

学 位 論 文 題 名

実験的糖尿病ラットにおける心筋 $\beta$ 受容体機構の  
変化に関する薬理学的研究

学位論文内容の要旨

I. 緒言

ヒトにおいて糖尿病病態が長期間持続すると心機能異常が発現し心不全に移行することも稀ではないと言われている。実験的糖尿病動物では $\beta$ 受容体を介する心筋収縮反応の抑制が良く知られている心機能異常の一つであるが、この機構は十分に明らかにされていない。そこで、streptozotocinによる実験的糖尿病ラットを用いて、 $\beta$ 受容体を介する心筋反応性低下の機序を解明することを目的に本研究をおこなった。

II. 実験方法

(1)糖尿病の作成：8週齢のWistar ratにstreptozotocin 45mg/kgを尾静脈より静注して糖尿病を作成した。対照群はcitrate buffer solutionのみを静注し、糖尿病作成4-6週後に以下の実験を行った。

(2)機能的実験：動物より、左室乳頭筋を摘出し、1Hzで電氣的に駆動しながらisoproterenol, norepinephrine, epinephrine, forskolin, dibutylic-cAMP(DBcAMP), IBMXを累積的に作用させその濃度反応曲線を得た。栄養液はKrebs-Henseleit(K-H)液を使用した。

(3)受容体結合実験：摘出心臓を冷却Tris緩衝液中で摩砕し遠心を繰り返し蛋白濃度1-2mg/mlの膜標品を作成した。 $[^{125}\text{I}]$ -iodocyanopindolol(ICYP)の膜標品の結合飽和実験を急速吸引濾過法にて行った。非特異的結合は10 $\mu\text{M}$  propranolol存在下で測定した。解離定数( $K_D$ )および最大結合能( $B_{\text{max}}$ )はScatchardの方法を用いて求めた。 $\beta$ 受容体サブタイプの割合を決めるために、isoproterenolおよび $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 受容体の選択的阻害薬であるatenolol, ICI118,551を用いて $[^{125}\text{I}]$ -ICYPの結合阻害実験を行った。Isoproterenolを用いる場合は100 $\mu\text{M}$  GppNHp存在下で同様の実験を行った。結果は、Munson等の非線形最小二乗法に従い解析し、解離定数( $K_D$ )はCheng等の方法に従い求めた。

(4)Adenylate cyclase活性の測定：Salomonの方法に若干の修飾を加えadenylate cyclase活性を測定した。活性薬としてisoproterenol, NaF, GppNHp, forskolinを用い濃度反応曲線を得た。また、isoproterenolの最大活性に対するatenolol, ICI118,551の抑制効果も検討した。Isoproterenolを活性薬として用いる場合は100 $\mu$ M GTP存在下で実験を行った。

(5)Phospholambanリン酸化の測定：摘出心臓をLindemann等の方法に従いLangendorff法により1.5mCi  $^{32}$ Piを含有するK-H液で再還流法で灌流後10 $\mu$ M isoproterenolを含む同液で4分間灌流した。その後凍結した各心臓より筋小胞体を単離しSDS電気泳動を行いLindemann等の方法に従い筋小胞体phospholambanのリン酸化を測定した。放射活性の測定はimage analyzer (Fujix BAS2000)を用いた。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ のspecific activityはEngland & Walshの方法で測定した。蛋白定量はLowry法で行った。

### Ⅲ. 結果

Streptozotocin投与により血糖値は著明に増加した(range; 486 - 775 mg/dl)。糖尿病ラット心筋では、

(1)各catecholaminesで $\beta$ 受容体を介する陽性変力作用は濃度依存性に惹起されたがその程度はいずれのアゴニストにおいても対照群に比較して顕著に減弱し、forskolin, IBMX, DBcAMPの最大収縮反応も有意に対照群より減弱していた。

