

博士論文

心筋細胞特異的 $\beta 1$ 受容体ノックアウトマウスの
解析

大津 裕

論文題目：心筋細胞特異的 β 1 受容体ノックアウトマウスの解析

所属：循環器内科

指導教員名：小室 一成教授

申請者名：大津 裕

目次

1. 略語一覽

2. 要旨

3. 序文

4. 方法

5. 結果

6. 考察

7. 引用文献

8. 謝辞

1. 略語一覽

Adrb adrenergic receptor beta

α MHC alpha myosin heavy chain

BAC bacterial artificial chromosome

BSA bovine serum albumin

BW body weight

cAMP cyclic adenosine monophosphate

cDNA complementary deoxyribonucleic acid

Cre causes recombination

CLST Center for life science technologies

CO cardiac output

DNA deoxyribonucleic acid

Dd diastolic diameter

EF ejection fraction

ES embryonic stem

FS fractional shortning

GPCR G protein coupled receptor

HE hematoxylin-eosin

HW heart weight

ICI Imperial chemical industries

IP instantaneous pressure

ISP isoproterenol

KO knock out

LV left ventricle

Mil milrinone

mRNA messenger ribonucleic acid

PCR polymerase chain reaction

PDE3 phosphodiesterase 3

PKA protein kinase A

PLB phospholamban

RNA ribonucleic acid

SerCa Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase

TAC transverse aortic constriction

TL tibia length

TnI troponin IWT wild type

2. 要旨

心血管疾患は全世界的に罹患患者数が多く、現在 β 1カテコラミン受容体をターゲットとした薬剤が治療薬の中でも主要な薬剤の一つであるが、詳細な薬効のメカニズムは未だ明らかでない。本研究ではジェネラルノックアウトでは8～9割が胎生致死となる *Adrb1* 遺伝子について、心筋細胞特異的なノックアウトマウスを作製し、その生理学的・分子生物学的特性を検討し、心臓における役割について検討した。その結果急激に増大した後負荷に対して心臓が適応する際、またその後負荷が解除された時に心拍出量が復帰する際に、 β 1カテコラミン受容体が重要な役割を果たしていることが判明し、ある種の心不全状態への適応に対して寄与している可能性が示された。

3. 序文

[心血管疾患とその治療]

心血管疾患は全世界的に罹患患者数が多く¹、かつては先進国を中心とする印象であったが、今や低または中等度の収入の国々においても死因に寄与する割合も大きい²。治療や薬剤の絶え間ない発展によってその予後は改善しつつあるものの、罹患患者数は増加していく傾向にあり³、未だ現代医学の課題の一つである。

心血管疾患に対してはアンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬、アルドステロン受容体拮抗薬等の多くの種類の薬剤が効果を示している⁴⁻⁹が、 β カテコラミン受容体を標的とした薬剤は、心機能に直接的に影響を及ぼす薬効を持ち¹⁰、心不全から虚血性心疾患等の幅広い心血管疾患の日常臨床において欠かせない存在となっている¹¹⁻¹⁴。

[心血管疾患の治療と β カテコラミン受容体の変遷]

G蛋白質共役型受容体(GPCR)は多くの真核生物において細胞膜を介したシグナル伝達に主要な役割を果たしている¹⁵。 β カテコラミン受容体はG蛋白質共役型受容体の一種であり、生体内では主に内因性カテコラミンであるアドレナリンやノルアドレナリン、ドパミンをリガンドとしていることが知られている¹⁶。カテコラミンと β 受容体の歴史は古く、19世紀末より昇圧物質の分離・抽

出が試みられており、1900年に Takamine らが世界で初めてアドレナリンの結晶化に成功している¹⁷。また、1921年に Cannon が交感神経からアドレナリン様物質が遊離されることを見出し、これを *sympathin* と名付けた。後に von Euler がノルアドレナリンを発見し、*sympathin* がノルアドレナリンと同定された¹⁸。1940年には Konzett らがアドレナリンの誘導体であるイソプロテレノールを合成し、翌年には気管支拡張作用と強心作用があることを報告した¹⁹。以降カテコラミンとその誘導体は徐々に薬剤としての地位を獲得していく。1948年に Ahlquist がアドレナリン受容体は2種類存在し、器官によって異なった作用を発現することを提唱し、現在の α 、 β 受容体の概念の基礎を築いている²⁰。1962年に Black が英国の Imperial Chemical Industries(ICI)社においてイソプロテレノールに類似した多種類の化合物を合成した²¹が、その内の一つであるプロプラノロールが β 遮断薬として後に臨床応用され狭心症・高血圧への薬剤として用いられ始めた^{22,23}。また今日において、 β 遮断薬は心不全の予後を改善する薬剤として広く知られている¹¹⁻¹⁴が、心筋収縮力を上昇させる β カテコラミン受容体刺激の遮断薬という位置づけから、長らく心不全には禁忌とされていた時代もあった²⁴。しかし1970年代中頃より Swedberg らが慢性心不全患者の長期予後を改善することを報告²⁵し、1990年代から2000年代初頭にかけて心不全に対する β 遮断薬の有効性について大規模臨床試験が行われた

11-14。その結果、一部の β 遮断薬投与によって心不全患者の予後が改善し、現在では心不全に対する標準治療の地位を獲得している。以上のように β 受容体を介した刺激は心血管疾患と非常に密接な関連があるが、未だ明らかでない部分も多い。例えば β 遮断薬の有効性のメカニズムにも、抗不整脈効果・アポトーシス予防効果・線維化やリモデリングの抑制等、諸説ある²⁶⁻³³が明瞭な答えは出ていない。

[β カテコラミン受容体の構造とそのメカニズム]

前述の通り β カテコラミン受容体はG蛋白共役型受容体の1種であり、これまでに β 1~3の3種類のサブタイプが確認されている。心臓においては3種類全てのサブタイプが発現しているが、その中では β 1受容体が最も多く発現しており、通常心臓においては全ての β カテコラミン受容体の8割程度を β 1受容体が占めている³⁴⁻³⁸。またヒト個体においては、胎盤を除くと心臓が最も多く β 1受容体を発現しており、心臓の他では子宮、脂肪細胞で発現が認められている。 β 2受容体は気管支、子宮、肝臓で発現が認められ、気管支平滑筋の拡張、糖代謝調節に関わっている。 β 3受容体は脂肪細胞、消化管、肝臓に発現しており、脂肪代謝に関わっているとされている。いずれのサブタイプも細胞膜上に存在し、7回膜貫通構造を有している。細胞膜内外にそれぞれ3つのアミノ鎖ループを作っており、細胞膜外にアミノ鎖のN末端が、細胞膜内にC末端が位置して

いる³⁹。一方でG蛋白は細胞膜上で α 、 β 、 γ の三種類のサブユニットからなるヘテロ三量体として存在している。G α 蛋白は4つのファミリーから成り、カテコラミン等のリガンドと結合した β カテコラミン受容体は、主にG α_s と共役しアデニル酸シクラーゼの活性化を介して細胞内のcAMP濃度を上昇させる。cAMPの濃度上昇によってprotein kinase A (PKA)が活性化し、心筋細胞においてはL-type calcium channelやphospholamban (PLB)、troponin I (TnI)などのリン酸化と発現量の変化を介して、細胞内のCaイオン濃度を調整するCa handling機構を修飾する⁴⁰。以上のような β 受容体へのリガンド結合に始まるシグナル伝達によって、心臓全体としては陽性変力・変時作用、弛緩促進作用を呈する⁴¹。これらの知見はカテコラミンとその誘導体の薬剤としての利用や心疾患の病態生理の理解に重要であるが、現在解明されているメカニズムによって未だ明らかにされていない疑問も多い。 β 遮断薬は心血管疾患の日常診療において広く用いられる存在となって久しいが、その薬効の詳細な分子生物学的メカニズムは明らかになっていない。また、 β 遮断薬投与下において陽性変力作用を呈する β 刺激薬を投与するような状況に遭遇することは珍しくないが、その生理学的意味も明らかではない。

[実験の目的]

心血管疾患の治療において、 β 遮断薬は効果が認められ広く用いられている薬剤であるが、その詳細な生理学的・分子生物学的メカニズムは明らかになっていない。 β 受容体のサブタイプの中で β 1受容体は人体において心筋細胞に最も多く発現しているものの、実際に心筋細胞をターゲットとして薬効を示しているかどうかについては見解が定まっておらず、心臓の線維芽細胞や免疫系の細胞等の心筋細胞以外の細胞をターゲットとしていることについても諸説ある。また現在において、生体内での蛋白質の機能を調べる上でノックアウトマウスを作製する手法は一般的であるが、 β 1受容体の全身でのノックアウトマウスは8～9割が胎生致死となるとの報告⁴²もあり、このことが β 1受容体の機能解析において障害の一因となっていると推測された。そこで本研究では、これまでに当科と理化学研究所とで共同作製された β 1受容体遺伝子における条件的遺伝子ノックアウトマウスの凍結卵より、心筋細胞特異的 β 1受容体ノックアウトマウスを作製した。(作製方法の詳細については後述する。)同マウスは β 1受容体の遺伝子である*Adrb1*の発現を心筋細胞特異的に抑制したマウスであり、その表現型を解析することが、 β 1受容体機能のより詳細なメカニズムを理解することに寄与できるのではないかと考えた。同マウス及びコントロールとなる野生型マウスに対して左心室の圧・容積曲線を測定するとともに、日常臨床において陽性変力作用を期待して用いられる isoproterenol、milrinone 投与に対する

反応性を比較した。また循環器領域の基礎研究においてある種の心不全状態を再現するモデルとして知られる腹部大動脈牽引と TAC (transverse aortic constriction) を適用し反応性の差異を検討した。本研究結果によって急性の圧負荷により心不全を生じるような状況において β 1 受容体が循環動態の維持に重要な役割を示していること示唆していると考えられた。また心筋細胞特異的 β 1 受容体ノックアウトマウスは β 受容体の機能研究においてさらなる検討の余地があり、今後同マウスの解析を進めることによってさらなる知見が得られる可能性が期待される。

4. 方法

本研究において行われた動物実験は東京大学動物実験倫理委員会の承認を得て施行されており、施行の際には東京大学動物実験ガイドラインを遵守した。

(動物実験計画書承認番号：医 P19-057)

(1) 本研究において用いられたマウス

本研究において用いられたマウスは当科に在籍していた内藤篤彦先生が理化学研究所ライフサイエンス技術基盤センター (CLST) と共同で作製し、凍結保存されていた受精卵(*Adrb1*(CDB1068K))を提供頂き使用した。この受精卵において、*Adrb1* 遺伝子はその塩基配列内 2 カ所に loxP 配列を挿入されており、Cre の発現によって loxP で挟まれた領域が塩基配列から切除される。以降この loxP を挿入された状態を *Adrb1* flox と記載し、遺伝情報の詳細については後述する。心筋細胞特異的 β 1 受容体ノックアウトマウスを作製するため、同受精卵を胚移植して出生したマウスを C57BL/6-Tg(Flippase)マウスと交配して *Adrb1* flox のヘテロ接合型マウスが出生した後に、C57BL/6-Tg(α MHC promoter Cre)と交配し、その子孫において α MHC Cre が positive で *Adrb1* flox がホモ接合型となる個体が得られるまで交配を繰り返し、心筋細胞特異的 β 1 受容体ノックアウトマウスを作製した。この交配過程を図 1 に示す。また以下の実験における対照として α MHC Cre が negative で *Adrb1* flox がホモ接合型である個体を用いた。

Adrb1 flox-homo かつ α MHC Cre(+)である個体を得る交配過程の最終段階である flox-homo/Cre(-)と flox-hetero/Cre(+)の交配において数カ月間目的の個体を得られず、胎生致死が疑われたが、最初の flox-homo/Cre(+)である個体が出生してからは、その個体から問題なく生殖が得られた。最初の1個体出生前と出生後の交配段階における各遺伝型の収率を表1に示す。

図 1. マウス交配過程

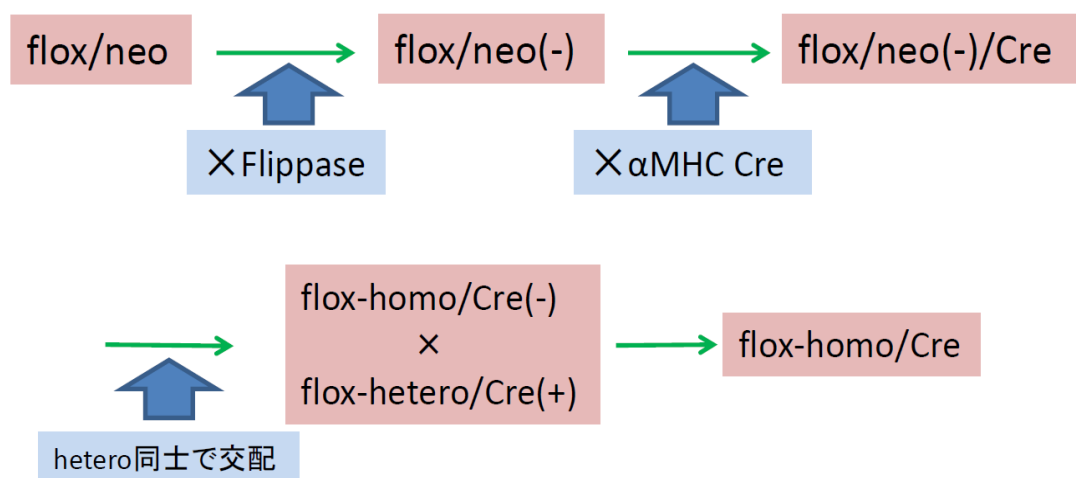


表 1. 交配段階毎の各遺伝型の収率

	flox-hetero /Cre(-)	flox-hetero /Cre(+)	flox-homo /Cre(-)	flox-homo /Cre(+)	計
flox-homo /Cre(-) ×	1 (2.4%)	20 (48.8%)	19 (46.3%)	1 (2.4%)	41(100%)
flox-hetero /Cre(+) ×	0 (0%)	0 (0%)	36 (53.7%)	31 (46.2%)	67 (100%)
flox-hetero /Cre(+)					

(2) 左心室の圧・容積曲線の測定

β 1 受容体ノックアウトマウスとその対照群の各個体に対して以下の同様のプロトコルで圧・容積曲線を測定した。

密閉容器に isoflurane 吸入麻酔液(Pfizer 社製)を気化充満させ、そこに実験対象となるマウスを入れて麻酔導入を行った。マウスの活動が抑制されたことを確認し、マウスの体重測定を行った。補助麻酔薬として etomidate 5~10mg/kg と urethane 75~100mg/kg を腹腔内に投与し保温台にマウスを固定して頸部皮膚を切開し、気管と内頸静脈を十分に露出させた。マイクロカテーテルに接続された 30G 針を内頸静脈へ挿入し 10%BSA 溶液や isoproterenol 等の薬剤を投与するための輸液ラインとした。また、気管前面を横断切開して 21G の留置針を挿入し、人工呼吸器(室町機械社製、MK-V100/C)に接続して陽圧換気を行った。麻酔気化器(室町機械社製、MK VAPO)より isoflurane を気化し吸入維持麻酔とした。また精密な操作を要するため、マウスの動きを抑制することを目的に筋弛緩薬である pancronium 0.75~1.25mg/kg を腹腔内投与した。剣状突起よりやや尾側より左右へ開腹・開胸し心尖部と下大静脈を露出させ、心尖部より左室腔へ向けて 27G 針を穿刺し細孔を作製し、細孔を介して Micro-Tip® Catheter Transducer PVR-1035 (Millar 社製) を左室腔へ挿入、圧・容積曲線を測定した。

また各種循環パラメーターの算出のため、IVC 遮断と飽和食塩水負荷を加えた際の圧・容積曲線についても記録した。これらの測定の後にはマウスを左側臥位とし、大動脈を露出して心拍出量についても超音波血流量測定器 (TS420、Transonic 社製) にて測定を行った。これらによって測定されたデータは解析ソフトウェアである LabChart 7 Pro (Ad Instruments 社製) によって解析を行った。

この際に、必要に応じて内頸静脈に挿入したマイクロカテーテルを介して、Elite Syringe Pumps (Harvard Apparatus 社製) を用いて 1~50ul/min 程度の微流量にて薬剤投与を行った。

さらに必要に応じて大動脈に 5-0 絹糸をかけて尾側方向に牽引して急性の圧負荷を 5 分間加えた。

(3) マウスへの TAC (tranverse aortic constriction) 心不全モデルの適用

マウスの胸部大動脈を結紮することにより心臓に圧負荷を加える手法は、マウス実験における圧負荷心不全モデルとしてよく知られている。本研究で用いた手術方法について以下に記載する。

前述の如く、マウスを密閉容器に気化充満させた isoflurane によって麻酔導入を行い、マウスの活動低下を確認した後に、顕微鏡下に声門を観察して 22G の留置針を挿管チューブとして気管内挿管を行った。留置針を人工呼吸器 (シナノ製作所製、SN-480-7) に接続し陽圧換気を行った。この際前述の如く isoflurane

による吸入維持麻酔を行っている。仰臥位にて胸骨左縁より切開を加え、組織を剥離して大動脈弓を十分に露出、26G針を大動脈に平行に隣接させ、一塊にして7-0絹糸にて結紮、その後に針を抜去して狭窄を完成させた。切開創を縫合してisofluraneの吸入を中止した後に、マウスの呼吸再開を確認して抜管した。

