

学位論文題名

Norepinephrine Release from the Ischemic Heart is Greatly Enhanced in Mice Lacking Histamine H₃-Receptors

(虚血心からのノルエピネフリン放出はヒスタミン H₃ レセプターノックアウトマウスにおいて大きく増強される)

学位論文内容の要旨

【背景】交感神経の過度の緊張は過量の norepinephrine (NE) の放出を伴い、臨床的にも心筋虚血時に生じる致死的不整脈や心不全の主な原因とみなされている。交感神経の過緊張と過量の NE 放出は代謝を促進するため、さらに虚血状態を悪化心筋障害を増悪させるという悪循環をもたらす。NE は細胞内カルシウムを増加させるが、過量の細胞内 Ca は不整脈と不協調心筋収縮の原因となるため、心臓交感神経からの NE 放出を抑制することは虚血心保護の重要な手段となりうる。われわれは、心臓交感神経終末(cSNE)にある histaminH₃ レセプター (H₃R) の活性化が虚血状態にある心臓からの NE 放出を抑制し、それに伴う心室性不整脈の重篤度を弱めることを報告した。H₃R は節前ヘテロレセプターのひとつである。心筋虚血モデルにおける H₃R の役割は、これまで薬理学的手法により検討されてきたが、H₃R ノックアウトマウスを用いた報告はない。本研究では H₃R ノックアウトマウスを用い、虚血心での NE 放出における H₃R の役割について検討した。

【材料および方法】ワイルドタイプマウス (H₃R^{+/+}) とノックアウトマウス (H₃R^{-/-}) を用いた。1) 虚血心からの NE 放出の測定: 摘出心を Langendorff 法に準じ Krebs-Henseleit 液で灌流し、グルコースなしの Krebs-Henseleit 液に還元剤である Sodium-Dithionite 0.25M を加え 95% 窒素 5% 二酸化炭素でバブリングしたもので灌流することで虚血状態を作成した。虚血時間は 20 分とし、その間の冠灌流液中の NE 放出量を HPLC により測定した。2) 心臓 synaptosome からの NE 放出の測定: 冠灌流系より血液を洗い流すため Langendorff 法で 15 分灌流した後、心臓を細かく切り、collagenase で溶解した。数回の遠心分離とホモジネートの後、細胞残渣は破棄し、残った上澄みを 4 等分した。それぞれをさらに遠心分離にかけ、心臓シナプトソームを含む固体部分を得た。これを HEPES-buffered saline で 500ul とし、①control として薬を用いず K⁺濃度が 5mM のもの、②薬を用いず K⁺濃度を 100mM にして NE exocytosis を誘発したもの、③アゴニストを用い K⁺濃度を 100mM にしたもの、④アゴニストとアンタゴニストと用い K⁺濃度を 100mM にしたもの 4 群について NE を HPLC により測定した。

【結果】1) 心臓交感神経終末(cSNE)からの内因性 norepinephrine exocytosis: まず、マウスに心臓交感神経ヘテロインヒビトリールレセプターである H₃R が存在するか否かを、H₃R^{+/+}マウスを用い検討した。cSNE に 100mM の K⁺を作用させると上記①の basal level に比し 20~30% の NE 放出

の増加が見られるが(同②), 選択的 H_3R アゴニストである imetit を $H_3R^{+/+}$ マウスの cSNE に作用させると(同③) 50%の減少を見た. この効果は選択的 H_3R アンタゴニストである thioperamide によって消失した(同④). したがって $H_3R^{+/+}$ マウスに H_3R が存在することが示された. 他のインヒビトリヘテロレセプターであるアデノシン A_1 レセプター(A_1R)についても同様に, アゴニストの CPA とアンタゴニストである DPCPX を用いてその存在が証明された. 一方 $H_3R^{-/-}$ マウスの cSNE では, A_1R の存在は同様に証明できたが, imetit の効果は見られず, H_3R は存在しないことが示された. 2) 虚血心からの内因性 NE 放出: $H_3R^{+/+}$ マウスの摘出心を 20 分虚血にすると約 400pmol/g の NE 放出が得られた. NE 担体の抑制剤である desipramine は NE 放出を約 50%抑制した. Imetit は約 40%抑制し, thioperamide によりその効果は消失した. Thioperamide を単独で用いた場合, NE の放出はコントロールより約 35%増加した. 一方 $H_3R^{-/-}$ マウスの場合, 20 分虚血により $H_3R^{+/+}$ マウスと比し約 2 倍の NE 放出を見た. desipramine によりこの NE 放出は抑制されたが, Imetit と thioperamide は NE 放出になんら影響がなかった.

【討論】 心筋虚血においては, SNE における代謝性アシドーシスが Na/H エクスチェンジャーを活性化し Na の神経細胞内濃度を上昇させる. また ATP の枯渇と NE 貯蔵の障害により, NE はアクソプラズムに蓄積される. こうした状況では Na 依存性の NE 担体が外向き輸送に反転し NE の大量放出(担体による NE 放出)が生じ, 不整脈が引き起こされる. 心筋虚血における NE 放出量は不整脈の重篤度と相関関係にある. われわれは H_3R アゴニストが交感神経終末からの NE exocytosis に加えて, 担体による NE 放出を抑制することを動物と人の心筋虚血モデルにおいて示してきた. したがって H_3R 活性化は虚血時の不整脈の重篤度を弱めると考えられる. シナプス前レセプターには, H_3R に加えて, α_2 交感神経レセプターと A_1R もあるが, H_3R 活性化が NE exocytosis と担体による NE 放出の両方を抑制するのに対し, α_2R は前者のみ抑制し後者を促進する. また A_1R には陰性変時作用と陰性変伝導作用があるが, これらの短所は H_3R にはない. したがって H_3R アゴニストは臨床的にも有望な治療薬となりうると考えられる.

