

学 位 論 文 題 名

Effects of β -adrenoceptor stimulation on
contractility, $[Ca^{2+}]_i$ and Ca^{2+} current
in diabetic rat cardiomyocytes

（糖尿病ラット心筋細胞における細胞収縮性、細胞内 Ca^{2+} 濃度、
および Ca^{2+} 電流に対するアドレナリン作動性 β 受容体刺激の影響）

学位論文内容の要旨

糖尿病患者では、血管病変による合併症の有無とは独立に心機能が変化することが知られている。糖尿病モデル動物でも同様な心機能変化が生ずるが、その主要な原因のひとつとして、アドレナリン作動性 β 受容体（以下、 β 受容体）刺激による陽性変力作用が減弱していることが知られている。実験的糖尿病モデルにおいて心筋の β 受容体数の減少や β 受容体とアデニール酸シクラーゼの連関が障害されていることが報告されているが、一方、心筋 β 受容体数の減少が必ずしも β 受容体を介する陽性変力作用の減弱につながらないとの指摘もあり、さらに、最近では心筋 β 受容体とアデニール酸シクラーゼの連関が糖尿病でも変化していないとの報告も多くある。このように、糖尿病病態心における β 受容体刺激に対する陽性変力反応の減弱が、 β 受容体数の減少やそれ以降の情報伝達系の変化によるものかどうかは、未だ明確に示されていない。

本研究では、糖尿病心筋における β 受容体刺激への低反応性の一次的要因を知るために、実験的糖尿病モデルラットより作成した単一心室筋細胞を用いて細胞収縮性、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の一過性上昇 (Ca^{2+} トランジェント)、L 型 Ca^{2+} 電流 (I_{Ca}) および筋小胞体 (SR) の Ca^{2+} 含量に対する β 受容体作動薬イソプロテレノールの及ぼす作用がどのように変化しているかを検討した。また、 β 受容体刺激に対する反応性の変化が β 受容体レベルに起因するものなのか、あるいは受容体以降の情報伝達系レベルの問題なのかを知るために、アデニール酸シクラーゼを直接活性化するフォルスコリンと、cAMP の誘導体である dibutyryl cAMP (DBcAMP) に対する反応も合わせて検討した。

8 週令雄性ウィスター系ラットにストレプトゾトシン (STZ) 45mg/kg を静注して糖尿病を誘発したのち 4-6 週経過した時点で実験を行った。正常対照群には、STZ の代わりにクエン酸緩衝液のみを静注した同週令のラットを用いた。また、STZ 投与後よりインスリンを投与し続けたインスリン治療糖尿病群、および食餌制限により糖尿病群と同等の体重とした食餌制限非糖尿病群のラットも作成した。ラットの心臓を単離灌流し、コ

ラゲナーゼ処理にて単一心室筋細胞を得た。得られた細胞に蛍光 Ca^{2+} 指示薬であるindo-1を負荷し、蛍光顕微鏡のステージに設置した灌流槽内で、白金電極により0.5Hzの電気刺激を与えて細胞を収縮させ、その際の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を顕微測光した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定と同時に、蛍光顕微鏡に設置したビデオ・エッジ・ディテクタにより細胞長軸の長さの変化を経時的に測定し、細胞長の変化率をもって心筋細胞の収縮性を評価した。 I_{Ca} の測定はwhole cellパッチ・クランプ法で行った。細胞の近傍からカフェイン溶液を急速投与すると、SRから Ca^{2+} が急速に放出されることによって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が急激に上昇するが（カフェイン誘発性 Ca^{2+} トランジェント）、その上昇の振幅をSR Ca^{2+} 含量の指標として評価した。

実験動物の血糖値は、正常対照群に比べ糖尿病群で約3.5倍で著明な高血糖を示した。体重は、糖尿病群は対照群の約0.6倍の著明な低値を示した。インスリン治療糖尿病ラットでは、正常対照群とほぼ同等の血糖と体重を示した。食餌制限非糖尿病ラットでは、血糖値は正常対照群と同等だが、体重は糖尿病群と同等だった。単一心室筋細胞の長軸および短軸の長さは、対照群と糖尿病群間で有意差はなかった。