(4) 心エコーによる非侵襲的心機能評価

前述のTACによる圧負荷心不全モデル適用前と、適用後に一定期間経過した後、心エコー（Visual Sonics社製、Vevo2100）による心機能評価を行った。対象マウスを把持して仰臥位とし、胸骨左縁より左室中隔壁厚（IVS:interventricular septum）・左室後壁厚（PW:posterior wall）・左室拡張末期径（Dd:Diastolic diameter）・左室内径短縮率（FS:fractional shortening）を計測した。また測定結果より左室重量（LV mass:left ventricular mass）を算出した。

(5) 血清サンプルの採取

可能な限りマウスへの刺激を避けて、前述の如くisofluraneを気化充満させた密閉容器にて麻酔を行い、気管切開にて人工呼吸器に接続し、胸骨左縁より切開して心臓を露出した。左室へ24G針を挿入し、ヘパリンコーティングを行ったシリンジにて血液を吸引採血した。血液は採血の後にEDTA-2Na 1.0mgと速やかに混和し、1200Gで血球の遠心分離を行い、血清サンプルとした。

(6) 組織サンプルの採取と基本的な表現型の測定

組織サンプルの取得に当たっては、前述の如く isoflurane を気化充満させた密閉容器にて麻酔を行い、体重測定を行った後にマウスを頸椎脱臼させて安楽死させ、素早く開胸して心臓を主とした組織サンプルの取得を行った。この際に心重量・左心重量・右心重量・肺重量・脛骨長を測定した。測定が終了した後可能な限り速やかに液体窒素による snap freezing を行い、後述する評価を行うまで -80°C で保存した。

(7) 取得したサンプルの解析

①マウスの遺伝型の決定

あらかじめ取得された耳・尾などの組織片より DNA の抽出を行い、PCR により目的領域を増幅して、電気泳動にてマウスの遺伝型を決定した。

REDEExtract-N-Amp™ Tissue PCR kit (Sigma-Aldrich 社製) を用い、kit のプロトコルに従って DNA 抽出・増幅と PCR を行った。PCR に際してサーマルサイクラーとして Verti (Applied biosystems 社製)、PC-808 (Astec 社製) のいずれかを用いた。また、電気泳動槽として Mupid®-exU (Advance 社製) を用いた。

Adrb1 flox マウスは、C57BL/6 由来の胚に HK3i method⁴³ を適用して作製した胚性幹細胞に対して、BAC recombination method⁴⁴ を用いて作られた targeting vector を 8 細胞期胚の時期に電気穿孔法にて導入することによって作成されている。

遺伝子組み換え情報について図 2 に、PCR に使用したプライマーについては表 2 に図示した。改変された DNA 上では targeting vector の作製の際に、reporter gene として neomycin 耐性遺伝子 (図 2 においては Neo と記載) が導入されており、前述の通り C57BL/6-Tg(Flippase)マウスと交配させることによって組み換え allele より、frt 領域に挟まれた neomycin 耐性遺伝子領域を除去した。その確認のため表 2 の③、④、⑤に示したプライマーを用いて PCR を行い、電気泳動にて neomycin 耐性遺伝子残存 allele では 384bp に、除去に成功した allele では 525bp に band が出現することを利用して neomycin 耐性遺伝子領域の除去を確認した。その後、その子孫を C57BL/6-Tg(α MHC promoter Cre)と交配させることによって loxP 領域に挟まれた領域を除去した。表 2 ①、②に示したプライマーを用いて *Adrb1* floxed allele(366bp)、wild type allele(279bp)の band を確認し遺伝型を決定した。また今回は C57BL/6-Tg(α MHC promoter Cre)との交配によって心筋細胞での *Adrb1* 遺伝子のノックアウトを行ったため、⑥、⑦のプライマーを用いて同様に PCR を行い、band の有無によって α MHC promoter Cre の導入を確認した。

図 2. *Adrb1* flox マウスにおける遺伝子組み換えマップ

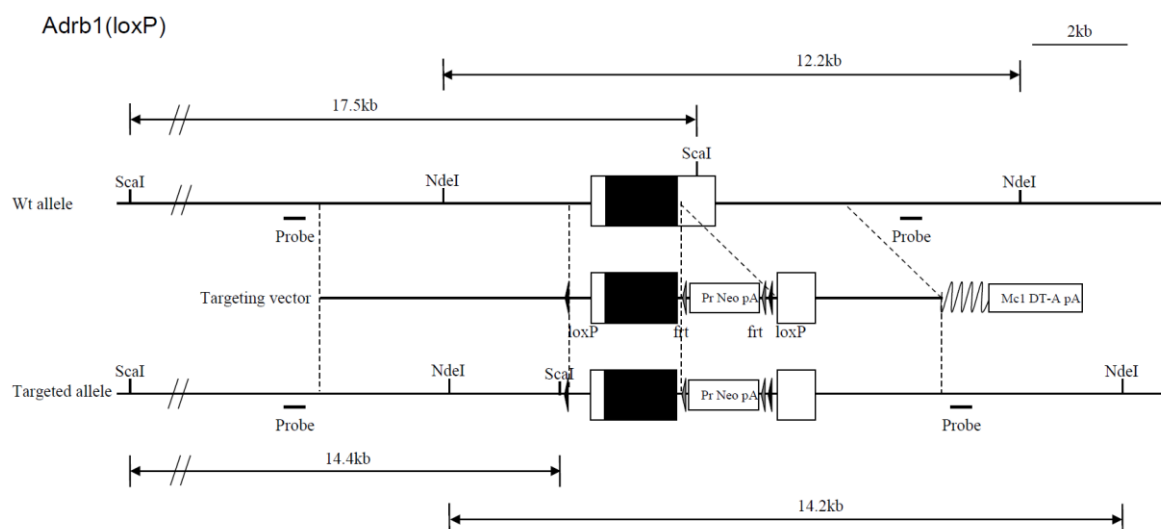


表 2. *Adrb1* flox マウスの遺伝型同定に用いたプライマー

①	<i>Adrb1</i> 5 prime arm Fwd	25 base	TCACTAACACCCACTTCCTATTCCC
②	<i>Adrb1</i> floxed arm Rev	23 base	TTTCCTGCTCAGGCTTCTTCCAG
③	<i>Adrb1</i> floxed arm Fwd	20 base	AACCACTGTGGACAGCGATT
④	<i>Adrb1</i> frt/Neo/frt/loxP Fwd	25 base	CCTCCCACTCATGATCTATAGATCC
⑤	<i>Adrb1</i> 3 prime arm Rev	22 base	GAAAGCCAGGTGATAGACTCCA
⑥	Cre Fwd	19 base	ATGTCCAATTTACTGACCG
⑦	Cre Rev	21 base	TAACCAGTGAAACAGCATTGC

②RNA の定量的評価

取得された組織での mRNA 発現量を定量評価するため、real-time PCR（以下 RT-PCR）を行った。以下に記述のいずれの試薬も製品プロトコルに沿って使用した。

前述の通り取得・保存を行った組織サンプルに対して、TRIzol reagent (Invitrogen 社製)を用い、対象サンプルの RNA transcriptome を抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied biosystems 社製) を用いて逆転写反応を行い、RNA を cDNA へと変換した。得られた cDNA をサンプルとして THUNDERBIRD® qPCR Mix (TOYOBO 社製) に表 3 に示すプライマーと共に加えて調製し、Quant Studio 5 (Applied biosystems 社製) を用いて RT-PCR と $\Delta\Delta$ Ct 法による Ct 値を得た。細胞の生存に必須の遺伝子である、house keeping gene として知られる *Gapdh* 遺伝子の発現量で除した値を、各遺伝子の相対的な発現量として算出・比較した。

表 3. RT-PCR を行う際に用いたプライマー

<i>Adrb1</i>	Fwd	21 base	CCTAGAGGGCAAACCCTTGTG
	Rev	22 base	TGCACAGAGTGAGGTAGAGGAC
<i>Adrb2</i>	Fwd	19 base	TGCTATCACATCGCCCTTC
	Rev	20 base	ACCACTCGGGCCTTATTCTT
<i>Adrb3</i>	Fwd	18 base	CAGCCAGCCCTGTTGAAG
	Rev	21 base	CCTTCATAGCCATCAAACCTG
<i>SerCa2a</i>	Fwd	20 base	TACTGACCCTGTCCCTGACC
	Rev	20 base	CTGCTCCCCAAACTCGTCTA
<i>RyR</i>	Fwd	20 base	AAGTCCCACAACCTTTAAGCG
	Rev	19 base	TCTTCTTGGTGCGTTCCTG
<i>PLB</i>	Fwd	24 base	ATGACGACGATTCAAATCTCTTGG
	Rev	23 base	TGGGTTTGCAAAGTTAGGCATAA
<i>Gapdh</i>	Fwd	20 base	CATGGCCTTCCGTGTTCTTA
	Rev	22 base	CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT

③組織標本の作製と観察

前述の通り採取したマウス心臓検体を素早く 20%ホルムアルデヒド水溶液に液浸させ、Genostaff 社に依頼して HE 染色標本を作製した。作製されたスライドを倒立顕微鏡 (FSX100、Olympus 社製) にて観察・撮影を行った。

(8) データのグラフ作成と統計解析

上記の方法で得られたデータに対して、Microsoft Excel 2013 (Microsoft 社製) を用いてグラフ作成と t 検定を行った。t 検定については 2 群の分布は等分散であること前提とした比較を行い、有意差についてはいずれも $p < 0.05$ であることを基準とした。また標準偏差を算出しエラーバーとして記載した。

5. 結果

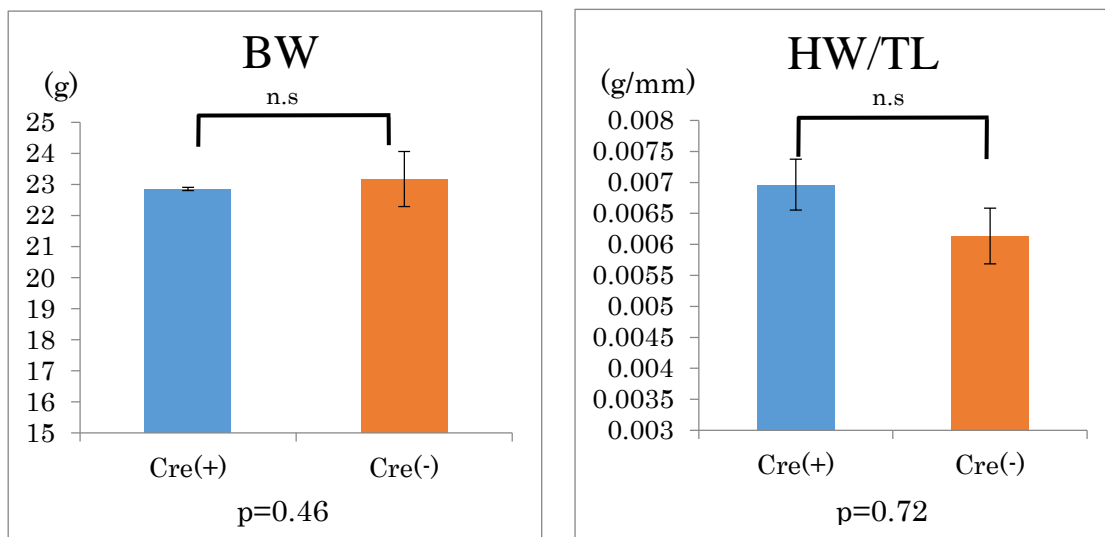
(1) β 1 受容体とマウスの体重・心重量の比較および成長・生殖について

前述の通り遺伝子型が決定されたマウスの内、*Adrb1* flox(+/+)のホモ接合体で α MHC-Cre が導入され *Adrb1* 遺伝子が心筋細胞特異的にノックアウトされた個体群 (Cre(+)) を、導入されず *Adrb1* floxed allele のみを有する個体群 (Cre(-)) を対照として 7 週齢の時点で比較したその結果を図 3 として示した。心重量については脛骨長で除した値を採用し表現型を比較した。体重と心重量は、心重量において Cre(+))群で増大する傾向にあったが、両側 t 検定で 2 群間を比較し、体重で $p=0.46$ 、心重量/脛骨長で $p=0.72$ と 2 群間で有意な差を認めなかった。

マウスの外見には大きな差を認めず、成長についても一見して認識できる明瞭な差や明らかな奇形発生は観察されなかった。また全身的な *Adrb1* ノックアウトマウスにおいては 8 ~ 9 割が胎生致死となる報告もあったが、前述の通り生殖に関しても Cre(+))個体と Cre(-))個体で出生率に著明な差はなかった。

図3. マウスの体重と心重量 (週齢7)

(n=3:3、いずれの群もオス個体)



体重 (BW:body weight)、心重量 (HW:heart weight)、脛骨長 (TL:tebia length)、有意差無し (n.s:not significant) として示す。

(2) RT-PCR による mRNA の発現に関する定量的評価

作成されたマウスの遺伝型において floxed allele と α MHC promoter Cre がそれぞれ遺伝子組み換えされていることは前述の方法で確認できたが、実際に心筋細胞において loxP/Cre システムによる条件的遺伝子ノックアウト系が機能し、 β 1 受容体の発現が消失していることを確認するため、取得した心臓を検体として *Adrb1*~3 および *Gapdh* の mRNA 発現量について RT-PCR を行って *Adrb1*~3 の各測定値を *Gapdh* の測定値で除した値を各遺伝子の発現量の定量評価とした。また、心臓での特異性を確認するためマウスにおいて心臓の他に *Adrb1* が発現している腎・脳を検体として *Adrb1* と *Gapdh* の mRNA 発現量を同様に測定し除した値を算出した。その結果を図 4 に示す。

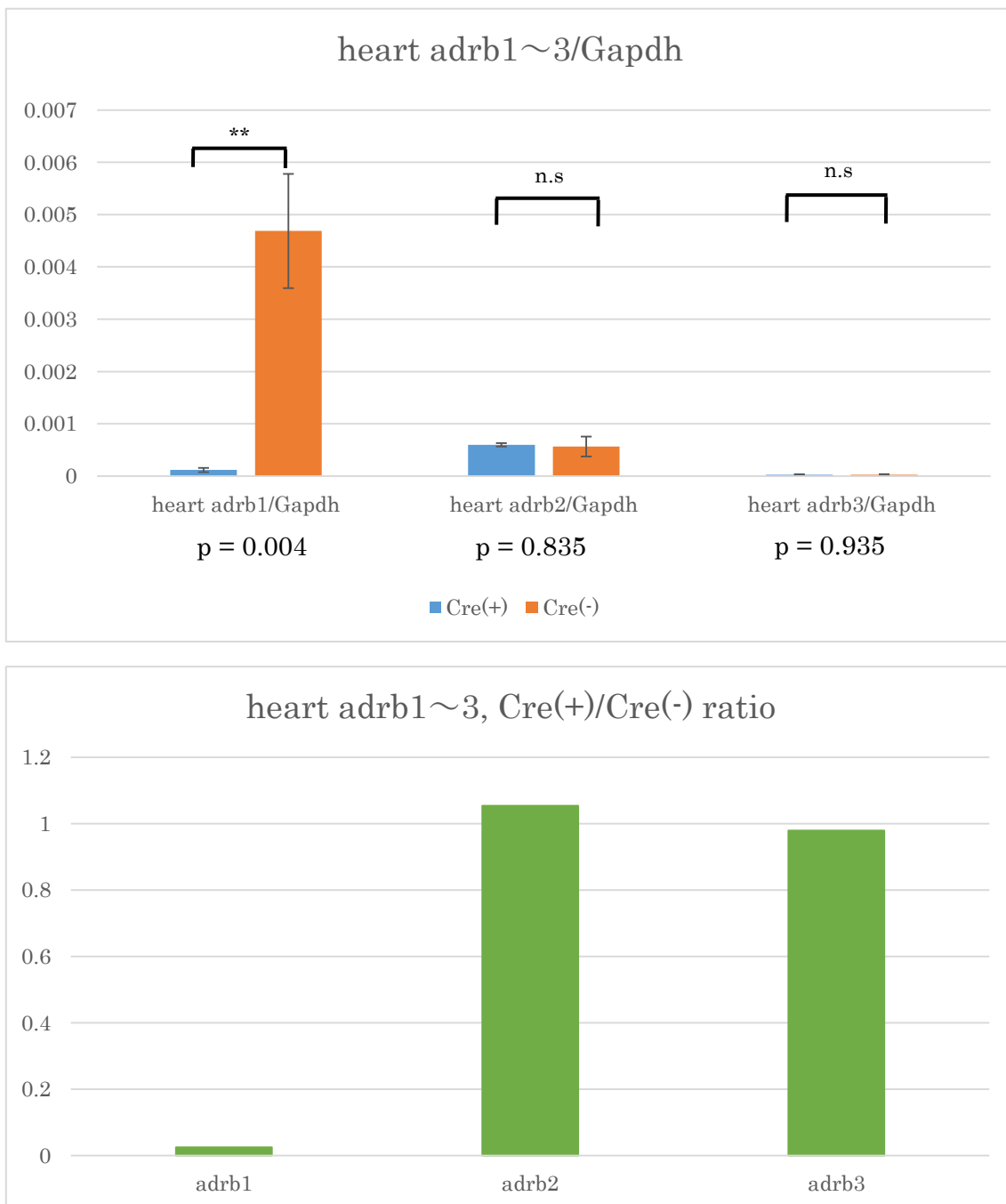
Adrb1 の mRNA は Cre(+)群でほぼ消失しており、ノックアウト系は機能していることが示された。*Adrb2*、*Adrb3* については Cre(+)群と Cre(-)群で発現は変化しておらず、Cre(+)/Cre(-)の割合はほぼ 1 であった。腎・脳における *Adrb1* の発現は検体毎にばらつきが大きいものの心臓で見られた極端な発現低下は見られず、*Adrb1* の偶発的な全身でのノックアウトではなく心筋細胞特異的なノックアウトであることが示された。

