分極が起こると、Ca チャンネルが開いて細胞外から内への Ca 流入が起き、細胞内 Ca 濃度が上昇して平滑筋収縮が起こる。

今回の研究では glybenclamide は 21 日胎仔では動脈管収縮を起こしたが、19 日胎仔では起こさなかった。このことは、21 日胎仔の成熟した動脈管では ATP 感受性 K チャンネルが存在している

A. 21-day fetus



B. 19-day fetus

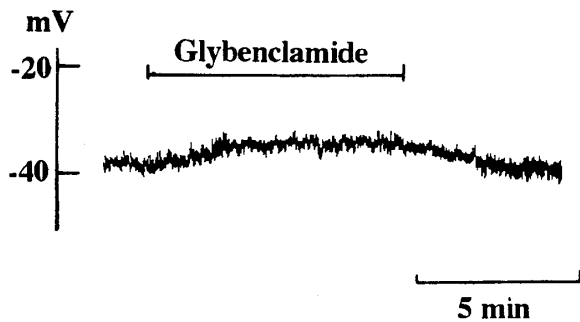


図5 Glybenclamideによる膜電位の変化

Glybenclamideは両日齢群で脱分極を起こしたが、その脱分極の程度は21日胎仔に比べ、19日胎仔ではわずかであった。

低酸素状態では開口しているが、19日胎仔の未熟な動脈管ではATP感受性Kチャンネルは量的に少ないか機能が未発達であることを示唆する。

実際に動脈管から単離した平滑筋細胞でKチャンネル電流を測定すると、pinacidilで活性化される電流も、glybenclamideで抑制される電流も、19日胎仔では21日胎仔に比べ小さかった。このことはATP感受性Kチャンネル電流は19日胎仔では21日胎仔に比べ少ないことを示唆する。

我々は以前に、21日胎仔ラットの動脈管は酸素で収縮し、19日胎仔ラットは酸素で収縮しないことを示した⁷⁾。今回の結果と総合すると、21日胎仔動脈管は酸素で収縮し、19日胎仔動脈管は酸素で収縮しないのは、ATP感受性Kチャンネルがまさに酸素センサーとして働いていて、19日胎仔ではATP感受性Kチャンネルが未発達であるための可能性が高い。

今回の研究では、膜電位依存性Kチャンネルの阻害剤である4-aminopyridineを含む液で灌流す

ると、21日胎仔動脈管、19日胎仔動脈管ともに収縮した。また、4-aminopyridineを用いた膜電位依存性Kチャンネル電流の測定では、21日胎仔と19日胎仔では有意差はなかった。このことは19日胎仔で既に膜電位依存性Kチャンネルが発達していることを示唆する。もし膜電位感受性Kチャンネルが酸素センサーなら、19日胎仔で4-aminopyridineを含む液で灌流しても収縮が起こらないはずである。以上の結果から、19日胎仔動脈管が酸素で収縮しない理由は、少なくとも一部には、ATP感受性Kチャンネルの未発達が関係していることを示唆する。

Roulet & Coburn⁴⁾は、酸素は動脈管平滑筋の脱分極を起こすことを示した。今回の実験では、glybenclamideも動脈管平滑筋の脱分極を起こした。Glybenclamideは動脈管平滑筋の脱分極を起こすことで収縮をもたらす可能性が高いが、その脱分極の程度は21日胎仔の方が19日胎仔に比べて大きく、19日胎仔での脱分極はわずかなものであった。19日胎仔ではATP感受性Kチャンネルが未発達で、それ故、glybenclamideの脱分極作用が少なく、glybenclamideを投与しても収縮に至らないと考えられる。

結 論

ラットでは胎仔発達とともにATP感受性Kチャンネルが増加する。今回の研究は、動脈管においては、ATP感受性Kチャンネルが酸素センサーとして重要な役割をはたすという仮説を支持する。

文 献

- 1) Coceani F, Olley PM: Prostaglandins and the ductus arteriosus. *Pediatr Cardiol* 4 (Suppl II): 33-37, 1983
- 2) Kovalcik V: The response of the isolated ductus arteriosus to oxygen and anoxia. *J Physiol* 169: 185-197, 1963
- 3) Fay FS: Guinea pig ductus arteriosus. I. Cellular and metabolic basis for oxygen sensitivity. *Am J Physiol* 221: 470-479, 1971
- 4) Roulet MJ, Coburn RF: Oxygen-induced contraction in the guinea pig neonatal ductus arteriosus. *Circ Res* 49: 997-1002, 1981
- 5) Nakanishi T, Gu H, Hagiwara N et al: Mecha-

- nisms of oxygen-induced contraction of ductus arteriosus isolated from the fetal rabbit. *Circ Res* **72**: 1218–1228, 1993
- 6) **Tristani-Firouzi M, Reeve HL, Tolarova S et al**: Oxygen-induced constriction of rabbit ductus arteriosus occurs via inhibition of a 4-aminopyridine- ,voltage-sensitive potassium channel. *J Clin Invest* **98**: 1959–1965, 1996
 - 7) **Wu G, Jing S, Momma L et al**: The effect of vitamin A on contraction of the ductus arteriosus in fetal rat. *Pediatr Res* **49**: 747–754, 2001
 - 8) **Nakanishi T, Gu H, Abe K et al**: Developmental changes in contractile system of the mesenteric small artery of rabbit. *Pediatric Research* **41**: 65–71, 1997
 - 9) **Quayle JM, Nelson MT, Standen NB**: ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* **77**: 1165–1232, 1997
 - 10) **Hamill OP, Marty A, Neher E et al**: Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch* **391**: 85–100, 1981
 - 11) **Quayle JM, Bonev AD, Brayden JE et al**: Pharmacology of ATP-sensitive K currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery. *Am J Physiol* **269**: C1112–C1118, 1995
 - 12) **Clapp LH, Davev R, Gurney AM**: ATP-sensitive K channels mediate vasodilation produced by lemakalim in rabbit pulmonary artery. *Am J Physiol* **264**: H1907–H1915, 1993
 - 13) **Clapp LH, Gurney AM**: ATP-sensitive K channels regulating potential of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol* **H916–H920**, 1992
 - 14) **Snedecor GW, Cochran WG**: *Statistical Methods* Ames. Iowa State University Press, Iowa (1970)
-