博士（医　学）　長　島　雅　人

学 位 論 文 題 名

心筋α_1受容体サブタイプの機能的意義に関する薬理学的研究

学位論文内容の要旨

I　研究目的

カテコラミンによる陽性変力作用は心筋細胞膜に存在するアドレナリン作動性β受容体ばかりでなくα_1受容体をも介してもたらされることがヒトを含めた数多くの哺乳類心筋で明らかにされている．しかしβ受容体を介する作用機序に比べて，α_1受容体を介する作用機序はまだ不明な点が多く動物種により差が認められる．すなわちラット心室筋においてはα_1受容体を介した陽性変力作用は一過性外向き電流の抑制による活動電位幅(APD)延長作用に伴うプラトー相の細胞内へのカルシウム流入量の増大により惹起されるが，ウサギ心室筋においてはその陽性変力作用の出現に必ずしもAPDの延長を必要としない．

近年α_1受容体はWB4101で選択的に拮抗されるα_{1A}受容体とchloroethylclonidine(CEC)で選択的に拮抗されるα_{1B}受容体の二つのサブタイプに薬理学的に機能分類されるようになった．　本研究は，これらのサブタイプ特異的拮抗薬を用いる薬理学的手法によって，いずれのα_1受容体サブタイプを介して陽性変力作用および活動電位幅延長作用が惹起されるかを，α_1受容体刺激による陽性変力作用機構に差異があると考えられたラットとウサギの心室筋で，明らかにし、あわせて，α_1受容体の細胞内情報伝達に重要といわれるイノシトールリン脂質(PI)代謝回転亢進に関与するα_1受容体サブタイプをラット心室筋を用いて同定し，心筋におけるα_1受容体サブタイプの機能的意義を解明しようとするものである．

II　実験方法

1）収縮力の測定

ラット左室乳頭筋とウサギ右室乳頭筋を95%O_2+5%CO_2の混合ガスで酸素化したKrebs-Henseleit液に懸垂した．一端に連結した張力トランスジューサーにより発生張力を測定した．標本は0.5Hzの電気刺激により駆動し,温度は30±1℃に維持した．

2）活動電位と張力の同時測定

乳頭筋標本の一端を液量5mlの器官槽底にピン固定し，酸素化したKrebs-Henseleit液を10ml／minの速度で30±1℃の温度を維持しつつ表面潅流した．一端に連結した張力トランスジューサーにより発生張力を測定しながら，微小電極を刺入し細胞内電位を記録した．標本は0.5Hzの電気刺激で駆動した．

3）イノシトールリン酸の測定

Hattoriらの方法（Naunyn-Schmiedeberg' s Arch Pharmacol 1989）でPI代謝回転を測定した．すなわちラット左心室切片標本にmyo-[^{3}H]inositolを負荷後インキュベートし，LiCl存在下のphenylephrine刺

激による[^{3}H]イノシトールーリン酸産生量を検討した.

III 実験結果

ラット左室乳頭筋標本における，β受容体遮断薬(propranolol 1 μM)存在下でのα_1受容体刺激薬(phenylephrine)よる陽性変力作用の濃度反応曲線はWB4101(1nM〜100nM)前処置により濃度依存性に右方移動したが,1 μMまでのCEC前処置は濃度反応曲線に影響を与えなかった．一方ウサギ右室乳頭筋においてはphenylephrine刺激による濃度反応曲線はWB4101(100nM)，CEC(1 μM)いずれの前処置によっても右方移動し,CEC前処置によっては最大反応の減弱が認められた.100nM WB4101に1 μM CECを加えると曲線はさらに右方移動したが、最大反応の減弱の程度は1 μM CEC単独前処置の時と変らなかった． これらの結果は，α_1受容体刺激による陽性変力作用はラット心室筋においてはα_{1A}受容体を介しているが，ウサギ心室筋においてはα_{1A}とα_{1B}の両方を介していることを示している.