(2) $\beta$ 受容体数が約50%減少( $B_{\max}$ ;  $138 \pm 16$  vs.  $78 \pm 6$  fmol/mg of protein)していたが、リガンドに対する親和性( $K_D$ ;  $99 \pm 17$  vs.  $115 \pm 13$  pM)には差はなかった。Isoproterenol, atenolol, ICI118,551はいずれも $^{125}\text{I}$ -ICYPの結合を濃度依存性に阻害しこれらの曲線を解析すると二結合部位モデルに一致した。Isoproterenolに対する高親和性結合部位の比率は変化しておらず、この高親和性結合部位はGppNHpにより消失した。またatenolol, ICI118,551の結合阻害曲線より検討した $\beta_1/\beta_2$ 受容体の比率も変化していなかった。

(3)Isoproterenolによるadenylate cyclase活性の増加はatenololによってのみ抑制され、 $\beta_2$ 受容体刺激薬であるsalbutamolでadenylate cyclase活性の増加は観察されなかったことからadenylate cyclase活性の増加は全て $\beta_1$ 受容体を介していると考えられた。さらにisoproterenolをはじめNaF, GppNHp, forskolinいずれの活性薬によるadenylate cyclase活性の増加も対照群との差は観察されなかった。

(4)刺激薬非存在下でのphospholambanリン酸化は対照群と差はないが、対照群で認められたisoproterenol刺激によるphospholambanのリン酸化の著明な増加は認められなかった。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ のspecific activityは、対照群同様isoproterenol投与前後で変化しなかった。

## VI. 結語

糖尿病病態でみられる心機能異常の一つである心筋 $\beta$ 受容体機構の変化について実験的糖尿病ラット心臓を用い、機能的実験、受容体結合実験、adenylate cyclase活性測定、筋小胞体phospholambanリン酸化の測定により解析した。

1.糖尿病心筋では $\beta$ 受容体を介する陽性変力作用およびforskolin, IBMX, DBcAMPによる陽性変力作用が顕著に減弱していた。

2.糖尿病心筋では $\beta$ 受容体が有意に減少しているが $\beta_1/\beta_2$ 受容体比に差はなく、親和性も変化していなかった。

3.糖尿病心筋におけるisoproterenolに対する高親和性結合部位の比率も変化していなかった。

4. $\beta$ 受容体刺激、forskolin, GppNHp, NaFによるadenylate cyclase活性の増加は糖尿病病態で十分に保たれていた。

5.糖尿病心筋では $\beta$ 受容体刺激によるprotein kinase Aを介する筋小胞体phospholambanのリン酸化が障害されていた。

以上より、糖尿病ラット心筋にみられる $\beta$ 受容体刺激によるcAMPを介した陽性変力作用減弱は、 $\beta$ 受容体-G蛋白質-Adenylate cyclase連関の変化によるものではなくprotein kinase Aによるphospholambanをはじめとする収縮に関与する蛋白質のリン酸化過程の障害であることが示唆される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菅 野 盛 夫  
副 査 教 授 劔 物 修  
副 査 教 授 齋 藤 秀 哉

## 学 位 論 文 題 名

### 実験的糖尿病ラットにおける心筋 $\beta$ 受容体機構の 変化に関する薬理学的研究

実験的糖尿病動物の心機能異常に $\beta$ 受容体を介する心収縮反応の抑制があるが、その機序は十分に明らかにされていない。そこで、申請者は、streptozotocinによる実験的糖尿病ラットを用いて $\beta$ 受容体を介する心筋反応性低下の機構を解明することを目的に本研究をおこなった。