単一心室筋細胞の収縮性の基礎値は正常対照群と糖尿病群で同等だった。また $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の基礎値も、拡張期・収縮期ともに両群で有意差はなかった。両群においてイソプロテレノールは濃度依存性に細胞収縮性と Ca^{2+} トランジェントを増強したが、その濃度反応曲線は、収縮性、 Ca^{2+} トランジェントともに対照群に比べ糖尿病群で著明に下方に移動していた。フォルスコリンおよびDBcAMPに対する収縮性および Ca^{2+} トランジェントの増強反応も、イソプロテレノールの場合と同様に糖尿病群で顕著に減弱していた。このことは、糖尿病心筋細胞では β 受容体-Gs蛋白-アデニール酸シクラーゼの連関や細胞内cAMP濃度の上昇よりも下流の情報伝達系の障害によって、 β 刺激時の Ca^{2+} 動員の増加反応が減弱し、それが陽性変力反応減弱の要因であることを示唆する。

I_{Ca} は、その基礎値に糖尿病群と正常対照群で有意差を認めなかった。さらに、イソプロテレノール、フォルスコリン、およびDBcAMPによって糖尿病群、対照群ともに I_{Ca} は顕著に増強したが、その程度は両群間で有意差がなかった。このことは、前記 Ca^{2+} 動員増加反応の減弱の責任部位が、少なくとも Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入ではないことを示唆している。

SRの Ca^{2+} 含量の指標であるカフェイン誘発性 Ca^{2+} トランジェントは、その基礎値は糖尿病群が対照群よりも有意に低値を示した。さらに、イソプロテレノール、フォルスコリン、およびDBcAMPによって両群ともにカフェイン誘発性 Ca^{2+} トランジェントは増加したが、その程度は糖尿病群で顕著に減弱していた。このことは、糖尿病心筋細胞における Ca^{2+} 動員増加反応の減弱の責任部位のひとつが、SRにおける Ca^{2+} 取り込み、あるいは放出の障害であることを示唆している。

糖尿病群心室筋細胞で認められた上記の反応の変化は、インスリン治療糖尿病群と食餌制限非糖尿病群の心室筋細胞では認めなかった。これは、上記のような糖尿病ラットでの変化が、STZの心筋への直接作用や低栄養によるものではないことを示している。

以上のように、糖尿病群心室筋細胞では、 β 受容体刺激およびその下流のアデニール酸シクラーゼ刺激あるいは細胞内 cAMP を直接上昇させた際の心筋細胞の収縮性と Ca^{2+} トランジェントの増強反応が正常対照群に比べて有意に減弱しており、さらに、カフェイン誘発性 Ca^{2+} トランジェント、すなわち SR の Ca^{2+} 含量は、基礎値および上記の刺激時の反応ともに対照群よりも低下していた。しかし、 I_{Ca} 、すなわち Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入は基礎値、刺激時ともに両群で有意差がなかった。従って、糖尿病心筋におけるアドレナリン作動性 β 受容体を介する陽性変力反応の減弱は、SR における Ca^{2+} の取り込みと放出の両者あるいはどちらか一方に主に起因するものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 北 畠 顯

副 査 教 授 菅 野 盛 夫

学 位 論 文 題 名

Effects of β -adrenoceptor stimulation on contractility, $[Ca^{2+}]_i$, and Ca^{2+} current in diabetic rat cardiomyocytes

(糖尿病ラット心筋細胞における細胞収縮性、細胞内 Ca^{2+} 濃度、
および Ca^{2+} 電流に対するアドレナリン作動性 β 受容体刺激の影響)

申請者が提出した学位論文は、糖尿病性心筋症モデルの心筋細胞におけるアドレナリン作動性 β 受容体（以下、 β 受容体）刺激に対する陽性変力反応低下の機序に関する研究で、雑誌 American Journal of Physiology に申請者が主著者となって発表したものである。

