

---

# 心筋 $\beta$ アドレナリン受容体情報伝達機構 における脱感作発現に関する研究

---

(課題番号：05670587)

平成5年, 6年度科学研究費補助金

一般研究 (C) 研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者

長谷部 直 幸

(旭川医科大学医学部 助手)



心筋 $\beta$ アドレナリン受容体情報伝達機構  
における脱感作発現に関する研究

(課題番号 05670587)

平成5年度科学研究費補助金一般研究(C)研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者 長谷部直幸  
(旭川医科大学医学部助手)

研究組織

研究代表者	長谷部直幸	旭川医科大学医学部助手
研究分担者	飛世 克之	旭川医科大学医学部助教授

研究経費

平成5年度	1, 100千円
平成6年度	1, 000千円
計	2, 100千円

目次

- I. 研究目的と背景
- II. 研究方法, 結果
- III. 研究発表
  - (1) 学会誌発表
  - (2) 口頭発表
- IV. 発表論文 (抜粋)

## 研究成果

### 研究目的と背景

脱感作現象とは、同種と異種との差はあるが、細胞がある刺激を受け続けたとき、その刺激に対する反応を弱めることであり、生体の防御機構の一つである。

$\beta$ 受容体機能の低下をきたす同種脱感作には 1)  $\beta$ 受容体のリン酸化による脱共役、2)  $\beta$ 受容体の細胞質内へ取り込まれる internalization、3)  $\beta$ 受容体の一部が分解され、受容体が消失する down-regulation の 3つの段階が進行すると考えられている。この同種脱感作は数分でおきるとされ、cAMPの関与しないレセプターレベルの問題である。すなわち、1)  $\beta$ 受容体のリン酸化は主に A kinase や、 $\beta$ 受容体のみを特異的にリン酸化する分子量約 150kDa の糖蛋白質である  $\beta$ 受容体リン酸化酵素 ( $\beta$ ARK) によることが知られている。Gs の関与もなく、アデニル酸シクラーゼ (AC) 活性の低下は  $\beta$ 受容体の down-regulation の結果であると考えられる。

一方、異種脱感作はアゴニストに対してのみならず、異種のアゴニストや受容体を介さない GTP アナログ、forskolin に対しても反応性の低下を示すが、その成立機構については不明な点が多い。細胞内に蓄積した cAMP が、AC を阻害するという成績も得られている。 $\alpha$ 受容体を介する C kinase も in vitro では、 $\beta$ 受容体をリン酸化させるし (Bouvier et al, 1987)、A kinase も in vitro では、AC をリン酸化させ、その活性を低下させるという (Yoshimasa et al, 1985)。A kinase または C kinase によるリン酸化が、in vivo でどのように AC 脱感作の発現に関係し、さらに AC の mRNA の発現調節にどのように関係してくるかは興味のあるところである。また、心臓の AC のクローニング (Type V) が成功し (Ishikawa Y et al, 1992)、6 回膜を貫通する 2 重のドメインを持つ構造が明らかとなったので、そのアミノ酸配列から抗体の作製や cDNA の作製が可能であり、AC の脱感作におよぼす役割はより明白になるものと思われる。すなわち、in vitro で cDNA より作製した AC をリン酸化することで forskolin 刺激による AC 活性は、リン酸化の程度に比例して抑制されることが確認された (Iwami G et al, 1994)。

我々は、加齢や虚血、心不全などの種々の病態では、この伝達機構のうち心筋  $\beta$ 受容体数の変化より、AC の触媒部位の活性低下がより大きな役割を担っている

と推測している。本研究ではこれらの病態における脱感作現象，特にあまりその発現機構の判明していない異種脱感作にも注目し，発現に関与すると思われる $\beta$ 受容体以後の情報伝達路のうちACのリン酸化現象の有無，それに影響するprotein kinaseレベル，さらにはACの遺伝子発現との関係を検討し，脱感作現象の作用機序を探ることにある。

## 研究方法および結果

1. Western blottingや immunoprecipitation に用いるアデニル酸シクラーゼ (AC) 抗体を作製した。既報のAC (Type V, VI) のアミノ酸配列のうち，既存の抗体と共通性のない部分をデータベースから検索し，以下の計5種を合成し，keyhole limpet hemocyanin (KLH) と結合させて抗原性を高め，ウサギに静注しポリクロナール抗体を作製した。合成ペプチドはイヌAC (Type VI) のアミノ酸配列のC末端である [MTTYFLNGGPPS]，ラットAC (Type V) のアミノ酸配列のN末端側に近いところの [GTGTVEDGDGSE] (Type 5-2)，ラットAC (Type V) のアミノ酸配列の中間部分でかつ親水性である [GFEDPKDKNAQE] (Type 5-6)，ラットAC (Type VI) のアミノ酸配列のN末端側に近いところの [ERNGQKRPRQA] (Type 6-2)，ラットAC (Type VI) のアミノ酸配列の中間部分でかつ親水性である [QREDLEKKYSRK] (Type 6-6)とし，ペプチド合成機で作製した。これらの抗体の力値はELISA法で確認したが，ウサギ個体によってばらついていた。ELISA法の結果はTable 1に示す。