次に β 1 受容体からの細胞内シグナル伝達の結果修飾されることが予想される Ca handling を司る遺伝子 3 種に関して、Cre(+)群と Cre(-)群で同様に発現量を定量し、比較した。その結果を図 5 に示す。

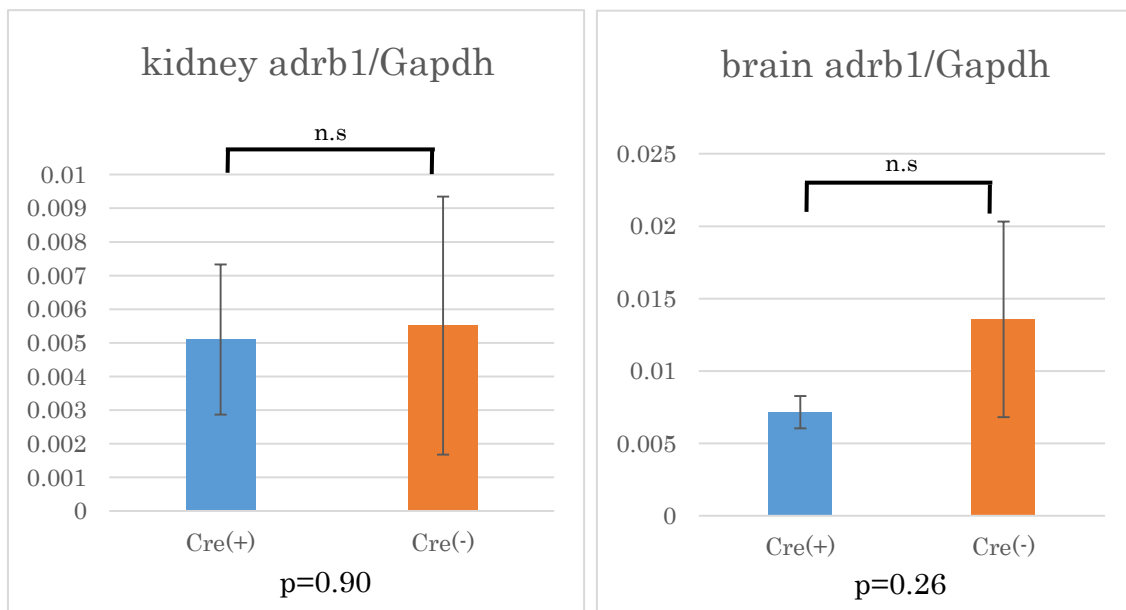
その他 3 種の遺伝子については心筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (*SerCA2A*) とリアノジン受容体 (*RyR*) において Cre(+)群で有意に発現が低下した結果であったが、ホスホランバン (*PLB*) においては、同様の傾向はあったもののばらつきが大きく有意な差は認めなかった。

図 4. *Adrb* 各サブタイプ遺伝子の心臓での発現量比較

(n=3:3、いずれの群も 10 週齢のオス個体)



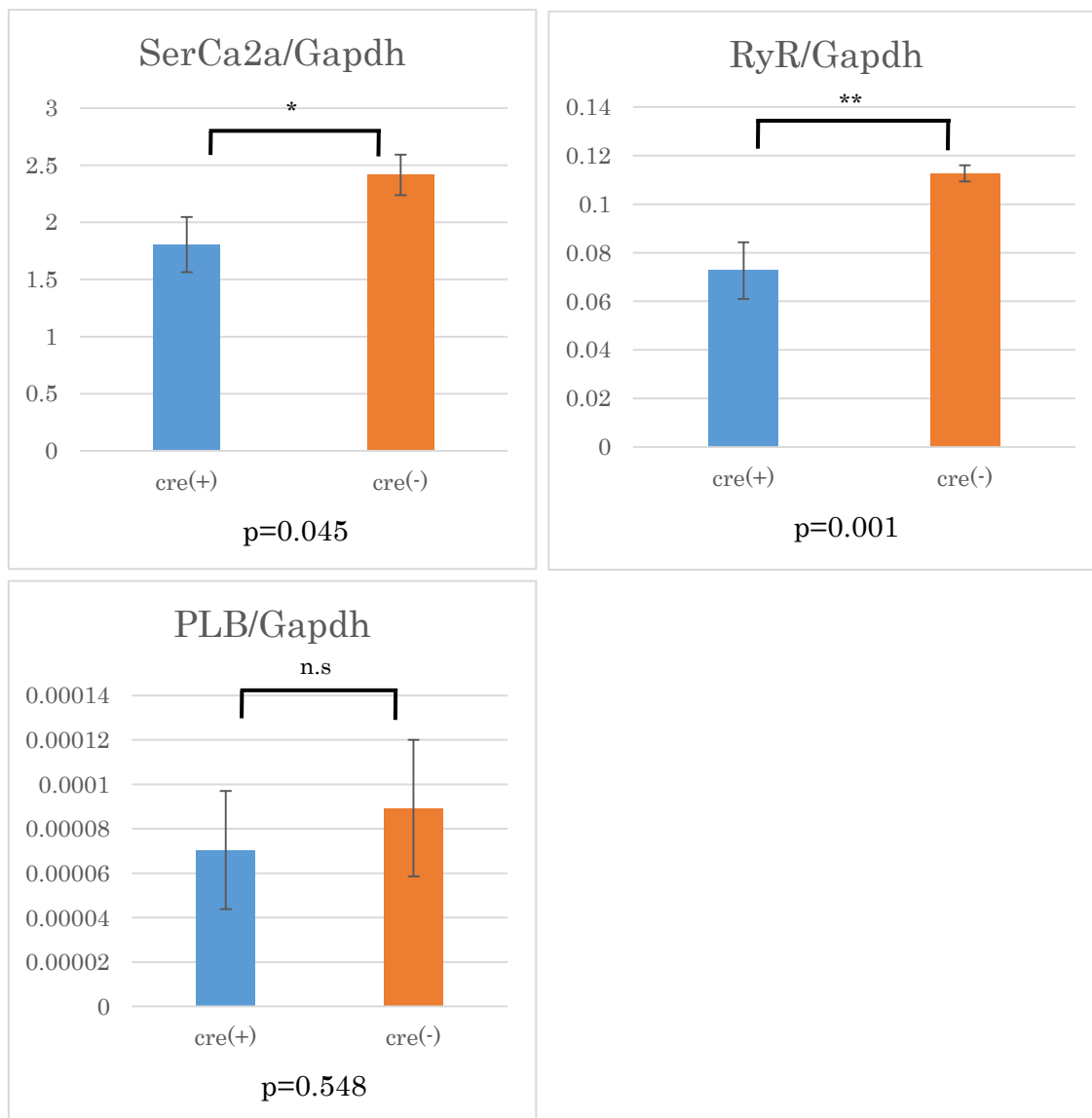
次頁へ続く



有意差無し (n.s.:not significant)、有意確率 5 %において有意差あり (*)、有意確率 1 %において有意差あり(**)として示す。

図 5. Ca handling に関する遺伝子の発現量比較

(n=3:3、いずれの群も 10 週齢のオス個体)



有意差無し (n.s.:not significant)、有意確率 5%において有意差あり (*)、有意確率 1%において有意差あり(**)として示す。

(4) 組織標本による比較

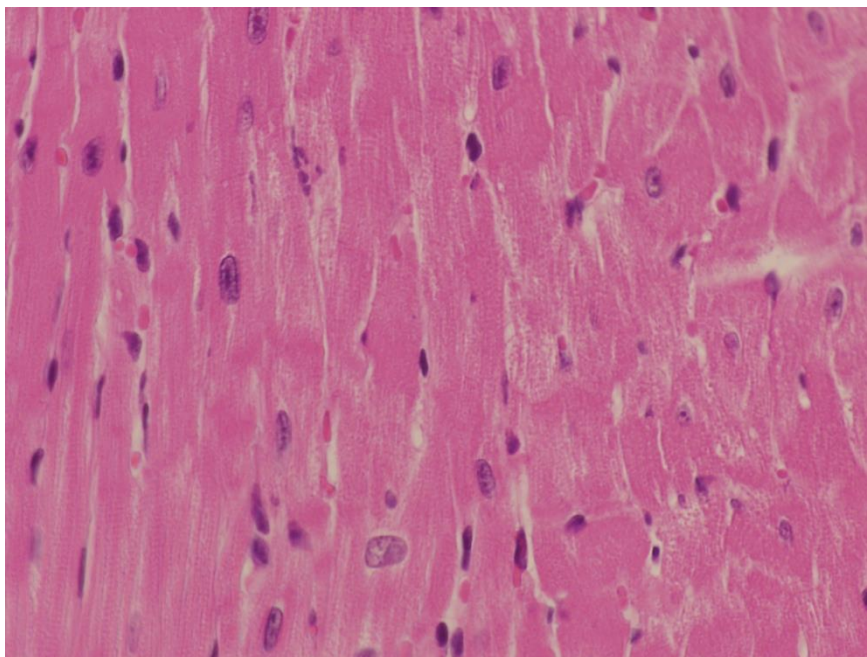
HE (hematoxylin-eosin) 染色による心臓短軸組織標本を観察した。その結果を全体像と400倍の強拡大像で図6に示す。HE染色において2検体に明らかな差異は認められず、縦横比は Cre(+)個体で0.848、Cre(-)個体で0.934であった。

図 6. HE 染色標本

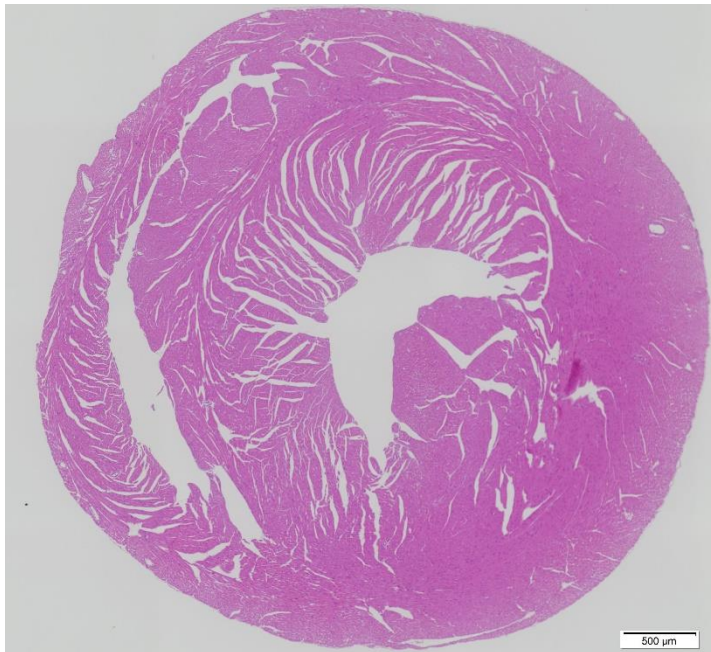
a.Cre(+)個体



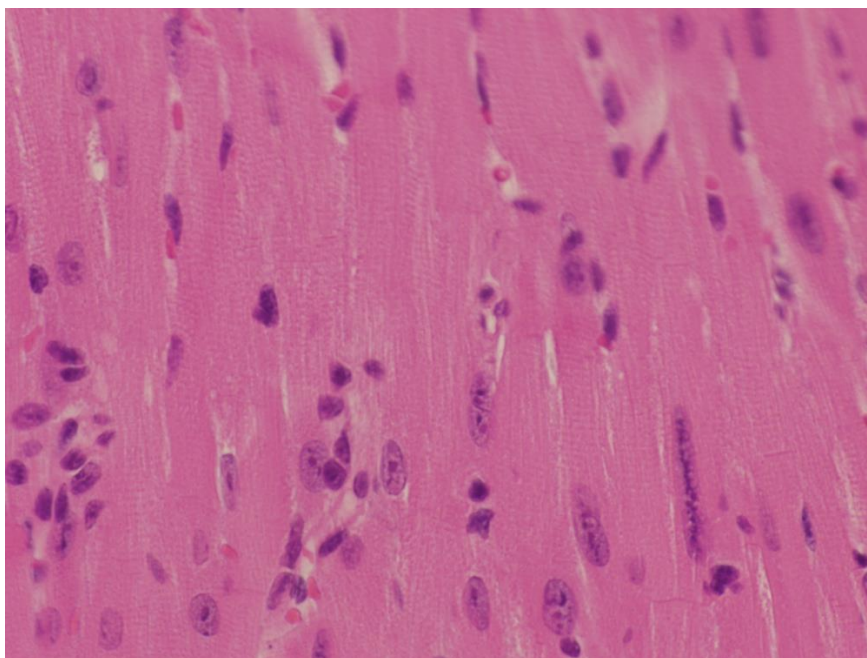
強拡大像 (400倍)



b.Cre(-)個体



強拡大像（400倍）



(3) 圧・容積曲線の測定による比較

マウスが生存下、陽圧換気下の状態において左室の圧・容積曲線を測定し、結果として最大左室内圧、心拍数 (HR)、左室容積が測定値として得られる。その測定値から前述の解析ソフトウェアによって心拍出量 (CO)、左室駆出率 (EF)、収縮期血圧 (P max)、左室内圧の時間変化率の最大値 (dP/dt max) と最小値 (dP/dt min)、dP/dt max を測定した時点での血圧で補正した値 (dP/dt max/IP)、 τ (tau)、大動脈のエラスタンス (Ea) を算出した。EF、dP/dt max、dP/dt max/IP は心臓の収縮能の指標となり、いずれも収縮能が増大すると値が上昇する正の相関関係にある。また dP/dt min、 τ (tau) は拡張能の指標でありいずれも拡張能が増大すると低下する負の相関関係にある。 τ (tau) は等容弛緩期の左室圧曲線の減衰時定数であり、拡張能の低下によって左室圧下降脚の傾きがなだらかになるほど τ (tau) が延長する。Ea は大動脈によって生じる弾性抵抗を示している。

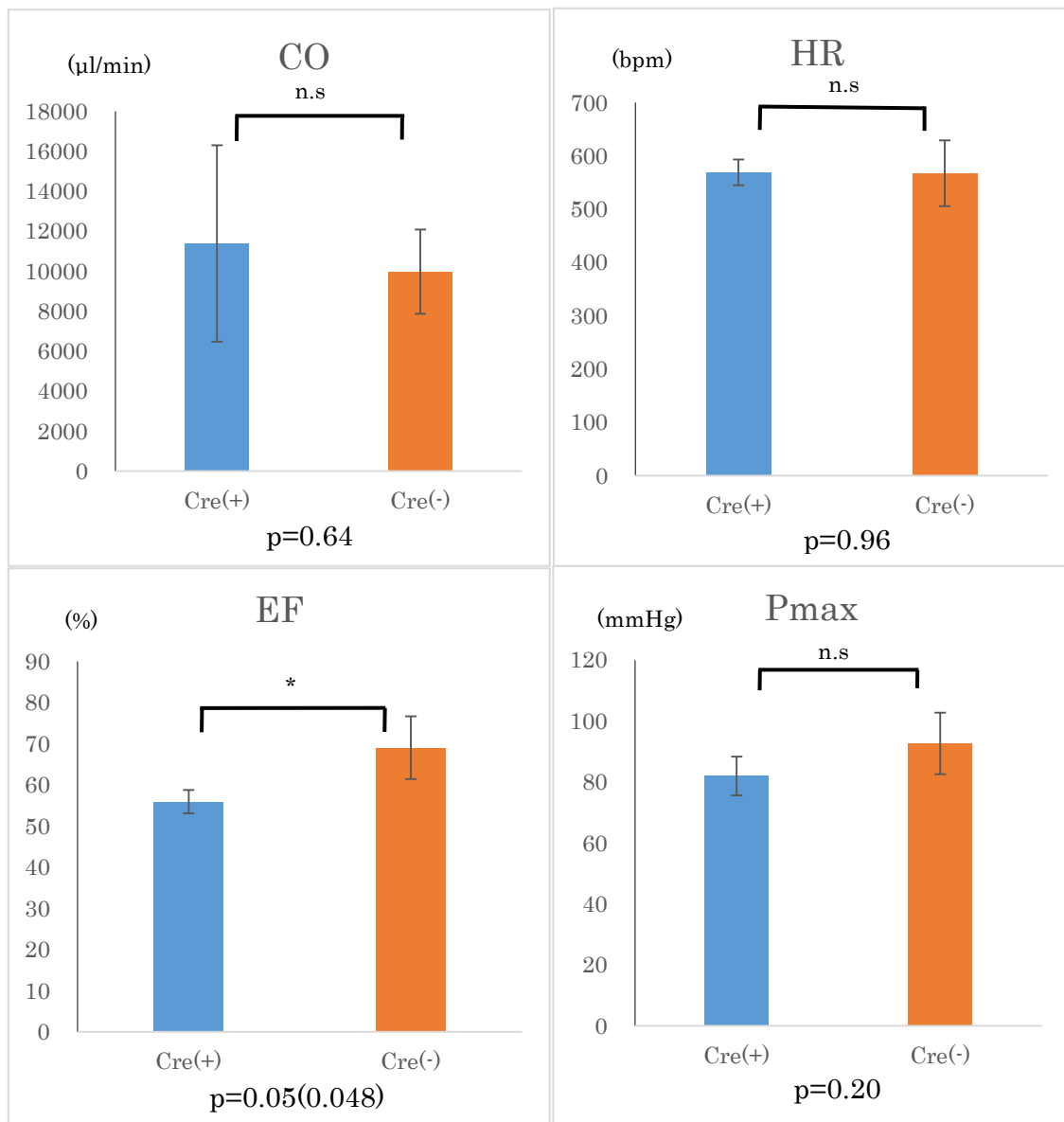
以上の算出された循環パラメーターについて Cre(+)群と Cre(-)群で比較を行った。

