

## $\alpha_1$ 受容体を介する心筋収縮力調節機序

### Mechanism for $\alpha_1$ -adrenergic regulation of cardiac contractility

代表研究者 関西医科大学薬理学教室助手 大谷 ひとみ  
Res. Assoc. Kansai Medical Univ.  
Hitomi OTANI

Both inositol trisphosphate ( $IP_3$ ) and diacylglycerol (DAG), degradative products of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ( $PI-4, 5-P_2$ ), play important roles as second messengers in intracellular signal transduction.

We previously demonstrated that  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation of rat left ventricular papillary muscles results in  $PI-4, 5-P_2$  breakdown associated with a triphasic inotropic response; transient positive inotropic effect (PIE), followed by transient negative inotropic effect (NIE), and sustained PIE. The transient PIE is thought to be mediated by  $Ca^{2+}$  release from intracellular store sites, while the mechanism for sustained PIE remains unknown.

Recently, we found that the last two phases of inotropic response were inhibited by protein kinase C (PKC) inhibitors (H-7, staurosporine) and/or  $Na^+/H^+$  exchange inhibitors (amiloride, its analog), suggesting that both activation of PKC and stimulation of  $Na^+/H^+$  exchange system are involved in  $\alpha_1$ -adrenoceptor-mediated inotropic responses.  $Na^+/H^+$  exchange system extrudes  $H^+$  across the plasma membrane, leading to cytoplasmic alkalization and intracellular  $Na^+$  accumulation which secondary increase intracellular  $Ca^{2+}$  via stimulation of  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange. Intracellular  $Ca^{2+}$  level ( $[Ca^{2+}]_i$ ) and intracellular pH ( $pH_i$ ) are the important factors regulating the cardiac contractility.

In the present study, this hypothesis was verified by analysis of patterns of PKC activation and of changes in  $[Ca^{2+}]_i$  and  $pH_i$ . Stimulation of rat left ventricular papillary muscle with an  $\alpha_1$ -agonist, phenylephrine (PE), increased the membrane-bound PKC activity without significant changes in cytosolic  $Ca^{2+}$ /phospholipid-independent protein kinase (PKI) activity, the latter being a catalytically active fragment generated from the cleavage of the membrane-bound PKC. In contrast, a PKC stimulant, phorbol 12,13-dibutyrate, decreased contractility and slightly increased PKC activity, with a marked increase in PKI activity. Such differences in the patterns of PKC redistribution may account for the opposite inotropic effects of PKC stimulation by an  $\alpha_1$ -agonist and a phorbol ester.

To monitor  $[Ca^{2+}]_i$  and  $pH_i$ , adult rat single ventricular myocytes were prepared and loaded with fura 2-AM or BCECF-AM. PE produced triphasic changes in  $[Ca^{2+}]_i$ ; a transient increase followed by a transient decrease and a subsequent sustained increase, with a time course similar to that in the triphasic inotropic response. PE also produced an increase in  $pH_i$ , i.e., intracellular alkalization. PKC inhibitors (H-7 and staurosporine) significantly reduced both the sustained increase in  $[Ca^{2+}]_i$  and alkalization, and  $Na^+/H^+$  exchange inhibitors (amiloride and its analog) completely inhibited them. These results suggest that the  $\alpha_1$ -adrenoceptor-mediated sustained PIE is produced by the stimulation of  $Na^+/H^+$  and/or  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange system through the receptor-linked PKC activation.

#### 研究目的

生体内神経伝達物質であるアドレナリンは  $\alpha_1$  受容体と  $\beta$  受容体を介して、心臓機能制御に重要な役割を果たしている。いずれの受容体も心筋収

縮力に対して増強効果を示すが、 $\alpha_1$  受容体刺激時では  $\beta$  受容体刺激時と異なり、細胞内サイクリック AMP の上昇を介さずに発現することから、その細胞内機序について多くの論議がなされてき

た。

近年、細胞膜でのイノシトールリン脂質代謝回転の促進 (PI 応答) が、新しい情報伝達機構として生体反応を調節することが知られてきたが、報告者らは、 $\alpha_1$  受容体刺激に伴う PI 応答が、収縮力増強効果の発現に関与することを見いだした。しかしながら、イノシトールリン脂質の代謝産物であるイノシトール 3 リン酸 (IP<sub>3</sub>) とジアシルグリセロールがそれぞれ 2 次情報伝達物質として、 $\alpha_1$  受容体刺激時の収縮力増強過程において果たす役割については未だ不明である。最近、受容体刺激に伴いジアシルグリセロールにより活性化される Ca<sup>2+</sup>/リン脂質依存性プロテインキナーゼ (プロテインキナーゼ C: PKC) が、細胞膜の Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換機構を亢進させることが注目されている。Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換により調節される細胞内カルシウム濃度と細胞内 pH は、いずれも心筋収縮性を規定する重要な因子である。