2. モノクロタリン (40mg/kg) を1回SDラットに筋注することで，2週目より肺高血圧ができ，3週目より右室肥大・不全心になる (Table 2)。それらの右室・心室中隔・左室を分け，Jones法によって心筋粗膜分画を作製した。それぞれの膜分画を，AC抗体と市販のC kinase  $\gamma$ ， $\beta$ ， $\alpha$ 抗体を用いて，右室肥大・不全心の心筋粗膜分画のそれぞれの蛋白量を定量した (western blotting)。最終的には5種類のACポリクロナール抗体では，鮮明な画像は得られていない。Figure 1に [CGFEDPKDKNAQE] (Type 5-6) によるwestern blottingの成績を示す。多くのバンドが出現しているが，ACの蛋白量が極めて少ないか，または作製した抗体が



非特異的であるためではないかと考えている。110KDa付近のACと思われるバンドは右室・心室中隔・左室でもコントロール群，モノクロタリン群の間で差はなかった。C kinaseの蛋白量は右室肥大・不全心となっても，コントロール群と比べて大きな変動は見られず，C kinaseの蛋白量はモノクロタリン群による肥大・不全心では変化していないと思われた (Figure 2)。

3. 2と同様のモノクロタリン (40mg/kg) 投与による右室肥大・不全心の心筋から poly A+ RNAを抽出し，ACのType V, VI cDNA (Ishikawa, J Biol Chem 267: 13553,1992; Katsushika S, Proc Natl Acad Sci USA 89:8774,1992)でhybridizationし，mRNA bandから  $\beta$ -actinの量を基準として，定量化した (Northern blotting)。

V型およびVI型ACmRNAはそれぞれ約6 kbのバンドとして認められた。モノクロタリン群の各ACmRNA発現量は，右室において1週間後では有意な変化を示さなかったが，2週間後ではV型およびVI型はそれぞれコントロール群の47%，53%に，3週間後はそれぞれ19%，20%，4週間後ではそれぞれ38%，28%とコントロール群に比し有意に低下していた (Figure 3A)。心室中隔においては，1，2週間後では有意な変化を示さず，3週間後でそれぞれコントロール群の64%，55%，4週間後ではそれぞれ58%，47%と有意に低下していた (Figure 3B)。左室ではモノクロタリン群は3週間後まで有意な変化を示さず，4週間後においてそれぞれコントロール群の66%，48%と有意な低下を認めた (Figure 3C)。

一方，forskolin刺激によるAC活性は，モノクロタリン群では右室において1，2週間後には有意な変化を示さなかったが，コントロール群に比し3週間後で36%，4週間後で30%と有意に低下していた (Figure 4A)。心室中隔においても同様に2週間後までは有意な変化を示さず，3週間後でコントロール群の63%，4週間後で61%と有意に低下していた (Figure 4B)。左室では3週間後まで有意な変化を認めず，4週間後でコントロール群の77%と有意な低下を示した (Figure 4C)。basal activity, isoproterenol + Gpp(NH)p, およびNaF刺激による活性もforskolin刺激による活性とほぼ同様の傾向を示した。したがって，モノクロタリン肺高血圧ラットでは，右心不全末期において右室，心室中隔ではV型およびVI型 ACmRNA 発現量の低下が認められ，これに伴いAC触媒部位活性も低下していた。一方，直接的圧負荷，肥大を認めない左室でも同時期にV型およびVI型 ACmRNA 発現量とAC触媒部位活性

が低下していた。心不全に至っていない右室肥大心でもV型およびVI型ACmRNA発現量は低下していたが、AC触媒部位活性には有意な変化は認められなかった。

4. 加齢に伴う心筋の反応性の低下は、主にACの触媒部位の活性低下によるのではないかと推測している。しかし、そのメカニズムについての詳細はいまだに明らかにされていない。これらを解明するために、胎生期から老年期までの成長・加齢に伴うラット心筋AC活性の変化をそのmRNA levelからも検討した。

心筋ACe活性は、fetusと比較して、adult以後、mature adult・oldで、basal activity, iso+Gpp(NH)p刺激, NaF刺激, forskolin刺激のすべてで有意に低下していた。AC type V mRNAの発現量は、fetus・neonateと比較して、mature adult・oldで増加していた。ACe type VI mRNAのmRNA発現量はtype Vのパターンとは丁度逆で、fetus・neonateで1番高く、adult・mature adult・oldで急速に減少していた。以上より加齢に伴うラットの心筋AC活性の変化は、AC type Vよりもtype VIのmRNA発現量とより関連している可能性が示された (Tobise K et al; Circ Res. 74: 596-603, 1994)。