①Baseline の循環パラメーター

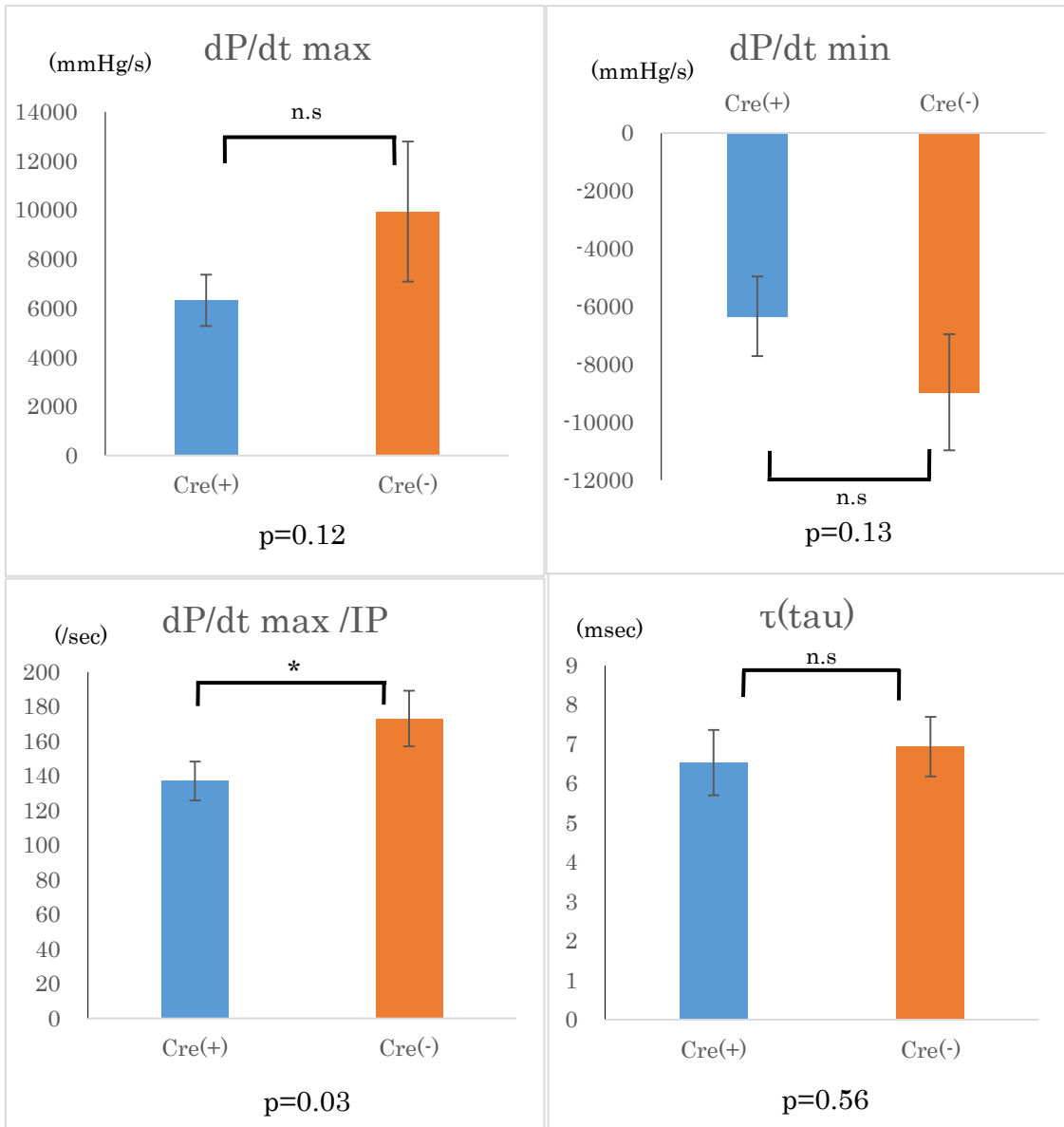
上記の手順によって得られた結果を図7に示す。CO はばらつきが大きく2群間で有意差は認めなかった。HR と P max ついても2群間で差は無く、dP/dt max では有意差を認めなかったものの、その際の血圧によって補正した dP/dt max/IP と EF では有意差を持って Cre(-)群が高く、収縮能の指標のいくつかにおいて Cre(-)群が Cre(+)群を上回った。dP/dt min では Cre(-)群でより低い(絶対値として大きい)傾向がみられたが有意差は認めなかった。 τ (tau)は両群間で有意な差を認めなかった。大動脈の血管抵抗の指標となる Ea についてもばらつきが大きく両群間で有意な差を認めなかった。

図 7. Baseline の循環パラメーター

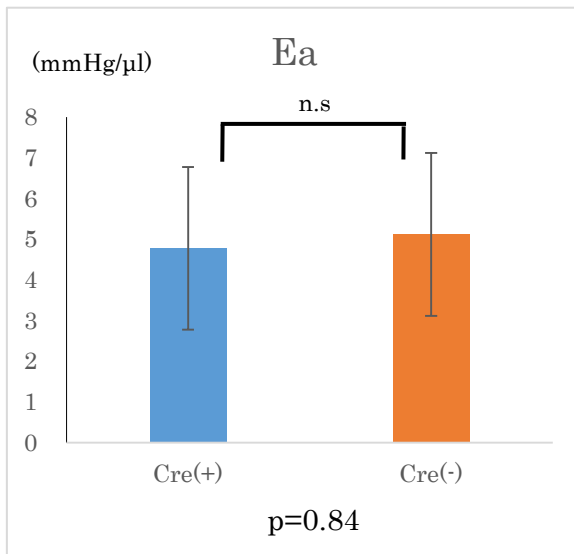
(n=3:5、いずれの群も 7 ~ 12 週齢のオス個体)



※次頁へ続く



※次頁へ続く



心拍出量 (CO:cardiac output)、心拍数 (HR:heart rate)、左室駆出率 (EF) 左室内腔圧最大値 (Pmax)、左室内腔圧の時間変化率の最大値 (dP/dt max)、左室内腔圧の時間変化率の最小値 (dP/dt min)、dP/dt max の圧補正值 (dP/dt max/IP)、 τ (Tau)、大動脈のエラスタンス (Ea) として、また有意差無し (n.s:not significant)、有意確率 5 %において有意差あり (*)、有意確率 1 %において有意差あり(**)として示す。

②Isoproterenol 負荷下の循環パラメーター

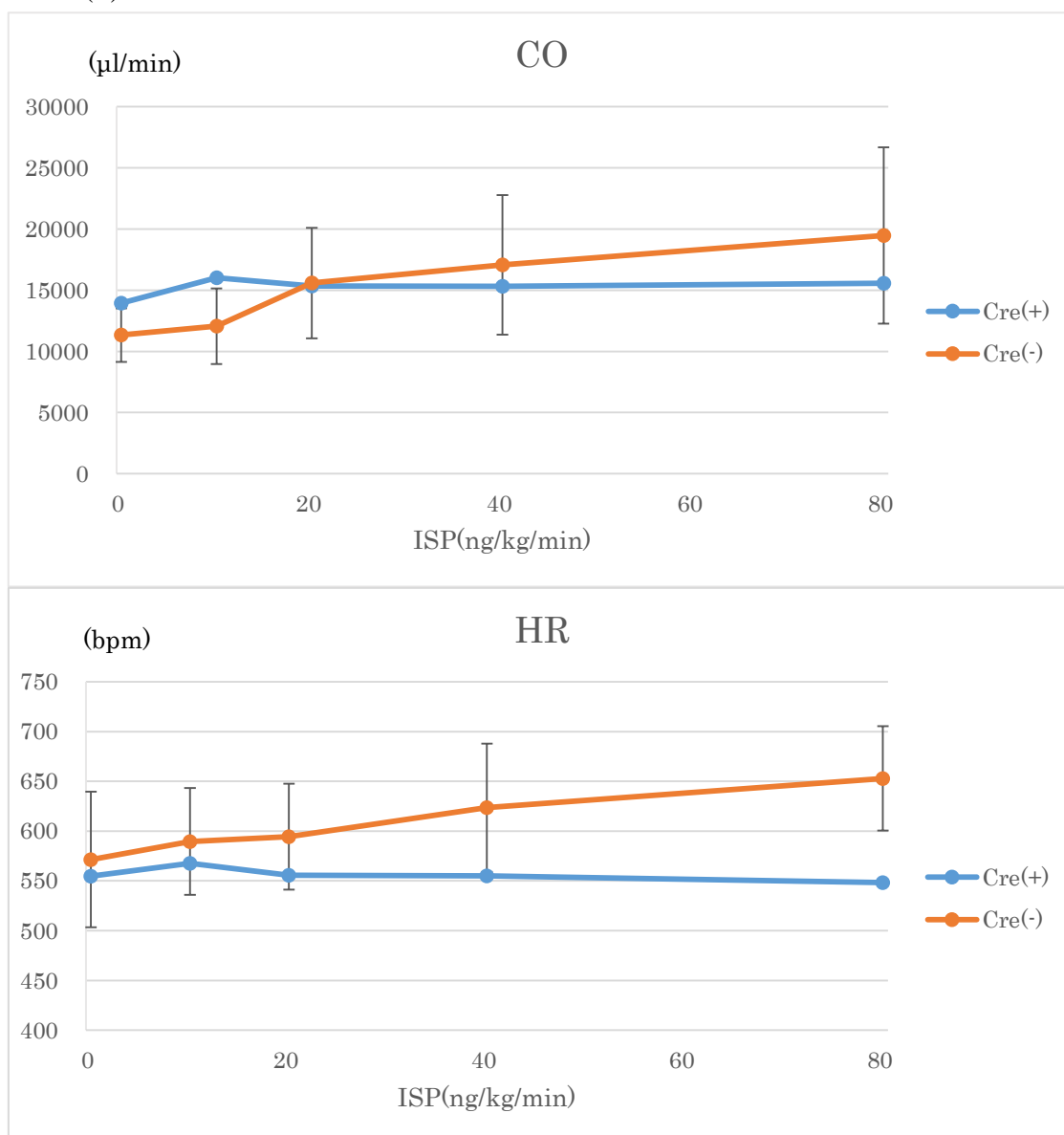
方法の項に記載の通り、内頸静脈にマイクロカテーテルに接続した 30G 針を刺入し、マウス 1 個体に対して 10, 20, 40, 80ng/kg/min と流量を漸増しながら Isoproterenol を持続静注し、その上で各流量での循環パラメーターを baseline と同様に測定、各流量での変化をグラフ化し Cre(+)群 2 匹と Cre(-)群 2 匹の 2 群間での比較を行った。その結果を図 8 に示す。

Isoproterenol は β 1 受容体の ligand として知られており、心筋細胞の β 1 受容体に作用して陽性変力・変時作用を生じることが既知⁴⁵である。この薬剤としての効能から推測される通り、Cre(-)群では HR や収縮能を反映する CO、EF、P max、dP/dt max、dP/dt max /IP については Isoproterenol 流量の上昇とともに増加する傾向を示したが、Cre(+)群では Cre(-)群で見られた収縮能の上昇を示す反応は認められなかった。一方で拡張能を反映する dP/dt min においては大きな変化は見られなかった。もう一つの拡張能のパラメーターである τ は Isoproterenol の投与開始によって両群ともに低下し、その後流量の増加に伴い差が開く結果となっているが、上昇に転じた Cre(-)群においても baseline と同程度までは復帰しなかった。

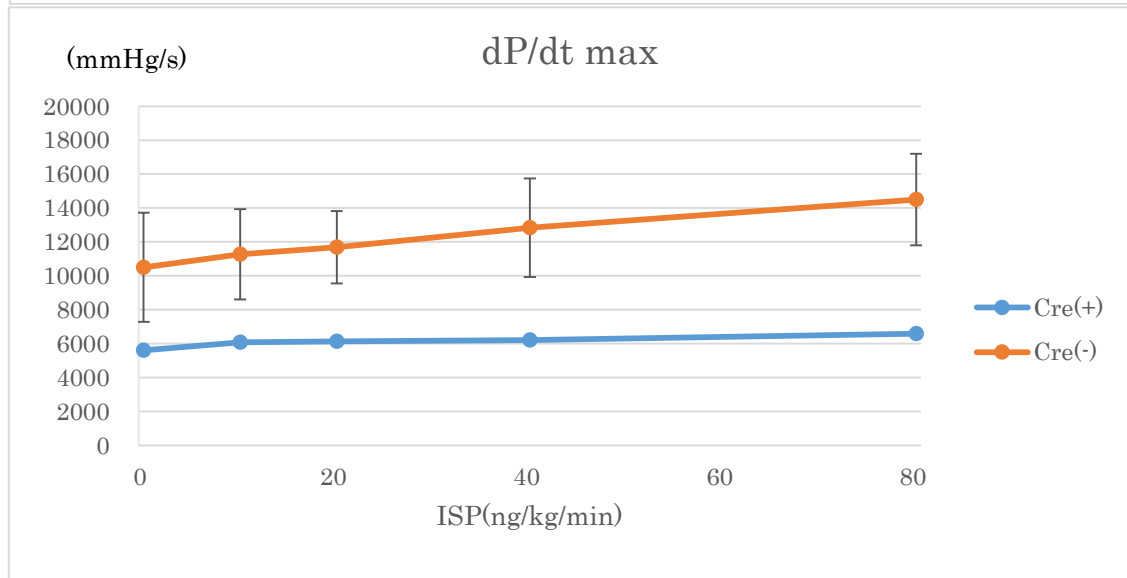
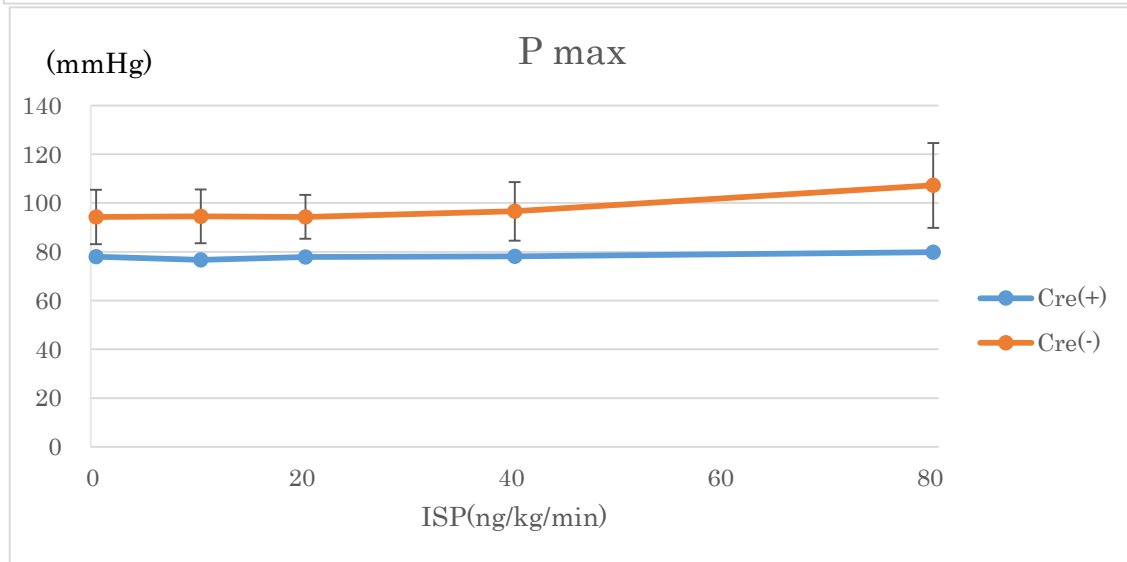
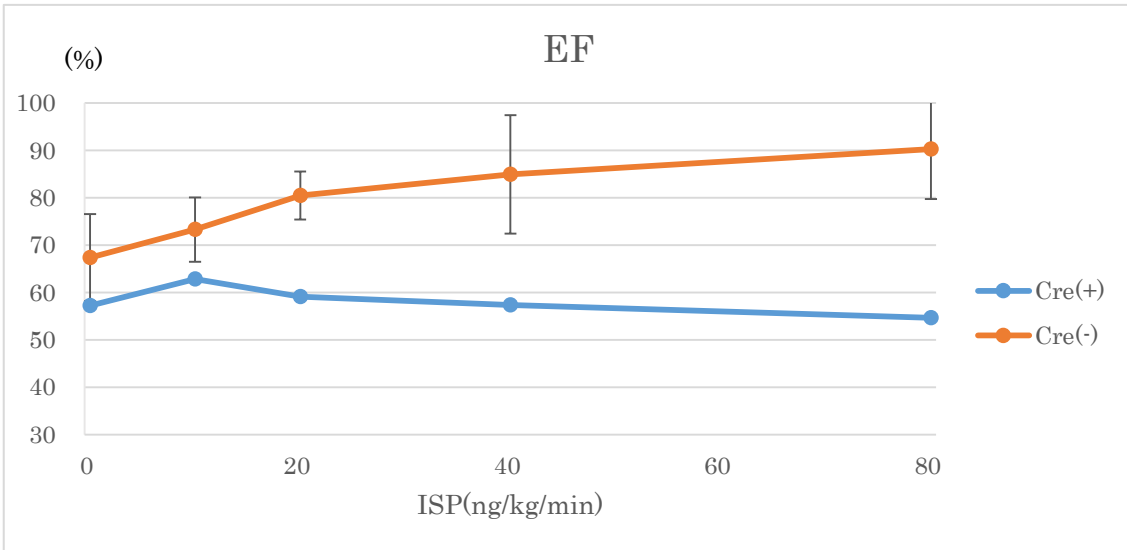
図 8. Isoproterenol 負荷増大に伴う循環パラメーターの変化

