

心筋細胞内情報伝達系への病態修飾

—敗血症心筋と糖尿病心筋におけるカテコラミン陽性変力作用の変容機構—

学位論文内容の要旨

カテコラミンが心筋細胞に陽性変力作用を惹起する細胞内情報伝達機構の大筋が現在ほぼ同定され、従来はアドレナリン β 受容体レベルで議論されていたカテコラミンの反応も、細胞内情報伝達に照準をあわせた細かな検討が必要となった。本研究では、麻酔科学、集中治療医学、救急医学領域で合併率が高い糖尿病と敗血症が心筋細胞内情報伝達系にどのような変化を与えるかを検討した。カテコラミンの陽性変力作用が異なった機序で減弱することを示し、急性期循環管理を病態に応じて講じる必要性を明らかにした。

敗血症動物作成には、New Zealand 白色ウサギ(体重 2 - 2.5 kg)に endotoxin (*E.coli* 055:B5 LPS No.8B, List Biological Laboratories Inc, Campbell) 100 μ g/kg を静脈内投与したものをを用い、対照には溶媒のみを投与した。LPS 投与の5分後より一過性の心拍数減少と血圧低下が生じたが、LPS 投与の約1時間で基礎値へ回復した。LPS 投与の2時間後には突然の頻脈が出現し、3時間後には持続する血圧低下が生じ、6時間後より極度の低血圧が持続し、7時間で血圧測定が不可能となった。LPS 投与の3時間後と6時間後で摘出した右室乳頭筋で isoproterenol による陽性変力作用が有意に減弱したが、colforsin daropate や dibutylcyclic AMP ではその陽性変力作用に差が認められなかった。また、isoproterenol による陽性変力作用減弱は nitric oxide(NO)合成酵素の抑制薬である NG-nitro-L-arginine の器官槽への投与で回復しなかった。[¹²⁵I]-iodocyanopindlol を用いたアドレナリン β 受容体結合飽和実験ではアドレナリン β 受容体の数と親和性に変化が認められなかった。アデニール酸シクラーゼ活性を評価した結果、基礎値に差は認められなかったが、isoproterenol と GppNHp によるアデニール酸シクラーゼ活性が敗血症群6時間で有意に減弱した。colforsin daropate によるアデニール酸シクラーゼ活性には差が認められなかったことより、敗血症病態での陽性変力作用減弱の障害部位は、アドレナリン β 受容体とアデニール酸シクラーゼの間に存在すると結

論された。G 蛋白 α サブユニットのイムノブロット解析の結果、 $G_i\alpha$ 蛋白には変化が認められなかったが、 $G_s\alpha$ 蛋白が約 40-50%に減少していた。ノーザン・ブロット解析により $G_s\alpha$ mRNA の同様な減少が認められ、 $G_s\alpha$ 蛋白減少は転写段階での減少に基づく結論された。

糖尿病動物作成には8週齢の雄性 Wistar rat を用い、streptozotocin 45 mg/kg を尾静脈より投与した 4-6 週後を研究対象とした。対照は緩衝液のみを静脈内投与した同週齢のものを用いた。更に、糖尿病作成後2日目よりインスリンを皮下投与したインスリン治療群を作成し、同週齢のものを研究に用いた。糖尿病群は血糖値 500mg/dl を越えたサンプルを用い、インスリン治療群には血糖値 200mg/dl 以下にコントロールされたサンプルを用いた。 $[^3H]$ CGP 12177 を用いたアドレナリン β 受容体結合飽和実験の結果、アドレナリン β 受容体の親和性には変化が認められなかったが、受容体数が約 50%に減少していた。ノーザン・ブロット解析により、糖尿病群でアドレナリン β 1受容体 mRNA が約 57%に減少していた。G 蛋白のイムノブロット解析では、糖尿病病態で $G_s\alpha$ 蛋白量の変化は認められず、心室筋で強く発現していた $G_i-2\alpha$ と $G_i-3\alpha$ が、糖尿病群でそれぞれ約 79%と約 43%に減少していた。ノーザン・ブロット解析による mRNA の定量も同様に、 $G_i-2\alpha$ mRNA と $G_i-3\alpha$ mRNA の減少を認めた。これら G_i 蛋白の転写段階での減少はインスリン治療により回復した。以上より、糖尿病心室筋では、アドレナリン β 受容体数の減少を補うように $G_i\alpha$ 蛋白量が減少しアデニール酸シクラーゼ活性を保つこと、そして、インスリン治療による適切な血糖コントロールにより細胞内情報伝達系の修復が施されることを明らかとした。