## 研究発表

### 学会誌発表

1. Hasebe N, Shen YT, Vatner SF : Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances myocardial stunning in conscious dogs. *Circulation* 88:2862-2871,1993
2. Tobise k, Ishikawa Y, Holmer SR, Im M-J, Newll JB, Fujita M, Susanni EE, Homcy CJ : Change in type VI adenylylcyclase isoform expression correlate with a deareased capacity for cyclic AMP generation in the aging heart. *Circulation (Suppl III)* 88: I-242, 1993.
3. 上北和実, 飛世克之, 吉江浩光, 藤田雅章, 菊池健次郎: 早期発症および後期発症自糖尿病ハムスターにおける心筋膜 $\beta$ アドレナリン受容体情報伝達系の差異. *心臓* 25 (Suppl 3): 35-38, 1993
4. 飛世克之 : ハイリスク右心不全. *総合臨床* 43:757-760, 1994
5. 飛世克之 : モノクロタリン. 呼吸器疾患-STATE OF ARTS 1995-'98. 原澤道美, 北村 諭 編集, 医歯薬出版, 東京, 1994, P76-79
6. Hasebe N, Shen YT, Kiuchi K, Hittinger L, Bishop SP and Vater SF: Enhanced post-ischemic dysfunction selective to the subendocardium in conscious dogs with left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol.* 266:H702-H713,1994.
7. Sugawara H; Tobise K; Onodera S: Absence of antioxidant effects of nifedipine and diltiazem on myocardial membrane lipid peroxidation in contrast with those of nisoldipine and propranolol. *Biochem-Pharmacol.* 47: 887-92, 1994
8. Tobise K; Ishikawa Y; Holmer SR; Im MJ; Newell JB; Yoshie H; Fujita M; Susannie EE;



8. Tobise K; Ishikawa Y; Holmer SR; Im MJ; Newell JB; Yoshie H; Fujita M; Susannie EE; Homcy CJ: Changes in type VI adenylyl cyclase isoform expression correlate with a decreased capacity for cAMP generation in the aging ventricle. *Circ Res.* 74: 596-603, 1994
9. Yoshie H, Tobise K; Onodera S: Interventricular differences of  $\beta$ -adrenoceptor adenylate cyclase system of rat heart with the the progress of right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline. *Jpn Circ J:* 58: 855-865, 1994
10. Fujita M, Tobise K, Hasebe N, Yoshie H, Uekita K, Onodera S, Kikuchi K, Ishikawa Y, Homcy CJ: Alteration in Type V and VI adenylyl cyclase isoform gene expression in rat heart with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 90: I-584, 1994.
11. Hasebe N, Hittinger L, Kohin Suzy, Shen YT, Graham RM and Vatner SF: Effects of Hypertrophy on Left Atrial and Ventricular Compliance and Plasma ANF Levels in Conscious Dogs. *Am J Physiol.* 268: H781-H787, 1995
12. Sato M, Ohsaki Y, Tobise K: Transforming growth factor- $\beta$  1 proliferated vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 8(2), 1995 (in press)

## 口頭発表

1. 飛世克之, 吉江浩光, 上北和実, 藤田雅章, 小野寺壮吉: 心筋の機能不全に伴う  $\beta$  受容体情報伝達路の異種脱感作 (HETEROLOGOUS DESENSITIZATION) の発現. 第56回日本循環器学会学術集会, 千葉市, 平成4年3月
2. Hasebe N, Shen YT, Vatner SF: Inhibition of Nitric Oxide Synthesis Enhances Myocardial Stunning. The 66th Scientific Sessions of American Heart Association, November 8-11, Atlanta, Georgia, 1993.
3. Hasebe N, Hittinger L, Kohin S, Shen YT, Graham MR, Vatner ST: Atrial and Ventricular Compliance and ANF Levels During Hemorrhage and Volume Expansion in Conscious Dogs with Cardiac Hypertrophy. Annual Meeting of FASEB 93, New Orleans USA, 1993.
4. Tobise K, Ishikawa Y, Holmer SR, Im M-J, Newell JB, Fujita M, Susanni EE, Homcy CJ: Change in type VI adenylyl cyclase isoform expression correlate with a decreased capacity for cyclic AMP generation in the aging heart. American Heart Association's 66th Scientific Sessions, November 8-11, Atlanta, Georgia, 1993.
5. 藤田雅章, 飛世克之, 吉江浩光, 上北和実, 菊池健次郎: 右室肥大心の進展に伴うアデニル酸シクラーゼ (AC) 活性の変化—mRNAレベルでの検討. 第57回日本循環器学会学術集会, 千葉市, 平成5年3月
6. 藤田雅章, 飛世克之, 吉江浩光, 上北和実, 菊池健次郎: 加齢によるアデニル酸シクラーゼ (AC) 活性の変化—mRNAレベルでの検討—. 第57回日本循環器学会学術集会, 千葉市, 平成5年3月
7. 長谷部直幸, 菊池健次郎, Shen YT, Vatner SF: Nitric Oxide (NO) の局所産生阻害の効果と Myocardial Stunning. 第58回日本循環器学会学術集会, 東京, 平成6年

3 月.

8 . 長谷部直幸, 菊池健次郎, Shen YT, Vatner SF: 左室肥大心の冠予備能と虚血後心機能障害. 第58回日本循環器学会学術集会, 東京, 平成 6 年 3 月.

9 . Zeballos GA, Hasebe N, Shen YT, Vatner SF, Wolin MS and Hintze TH: Plasma Nitric Oxide Measurements by Chemiluminescence of Head Space Gas. Annual Meeting of FASEB, Anaheim USA, 1994.