(n=2:4、いずれの群も 7～8 週齢のオス個体)

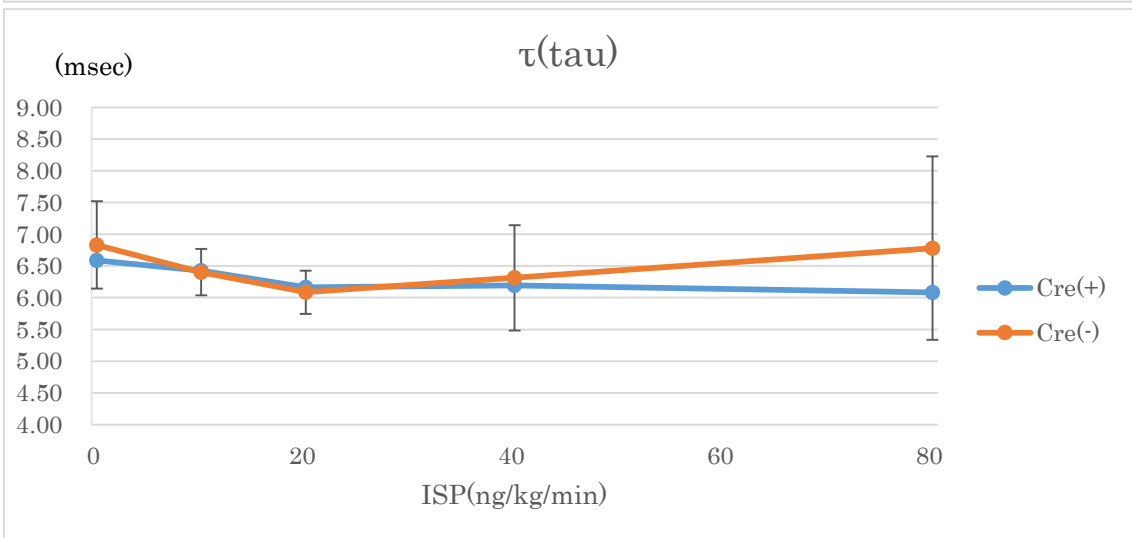
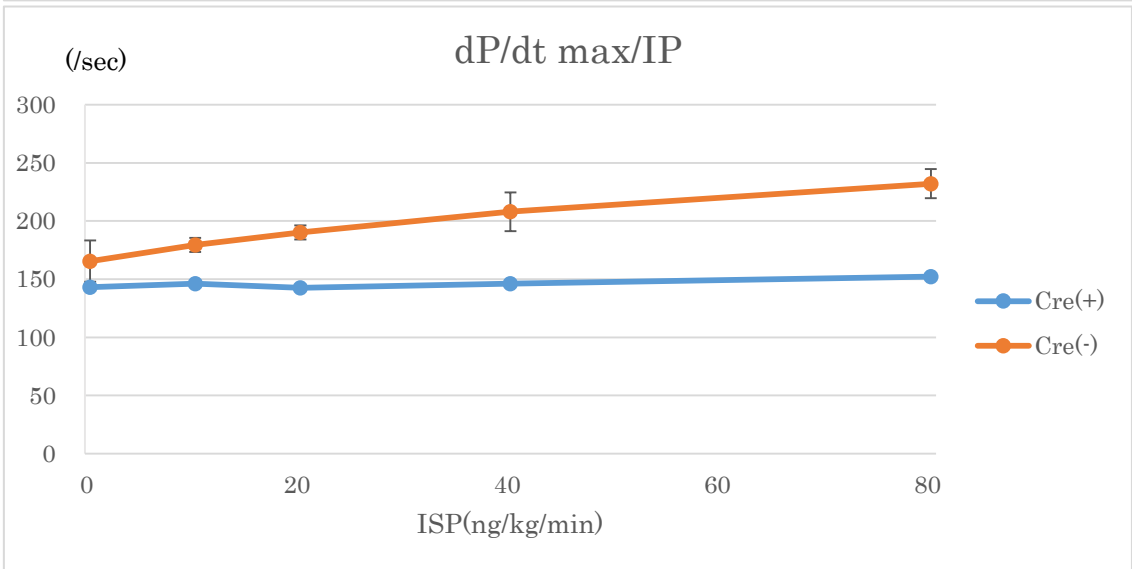
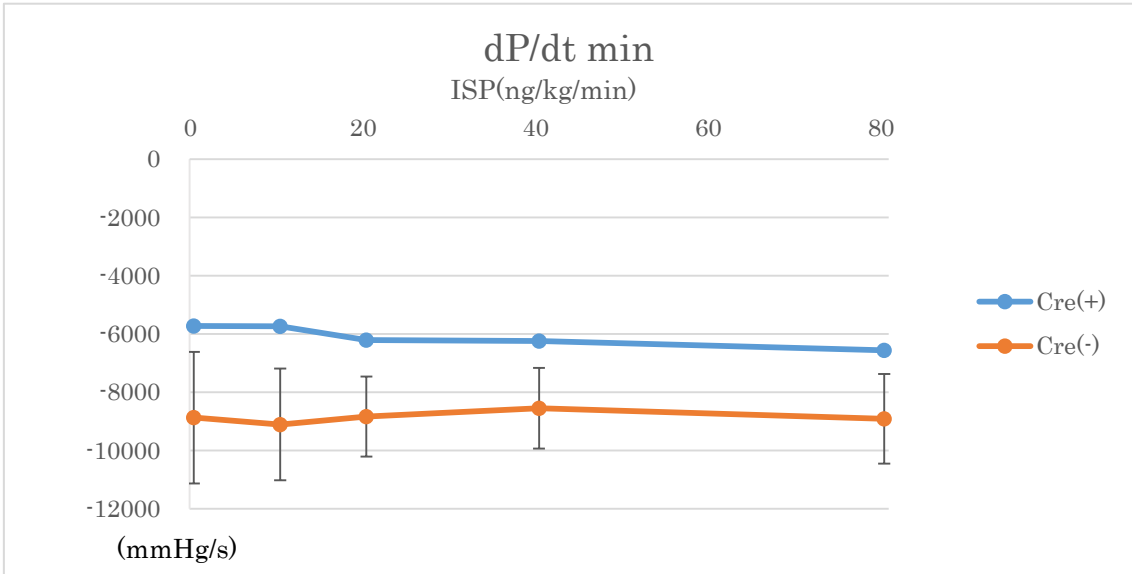
※Cre(+)群は n=2 であるためエラーバーを付加せず



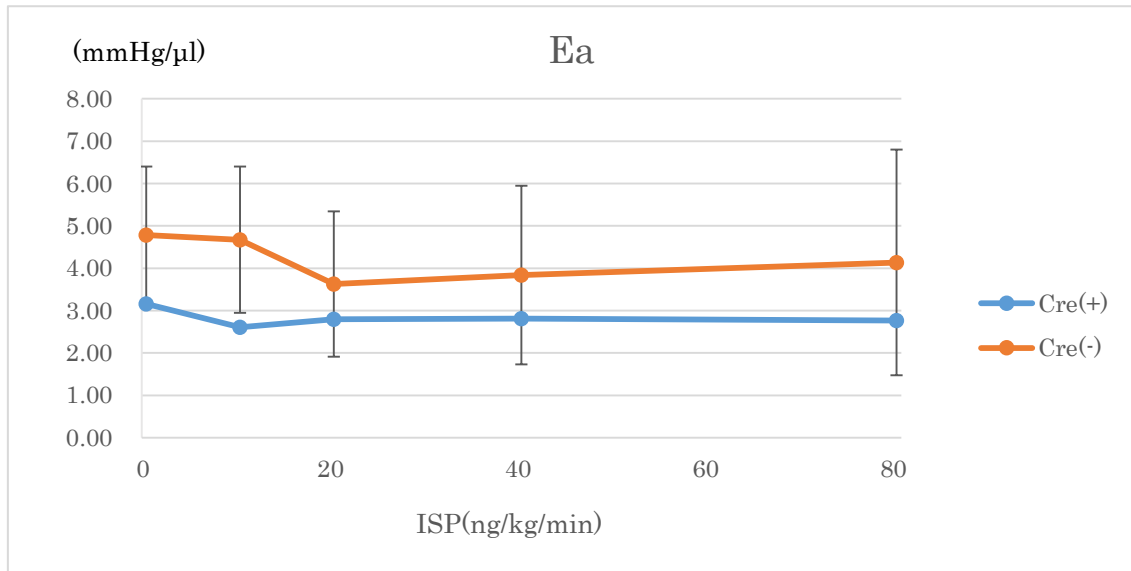
次頁へ続く



※次頁へ続く



※次頁へ続く



心拍出量 (CO:cardiac output)、心拍数 (HR:heart rate)、左室駆出率 (EF) 左室内腔圧最大値 (Pmax)、左室内腔圧の時間変化率の最大値 (dP/dt max)、左室内腔圧の時間変化率の最小値 (dP/dt min)、dP/dt max の圧補正值 (dP/dt max /IP)、 τ (Tau)、大動脈のエラスタンス (Ea) として、また有意差無し (n.s:not significant)、有意確率 5%において有意差あり (*)、有意確率 1%において有意差あり(**)として示す。

③Milrinone 負荷下の循環パラメーター

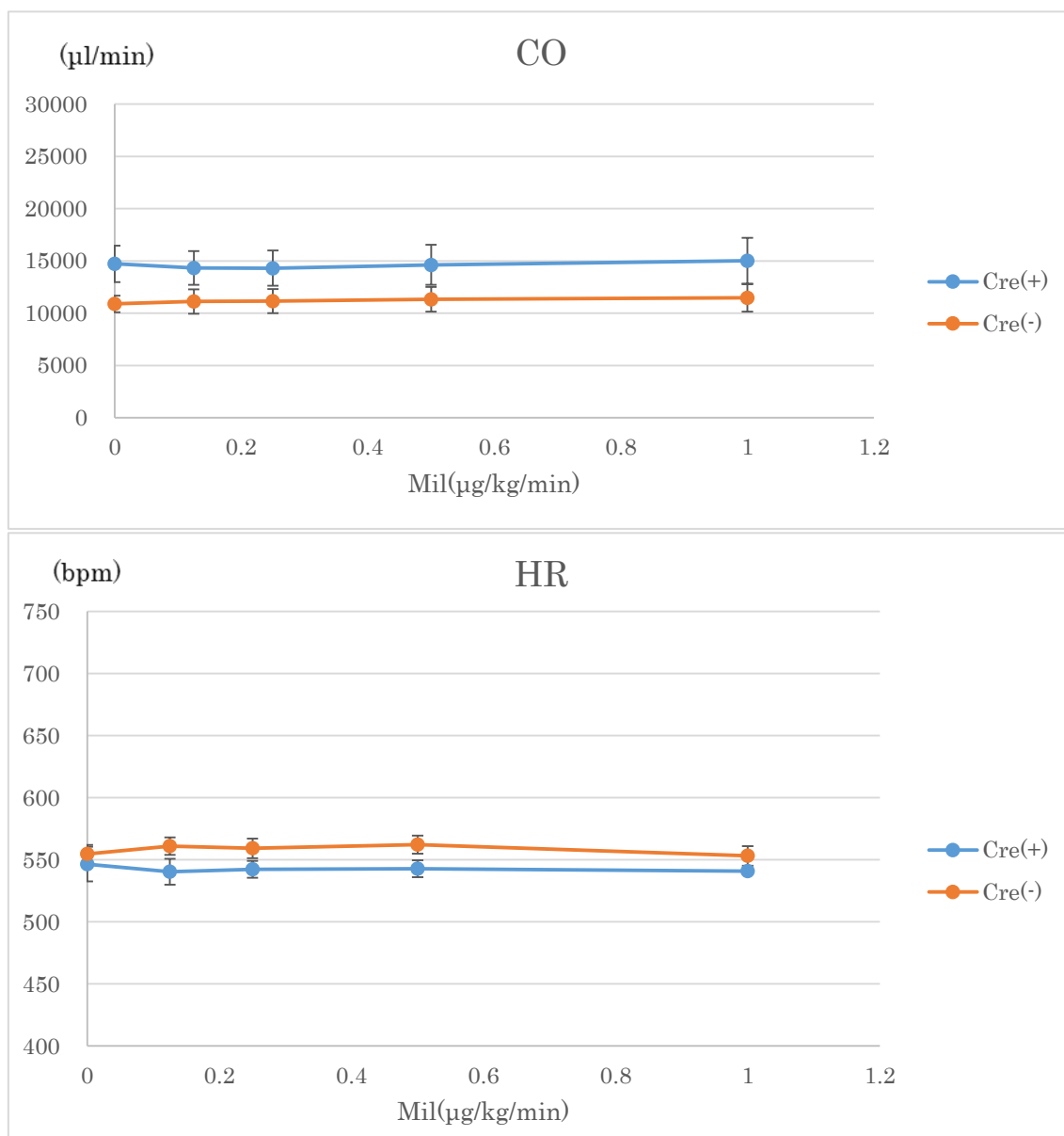
Milrinone は PDE3 阻害薬として薬剤として活用されており、細胞内において cAMP を分解する PDE3 の働きを抑制することによって cAMP 濃度を上昇させ、 β 1 受容体を介さずに cAMP 以降の β 1 受容体シグナルと同様の経路で陽性変力・変時作用を生じることが知られている。

Isoproterenol 負荷と同様の方法で Milrinone においても 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 μ g/kg/min の流量で、1 個体に対し漸増して持続静注し、各流量での循環パラメーターを測定した。Cre(+)群 3 匹に Cre(-)群 4 匹において測定されたパラメーターを比較した。その結果を図 9 に示す。

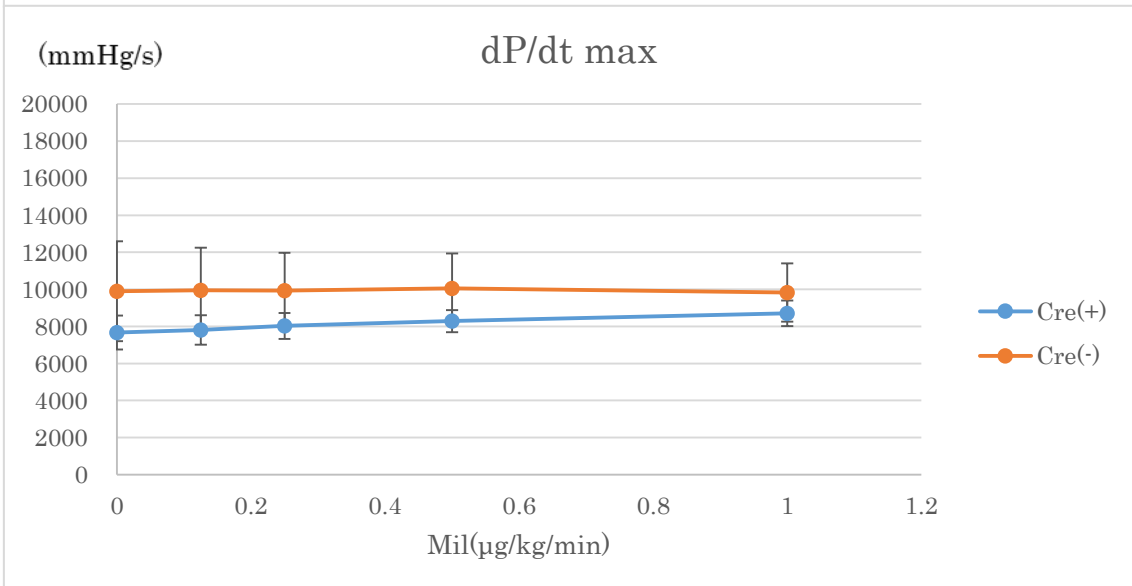
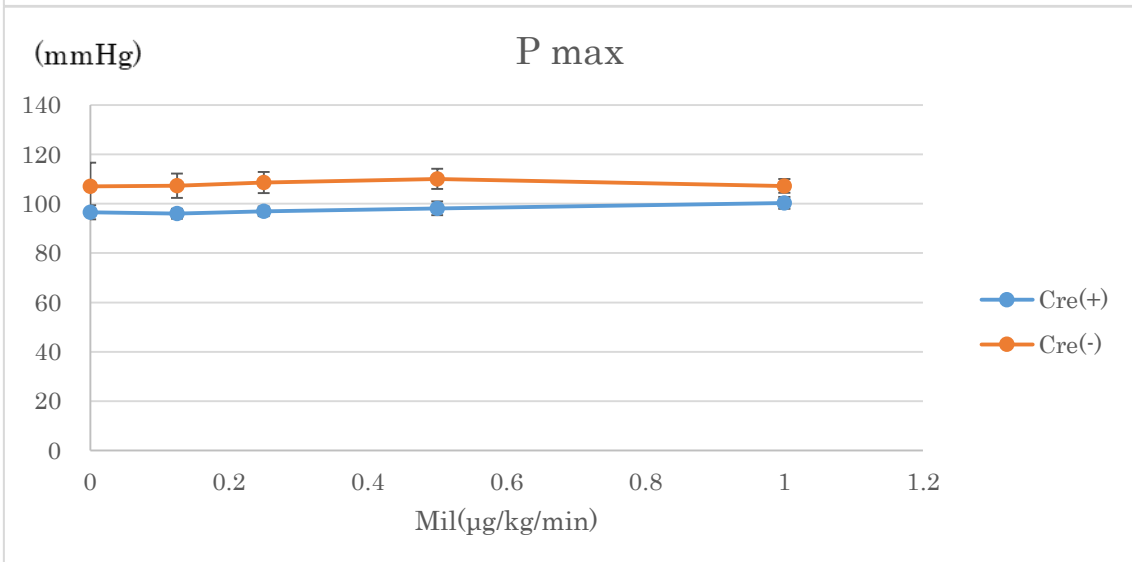
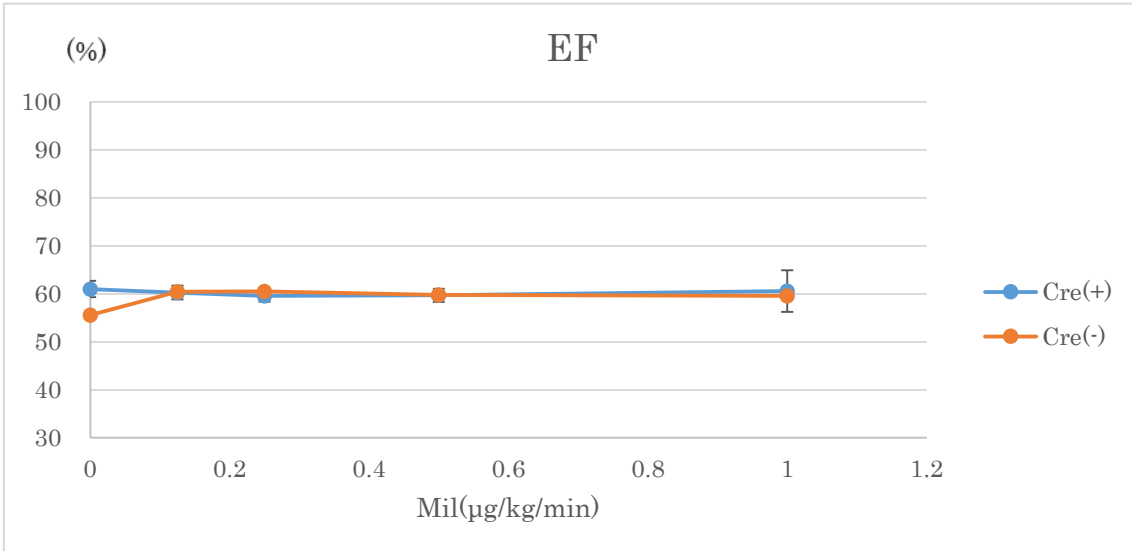
Isoproterenol 負荷の際に認められた HR や収縮能を反映するパラメーターの上昇は Cre(-)群、Cre(+)群のいずれにおいても認められなかった。CO は Milrinone 投与前より乖離を生じており、milrinone 投与によっても変化しなかった。dP/dt max や dP/dt min は baseline において 2 群間で乖離しており、Cre(-)群が Cre(+)群に catch up する傾向がみられたが、明瞭な変化ではなかった。

