

論文内容の要旨

論文題目 Emotional stress induces regional systolic dysfunction in rat heart under α_2 -adrenoceptor stimulation
(α_2 アドレナリン受容体刺激下で心理ストレスはラット心の局所的収縮不全を惹起する)

氏名 黒田亮平

【序文】

ストレスは元来「ゆがみ」を意味する用語であったが、Selye が「外界からの刺激に対する非特異的反応」と定義したことで、生体に用いることが一般化した。ストレスは交感神経-副腎髄質系、視床下部-下垂体前葉-副腎皮質系を活性化する。心理ストレスが関与する心筋障害にストレス心筋症が知られている。症状は急性心筋梗塞に類似するが冠動脈閉塞を認めず、たこつぼ様に心尖部が拡張することを特徴とする。予後は良好とされるが心不全による死亡例もある。

α 受容体は節前線維のノルエピネフリン放出を抑制する作用を持ち、 α_2 受容体の変異は心筋症の発症に関与する。 α_2 作動薬は鎮静や循環動態の安定を目的に使用されている。従来、心筋細胞の α 受容体は主に α_1 で、 α_2 は主に交感神経終末に分布すると考えられてきたが、Ibacache らは α_2 受容体が心筋細胞膜に存在することを明らかにした。 β 受容体刺激は cAMP 依存性キナーゼ (PKA) や Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) などのリン酸化酵素を介して陽性変力・変時作用を生じる。 β_2 受容体は近年ストレス心筋症の原因として注目されている。高濃度のアドレナリン環境では β_2 受容体と共役する G 蛋白が G_s から G_i に変化し、収縮低下が生じると考えられている。

ストレスが心血管に与える研究は多いが、薬物の作用に与える影響は不明な点が多い。そこで、心理ストレスモデルとして知られる身体拘束ラットで、 α_2 作動薬のキシラジンが心機能、細胞内シグナルに与える影響を検討した。また、ストレス心筋症との関連、近年提唱されている β_2 受容体、 G_i 蛋白の関与も検討した。

【方法】

動物は雄 SD ラット (250-350g) を用いた。IMO は粘着テープを用いて背臥位に固定することで実施した。心エコー、心筋サンプリング、採血は全てイソフルランによる吸入麻酔下で行った。アドレナリン投与モデルでは β 作動薬のアドレナリン 150 nmol/kg を尾静脈投与した (n=5)。

キシラジン投与モデルでは拘束終了時に α_2 作動薬のキシラジン 6 mg/kg を腹腔内投与した。ラットは身体拘束の有無、キシラジン投与の有無により 4 群（自由行動+キシラジンなし：F, n=4、身体拘束+キシラジン投与：IMO, n=4、自由行動+キシラジン投与：F+Xy, n=6、身体拘束+キシラジン投与：IMO+Xy, n=6）に分けた。PTX 投与モデルでは Gi 蛋白阻害薬の PTX を 25 μ g/kg を拘束開始 48 時間前に尾静脈投与した（F+Xy+PTX; n=5, IMO+Xy+PTX: n=6,）。ICI-118,551 投与モデルでは β_2 阻害薬の ICI-118,551 を 0.1 μ g/kg 拘束終了時にキシラジン投与と同時に尾静脈投与した（F+Xy+ICI: n=5, IMO+Xy+ICI: n=5）。

心エコーはアドレナリン投与モデルではアドレナリン投与前（pre）と投与 15 分後（post）に測定した。キシラジン投与モデルでは拘束前（pre）と拘束終了 5、20、35 分後に測定した。PTX 投与モデルおよび ICI-118,551 投与モデルでは拘束終了 5 分後に測定した。

心筋サンプリングはキシラジン投与モデルでは F（n=5）、IMO（n=5）、F+Xy（n=7）、IMO+Xy（n=7）の 4 群を対象に、自由行動あるいは拘束終了 5 分後に開胸して心臓を摘出した（図 2A）。PTX 投与モデルでは身体拘束終了 35 分後まで生存した個体（s）では 35 分後に、死亡した個体（d）では死亡時に心臓を摘出した（PTX(-): n=7, s: n=8, d: n=3）。心臓は左心室を心尖部、前壁、後壁に分割した。ウエスタンブロッティング（WB）は総蛋白量で 25 μ g に相当する量を泳動した。細胞分画は従来の方法に従い、P1、P2、S 分画を作成した。免疫染色はパラホルムアルデヒドで一晩固定してパラフィン包埋後薄切し、DAB 法で染色した。