ラット乳頭筋では,10 μM phenylephrineの変力作用は時間依存性に陰性相から陽性相へ転じる変化を示す.この陰性変力相と陽性変力相は,いずれも100nM WB4101前処置によりほぼ完全に消失したが,1 μM CECは,いずれの相にも全く影響を与えなかった．Ca^{2+}チャンネル遮断薬であるnifedipine(1 μM)を前処置しておくと、α_1受容体を介する反応のうち陽性変力作用は抑制され、陰性変力反応のみが発現してくるが、この陰性変力作用は100nM WB4101前処置でのみ抑制され,1 μM CECは影響を与えなかった.またprotein kinaseC(PKC)を直接活性化することが知られているphorbol 12,13-dibutyrate(100nM)を前処置すると、α_1受容体刺激による陰性相は消失して陽性相のみが増強した形で認められる様になるが,この陽性相も100nM WB4101前処置でのみ抑制され,1 μM CECは影響を与えなかった.

ラット左室乳頭筋とウサギ右室乳頭筋において phenylephrine は活動電位幅を延長させたがその延長作用は WB4101 でのみ抑制されCECは有意な影響を与えなかった．ラットの乳頭筋においてのみphenylephrine は静止膜電位を過分極側にシフトさせたがこの反応もWB4101でのみ抑制された.

ラット心室筋におけるphenylephrine刺激によるPI代謝回転亢進作用はWB4101でのみ濃度依存性に阻害されたが，CECは高濃度用いた時にのみ抑制したに過ぎなかった.

IV 考察

本研究によりα_{1A}およびα_{1B}受容体を介した陽性変力作用の機序が異なっていることが明らかとなった．すなわち心筋のα_1受容体刺激による陽性変力作用は，活動電位幅延長作用によるα_{1A}受容体を介したものと，電気生理学的変化以外の機序によるα_{1B}受容体を介したものがあると示唆される． またラット心室筋においてはα_1受容体刺激による時間依存性の陰性変力作用と過分極反応はいずれもα_{1A}受容体を介していることが明らかになった.

ラット心室筋においてはα_1受容体刺激による陽性変力作用はα_{1A}受容体を介する活動電位幅延長作用により説明可能であるが，ウサギ心室筋においてはα_{1B}受容体を介する作用も関与すると考えられる.ウサギ心室筋におけるα_{1B}受容体を介する陽性作用機構については不明であるが，α_1受容体刺激により収縮蛋白のカルシウム感受性が増加するとの報告があり，α_{1B}受容体を介する陽性変力作用がカルシウム感受性の 増加と関係がある可能性が示唆される.

また本研究において心筋のα_1受容体刺激によるPI代謝回転亢進作用はα_{1A}受容体を介することが明らか になったが，α_1受容体刺激によるAPD延長作用にはPI代謝系産物は関与していないという過去の報告を併せ考えると陽性変力作用におけるPI代謝回転亢進の生理的意義は少ないと考えられる.

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　北　畠　　顕
副　査　教　授　宮　崎　勝　巳
副　査　教　授　本　間　研　一

学　位　論　文　題　名

心筋α_1受容体サブタイプの機能的意義に関する薬理学的研究

カテコラミンによる陽性変力作用は心筋細胞膜に存在するアドレナリン作動性β受容体ばかりでなくα_1受容体をも介してもたらされることがヒトを含めた数多くの哺乳類心筋で明らかにされている.

近年α_1受容体はWB4101で選択的に拮抗されるα_{1A}受容体とchloroethylclonidine(CEC)で選択的に拮抗されるα_{1B}受容体の二つのサブタイプに薬理学的に機能分類されるようになった.

本研究は，これらのサブタイプ特異的拮抗薬を用いる薬理学的手法によって，いずれのα_1受容体サブタイプを介して陽性変力作用および活動電位幅(APD)延長作用が惹起されるかを，α_1受容体刺激による陽性変力作用機構に差異があると考えられたラットとウサギの心室筋で，明らかにし、あわせて，α_1受容体の細胞内情報伝達に重要といわれるイノシトールリン脂質(PI)代謝回転亢進に関与するα_1受容体サブタイプをラット心室筋を用いて同定した.