以上の研究により、敗血症病態と糖尿病病態では異なる機序でアドレナリン β 受容体を介した陽性変力作用が減弱することが判明した。敗血症病態では、過剰産生された NO の直接作用によらず $G_s\alpha$ 蛋白の減少のために、アドレナリン β 受容体を介したアデニール酸シクラーゼ活性が減弱していると結論される。一方、糖尿病病態では、アドレナリン β 受容体を介した陽性変力作用減弱の障害部位がアデニール酸シクラーゼ以降の情報伝達系にあると考えられる。陽性変力作用を高めるためには直接的なアドレナリン β 受容体刺激では効力が弱く、敗血症病態では G_s 蛋白以降の伝達系を刺激する薬物の効果が期待でき、糖尿病病態ではインスリン治療を併用したカルシウム感受性増強薬の使用が有効であると結論した。これらの病態では、心室筋細胞内の G 蛋白サブユニットが転写段階から異なる制御を受けて増減することが示され、G 蛋白の量的変化が陽性変力作用の変容に強く関与することが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 劔 物 修
副 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 丸 藤 哲

学 位 論 文 題 名

心筋細胞内情報伝達系への病態修飾

－敗血症心筋と糖尿病心筋におけるカテコラミン陽性変力作用の変容機構－

本論文は外国誌に発表された3編の論文を中心にまとめられた学位申請論文であり、敗血症病態と糖尿病病態で異なる細胞内情報伝達系の変化が心室筋内で生じることを記述した。敗血症病態ではGs α 蛋白が転写段階から減少してくることを、糖尿病病態ではアドレナリン β 受容体とGi α 蛋白が転写段階で減少してくることを示した。敗血症病態ではGs α 蛋白の減少によりアデニール酸シクラーゼ活性が低下することでカテコラミンによる β 受容体を介した陽性変力作用が減じると結論されたが、糖尿病病態ではアデニール酸シクラーゼ活性が保たれており、陽性変力作用が減弱する主因はアデニール酸シクラーゼ以降の細胞内情報伝達系にあると結論された。

口頭発表に際し、副査の丸藤哲教授より、敗血症作成の6時間でGi α mRNAが若干減少する原因に関する質問があった。申請者は自身のデータを紹介し、敗血症進行の末期状態ではGi蛋白が増えることを示唆した。敗血症早期では様々なmRNAが若干の減少を示してくることを紹介し、その不安定性が高まることを説明した。また、敗血症病態や糖尿病病態で得られた結果よりコルホルシンダロパートやホスホジエステラーゼ抑制薬などの β 受容体を介さない薬物の臨床応用の可能性に関する質問があった。申請者は、生体内での投与では、心収縮性のみならず心拍変動と血管拡張作用の2つの因子を考慮する必要があることを重視し、それらの結果と併せて臨床使用するべきであると述べた。副査の安田慶秀教授からは、糖尿病病態で情報伝達系を障害してくる原因についての質問があった。申請者は情報伝達系蛋白が転写段階で変化を来してくるものに対しては、インスリン自体が関与する可能性があると答えた。糖化や脂質化の影響を受け、何らかの転写因子の活性が減じてくる可能性についても述べた。一方、糖尿病心室筋でのその障害部位の中心はホスホランバンのリン酸化にあることを紹介し、リン酸化部位が糖化や脂質化により障害されている可能性を説明した。また、情報伝達系の障害部位を調べたことを治療にどう結びつけていくかについて質問があった。申請者は遺伝子治療の可能性を説明した。主査の劔物修教授からは、今後の研究の発展性についての質問があった。申請者はアドレナリン β 受容体作用が減じる一方で、アドレナリン α 受容体を介した陽性変力作用が増強してくる可能性を紹介し、そのメカニズムを証明する必要性に関して説明した。更に、障害蛋白に対する遺伝子治療の可能性を説明した。フロアーからは、情報薬理学分野吉岡充弘教授より敗血症病態でGs α 蛋白が減少してくるその因子としてどのような機序が考えられるのかに関する質問があった。サイトカインとしてTNF- α 、IL-1 β などの心収縮性抑制効果を紹介し、それらが何らかの転写因子を抑制しGs α 蛋白発現を抑制する可能性を紹介した。いずれの質問に対しても、申請者は十分な論拠と客観性を持って答え、自身の

行った研究の限界と今後の研究指針を明確にさせた。

申請論文は、Anesthesiology, Biochemical Pharmacology および Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology に発表された論文を中心にまとめたものであり、病態での心収縮性を高めるために必要な知識を与えるものであり、治療を含めた今後の研究の発展性が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過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断した。