1 0 . Hasebe N, Ido A, Matsuhashi H, Natori S, Matsuzaka T, Fujita M, Fujino T, Yamashita H, Kikuchi K: Inhibition of Nitric Oxide does not Enhance Postextrasystolic Potentiation Despite Preserved Inotropic Response to External Calcium. The 67th Scientific Sessions AHA, Dallas Texas, 1994.

1 1 . Fujita M, Tobise K, Hasebe N, Yoshie H, Uekita K, Onodera S, Kikuchi K, Ishikawa Y, Homcy CJ: Alteration in Type V and VI adenylyl cyclase isoform gene expression in rat heart with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. American Heart Association's 67th Scientific Sessions, November 14-18, Dallas, Texas, 1994 .



**Table 1. Titer of Adenylyl Cyclase Antibody**

	$\times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-2}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-4}$
Type 5-2		0.017	-0.043	0.017
Type 5-6	1.129		1.285	0.363
Type 6-2		0.142	-0.052	-0.03
Type 6-6		-0.007	-0.067	-0.124
Dog VI	0.965		1.292	0.812

**Table 2. Body and Heart Weight in Control Rats and Monocrotaline-Treated Rats**

	1 week		2 weeks		3 weeks		4 weeks	
	C (n=10)	MCT (n=10)	C (n=10)	MCT (n=10)	C (n=10)	MCT (n=10)	C (n=10)	MCT (n=10)
<b>BW (g)</b>	196 ± 5	197 ± 3	255 ± 5	233 ± 6*	298 ± 5	258 ± 5*	374 ± 5	292 ± 10*
<b>RV (mg)</b>	138 ± 6	143 ± 4	155 ± 7	196 ± 6*	194 ± 7	291 ± 13*	225 ± 12	398 ± 15*
<b>IVS (mg)</b>	181 ± 8	181 ± 4	200 ± 9	195 ± 10	238 ± 7	213 ± 8 <sup>§</sup>	290 ± 9	244 ± 6*
<b>LV (mg)</b>	300 ± 15	292 ± 8	391 ± 15	362 ± 16	412 ± 12	378 ± 12	502 ± 9	410 ± 9*
<b>RV/BW (mg/g)</b>	0.704 ± 0.02	0.724 ± 0.02	0.605 ± 0.02	0.840 ± 0.02*	0.651 ± 0.02	1.13 ± 0.06*	0.603 ± 0.04	1.37 ± 0.06*
<b>IVS/BW (mg/g)</b>	0.921 ± 0.02	0.919 ± 0.02	0.784 ± 0.03	0.836 ± 0.03	0.796 ± 0.02	0.825 ± 0.03	0.774 ± 0.03	0.838 ± 0.02
<b>LV/BW (mg/g)</b>	1.53 ± 0.06	1.48 ± 0.04	1.53 ± 0.05	1.55 ± 0.05	1.38 ± 0.04	1.47 ± 0.05	1.34 ± 0.03	1.42 ± 0.05

BW, body weight; RV, right ventricle; IVS, interventricular septum; LV, left ventricle; C, control rats; MCT, monocrotaline-treated rats. Values are mean ± SEM.

\*p<0.01 and <sup>§</sup>p<0.05 vs the corresponding value in control rats.