0.5Hzで電気的に駆動したラット左室乳頭筋標本における，β受容体遮断薬 (propranolol 1μM) 存在下でのα_1受容体刺激薬(phenylephrine)よる陽性変力作用の濃度反応曲線は　WB4101 (1nM～100nM)前処置により濃度依存性に右方移動したが,1μMまでのCEC前処置は濃度反応曲線に影響を与えなかった．一方ウサギ右室乳頭筋においてはphenylephrine刺激による.濃度反応曲線はWB4101(100nM)，CEC(1μM)いずれの前処置によっても右方移動し,CEC前処置によっては最大反応の減弱が認められた. 100nM WB4101に1μM CECを加えると曲線はさらに右方移動したが、最大反応の減弱の程度は1μM CEC単独前処置の時と変らなかった. これらの結果は，α_1受容体刺激による陽性変力作用はラット心室筋においてはα_{1A}受容体を介しているが，ウサギ心室筋においてはα_{1A}とα_{1B}の両方を介していることを示している.

ラット乳頭筋では, 10μM phenylephrineの変力作用は時間依存性に陰性相から陽性相へ転じる変化を示す. この陰性変力相と陽性変力相は,いずれも100nM WB4101前処置によりほぼ完全に消失したが, 1μM CECは, いずれの相にも全く影響を与えなかった. Ca^{2+}チャンネル遮断薬であるnifedipine(1μM)を前処置しておくと、α_1受容体を介する反応のうち陽性変力作用は抑制され、陰性変力反応のみが発現してくるが、この陰性変力作用は100nM WB4101前処置でのみ抑制され, 1μM CECは影響を与えなかった.またprotein kinaseC(PKC)を直接活性化することが知られているphorbol 12,13-dibutyrate(100nM)を前処置すると、α_1受容体刺激による陰性相は消失して陽性相のみが増強した形で認められる様になるが, この陽性相も100nM WB4101前処置でのみ抑制され, 1μM CECは影響を与えなかった. 微小電極法を用いた活動電位についての検討では，ラット左室乳頭筋とウサギ右室乳頭筋においてphenylephrineは活動電位幅(APD)

を延長させたがその延長作用はWB4101でのみ抑制されCECは有意な影響を与えなかった．$[^3H]$イノシトールーリン酸産生量により評価したラット心室筋におけるphenylephrine刺激によるPI代謝回転亢進作用はWB4101でのみ濃度依存性に阻害されたが，CECは高濃度用いた時にのみ抑制したに過ぎなかった．

以上の結果より，心筋のα_1受容体刺激による陽性変力作用は，活動電位幅延長作用によるα_{1A}受容体を介したものと，電気生理学的変化以外の機序によるα_{1B}受容体を介したものがあることが示唆された．また本研究において心筋のα_1受容体刺激によるPI代謝回転亢進作用はα_{1A}受容体を介することが明らかになったが，α_1受容体刺激によるAPD延長作用にはPI代謝系産物は関与していないという過去の報告を併せ考えると陽性変力作用におけるPI代謝回転亢進の生理的意義は少ないと考えられた．

口頭発表の審査会において宮崎教授よりWB4101とCECの構造式上の差異,ラットとウサギの心室筋でα_1受容体刺激による陽性変力作用の作用機序に違いが生じる理由についての質問がなされた．また本間教授よりラット心室筋においてα_1受容体刺激により陰性変力作用が生じる生理的意義，収縮力の評価に乳頭筋を使用する妥当性についての質問がなされた．これらに対し，申請者は概ね妥当な回答を行った．その後行われた宮崎，本間両審査教授との試問においても、概ね妥当な回答がなされた．

本研究は，心筋α_1受容体サブタイプの変力作用機構について電気生理学的変化とPI代謝回転の面から検討を加え，α_{1A}受容体とα_{1B}受容体ではその作用機序が異なっていることを明らかにしたものであり，有意義な研究と考えられ，学位授与に値する．