糖尿病患者では血管病変による合併症とは独立に心機能が低下し、糖尿病性心筋症として知られている。ストレプトゾトシン(STZ)誘発性糖尿病ラットは同心筋症の心機能変化をよく再現し、そのモデルとして広く研究に使用されている。同モデル心筋では、 β 受容体刺激に対する陽性変力反応が低下しており、糖尿病性心筋症病態の主要な原因の一つと考えられている。しかしその詳細な機序については、 β 受容体数の変化や β 受容体とアデニール酸シクラーゼの連関の変化等について様々な報告があるが、未だ明確には示されておらず、またそれ以上の詳細な研究も数少ない。本研究は、糖尿病性心筋症の機序についてさらに詳細に検討する目的で行われた。本論文では、同モデルの心筋細胞を用い、その Ca^{2+} トランジェントと収縮性、細胞膜の電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル電流 (I_{Ca}) および筋小胞体(SR) Ca^{2+} 含量を測定することによって、陽性変力反応減弱の主要な原因が SR 機能異常にあると結論づけている。以下に、本論文で新しく示された実験結果とそこから導かれる結論を要約する。

1. STZ 誘発性糖尿病ラット心室筋細胞において、 Ca^{2+} トランジェントと収縮性の基礎値は正常対照群と差がないが、 β 受容体刺激刺激薬 isoproterenol、アデニール酸シクラーゼを直接活性化する forskolin、および cAMP 類似体である dibutyryl cAMP(DBcAMP)による増強反応は正常対照群よりも著明に減弱していた。このことは、 β 受容体刺激に対する低反応性が、 β 受容体や β 受容体-G 蛋白-アデニール酸シク

ラーゼの三者連関よりも下流の情報伝達系の変化に起因することを示唆する。

2. I_{Ca} は基礎値および isoproterenol、forskolin、DBcAMP による増強反応の全てが、糖尿病群と正常対照群で有意差がなかった。このことは、心筋細胞膜の Ca^{2+} チャネル機能が糖尿病でも変化せず、1 で示した Ca^{2+} トランジェントの変化に関与しないことを示す。

3. SR の Ca^{2+} 含量は、基礎値および isoproterenol による増加反応ともに糖尿病群で減弱しており、forskolin および DBcAMP に対しても同様の傾向を示した。2 と併せると、このことは Ca^{2+} トランジェントの反応低下の主要な原因が SR への Ca^{2+} 取り込みの低下にあることを示す。

4. 上記 1～3 で示された糖尿病心筋細胞での変化は、インスリン治療により消失あるいは改善された。このことは、上記の変化が STZ の非特異的毒性によるものではなく、糖尿病病態によるものであることを示す。

本論文ではさらに、共同実験者らが今までに同じモデル心筋について発表している事実、すなわち(1) β 受容体数は減少しているが陽性変力反応減弱を説明しうる程度ではないこと、(2) β 受容体-Gs 蛋白-アデニール酸シクラーゼの三者連関の反応性は保たれていること、(3)SR Ca^{2+} ATPase の調節蛋白でありリン酸化によって Ca^{2+} ATPase が活性化する phospholamban について、 β 受容体刺激時のリン酸化反応が著明に減弱していること、以上三つの事実と本研究の結果を併せて考察し、次のように結論づけている。すなわち、糖尿病心筋における β 受容体を介する陽性変力反応の減弱は、 Ca^{2+} トランジェントの増強反応の低下が直接的原因で、その機序として β 受容体-Gs 蛋白-アデニール酸シクラーゼの三者連関や I_{Ca} はあまり関与せず、SR の機能異常が主たる原因である、との結論を示している。

学位論文発表に際して、主査、副査および出席者から、糖尿病性心筋症のより根元的な原因や機序、SR の Ca^{2+} 放出に関わるライアノジン受容体の変化、糖尿病性心筋症へのインスリンの関与、糖尿病性神経障害との関連、および臨床への応用等について質問があったが、申請者は自己の実験データおよび文献的知識に基づいて概ね的確に回答した。

本研究は、斬新かつ明快な自己の実験データと既知の事実に対する詳細な考察により、いままで明確に示されていなかった糖尿病性心筋症病態の機序について新たな知見と理解を提供したという点において高く評価され、今後の研究をするうえでの重要な基礎データとなり、さらには将来の臨床的応用への礎となることが期待される。

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。