

学位論文題名

末梢血リンパ球 GRK mRNA 定量による
心不全重症度判定の試み

学位論文内容の要旨

β AR に代表される細胞膜 7 回貫通型の GTP 結合蛋白質連関受容体 (GCR : G protein coupled receptors) を特異的に修飾するリン酸化酵素 (GRK : G-protein coupled receptor kinase) として現在までに 6 種類がクローニングされている (GRK1 ~ 6) 。このうち、GRK2、GRK3、GRK5 が β AR をリン酸化し down-regulation を引き起こすと考えられており、心臓では GRK2、GRK5 の発現が確認されている。心不全患者の心室筋において GRK2 発現量が増加している報告や、心不全動物モデルにおける GRK mRNA 発現量の増加の報告などから、心不全の病態に GRK 活性亢進による β AR リン酸化が大きく影響していると推測される。本研究では、心不全重症度の指標としての末梢血リンパ球 GRK mRNA 発現量測定の意味を確立することを目的として、(1) カテコラミン慢性投与が心筋 GRK2、GRK5 発現に与える影響、(2) 心筋と末梢血リンパ球の GRK2、GRK5 発現量の相関、(3) GRK mRNA の持続時間 (代謝回転速度)、(4) ヒト心不全の重症度と GRK 発現量の関係について検討を加えた。

対象・方法

心筋と末梢血リンパ球の GRK 発現量の相関を検討するためのラットモデル：ウイスターラット (12週齢、体重約350g) の背部皮下に浸透圧ポンプを植え込み、Norepinephrine 0.5 μ g/kg/min (NE 群、n = 6) または Isoproterenol 1.0 μ g/kg/min (ISO 群、n = 6) を 2 週間連続投与した。対照群 (CNT群、n = 6) には 0.01N HCl を同様に 2 週間連続投与した。2 週間の薬物投与期間終了後に、Pentobarbital (50 mg/kg) にて麻酔し末梢血約 10ml をヘパリン採血した後、心臓を摘出し液体窒素中で急速冷凍した後 -80°C に保存した。末梢血は Ficoll-Isopaque (Pharmacia、Sweden) を用いた濃度勾配遠心法によりリンパ球を分離した

GRK mRNA の代謝回転速度を検討するためのラットモデル：ウイスターラット (12週齢、体重約350g) に 0.01N HCl に溶解した Isoproterenol (25mg/kg/日) を 2 週間毎日一回皮下投与した。対照群は等量の 0.01N HCl を皮下投与した。2 週間の薬物投与期間の終了時に心臓を摘出した ISO14D 群およびその対症群である CNT14D 群に加えて、薬剤非投与期間をさらに 2 週間加えた ISO28D 群と CNT28D 群を作成した (各群 4 匹)

心不全患者におけるリンパ球 GRK 発現量の検討：研究期間中に北海道大学医学部附属病院循環器科に入院した心不全患者の中から、NYHA 分類 II 度および III 度の心不全患者各 4 名を無作為に抽出し採血を行なった。前述の方法でリンパ球を分離した。採血に際しては、研究目的を十分に説明し全ての患者から文書によるインフォームドコンセントを得た。

定量的 RT-PCR 法：採取したリンパ球、心室筋より Single step 法にて total RNA を調製

し、逆転写反応で cDNA を得た。total RNA 10ng に相当する cDNA をもとに PCR 法で GRK2、GRK5 の mRNA 発現量を定量した。PCR プライマーには、すでに報告されている Rat GRK2 cDNA 配列、Rat GRK5 cDNA 配列情報をもとに合成した。また、各サンプル毎の増幅効率の差を補正する目的で、同一の PCR プライマーで増幅され標的 cDNA と塩基数の異なる内部標準 DNA を作成しその一定量を反応系に加えた。増幅された DNA は、ethidium bromide (0.5mg/ml) を含むアガロースゲル電気泳動で分離した後、UV transilluminator 上で写真に記録した。各サンプルの DNA 量はデンストメトリーにて求めた。得られた GRK cDNA 量を内部標準 DNA 量で除した値を求め、標的遺伝子 (GRK) の標準化 mRNA 量とした。GRK mRNA の代謝回転速度の検討、および心不全患者における GRK mRNA 発現量の検討においては、それぞれのサンプルにおける GAPDH 発現量にて標準化を行なった。

統計処理：得られた結果は「平均値±標準偏差」で表記した。有意差の検定には、unpaired t-test を用い、p 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

結果と考察

Isoproterenol の 2 週間投与で、心筋およびリンパ球の GRK5 mRNA の発現量は対照群に比較して有意に増加していた。全ての個体を用いた検討から、心筋とリンパ球の GRK 発現の間には有意な相関があることが示された。これらの結果は、GRK mRNA の転写効率が、血中のカテコラミン濃度により制御されている可能性を示唆している。末梢リンパ球と心筋の間で GRK 発現量に強い相関があるという事実は、心不全による血中カテコラミン濃度上昇の影響を受けたリンパ球 GRK の定量から、心臓における β 受容体リン酸化の程度を推測可能であることを示している。次に GRK mRNA の安定性 (代謝回転速度) 検討する目的で、Isoproterenol 連続投与により上昇した GRK 発現が、投与中止後 2 週間で前値に回復するかどうかを検討した。1 日 1 回の間欠的な投与であっても、2 週間連続して投与することにより、心筋 GRK5 mRNA 発現は有意に増加した。投薬中止後 2 週間で、心肥大は regression していたが、GRK5 mRNA 発現量は高値を維持していた。GRK2 mRNA においても投薬中止後 2 週間で高値を維持している傾向が観察されたが、有意差を認めるにいたらなかった。GRK mRNA の亢進が投薬中止後どの程度持続するのか、今後の検討が必要と思われる。NYHA クラス II 度および III 度の心不全患者の末梢リンパ球における GRK mRNA 発現を比較検討した結果、NYHA-II 度群に比べて NYHA-III 度群では GRK2、GRK5 とともに mRNA 発現量は有意に高値を示しており、予想された様に、