### A. Right Ventricle

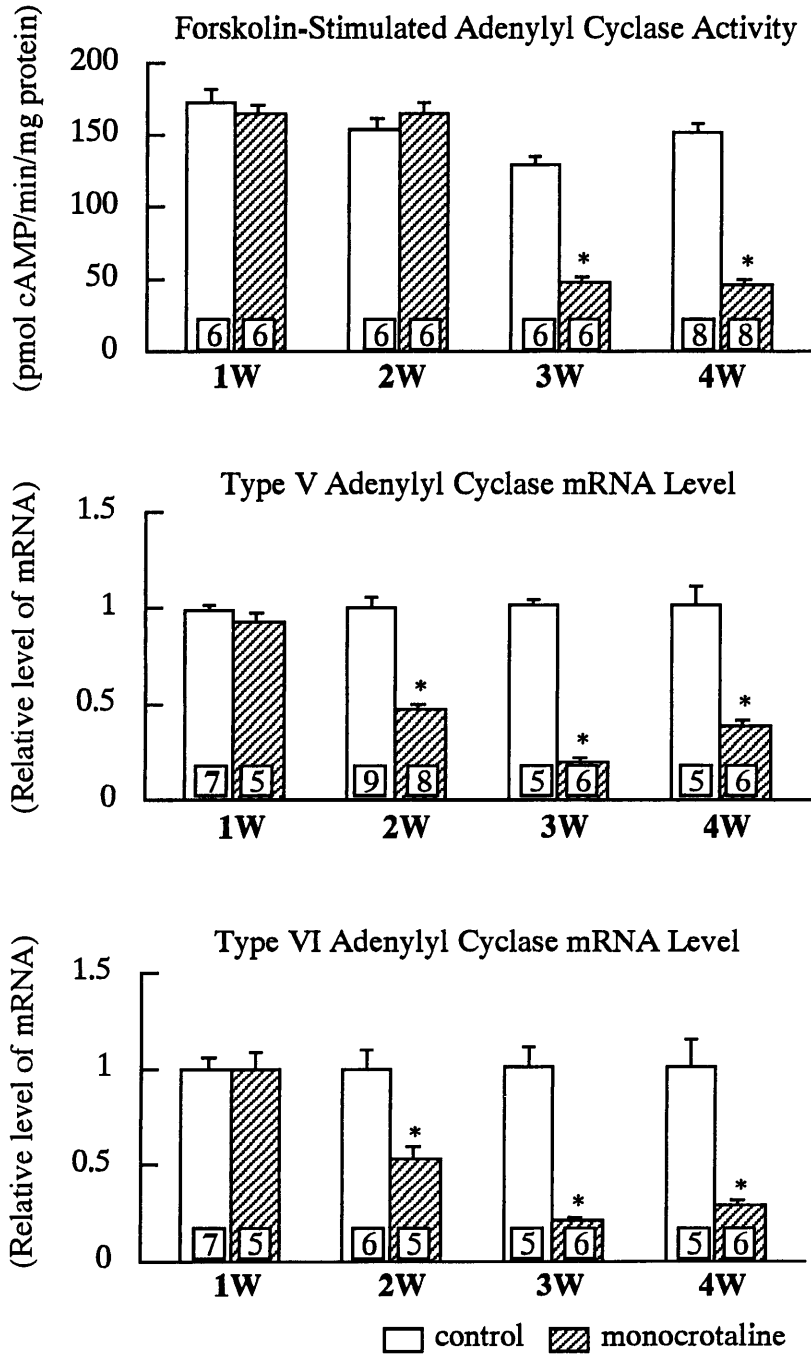


Figure 4 A



## B. Interventricular Septum

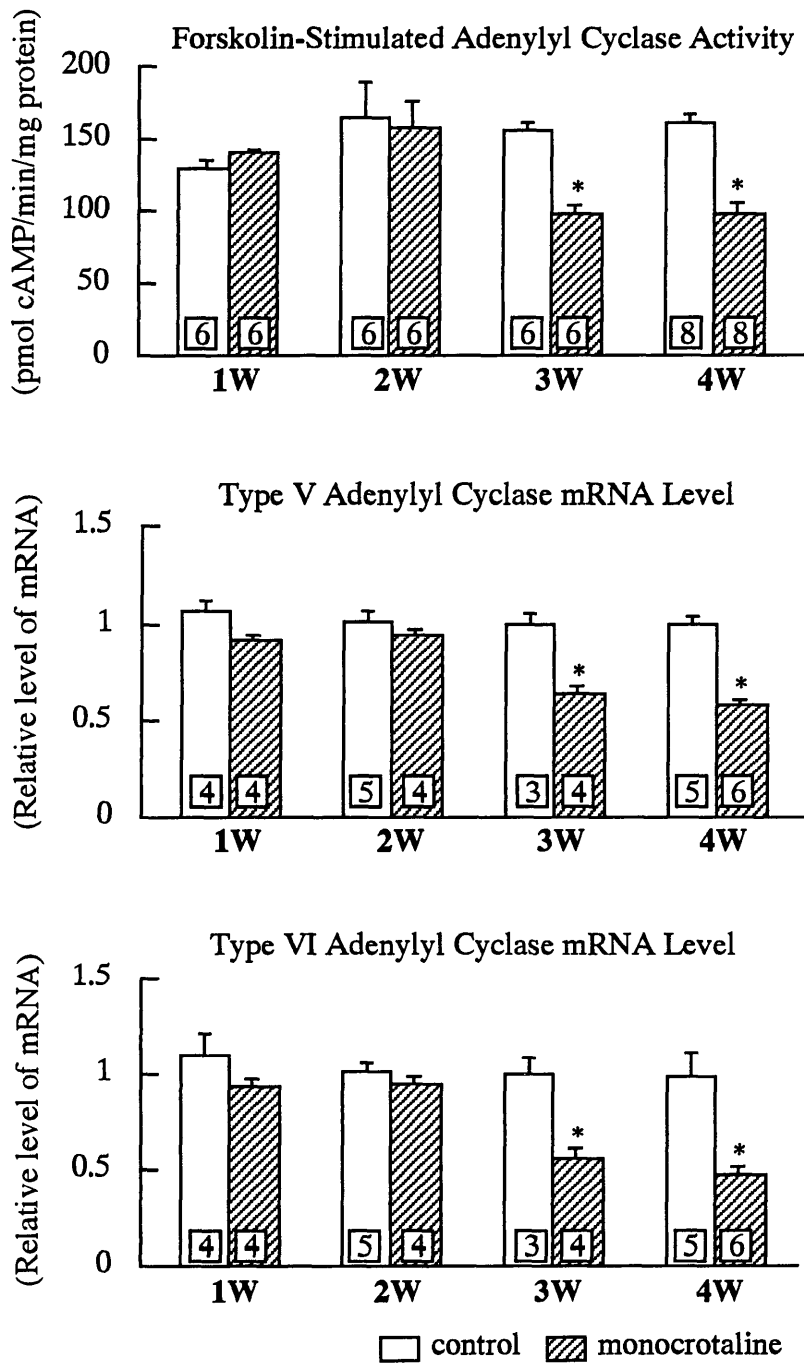


Figure 4 B

C. Left Ventricle

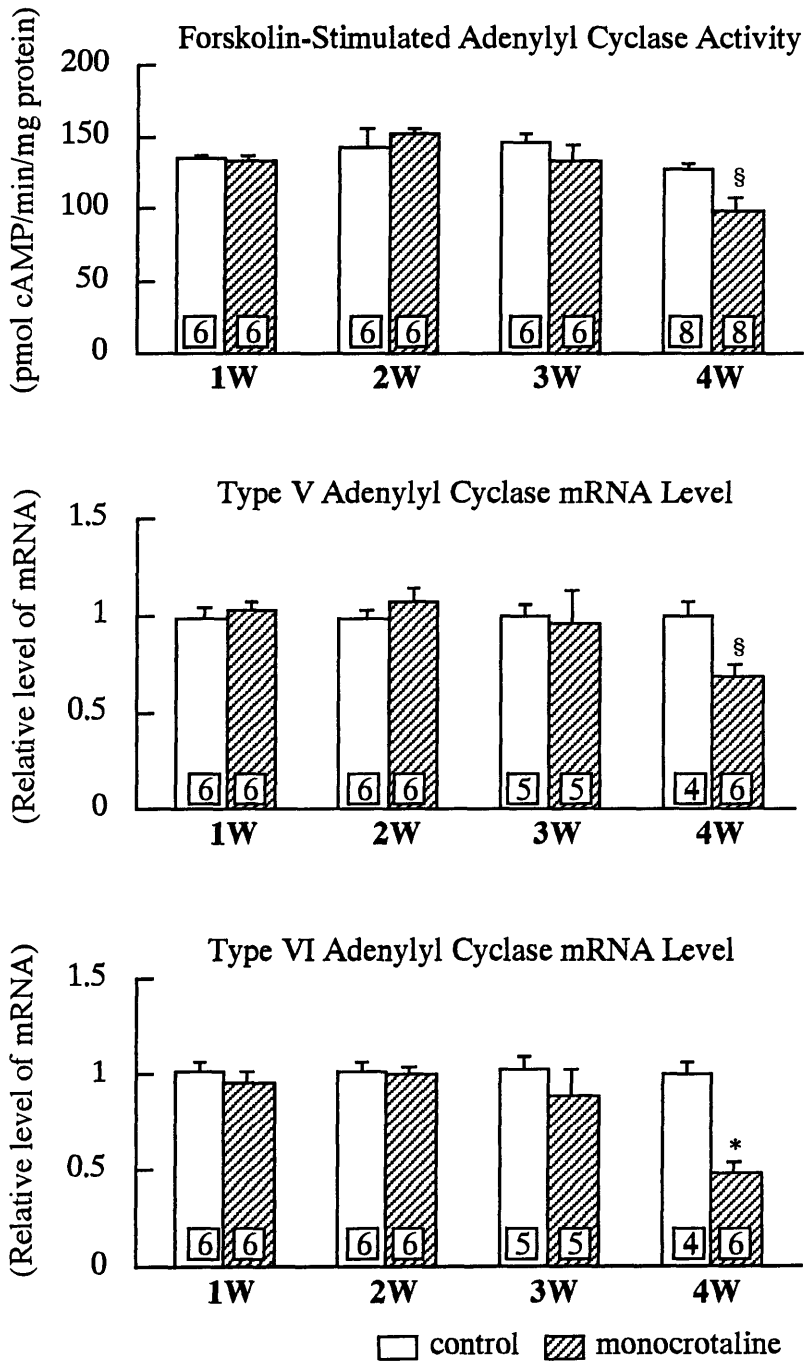


Figure 4 C

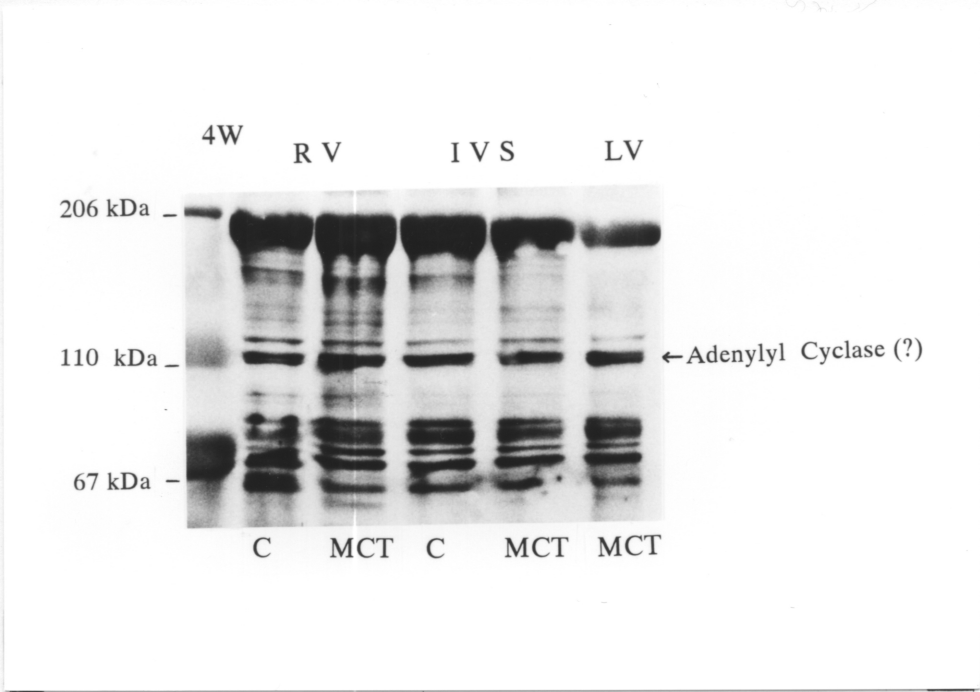


Fig 1

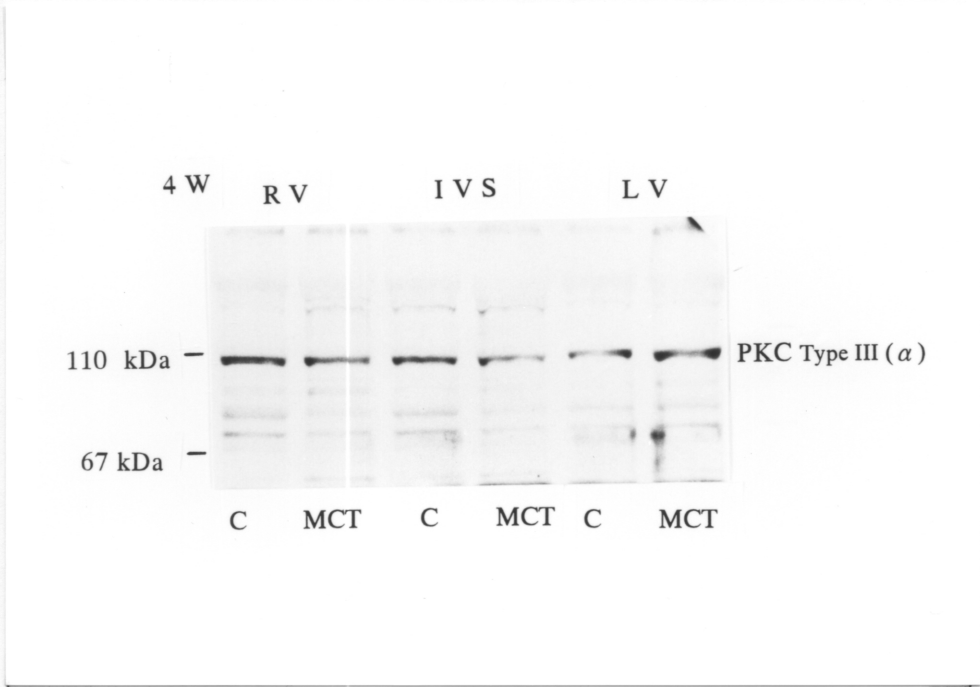


Fig 2



A. Right Ventricle

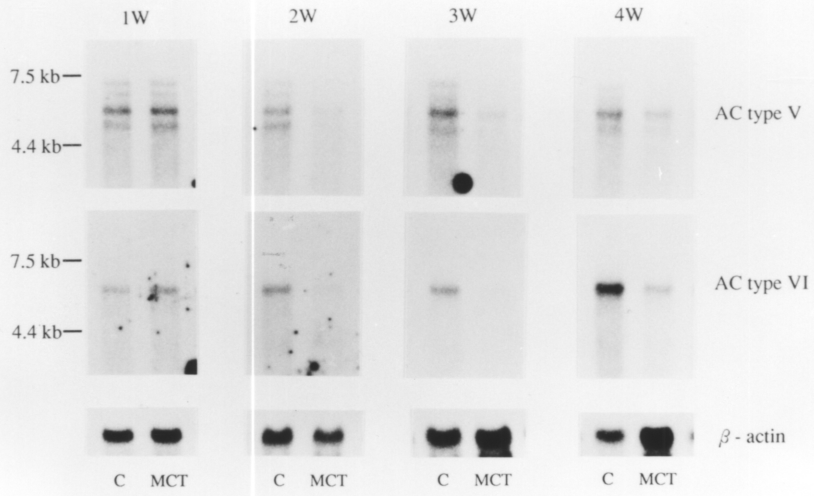


Fig 3A

B. Interventricular Septum

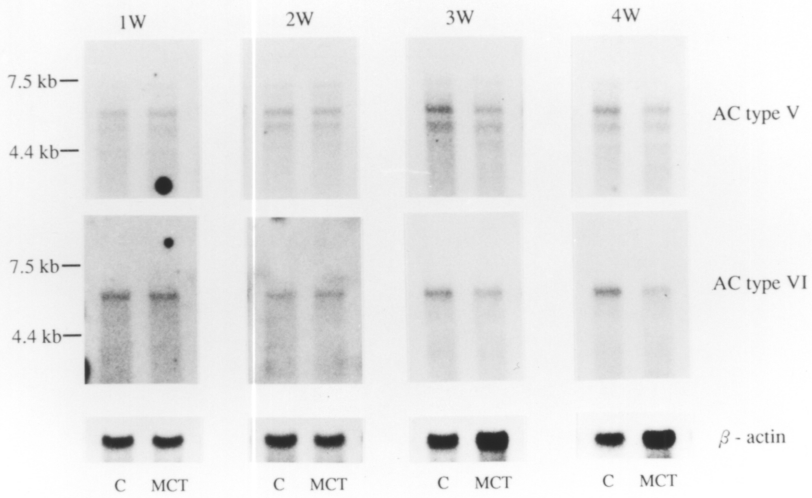


Fig 3B

# Inhibition of Factor E

# Endothelium-Derived Relaxing Factor-Dependent Myocardial Stunning in Conscious Dogs

Neergala, et al.

et al., MD; Stephen F. Vatner, MD

Fig 3C. Northern blot analysis of endothelium-derived relaxing factor synthase mRNA after coronary artery occlusion (CAO)

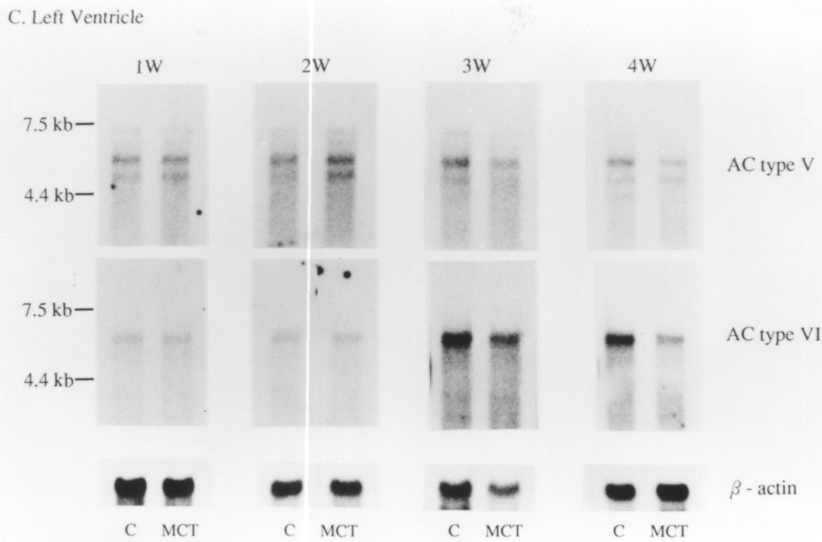


Fig 3C