図9. Milrinone 負荷増大に伴う循環パラメーターの変化

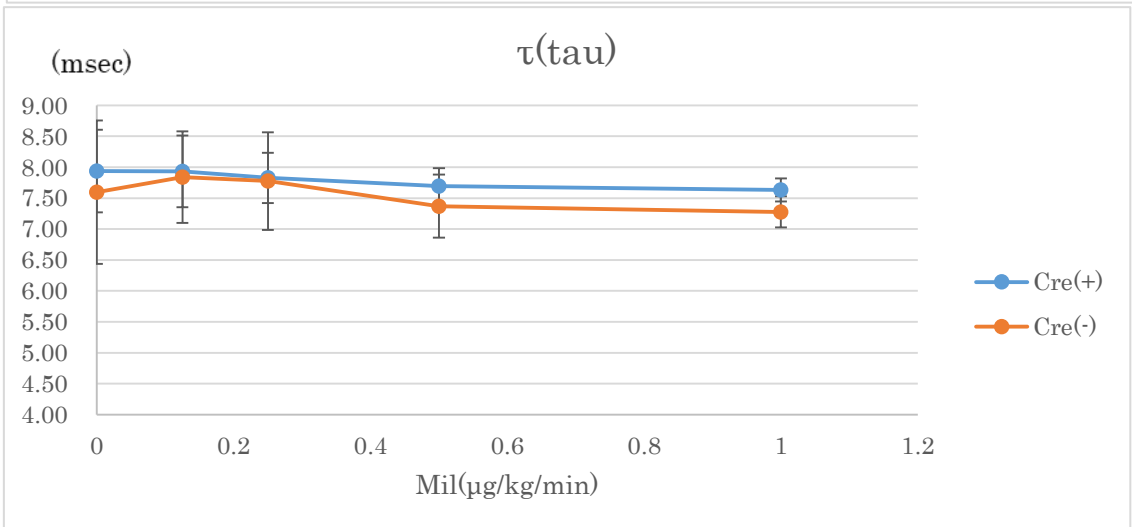
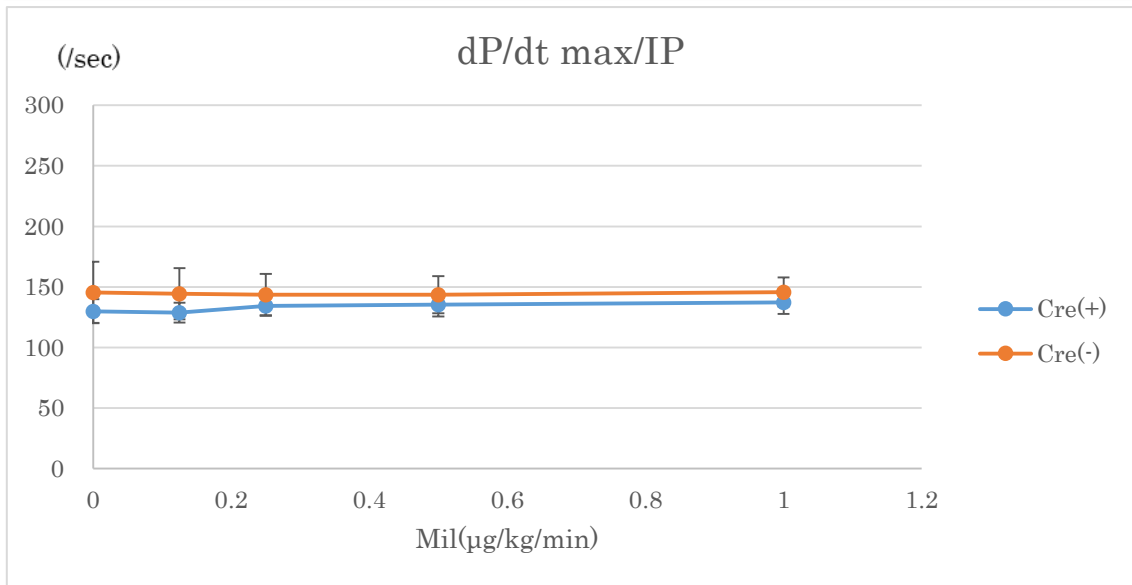
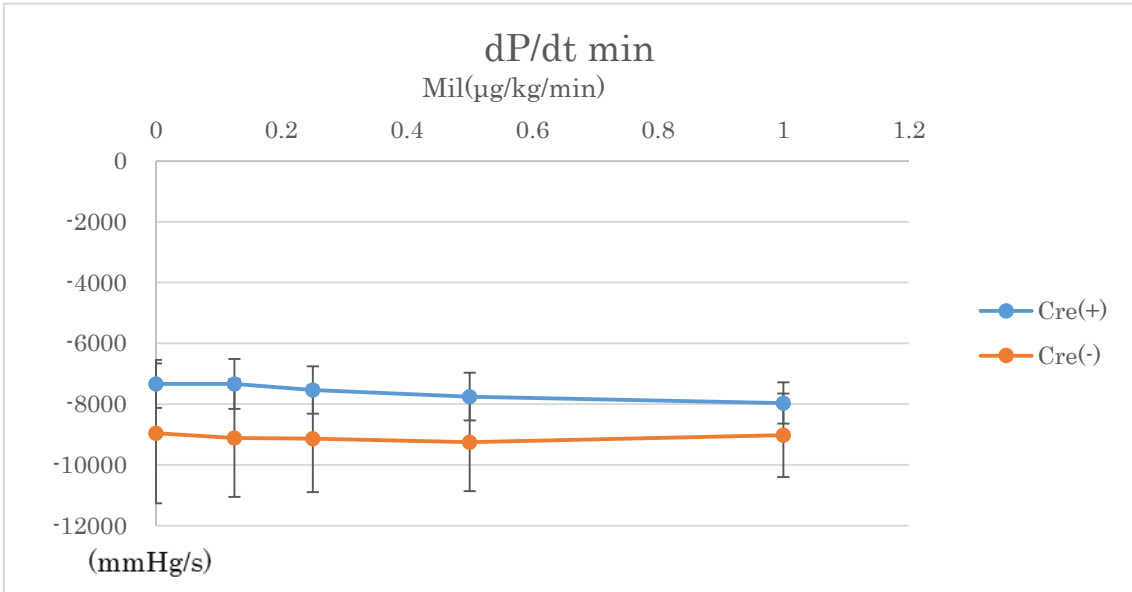
(n=3:4、いずれの群も9～11週齢のオス個体)



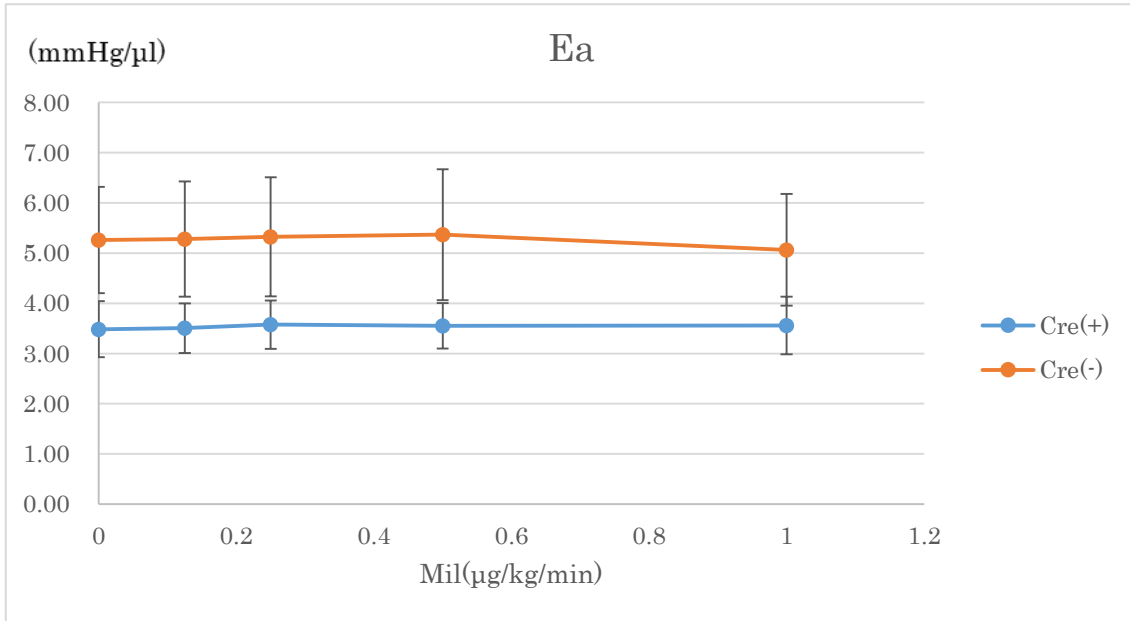
※次頁へ続く



※次頁へ続く



※次頁に続く



心拍出量 (CO:cardiac output)、心拍数 (HR:heart rate)、左室駆出率 (EF) 左室内腔圧最大値 (Pmax)、左室内腔圧の時間変化率の最大値 (dP/dt max)、左室内腔圧の時間変化率の最小値 (dP/dt min)、dP/dt max の圧補正值 (dP/dt max/IP)、 τ (Tau)、大動脈のエラスタンス (Ea) として、また有意差無し (n.s:not significant)、有意確率 5%において有意差あり (*)、有意確率 1%において有意差あり(**)として示す。

④腹部大動脈牽引時前後の循環パラメーター

対象マウスの腹部大動脈を牽引することによって急性の後負荷増大を発生させ、牽引前、牽引中、牽引解除直後、牽引解除 5 分後において循環パラメーターの測定を行った。その結果を図 10 に示す。

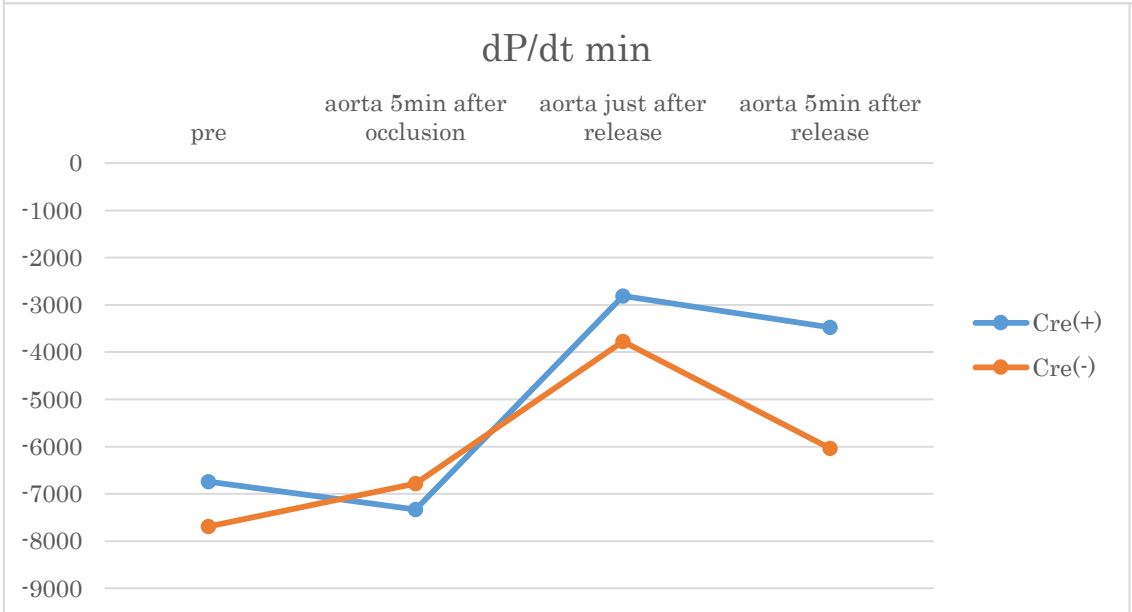
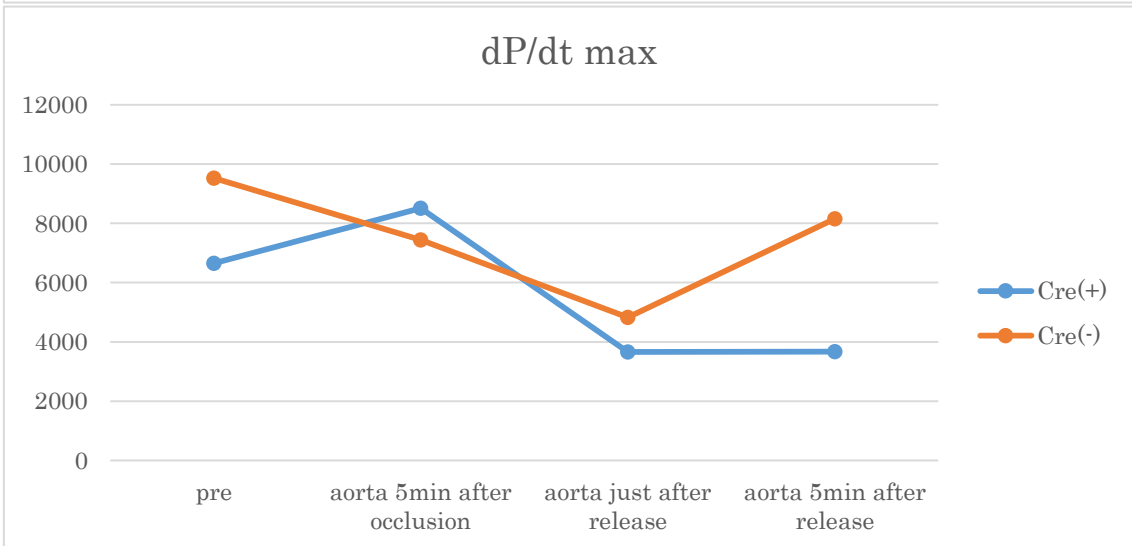
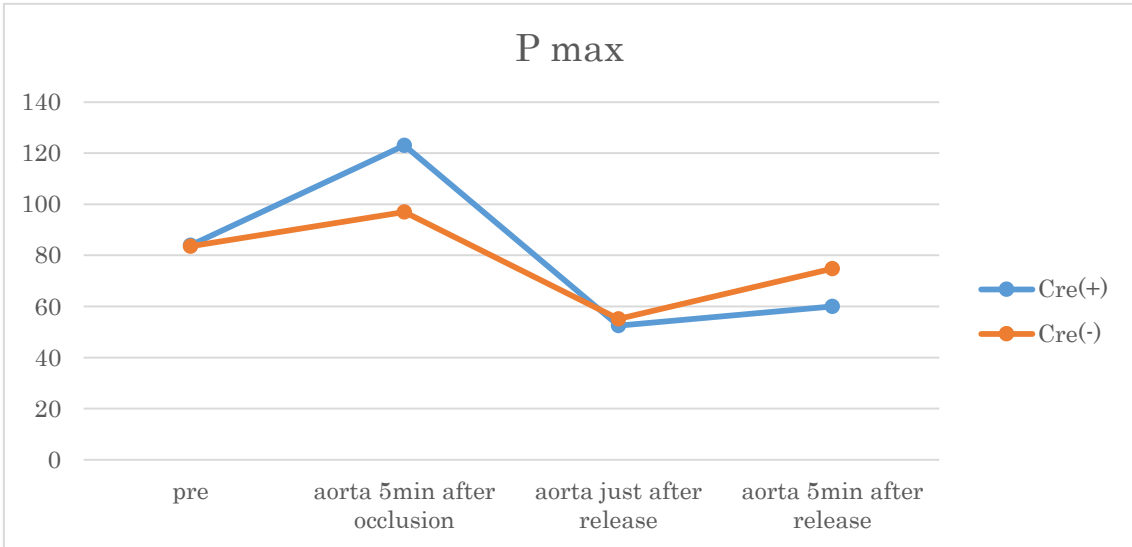
腹部大動脈の牽引によって HR は維持または低下する傾向にあり、CO と dP/dt max は両群ともに低下が認められた。両群間の明瞭な差異として β 1 受容体シグナルによって修飾されることが推測される HR と CO において、Cre(-)のマウスでは牽引解除直後から 5 分後にかけて baseline に向けての回復が認められるのに対し、Cre(+)のマウスでは HR と CO の低下が遷延し回復が認められないという現象が生じた。同じく収縮能の指標である dP/dt max、dP/dt max/IP についても Cre(+)群では Cre(-)群程の復帰を認めておらず、拡張能の指標となる dP/dt min、 τ (tau)についても牽引解除直後には低下していた拡張能が解除 5 分後には復帰する形をとっている。大動脈の血管抵抗の指標である Ea については Cre(+)群で CO 低下の遷延を代償したためか、Cre(-)群において見られるような再上昇を認めず、逆に下降している。

