

学位論文題名

Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition
and Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade
on β -Adrenoceptor Signaling in Heart Failure Produced
by Myocardial Infarction in Rabbits : Reversal
of Altered Expression of β -Adrenoceptor Kinase and $G_{i\alpha}$

(ウサギ心筋梗塞後の心不全モデルにおける心筋アドレナリン β 受容体
情報伝達機構の変化に対するアンジオテンシン変換酵素阻害薬及び
アンジオテンシン II タイプ 1 受容体拮抗薬の効果)

学位論文内容の要旨

I. 背景

種々の原因による心不全時には低下した血行動態を維持するために交感神経活性が亢進している。しかし、持続した交感神経刺激は β 受容体密度の低下 (down-regulation)、受容体と促進生 GTP 結合蛋白 (G_s) の親和性の低下 (functional uncoupling) をもたらし、その結果、脱感作 (desensitization) と呼ばれる β 受容体シグナルの反応性の低下が認められる。この過程には β -adrenergic receptor kinase 1 (β ARK1) の発現増加、活性化が重要な役割を果たしている。更に抑制性 GTP 結合蛋白 (G_i) の増加も反応性の低下に関与していると言われている。

また、心不全時には renin-angiotensin (RA) 系も活性化しているが、交感神経系と RA 系は相互に関係しているため、RA 系を抑制する薬剤が交感神経系にも影響を及ぼすと考えられる。実際、angiotensin converting enzyme (ACE) 阻害薬による交感神経活性の低下や β 受容体 down-regulation の抑制などの報告がある。通常、ACE 阻害薬の効果は angiotensin II (Ang II) の生成を抑制することによって考えられるが、同時に分解が抑制され蓄積する bradykinin による心血管系保護効果も認め、angiotensin II type 1 受容体 (AT1 受容体) 拮抗薬との違いも指摘されている。しかしながら、慢性心不全患者に対する大規模臨床試験では両薬剤は同等の有効性を示している。

II. 目的

心不全時の心筋細胞の β 受容体情報伝達機構の変化に対する ACE 阻害薬と AT1 受容体拮抗薬の影響、差違を検討すること。

III. 方法

心不全モデルとして雄性ニュージーランド白色ウサギ (2-2.5 kg) の左冠動脈回旋枝を結紮し、心筋梗塞モデルを作成し、無治療群、塩酸テモカプリル群 (0.5 mg/kg/day, p.o.)、バルサルタン群 (3 mg/kg/day, p.o.) に分け、コントロールとして sham 群を作成した (各

群 n=5)。3 週間後に血行動態測定及び心エコー評価を行い、血中ノルエピネフリン値測定のため採血した後、心臓摘出。引き続き心室重量（左室/体重比、右室/体重比）、梗塞サイズを測定した後、左室非梗塞領域の心筋細胞膜蛋白標品を作成し、 β 受容体 binding assay、GTP 結合蛋白 ($G_{s\alpha}$ 、 $G_{i\alpha}$) 及び β ARK1 の Western blotting、adenylate cyclase 活性の測定を行ない、これらの変化及び薬物処置の影響を検討した。

IV. 結 果

梗塞サイズは 30%前後で梗塞モデル 3 群間で差は認めなかった。心拍数は 4 群間で有意差は認めなかった。梗塞無治療群で対照と比較して収縮期血圧の有意な低下を認めたが、拡張期・平均血圧に差は認めなかった。また、両薬剤投与群とも梗塞無治療群と比較すると有意な血圧変化は認めなかった。体重は 4 群間で差を認めなかったが、心室重量/体重比は梗塞無治療群で左室 26%、右室 52%とともに有意な増加 ($p<0.01$) を認め、薬剤投与群ではいずれもその変化は有意に抑制された。心エコーでは梗塞無治療群で対照と比較して LVDd、LVDs の増加 ($p<0.01$)、EF の低下 ($p<0.05$) を認めたが、薬剤投与群では心内径増加は有意に抑制され、EF も改善傾向を認めた。心拍出量は有意差は認めなかったが、EF と同様の傾向を認めた。下大静脈から採血した血漿ノルエピネフリン値は梗塞無治療群で対照と比較して約 3 倍と有意に上昇 ($p<0.01$) していたが、薬剤投与群では対照とほぼ同等程度まで低下していた。