have demonstrated impaired endothelium-dependent vascular responses after coronary artery occlusion (CAO) and its relief by reperfusion (CAR) in the dog<sup>24</sup> and in vivo.<sup>24</sup> Most prior studies on the role of the endothelium in myocardial ischemia have focused on either altered endothelial control of vascular function<sup>25</sup> or the development of myocardial necrosis.<sup>9-21</sup> However, the extent to which endothelial function modulates the recovery of regional myocardial function following a brief period of CAO, insufficient to induce myocardial necrosis, ie, myocardial stunning,<sup>12,13</sup> is not known. Accordingly, the primary goal of the current investigation was to determine whether inhibition of endothelium-derived relaxing factor (EDRF), eg, nitric oxide (NO),<sup>14</sup> enhances postischemic myocardial

odilation is most prominent in the subendocardium<sup>12</sup> and is selectively attenuated in the subendocardium during ischemia and reperfusion.<sup>14</sup> Since systemic administration of NO synthesis inhibitors increases arterial and left ventricular pressures, ie, afterload, and potentially preload, which would, by itself, affect myocardial stunning,<sup>17,18</sup> it was thought to be critical to avoid these complicating issues by administering the NO synthesis inhibitor locally. To accomplish this, an infusion of *N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NA) was administered intracoronary to inhibit the NO synthesis pathway selectively in the territory of the left circumflex coronary artery, which was destined to become ischemic, relatively sparing the nonischemic zone and systemic circulation. L-NA was selected since it is more potent than *N*<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) as an inhibitor of NO synthesis<sup>19,20</sup> and does not have a muscarinic receptor antagonistic action.<sup>20</sup> A 10-minute period of CAO was selected for this study to avoid the potential problem that myocardial necrosis might develop with longer periods of ischemia.<sup>22</sup> However, the results from the initial 10-minute period of CAO were discarded since prior studies have shown that the response to an initial CAO differ from those from a subsequent second and

Received May 3, 1993; revision accepted August 3, 1993.  
From the Department of Medicine, Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital, Boston, Mass; and the Cardiovascular Medicine Division of New England Regional Primate Research Center, Southborough, Mass.  
Correspondence to Dr Stephen F. Vatner, New England Regional Primate Research Center, One Pine Hill Drive, 10 Box 300, Southborough, MA 01772-9102.