図10. 腹部大動脈牽引前後の循環パラメーター

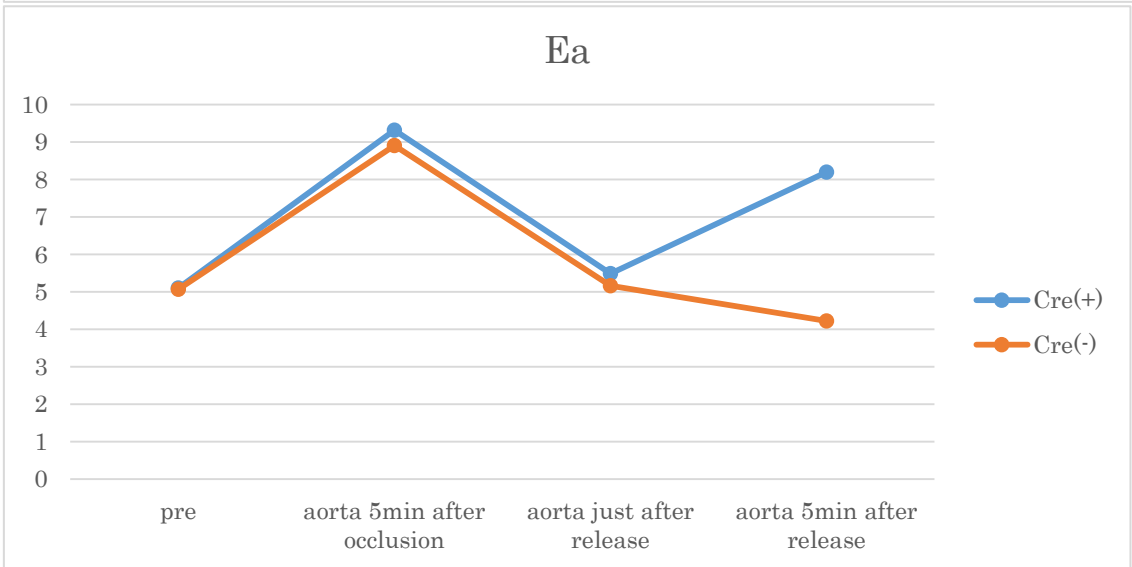
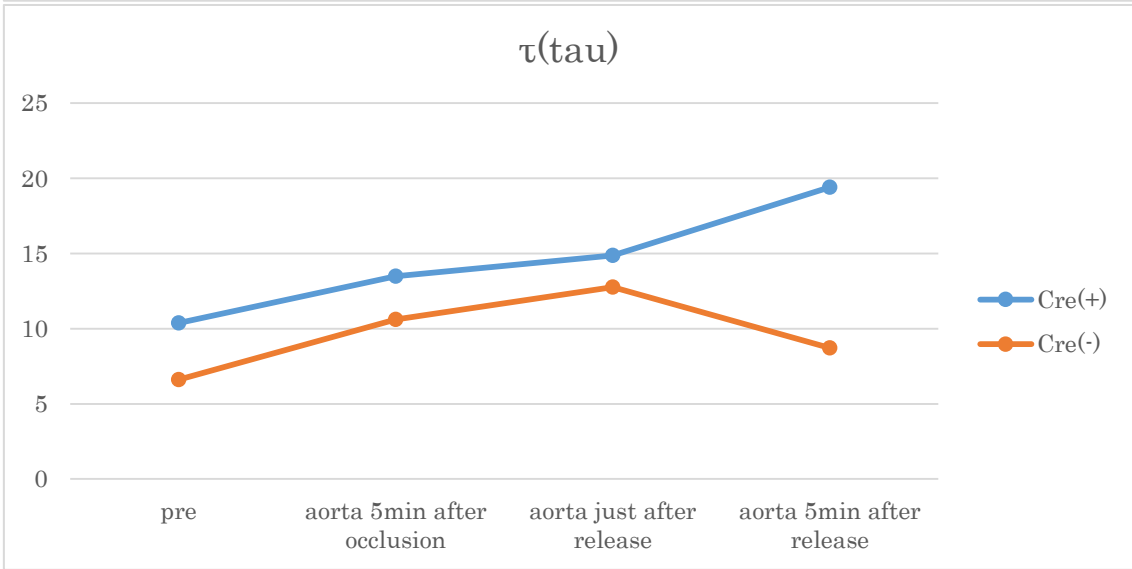
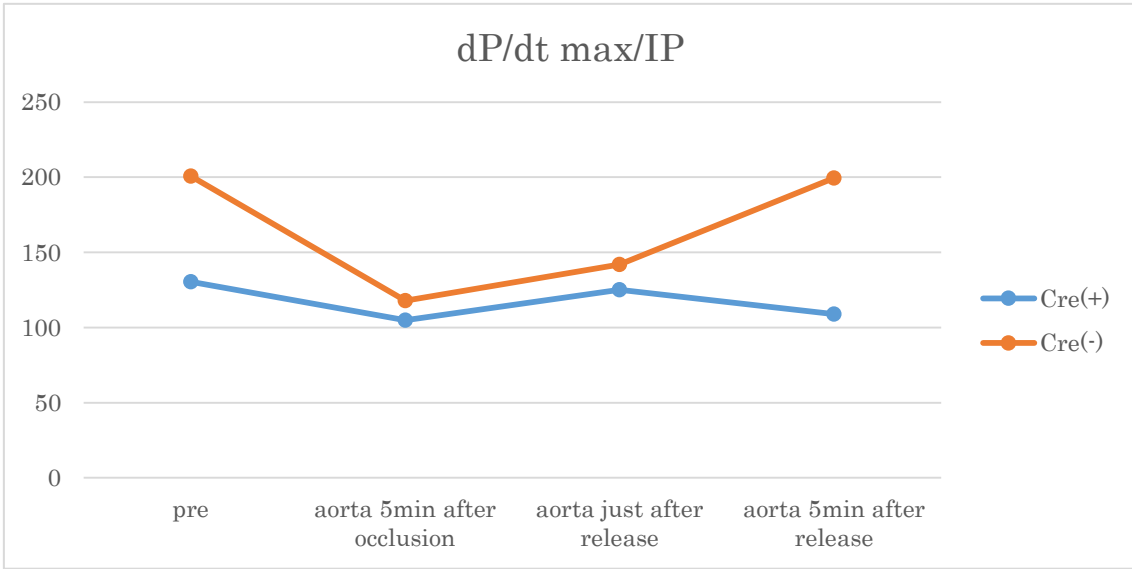
(各群オスメス各1匹の計2匹ずつ、いずれも7~8週齢)



※次頁へ続く



※次頁へ続く



(4) TAC 後マウスにおける心エコー所見の経時的変化

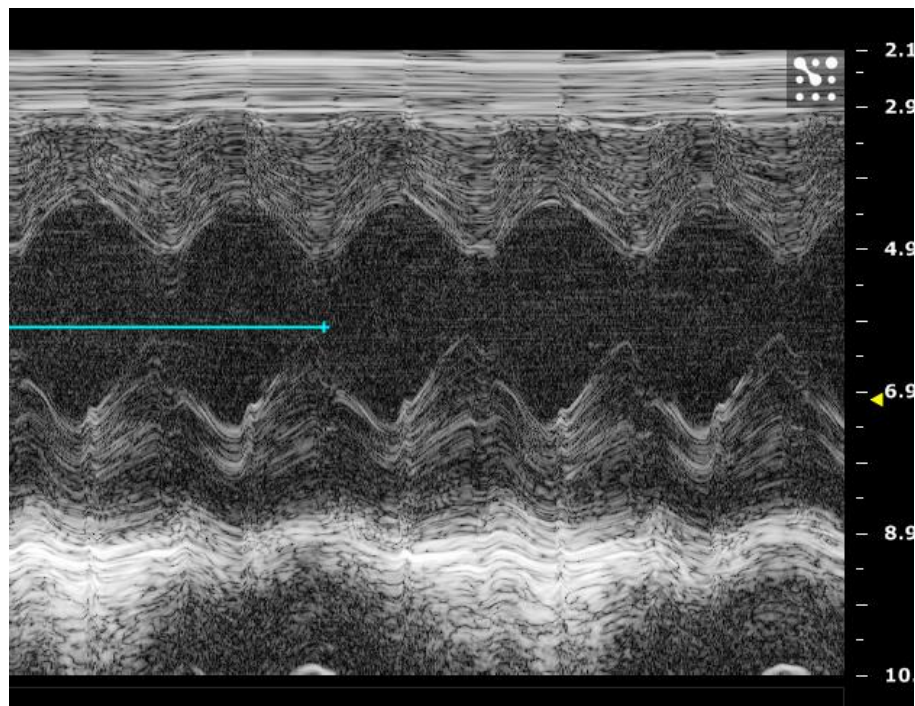
方法の項に記載の通り、胸部横行大動脈の結紮により、後負荷増大による心不全モデルをマウスに適用し、TAC 前、TAC 後 1 日目、3 日目、7 日目における心機能を心エコーにて非侵襲的に計測した。その結果を図 1 1 に示す。

a に示した TAC7 日後の M モード像において、Cre(-)マウスより Cre(+)マウスの方がより心拡大を呈し、収縮能も低下しているのが観察される。b に示した測定値においても Dd と LV mass の増大が顕著である。対して (IVS+PW) /2 で示される平均の左室壁厚は Cre(-)マウスにおいてより増大が認められる傾向にある。収縮能の指標である FS は Cre(-)マウスにおいて維持されているが、Cre(+)マウスでは経時的な低下が認められる。c に n を Cre(+)群 4 匹、Cre(-)群 5 匹として TAC 7 日後の時点での心エコー計測値の 2 群間の比較を示した。1 週間後の時点において Cre(+)群では Cre(-)群と比較して、有意差をもって (IVS+PW) /2 および FS が低下し、LVDd、LV mass の上昇が見られた。

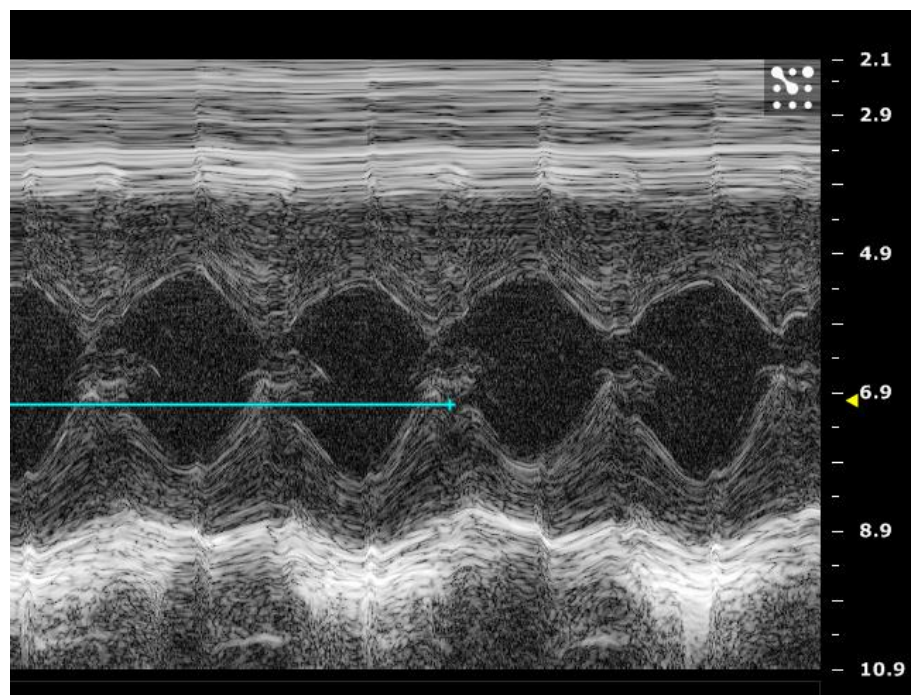
図 1 1 . TAC 後の心エコー所見の比較

a. 7 日目での M モード像 (いずれも 1 4 週齢オス個体)

Cre(+)
マウス



Cre(-)
マウス



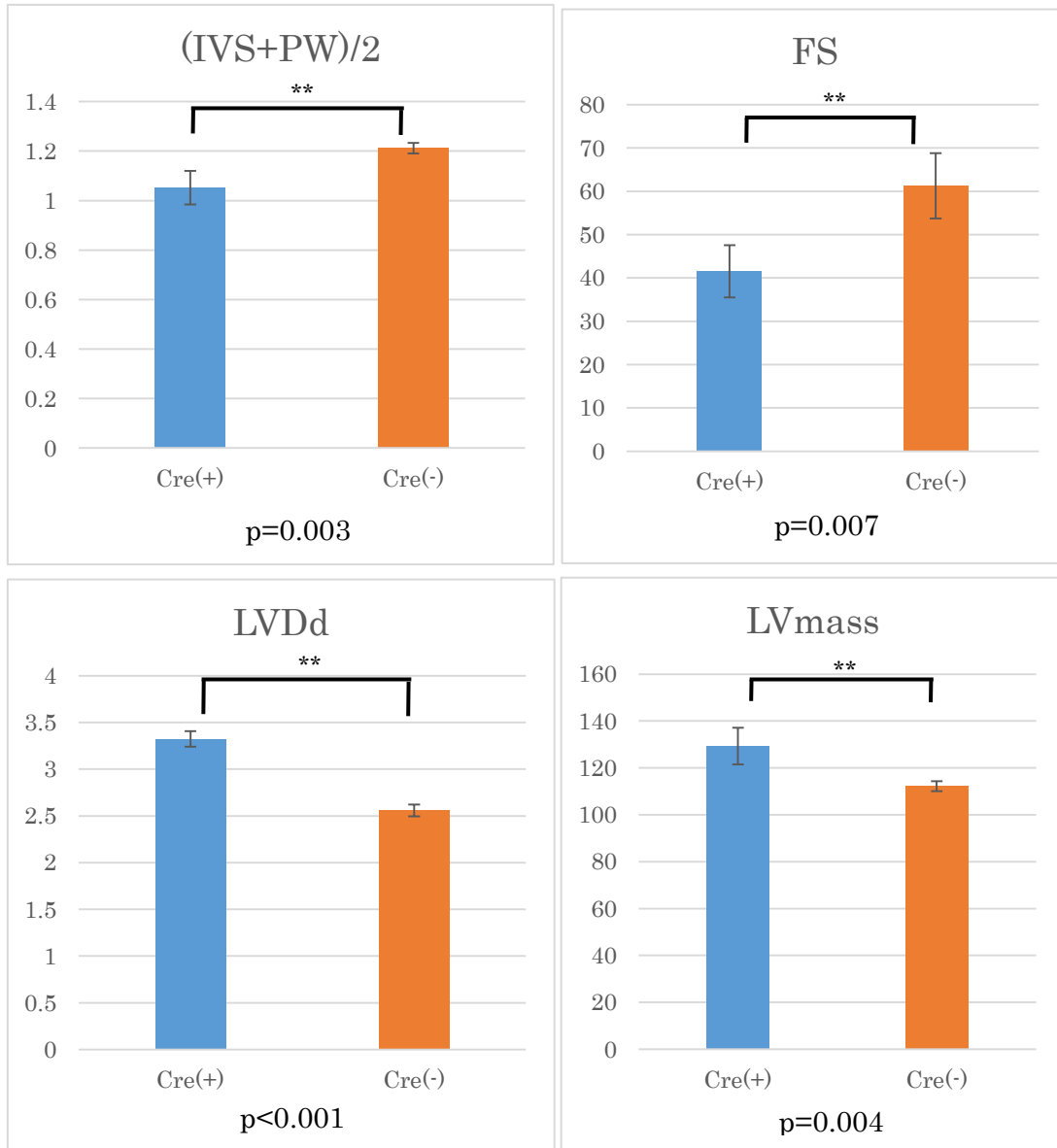
b. 心エコーでの測定値の経時変化の比較

(n=2:2、いずれの群も14週齢オス個体)



c.TAC 7日後の時点での心エコーでの測定値の比較

(n=4:5、いずれの群も週齢14~20週オス個体)