血中カテコラミン濃度は 30 分の自由行動あるいは 5、15、30 分の拘束を与えた群を作成した（図 3, 各 n=4）。キシラジン投与を行う群ではキシラジン投与を同時に行った。麻酔導入 5 分後に開胸し、左室より心臓血をサンプリングした。

各変数の測定結果は全て平均値 \pm 標準誤差で示した。統計検定量の算出には Stat View を用いた。2 群間の比較には t 検定、3 群以上には ANOVA を用い、 $p<0.05$ を統計学的有意差とした。

【結果】

アドレナリン投与モデルでは投与 15 分後に Ejection fraction (EF) の低下を認めた。前・後壁の運動ともに運動は低下していた。

キシラジン投与モデルでは 30 分間の拘束を行った IMO+Xy 群で EF の低下を認めたが、IMO 群、F+Xy 群では EF は低下しなかった（図 1A）。この収縮低下は拘束終了から 20 分経過すると改善した。IMO+Xy 群では前壁の運動が低下したが、後壁の運動は保たれていた（図 1B、C）。F+Xy 群、IMO+Xy 群の E/A、収縮速度、拡張速度に変化しなかった。IMO が 15、60 分の IMO+Xy 群では EF は低下しなかった。30 分の IMO を行った上でキシラジンを投与する操作を 1 日 1 回、3 日連続して行ったところ、3 回とも収縮低下が生じた。キシラジン投与を行わない場合にはアドレナリンの血中濃度は IMO 5 分で最高値となった。キシラジン投与を行うと IMO 5 分でのアドレナリンの上昇が抑えられる一方で、IMO 30 分でアドレナリン、ノルアドレナリンの血中濃

度が上昇した。

WB では、CaMKII でリン酸化される Phospholamban (PLB) の Thr17 残基 (PLB-Thr17) が IMO+Xy 群で前壁、後壁ともにリン酸化した (図 2A)。PKA でリン酸化される PLB の Ser16 残基、RyR の Ser2808 残基は変化しなかった。SERCA の発現量に変化しなかった。Myosin binding protein-C (MyBP-C) の Ser282 残基 (MyBP-C-Ser282) は IMO+Xy 群の後壁で前壁に対してリン酸化が亢進した (図 2B)。Troponin I は変化しなかった。CaMKII の Thr286 残基 (CaMKII-Thr286) のリン酸化は IMO、キシラジンの両方で亢進するが、IMO+Xy 群でより亢進した。IMO+Xy 群の後壁では前壁に対してリン酸化が亢進した (図 2C)。p38MAPK は変化しなかった。Akt、p44/42MAPK は IMO 群でリン酸化したが、IMO+Xy 群では脱リン酸化していた。Gs 蛋白、Gi 蛋白、GRK2 の発現量は変化しなかった。IMO+Xy 群でリン酸化が亢進した CaMKII-Thr286、MyBP-C-Ser282、PLB-Thr17 は拘束終了 35 分後には脱リン酸化していた。

α_2 受容体の免疫染色では心筋細胞の横紋 (矢印)、介在板 (矢頭) に一致した陽性像を認めた (図 3A)。WB では膜分画にバンドを認めた (図 3B)。 α_2 、 β_1 、 β_2 受容体の発現に領域差は認めなかった。

IMO+Xy 群で認めた EF と前壁の運動低下は PTX 投与で改善した。前壁の収縮低下に ICI-118,551 の有無は影響しなかった。IMO+Xy+PTX 群では 11 匹中 3 匹が死亡し、死亡例では前壁で MyBP-C-Ser282 のリン酸化が亢進していた。