GRK 発現量と心不全重症度との間には正の相関があることが示唆された。今回の検討では症例数が少ないことから、今後はより対象患者数を増やし、重症度や治療に対する反応性 (β 遮断薬やアンジオテンシン変換酵素阻害薬など)、短期的・長期的生命予後との相関などについての検討が必要であると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕
副 査 教 授 川 口 秀 明
副 査 教 授 三 輪 聡 一

学 位 論 文 題 名

末梢血リンパ球 GRK mRNA 定量による 心不全重症度判定の試み

β アドレナリン受容体 (β AR) に対するリン酸化酵素 (GRK : G-protein coupled receptor kinase) のうち、GRK2、GRK5 の発現が心臓で確認されている。心不全患者の心室筋において GRK2 発現量が増加している報告や、心不全動物モデルにおける GRK mRNA 発現量の増加の報告などから、心不全の病態に GRK 活性亢進による β AR リン酸化が大きく影響していると推測される。申請者は、心不全重症度の指標としての末梢血リンパ球 GRK mRNA 発現量測定の意義を確立することを目的として、(1) カテコラミン慢性投与が心筋 GRK2、GRK5 発現に与える影響、(2) 心筋と末梢血リンパ球の GRK2、GRK5 発現量の相関、(3) GRK mRNA の持続時間 (代謝回転速度)、(4) ヒト心不全の重症度と GRK 発現量の関係について検討を加えた。ラットの背部皮下に浸透圧ポンプを植え込み、Norepinephrine 0.5 μ g/kg/min (NE 群) または Isoproterenol 1.0 μ g/kg/min (ISO 群) を、対照群には 0.01N HCl (CNT 群) を 2 週間連続投与し、末梢血約 10ml をヘパリン採血した後、心臓を摘出した。定量的 RT-PCR の結果から、ISO 群は CNT 群に比較して心筋およびリンパ球の GRK5 mRNA の発現量が有意に増加していた。全ての個体を用いた検討から、心筋とリンパ球の GRK 発現の間には有意な相関があることが示された。これらの結果は、GRK mRNA の転写効率が、血中のカテコラミン濃度により制御されている可能性を示唆すると共に、リンパ球 GRK の定量から、心不全時の心臓における β 受容体リン酸化の程度を推測可能であることが示された。ラットに Isoproterenol (25mg/kg/日) を 2 週間毎日 1 回皮下投与した ISO14D 群およびその対症群である CNT14D 群を作成した。また、薬剤非投与期間をさらに 2 週間加えた ISO28D 群と CNT28D 群を作成し、GRK 発現が投与中止後 2 週間で前値に回復するかどうかを検討した。1 日 1 回の間欠的な投与であっても、2 週間連続して投与することにより、心筋 GRK5 mRNA 発現は有意に増加した。投薬中止後 2 週間で、心肥大は CNT28D 群と同程度にまで退縮していたが GRK5 mRNA 発現量は高値を維持していた。GRK2 mRNA においても同様に高値を維持している傾向が観察された。これらの結果から、GRK mRNA の代謝回転が緩除に進行することが明らかとなった。研究期間中に北海道大学医学部附属病院循環器科に

入院した心不全患者の中から、インフォームドコンセントを得られた NYHA-II 度および III 度の心不全患者各 16 名を無作為に抽出し採血を行なった。NYHA-II 度および III 度の心不全患者の末梢血リンパ球における GRK mRNA 発現を比較検討した結果、予想された様に NYHA-II 度群に比べて NYHA-III 度群では GRK2、GRK5 とともに mRNA 発現量は有意に高値を示しており、GRK 発現量と心不全重症度との間には正の相関があることが示唆された。また、NYHA-II 度の患者 10 名の検討から、ACE 阻害薬の服用により、GRK2、GRK5 のいずれも発現量が有意に低下していることが示された。今後はより対象患者数を増やし、重症度や治療に対する反応性 (β 遮断薬や ACE 阻害薬など)、短期的・長期的生命予後の相関などについての検討が必要であると思われた。

学位論文の発表に際し、副査の川口教授より動物モデルの作成について、および薬剤投与による変化の機序についての質問があった。ついで、副査の三輪教授より、薬剤による血行動態の変化について、ならびに心筋肥大の刺激経路についての質問があり、最後に主査の北畠教授から臨床データにおける薬剤治療との関連、本研究の臨床での応用についての質問があった。申請者は自身の研究結果に基づいて、あるいは文献的考察により、これらの質問に概ね適切に回答した。

本論文は、心不全時の受容体機能抑制機構に関する分子レベルでの検討をとおして、全く新しい心不全重症度の指標を見出した点で高く評価される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。