今回の実験では $H_3R^{-/-}$ マウスの場合 $H_3R^{+/+}$ マウスと比し約 2 倍の NE 放出が見られた. これは, モルモット心虚血再灌流モデルやヒト心筋虚血モデルにおいて thioperamide を用いて H_3R をブロックしたときに見られた所見と一致する. また A_1R が機能しているにも関わらず $H_3R^{-/-}$ マウスでの大量 NE 放出が見られたことは, 心筋虚血時の NE 放出において cSNE の H_3R が関与していることをはっきりと示したものである. H_3R アンタゴニストは虚血 $H_3R^{+/+}$ 心臓では NE 放出を増強したが $H_3R^{+/+}$ の SNE では見られなかった. これもモルモットとヒトモデルで観察された所見と一致する. 心筋虚血のような交感神経活性が増強した状況では, O_2 フリーラジカルによりマストセルから放出された histamin により H_3R が活性化され, NE 放出を抑制する. Thioperamide が $H_3R^{-/-}$ の虚血心臓において NE 放出を増強しなかったのはこれを裏付けるものである. さらに興味深いことは $H_3R^{-/-}$ の場合 $H_3R^{+/+}$ と比し SNE からの basal NE が約 60%多かったことで, このことは H_3R が構造活性を有すると言う最近の報告に合致する所見である.

【結論】

虚血心における過剰な NE 放出は重篤な不整脈, 心不全の原因となりうるが, H_3R 活性化はこれを抑制する. H_3R アゴニストは心筋虚血にたいする新しい治療薬として有望である.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 川 口 秀 明
副 査 教 授 北 畠 顯

学 位 論 文 題 名

Norepinephrine Release from the Ischemic Heart is Greatly Enhanced in Mice Lacking Histamine H₃-Receptors

(虚血心からのノルエピネフリン放出はヒスタミン H₃ レセプターノックアウトマウスにおいて大きく増強される)

ヒスタミン H₃ レセプターが虚血状態に際し、どのような心臓保護機構が働くのかを、従来の薬理学的見地のみならず、ノックアウトマウスを用いることにより検討したものである。ランゲンドルフ法によりマウスの摘出心臓を灌流し虚血状態にすると、ノックアウトマウスの心臓はワイルドタイプに比し約2倍のノルエピネフリンを放出した。また、ヒスタミン H₃ レセプターのアンタゴニストをワイルドタイプマウスに使用したところ、アンタゴニストを使用しない場合に比し約30%ノルエピネフリンを多く放出されることが確認された。この現象に関しては、アンタゴニストによる H₃ レセプターのコンフォメーション変化をその原因と考えるグループもあるが、申請者らはむしろ、血中ヒスタミン濃度によりトニックに H₃ レセプターが活性化されているのだと考え、虚血状態の場合、マストセルより放出されるヒスタミンが H₃ レセプターを介しノルエピネフリン放出を調節するのだと解釈した。ワイルドタイプとノックアウトマウス、それぞれの心臓より交感神経終末を分離すると、高カリウムによる脱分極により放出されるノルエピネフリンはそれぞれコントロール比約30%増と同程度であったが、そのコントロール（カリウム濃度が5mM）のノルエピネフリン放出量はノックアウトで約60%多く、この現象はDr. Morrisetteにより報告されたヒスタミン H₃ レセプターの構造活性に関する報告に合致するものと考えられた。虚血によりノルエピネフリン放出を促し、ヒスタミン H₃ レセプターのアゴニストによりそれを抑制するモデルとしては、ヒト右心耳を用いたモデルでも確認しており、

虚血からノルエピネフリン大量放出、致死的不整脈、心停止という病態が想定されるすべての疾患についてその臨床応用は可能であると考えられる。今のところヒスタミン H3 レセプターの活性化により、抑制される Sodium Hydrogen Exchanger の抑制剤がラットの心不全モデルに効果を示し、臨床治験にはいつている。

公開發表に際し、副査の川口教授よりベーターブロッカーとカルシウムブロッカーが虚血状態においてノルエピネフリン放出に与える影響について、北畠教授よりヒスタミン H3 レセプターノックアウトマウスとヒトの病態との関連、主査の安田教授からは今後の H3 レセプターに関する応用可能な薬剤の開発と臨床展望についての質問がなされたが申請者は関連論文および実験成績をもとに誠実に、概ね妥当な回答をなし得た。

この論文は、摘出心臓を用いた虚血再灌流モデルにおけるノルエピネフリンの放出に際して、ヒスタミン H3 レセプターの役割を解明したものであり、H3 レセプターアゴニストが、ノルエピネフリンの放出を抑制し、致死的不整脈から心停止、突然死へと至るプロセスに対する新たな治療薬となりうることを主張したものであり心臓薬理学の分野で高く評価され、今後の更なるヒスタミン H3 レセプターのメカニズム解明と、H3 レセプターアゴニスト自体、もしくは関連する Sodium Hydrogen Exchanger inhibitor の臨床応用が期待される。

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。