図 1

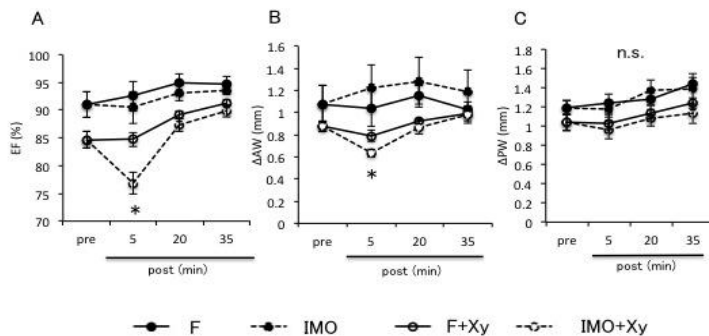


図 2

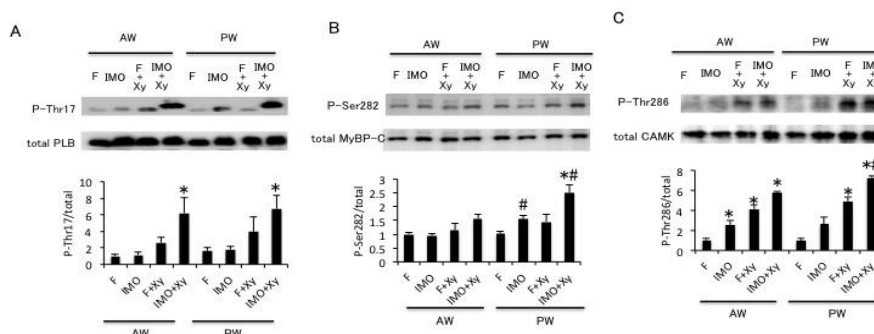
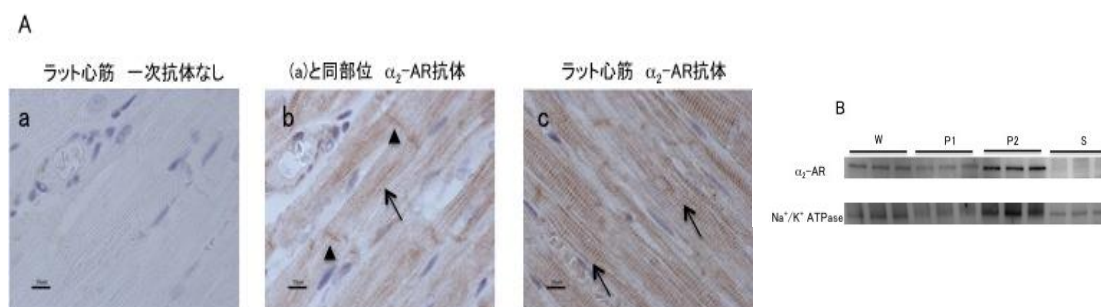


図 3



【考察】

IMO による心理ストレスにキシラジンによる α_2 受容体刺激を加えることで前壁の一過性の収縮低下が生じることを見いだした。この運動低下には Gi 蛋白シグナルが関与していた。IMO+Xy 群の後壁では前壁に比して CaMKII、MyBP-C のリン酸化が亢進することから、部位による活性化の差が運動機能の違いに関与した可能性がある。従来、心筋細胞に分布する α 受容体は主に α_1 受容体で、 α_2 受容体は交感神経終末に分布すると考えられてきたが、心筋細胞膜での α_2 受容体の発現を免疫染色と WB で確認した。非心筋細胞では α_2 受容体刺激が細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇、CaMKII を惹起することから、同様の機序が示唆された。IMO+Xy 群で生じた前壁の運動低下は PTX 投与で改善したが、ICI-118,551 では改善しなかった。このことから β_2 受容体を介さない α_2 受容体-Gi 蛋白シグナルの関与が示唆された。一方で、PTX 投与により死亡例が増加することから Gi 蛋白が心保護的に作用している可能性がある。

本研究では IMO では収縮は低下せず、キシラジンを併せて投与した場合に心尖部ではなく前壁で収縮低下が生じた。これらの点が従来のストレス心筋症モデルと異なっている。卵巣摘除ラットでは α_2 受容体刺激に対する反応性が增大することから、雄でも α_2 作用を薬理的に増強することで類似の病態を作り出している可能性がある。閉経後の女性にストレス心筋症が多い原因として α_2 受容体が関与している可能性も考えられる。ストレス心筋症の発症にはアドレナリン受容体の分布の差が想定されているが、前・後壁で発現の差は認めなかった。

本研究からストレス環境下では α_2 作動薬が平常時にはみられないストレス心筋症類似の心収縮低下を引き起こすことが明らかとなった。これはストレス心筋症の病態の解明に寄与するものと考えられる。法医学領域では身体拘束時の突然死はしばしば経験され、ストレス環境下での突然死の病態解明にも寄与するものと期待される。