β 受容体 binding assay では標識化合物として 125 I-cyanopindolol を用いた。結合飽和実験から求めた B_{max} つまり最大結合能は梗塞無治療群で約 30%の減少 ($p<0.05$) を認めたが、薬剤投与群ではいずれもこの down-regulation を抑制した。非放射性リガンドとして isoproterenol を用いた結合阻害実験では isoproterenol に対し異なる親和性を示す 2 つの結合部位の存在を認めたが、各群の平均を求めると梗塞無治療群で高親和性の割合の有意な低下 ($p<0.05$) を認め、受容体-G 蛋白の uncoupling が示唆された。薬剤投与群ではその割合の低下は対照と差のない程度まで抑制された。Adenylate cyclase 活性は基礎活性において梗塞無治療群では他の 3 群と比較して低下していた。また、 β アゴニストである isoproterenol 刺激では広い濃度範囲にわたり梗塞無治療群で adenylate cyclase 活性は低下 ($p<0.05$) していたが、薬剤投与群では回復していた。G 蛋白レベルを刺激する GppNHp、adenylate cyclase を直接刺激する forskolin 誘導体である colforsin daropate 刺激では梗塞無治療群で低下傾向を認めるものの、有意差は認めなかった。

Western blotting において β ARK1 の発現は梗塞無治療群で約 2.1 倍の増加 ($p<0.01$) を認め、薬剤投与群ではその増加は有意に抑制された。 $G_{s\alpha}$ の発現は 4 群間で差は認めなかったが、 $G_{i\alpha}$ は梗塞無治療群で約 2.3 倍に増加 ($p<0.01$) し、薬剤投与群ではその増加は有意に抑制された。

V. 考 察

本実験では心筋梗塞後の心肥大・心拡大等の心室リモデリング及びヒトの不全心と同様の β 受容体情報伝達機構の変化が認められた。また、ACE 阻害薬及び AT1 受容体拮抗薬投与によりリモデリングの抑制に加えて、上記 β 受容体情報伝達機構の異常も改善した。

交感神経終末において Ang II は AT1 受容体を介してノルエピネフリン放出を促進し、交感神経活性の亢進に働くとされている。心不全時には全身性に加えて組織 RA 系も亢進し、交感神経活性化に寄与するが、ACE 阻害薬・AT1 受容体拮抗薬によりその活性化が抑制されたと考えられる。そのため本実験では、一般に持続した交感神経刺激により生じる β 受容体 desensitization (down-regulation、functional uncoupling) が抑制されたと考えられる。この desensitization 過程に重要な β ARK1 の発現調節機構はまだ明らかではないが、カテコラミン刺激との相関は報告されている。更に、 $G_{i\alpha}$ とりわけ $G_{i-2\alpha}$ 遺伝子プロモーター領域には cAMP-response element の存在が報告されており、これら β ARK1・ $G_{i\alpha}$ 蛋白の発現の変化にも交感神経活性の影響が関与したと考えられる。

以上より本実験において ACE 阻害薬及び AT1 受容体拮抗薬は同等に心不全における交感神経活性亢進を抑制し、 β 受容体情報伝達機構の異常を改善することが証明され、この anti-adrenergic 作用が両薬剤の心機能・予後改善効果の一因であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀

副 査 教 授 北 島 顕

副 査 教 授 丸 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade on β -Adrenoceptor Signaling in Heart Failure Produced by Myocardial Infarction in Rabbits : Reversal of Altered Expression of β -Adrenoceptor Kinase and $G_{i\alpha}$

(ウサギ心筋梗塞後の心不全モデルにおける心筋アドレナリン β 受容体
情報伝達機構の変化に対するアンジオテンシン変換酵素阻害薬及び
アンジオテンシン II タイプ 1 受容体拮抗薬の効果)

