

論文の内容の要旨

論文題目 心筋細胞特異的 $\beta 1$ 受容体ノックアウトマウスの解析

氏名 大津 裕

心血管疾患は数多くの疾患群の中でも全世界的に患者数が多く、治療技術・薬剤は絶え間ない発展を続けているものの、依然として先進国を中心に死因の上位を占めている。このような背景から心臓という臓器の生理学的・分子生物学的なメカニズムをより詳細に解析し、生理学的機序の理解や創薬の基盤を拡大に繋げることに大きな価値があると考えた。

一方で、 β アドレナリン受容体は、主に自律神経系による各臓器へのシグナル伝達と制御に関与していることが知られており、心臓もその例外ではない。

β アドレナリン受容体は現在までに $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ の 3 種類のサブタイプが存在し、いずれも心筋細胞において発現しているが、特に $\beta 1$ 受容体は人体において心臓に最も豊富に発現しており、 $\beta 1$ 受容体下流の細胞内シグナル伝達が陽性変力作用や陽性変時作用等の心臓の生理学的特性の変化をもたらすことは既知となっている。

また、 β アドレナリン受容体は、細胞膜上に存在する多様な薬剤の作用ターゲットとなっている G 蛋白共役型受容体(GPCR)の 1 つである。 β 受容体の刺激薬は急性期の心不全や心臓手術後の臨床において欠かせない薬剤であり、 β 受容体の遮断薬である β 遮断薬は、かつては多くの心疾患において禁忌とされていたが、一部の β 遮断薬の投与によって、心血管疾患の多くで予後や症状が改善されることが知られるようになってから久しく、現代の医療において β 遮断薬が心血管疾患にもたらしている恩恵は大きい。予後改善をもたらすことが知られている β 遮断薬は、主に $\beta 1$ 受容体を作用ターゲットとしているが、これらの β 遮断薬が心臓に対して保護的に作用する詳細なメカニズムは明らかになっていない。

このように β 受容体は心臓において重要な役割を果たしており、一部のメカニズムの解明がなされているものの、そのメカニズムでは説明できない現象も多い。ある蛋白質の機能を解析する上で、ノックアウトマウスと野生型を比較する方法は広く用いられているが、 $\beta 1$ 受容体の全身的ノックアウトマウスは仔の 8~9 割が胎生致死であることが報告されており、 β 受容体を対象とした研究の障壁の一つとなっている。そこで本研究では $\beta 1$ 受容体が心臓において果たしている役割をさらに解明することに貢献すべく、これまで解析されたことのない心筋細胞特異的 $\beta 1$ 受容体ノックアウトマウスし、その特性を解析することとした。このノックアウトマウスは心臓のみに発現が認められる α MHC のプロモーター下流に挿入された Cre によって、あらかじめ $\beta 1$ 受容体の遺伝子に挿入された loxP 配列が認識され $\beta 1$ 受容体の遺伝子がノックアウトされる機構であり、本研究で行った解析の対照として loxP 配列は持つが α MHC プロモーター Cre は持たない Cre(-) 個体を用いた。

初めに体重・心重量等の一般的な表現型について検討したが、2群間に差はなく、生殖と出生の頻度に関しても $\beta 1$ 受容体を全身でノックアウトしたマウスにおいて見られるような大きな頻度の低下は見られなかった。次に mRNA に関する検討を行った。心・腎・脳における $\beta 1$ 受容体 mRNA の発現について検討したところ、Cre(-)群と比較して心臓において著明に発現が低下しており、腎・脳では心臓程の差を認めなかった。この結果により Cre(+)群では心筋細胞特異的な $\beta 1$ 受容体ノックアウト機構は機能していることが確認された。また、 β 受容体には1~3のサブタイプが存在しておりこれらについても mRNA の発現を測定した。 $\beta 2$ および $\beta 3$ 受容体の発現は変化しておらず、別のサブタイプの発現が増加することによる代償は認められなかった。さらに $\beta 1$ 受容体が細胞内に伝達するシグナルが、その発現に影響を与えることが既知である、細胞内の Ca^{2+} 濃度を調節する3種類の遺伝子についても差を検討したところ、そのうちの2種「筋小胞体 ATPase2A (SerCa2A)」と「リアノジン受容体 (RyR)」について発現の低下が認められた。「ホスフォランパン (PLB)」については Cre(+)群で発現が低い傾向を認めたが、結果のばらつきが大きく有意差は得られなかった。

次に圧・容積曲線の解析による基本的な循環パラメーターの測定を行い、2群間の差異について検討を行った。収縮能の指標である「駆出率 (EF)」と「心内圧の時間変化率の最大値を血圧で補正した値 (dP/dt max/IP)」について Cre(+)群で低下が認められた。この表現型の差異には mRNA の解析において Ca^{2+} 濃度の調節を行う遺伝子の発現が低下していることが影響している可能性が考えられた。

$\beta 1$ 受容体のアゴニストである isoproterenol 負荷下での圧・容積曲線を測定すると、Cre(-)群において陽性変力・陽性変時作用を呈す傾向が見られたのに対して、Cre(+)群ではほぼ反応を示さず、この点からもノックアウト機構が機能していることが示された。 β 受容体を介さない milrinone 負荷においては両群ともに明瞭な反応を認めなかった。

さらに心不全モデルとして2種類の後負荷増大モデルをマウスに適応し2群間の差異について検討した。まず急性の後負荷増大モデルとして圧・容積曲線の測定下に腹部大動脈牽引を行った。両群共に牽引からの解放時に一時的な循環抑制が生じたが、Cre(+)群ではその循環抑制が遷延するまたは抑制から回復しない現象が認められた。さらにより慢性に近い負荷として結紮による横行大動脈縮窄(TAC)を加え、心エコーによる1週間の観察を行ったところ、ノックアウトマウスではより早期の心機能の低下と心拡大を呈した。

以上の結果からある種の心不全状態や後負荷が急激に増大する状況、また一旦生じた循環抑制から復帰するような状況において $\beta 1$ 受容体が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後、本研究で認められた表現型の差異を生ずる分子生物学的メカニズムについて検討が必要と考える。