(5) 平常時と TAC 後における血清カテコラミンレベルの測定

方法の項に記載の通り、Cre(+)/Cre(-)の平常時の個体（11 週齢）および TAC2 週間後（17 週齢）の個体各 2 匹より血清サンプルを採取、日研ザイル社日本老化制御研究所（JaICA）に依頼し、各血清サンプル中のカテコラミン 3 分画（アドレナリン、ノルアドレナリン、ドパミン）を測定した。その結果を表 4 に示す。

アドレナリンに関しては個体ごとのばらつきが大きく一定の傾向は見いだせなかった。ノルアドレナリン、ドパミンはアドレナリン程のばらつきは見られなかったが、こちらも平常時と TAC 後で一定の傾向は見いだせなかった。

表 4. 平常時と TAC 負荷後の血清カテコラミン測定値の比較

a.Cre(+)群

Cre(+)		週齢	アドレナリン (ng/ml)	ノルアドレナリン (ng/ml)	ドパミン (ng/ml)
TAC 前	個体A	11	0.33	0.47	0.14
	個体B	11	1.3	2.24	0.12
TAC 後	個体C	17	8.41	1.06	0.3
	個体D	17	0.88	0.51	0.14

b.Cre(-)群

Cre(-)		週齢	アドレナリン (ng/ml)	ノルアドレナリン (ng/ml)	ドパミン (ng/ml)
TAC 前	個体E	11	16.77	1.06	0.24
	個体F	11	0.98	0.63	0.06
TAC 後	個体G	17	5.21	0.81	0.34
	個体H	17	1.4	0.83	0.15

6. 考察

本研究では、心臓における β 1 受容体の機能を解析するために、Cre-loxP システムを用いた心筋細胞特異的 *Adrb1* ノックアウトマウスを作製した。 β 1 受容体とその下流のシグナルは心血管疾患の診療において頻用される薬剤のターゲットとされており、臨床においても既に重要度が高いが、*Adrb1* ノックアウトマウスを用いた *in vivo* での生理学的特性の検討は意外と言えるほど少ない。前述の通り全身的 *Adrb1* のノックアウトマウスでは 8~9 割が胎生致死となる報告⁴²もあり、その生殖の困難さが一因となっていると推測されるが、そのような現況において今回初めて心筋細胞特異的 *Adrb1* ノックアウトマウスを用いて、*in vivo* での生理学的特性の解析を一部行ったことは一定の意義を得たのではないかと考える。またマウスの作製において心筋細胞特異的な Cre 発現のために promoter を利用した α MHC(*Myh6*)遺伝子は、胎生 9~10 日の心室形成が開始される頃から β MHC(*Myh7*)に置き換わり発現を開始する⁴⁶。今回の研究において *Adrb1* flox-homo かつ α MHC Cre(+)であるマウス個体と *Adrb1* flox-homo かつ α MHC Cre(-)であるマウス個体はほぼ同様の頻度で出生しており、発生の段階で問題が生じている可能性は低いと思われた。全身的 *Adrb1* のノックアウトマウスの高率な胎生致死発生の報告から、多少の飛躍も交えて推察するならば、 α MHC 遺伝子の発現以前である胎生早期における心原基形成、原始心筒形成、屈

曲形成等の心臓の発生に重要な役割を果たしている可能性や、心臓以外では胎盤にも胎仔由来細胞にて形成された絨毛膜絨毛部があり、胎盤は心臓について β 1 受容体が発現していることから、胎盤機能の維持に β 1 受容体が関わる未知の機構が存在する可能性も検討に値するであろう。

心臓の形態や baseline の心臓の機能について比較を行うと、左心の形態は TAC 前の心エコーにおける左室径や壁厚や補正後の心重量、および組織所見に明瞭な差は認めなかった。心機能を反映する値として、圧・容積曲線における心拍出量については侵襲的手技による出血の多寡による影響のためか、ばらつきが大きく有意な差は検出できなかった。心拍出量の要素である HR と EF に関しては、心拍数に差が見られず、EF が Cre(+)群で低下していた。同様に収縮能の指標である dP/dt max は Cre(+)群で低下しており、この事実は mRNA の定量評価における Ca handling 関連の遺伝子の発現が低下していることにも合致するが、dP/dt 最大時の圧で補正した dP/dt max /IP では差が見られていない。恒常性の観点から考慮すると心筋細胞の β 1 受容体のノックアウトによって低下した心拍出量を補うべく内因性的のカテコラミンが増加し、相対的に作用点としての地位が高まった血管内皮細胞や平滑筋細胞のカテコラミン受容体において作用し、Cre(-)群よりも高い血圧を呈したとも推測できるが、カテコラミン 3 分画の測定を行ったところ Cre(+)群と Cre(-)群に差を生じている結果は得られなかった。ア

ドレナリンについてはばらつきが大きく、明瞭な結論とは言えないため、今後サンプル数を増やしての検討は必要であると考え、実際に臨床的な知見として心不全患者においては、 β 受容体の細胞膜への発現低下とカテコラミンレベルの上昇が報告されており、カテコラミンレベルの上昇により心筋線維化を介してさらなる心機能低下を招くという悪循環が、進行性の心機能低下を説明する病態モデル⁴⁷として提唱されている。本研究ではいずれのマウスも少なくとも20週齢までには *sacrifice* しており、表現型としての長期予後については未解明のままである。ある種の β 遮断薬が心血管疾患の長期予後を改善させる事実は序文にも記載したが、もし長期におよぶ一定以上の心拍出量低下が生命予後を悪化させるのであれば、 β 遮断薬も生理学的な作用としては心拍出量を低下させる方向に働く薬剤であり、過量に投与を行えば生命予後を悪化させると予想される。実際には緩徐に漸増投与して決定された投与量において β 遮断薬が心不全患者の長期予後を改善しており、生命予後改善を目指した β 遮断薬の投与量には至適な用量が存在するものと考え。また、至適な用量は心拍出量と血液需要、カテコラミンレベル等により変動することが推測される。臨床での β 遮断薬の用量については *titration* を行うという方針はあるものの、それ以外に個々の症例に対して最適な用量を決定する方法は今のところない。今回作製した心筋細胞特異的 β 1受容体ノックアウトマウスに対して、TACやAdriamycin投与等

の心不全モデルを適用した上で β 遮断薬を投与することによって、カテコラミンレベルの変化や心保護作用の差異を検出できると予想され、得られた知見から β 遮断薬用量の最適化に利する知見が得られることも期待される。

以上に加えて本研究では、腹部大動脈牽引と1週間のTACという急性の後負荷増大モデルを適用し、Cre(+)/(-)の2群間での循環動態の変化を検討した。腹部大動脈牽引解除後にCre(+)群では循環動態の回復が生じない、または遅延することが示されており、実際には心停止に至るマウスも存在した。この結果は急性の後負荷増大からの復帰において心筋細胞の β 1受容体が重要な役割を果たしていることを示唆している。このような急性の後負荷の増大は日常臨床において起こりにくい状況ではあるが、高血圧性心不全や心臓外科手術における大動脈操作においてより緩徐ではあるが後負荷の増大を呈する状況はあり、過度の β 1受容体シグナルの抑制によって心機能低下が遷延する可能性も考慮に値する。

また、腹部大動脈の牽引という急性のモデルでは心臓の形態変化は観察できなかったが、TACによる慢性のモデルでは心エコーにてCre(+)個体でのDdとLV massの増大、FSの低下を認め、Cre(-)では左室壁厚の増大が認められた。長期の高血圧症の罹患によって心肥大を来すのに対し、 β 遮断薬によりその変化が抑制できることは広く知られた事実⁴⁸であるが、本研究の結果によって心筋

細胞自体の β 1 受容体がその反応に寄与していることが示唆された。その反面今回の結果においては Cre(+)では心拡大と収縮力低下を来している。TAC モデルでは心肥大の後に心拡大に転ずることが知られている⁴⁹が Cre(+)では肥大相を経ずに拡大相に至っており、この理由については未だ明らかではない。

本研究の限界として、いずれの実験もサンプル数が十分でなく、得られた結論の多くにおいて統計的有意差を検出できなかったことが挙げられる。今後サンプル数を増やし、より明瞭な差異として検出することが望まれる。また、生理学的特性や負荷に対する反応の差異としては一定の傾向が得られたが、それを説明する分子生物学的メカニズムについてはさらに検討の余地があると考えられる。新規に作製されたマウスであり、そのさらなる解析から β 1 受容体を介したシグナリングの解明に寄与する知見が得られることを期待したい。

7. 引用文献

1. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet (London, England)* **385**, 117–71 (2015).
2. Yusuf, S., Wood, D., Ralston, J. & Reddy, K. S. The World Heart Federation's vision for worldwide cardiovascular disease prevention. *The Lancet* **386**, 399–402 (2015).
3. Roth, G. A. *et al.* Demographic and Epidemiologic Drivers of Global Cardiovascular Mortality. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1333–1341 (2015).
4. Swedberg, K. & Kjeksus, J. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *Am. J. Cardiol.* **62**, (1988).
5. SOLVD investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators. *N. Engl. J. Med.* **325**, 293–302 (1991).
6. Pitt, B. *et al.* Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial--the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet (London, England)* **355**, 1582–7 (2000).

7. Pfeffer, M. A. *et al.* Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: The CHARM-overall programme. *Lancet* **362**, 759–766 (2003).
8. Mancia, G. *et al.* Blood Pressure Targets Recommended by Guidelines and Incidence of Cardiovascular and Renal Events in the Ongoing Telmisartan Alone and in Combination with Ramipril Global Endpoint Trial (ONTARGET). *Circulation* **124**, 1727–1736 (2011).
9. Vardeny, O. *et al.* Influence of baseline and worsening renal function on efficacy of spironolactone in patients with severe heart failure: Insights from rales (randomized aldactone evaluation study). *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 2082–2089 (2012).
10. Furnival, C. M., Linden, R. J. & Snow, H. M. The inotropic and chronotropic effects of catecholamines on the dog heart. *J. Physiol.* **214**, 15–28 (1971).
11. Packer, M. *et al.* The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N. Engl. J. Med.* **334**, 1349–55 (1996).
12. Dargie, H. J. & Lechat, P. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): A randomized trial. *Lancet* **353**, 9–13 (1999).

13. MERIT-HF Study Group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* **353**, 2001–7 (1999).
14. Dargie, H. J. Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left-ventricular dysfunction: The CAPRICORN randomised trial. *Lancet* **357**, 1385–1390 (2001).
15. Hanlon, C. D. & Andrew, D. J. Outside-in signaling - a brief review of GPCR signaling with a focus on the Drosophila GPCR family. *J. Cell Sci.* **128**, 3533–3542 (2015).
16. Rosskopf, D. Pharmacogenomics of G protein-coupled receptor ligands in cardiovascular medicine. *Pharmacol. Rev.* **60**, 513–535 (2008).
17. Aldrich, T. B. Adrenalin, the active principle of the suprarenal glands. *J. Am. Chem. Soc.* **27**, 1074–1091 (1905).
18. von Euler US. Sympathin in adrenergic nerve fibres. *J Physiol.* 1946 Sep 18;105:26.
19. Konzett H. Neue broncholytisch hochwirksame Körper der Adrenalinreihe. *Archiv für experimentelle Pathologie und pharmakologie* 1940;197:27-40.

20. Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol.* 1948 Jun;153(3):586-600.
21. BLACK JW, STEPHENSON JS. Pharmacology of a new adrenergic beta-receptor-blocking compound (Nethalide). *Lancet* 1962;2:311-4.
22. Shand DG, Nuckolls EM, Oates JA. Plasma propranolol levels in adults with observations in four children. *Clin Pharmacol Ther* 1970;11:112-20.
23. Paterson JW, Conolly ME, Dollery CT. The pharmacodynamics and metabolism of propranolol in man. *Pharmacologia Clinica* 1970;2:127-33.
24. Fisher ML, Plotnick GD, Peters RW, Carliner NH. Beta-blockers in congestive cardiomyopathy. Conceptual advance or contraindication? *Am J Med.* 1986 Feb 28;80(2B):59-66.
25. Swedberg K, Hjalmarson A, Waagstein F, et al. Prolongation of survival in congestive cardiomyopathy by beta-receptor blockade. *Lancet* 1979;1:1374-6.
26. Lotze, U. et al. Carvedilol inhibits platelet-derived growth factor-induced signal transduction in human cardiac fibroblasts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 39, 576–89 (2002).
27. Senior, R., Basu, S., Kinsey, C., Schaeffer, S. & Lahiri, A. Carvedilol prevents remodeling in patients with left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 137, 646–52 (1999).

28. Spallarossa, P. et al. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 37, 837–46 (2004).
29. Yue, T. L. et al. Possible involvement of stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol. *Circ. Res.* 82, 166–74 (1998).
30. Maltsev, V. A., Sabbah, H. N. & Undrovinas, A. I. Down-regulation of sodium current in chronic heart failure: effect of long-term therapy with carvedilol. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1561–8 (2002).
31. George, I., Sabbah, H. N., Xu, K., Wang, N. & Wang, J. β -adrenergic receptor blockade reduces endoplasmic reticulum stress and normalizes calcium handling in a coronary embolization model of heart failure in canines. *Cardiovasc. Res.* 91, 447–55 (2011).
32. McMurray, J. et al. Antiarrhythmic effect of carvedilol after acute myocardial infarction: results of the Carvedilol Post-Infarct Survival Control in Left Ventricular Dysfunction (CAPRICORN) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45, 525–30 (2005).
33. Cice, G., Tagliamonte, E., Ferrara, L. & Iacono, A. Efficacy of carvedilol on complex ventricular arrhythmias in dilated cardiomyopathy: double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Eur. Heart J.* 21, 1259–64 (2000).

34. Katritch, V., Cherezov, V. & Stevens, R. C. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**, 531–56 (2013).
35. Strader, C. D., Fong, T. M., Graziano, M. P. & Tota, M. R. The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* **9**, 745–754 (1995).
36. Devic, E., Xiang, Y., Gould, D. & Kobilka, B. Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice. *Mol. Pharmacol.* **60**, 577–583 (2001).
37. Bristow, M. R. *et al.* β 1- and β 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: Coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective β 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ. Res.* **59**, (1986).
38. Ota, A., Matsui, H., Asakura, M. & Nagatsu, T. Distribution of β 1- and β 2-adrenoceptor subtypes in various mouse tissues. *Neurosci. Lett.* **160**, 96–100 (1993).
39. Brueckner, F. *et al.* Structure of β -adrenergic receptors. *Methods Enzymol.* **520**, 117–151 (2013).
40. Duc, N. M., Kim, H. R. & Chung, K. Y. Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **763**, 214–222 (2015).

41. Capote, L. A., Mendez Perez, R. & Lympopoulos, A. GPCR signaling and cardiac function. *Eur. J. Pharmacol.* **763**, 143–148 (2015).
42. Rohrer, D. K. *et al.* Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7375–80 (1996).
43. Kiyonari, H., Kaneko, M., Abe, S. I. & Aizawa, S. Three inhibitors of FGF receptor, ERK, and GSK3 establishes germline-competent embryonic stem cells of C57BL/6N mouse strain with high efficiency and stability. *Genesis* **48**, 317–327 (2010).
44. Maye, P. *et al.* A BAC-bacterial recombination method to generate physically linked multiple gene reporter DNA constructs. *BMC Biotechnol.* **9**, 20 (2009).
45. Furnival CM, Linden RJ, Snow HM. Chronotropic and inotropic effects of isoprenaline and L-noradrenaline in the dog heart. *J Physiol.* 1968 May;196(2):109P-110P
46. Hang, C. T. *et al.* Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature* **466**, 62–7 (2010).
47. Zeisberg, E. M. *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* **13**, 952–961 (2007).

48. Franz, I. W., Wiewel, D., Behr, M. & Ketelhut, R. [Regression of myocardial hypertrophy in hypertensives on chronic beta-receptor block]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **111**, 530–4 (1986).

49. deAlmeida, A. C., van Oort, R. J. & Wehrens, X. H. T. Transverse Aortic Constriction in Mice. *J. Vis. Exp.* (2010). doi:10.3791/1729

8. 謝辞

今回本研究の実施と本論文を著作するにあたり、多大な御助力と御指導を賜りました東京大学医学系研究科循環器内科 小室一成教授に深く感謝申し上げます。本研究の遂行、実験手技の指導、方針決定に対して御指導頂きました東京大学医学系研究科循環器内科講師 瀧本英樹先生に心より感謝申し上げます。

本研究に用いた遺伝子組み換えマウスを提供頂きました東邦大学医学部医学科薬理学講座准教授 内藤篤彦先生に感謝申し上げます。日々の研究において御助力・御支援頂きました研究室同僚の先生方に感謝申し上げます。

最後に大学院での生活を支え続けてくれた家族に感謝の意を表明致します。