実験には、8週令のWistar系ラットにstreptozotocin (STZ) 45mg/kgを尾静脈から投与して作製した糖尿病動物を用い、溶媒であるcitrate buffer液のみを与えた動物を対照群とした。STZ投与4ないし6週後に以下に簡述する実験に供した。(1)機能的実験：電気的に駆動している左室乳頭筋の等尺性張力を測定し、isoproterenol、epinephrine、norepinephrineによる $\beta$ 受容体を介する陽性変力作用および受容体をバイパスする刺激薬であるforskolin、dibutylic-cAMP (DBcAMP)、IBMXの陽性変力作用の濃度作用関係を検討した。(2)受容体結合実験：摘出した心臓から得た膜標品を用いて、 $\beta$ 受容体の特異的リガンドである $[^{125}\text{I}]$ -iodocyanopindolol ( $[^{125}\text{I}]$ ICYP)の結合飽和実験から、Scatchardの方法により $\beta$ 受容体数と解離定数を求めた。さらに、 $\beta 1/\beta 2$ 受容体の割合および高親和性結合部位の比率を決めるために、 $\beta 1$ および $\beta 2$ 受容体の選択的拮抗薬ならびに isoproterenolを用いて $[^{125}\text{I}]$ ICYPの結合阻害実験をおこなった。(3)Adenylate cyclase活性の測定：Salomonの方法に若干の修飾を加えadenylate cyclase活性を測定した。活性薬として isoproterenol、NaF、GppNHp、forskolinを用いこれら薬物の濃度反応曲線を得た。また、isoproterenolによるadenylate cyclase最大活性に対するatenolol、ICI118,551の抑制効果も検討した。(4)Phospholambanリン酸化の測定：Langendorff法で灌流している摘出心臓を用い、Lindemann等の方法に従い筋小胞体phospholambanのリン酸化を測定した。得られた実験結果は次の通りである。

糖尿病動物の心筋では、(1)対照群動物に比べて、isoproterenol、epinephrine、norepinephrineによる $\beta$ 受容体を介する陽性変力作用の著明な減弱を認

め、さらに、受容体をバイパスするが同じ細胞内情報伝達系を利用する forskolin、IBMX、DBcAMPの最大収縮反応も有意に減弱していることを明らかにした。(2)対照群動物に比較して、 $\beta$ 受容体数が約50%減少していることを認めた。しかし、 $[^{125}\text{I}]\text{ICVP}$ に対する親和性、atenolol、ICI118,551による結合阻害曲線から解析して得られた $\beta 1/\beta 2$ 受容体比、isoproterenolに対する高親和性結合部位の比率は変化していないことを明らかにした。(3) $\beta$ 受容体を介する刺激(isoproterenol)、受容体とadenylate cyclaseを連関させているG蛋白への刺激( $\text{NaF}$ 、GppNHp)、adenylate cyclase 直接の刺激(forskolin)による心筋 adenylylase 活性の亢進には、糖尿病ラットと対照ラットの間に差が認められないことを明らかにした。さらに、isoproterenolによるadenylate cyclase活性の亢進には $\beta 1$ 受容体のみが関与していることをサブタイプ特異的拮抗薬を用いて証明した。(4)しかし、 $\beta$ 受容体を介する心臓筋小胞体phospholambanのリン酸化が糖尿病ラットで顕著に抑制されていることを見いだした。

以上の実験結果から、糖尿病病態でみられる心機能異常の一つである $\beta$ 受容体を介する陽性変力作用の減弱は、 $\beta$ 受容体-G蛋白-adenylate cyclase 連関の変化によるものではなく、protein kinase Aによる phospholambanをはじめとする収縮に関与する蛋白のリン酸化過程の障害によると結論している。

口頭発表に際して、飴物教授から $\beta$ 受容体反応減弱に関する従来の考え方、糖尿病患者の心不全に対する有効な治療薬についての考え方、齋藤(秀)教授から STZの心直接作用の有無、 $\beta$ 受容体数減少の機序、石橋教授から想定されるprotein kinase Aの異常の機序、phospholamban以外に protein kinase Aの基質蛋白のリン酸化異常の検討の有無などについて試問があったが、申請者は概ね適切に応答した。また、小池、北島両教授から糖尿病モデルの適切性、臨床病態との関連について有益な示唆ならびに助言があった。

なお、副査の飴物教授および齋藤(秀)教授より個別に面接試問を受け、合格と判定されている。

本研究は、実験的糖尿病病態における $\beta$ 受容体を介する心筋収縮反応減弱の機序に新しい考え方を提唱し、かつ、臨床で観察される糖尿病性心機能異常の理解に貴重な示唆を与えるものであるので、博士(医学)の授与に値すると評価する。よって、合格と判定する。