心不全時には低下した血行動態を維持するため交感神経活性が亢進しており、その結果、脱感作と呼ばれる β 受容体シグナルの反応性の低下が認められる。この過程には β -adrenergic receptor kinase 1 (β ARK1) の増加、抑制性 G 蛋白 (G_i) の増加が関与している。また、心不全時には renin-angiotensin (RA) 系も活性化しているが、交感神経系と RA 系は相互に関係しており、RA 系の抑制が交感神経系にも影響を及ぼすと考えられる。Angiotensin converting enzyme (ACE) 阻害薬による交感神経活性低下や β 受容体 down-regulation 抑制などの報告があるが、この効果が AT1 受容体を介した機構に基づくものは明確にはなっていない。本研究では心不全時の心筋細胞の β 受容体情報伝達機構の変化に対する ACE 阻害薬と AT1 受容体拮抗薬の影響及び差違を検討することを目的とした。心不全モデルとしてウサギの心筋梗塞モデルを作成し、無治療群、テモカプリル群、バルサルタン群に分け、対照として sham 群を作成した。3 週間後に心エコー評価、血行動態及び血中ノルエピネフリン (NE) 値測定をした。心臓摘出後、心室重量、梗塞サイズを測定し、左室非梗塞領域の心筋細胞膜蛋白標品を作成し、 β 受容体 binding assay、adenylate cyclase 活性測定、G 蛋白及び β ARK1 の Western blotting を行ない、これらの変化及び薬剤の影響を検討した。梗塞サイズ、心拍数に差は認めなかった。梗塞無治療群で対照と比

較し収縮期血圧の有意な低下を認めたが、拡張期・平均血圧に差はなかった。また、両薬剤投与群とも梗塞無治療群と比較し有意な血圧変化はなかった。心室重量/体重比は梗塞無治療群で左室、右室ともに有意に増加し、薬剤投与群ではいずれもその変化は抑制された。心エコーでは梗塞無治療群で LVDd、LVDs の増加 ($p<0.01$)、EF の低下 ($p<0.05$) を認めたが、薬剤投与群では心内径増加は有意に抑制され、EF も改善傾向を認めた。心拍出量に有意差はなかったが、EF と同様の傾向を認めた。血中 NE 値は梗塞無治療群で約3倍に上昇($p<0.01$)したが、薬剤投与群では対照と同程度であった。 β 受容体 binding assay の結合飽和実験から求めた最大結合能は梗塞無治療群で約 30%の減少 ($p<0.05$) を認めたが、薬剤投与群ではこの down-regulation を抑制した。結合阻害実験では isoproterenol に対し異なる親和性を示す 2 つの結合部位が存在し、梗塞無治療群で高親和性の割合の低下 ($p<0.05$) を認め、受容体-G 蛋白の uncoupling が示唆された。薬剤投与群ではその割合の低下は抑制された。Adenylate cyclase 活性は梗塞無治療群で基礎活性の低下を認めた。Isoproterenol 刺激では梗塞無治療群で adenylate cyclase 活性は低下 ($p<0.05$) していたが、薬剤投与群では回復していた。G 蛋白を刺激する GppNHp、adenylate cyclase を直接刺激する colforsin daropate 刺激では有意差を認めなかった。Western blotting では β ARK1 及び $G_{i\alpha}$ は梗塞無治療群で有意な増加 ($p<0.01$) を認め、薬剤投与群ではその増加は抑制された。 $G_{s\alpha}$ の発現に差は認めなかった。以上の結果より、ウサギ心筋梗塞モデルで認められた β 受容体システムの変化は AT1 受容体拮抗薬治療にて ACE 阻害薬と同等に抑制され、この効果は AT1 受容体を介した交感神経活性亢進の抑制効果によるものと考えられた。また、この anti-adrenergic 作用が両薬剤の心機能、予後改善効果の一因と考えられた。

口頭発表に際し、副査の丸藤教授から cAMP 以降のシグナルの変化、 $G_{i\alpha}$ 蛋白発現増加の機序及び大規模臨床試験の結果との関連について質問がなされた。次いで主査の安田教授から実験で用いた心筋梗塞モデルの血行動態、投与した薬剤の用量、両薬剤の作用機序の違いについて質問がなされた。最後に副査の北畠教授から RA 系と交感神経系の cross-talk 部位、血中 NE 濃度低下の機序、両薬剤の併用療法の有用性について質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は過去のデータや関連論文を引用し、概ね妥当な回答を行った。

この論文は、RA 系を抑制する薬剤の交感神経系に及ぼす影響及びその機序を明らかにしたものとして意義のあるものと評価され、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。