本研究ではこれらの点に着目し、 $\alpha_1$  受容体刺激由来の収縮力増強効果の発現機序を解析するため、ラット心室筋標本を用いて  $\alpha_1$  受容体刺激に伴う、① PKC 活性の変動を測定し、さらに ② Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換亢進過程における PKC の役割について検討を行った。

#### 研究経過

##### A. $\alpha_1$ 受容体刺激による変力効果と PKC 活性の変動

報告者らは以前に、ラット左心室乳頭筋を用い、 $\beta$  受容体遮断薬であるプロプラノロール存在下に  $\alpha_1$  受容体作動薬であるフェニレフリンを作用させると、細胞膜のホスファチジルイノシトール 4,5-2 リン酸の急速な分解とイノシトール 3 リン酸の産生を伴って、初期の一過性陽性変力効果 (収縮力増大) から一過性陰性変力効果 (収縮力減少)、次いで持続性陽性変力効果が発現することを報告した (図 1)。イノシトール 3 リン酸が細胞内貯蔵部位からの Ca<sup>2+</sup> 動員効果により一過性陽性変力効果を惹起するのに対して、他方の分解産物であるジアシルグリセロールが、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化を介して変力効果を発現する過程には不明な点が多い。最近、報告者ら

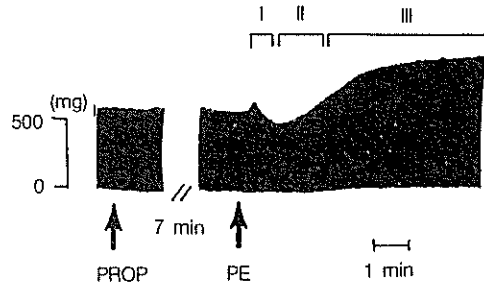


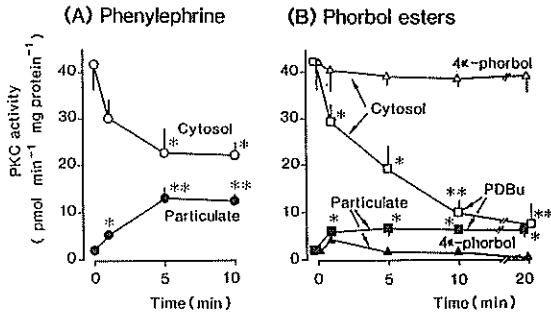
図 1. 摘出ラット左心室乳頭筋の収縮張力に及ぼすフェニレフリンによる  $\alpha_1$  受容体刺激の影響  
電気刺激により駆動させた乳頭筋標本を  $\beta$  受容体遮断薬のプロプラノロール (PROP) 存在下にフェニレフリン (PE) で処置すると、一過性の陽性変力効果 (I) と一過性の陰性変力効果 (II) およびそれに続く持続性陽性変力効果 (III) が認められた。

は PKC 阻害薬である H-7 とスタウロsporin が  $\alpha_1$  受容体刺激時の持続性陽性変力効果を抑制することを見だしたが、この成績は持続性陽性変力効果発現に PKC の活性化が関与する可能性を示唆している。そこで、ラット左心室乳頭筋をフェニレフリンで一定時間 (1, 5, 10 分) 処置した後、細胞膜分画と細胞質 (可溶性) 分画に分離し、部分精製し、各分画の PKC 活性を測定した (図 2, 上)。フェニレフリン投与 5 分後から、PKC 活性は膜分画で対照の約 10 倍に上昇し、細胞質分画では約半分減少したが、この膜結合型 PKC の活性増大の時間経過は持続性陽性変力効果の発現経過とよく対応していた。

##### B. $\alpha_1$ 受容体刺激時とホルボールエステル投与時での、変力効果と PKC 活性化様式の比較

受容体刺激時と異なり、直接 PKC を活性化することが知られるホルボールエステルを組織に作用させた場合、PKC はいったん膜結合型として活性化された後、蛋白分解酵素であるカルパインによりその触媒基が細胞質内に遊離され、Ca<sup>2+</sup>/リン脂質非依存性プロテインキナーゼ (PKI) として細胞応答に関与することが知られている。ラット左心室乳頭筋の  $\alpha_1$  受容体刺激に際しては、陽性変力効果発現に対応した膜結合型 PKC 活性の増大は認められたが、PKI 活性は変動しなかった。

## [I] PKC activity



## [II] Total PKC activity and PKI activity

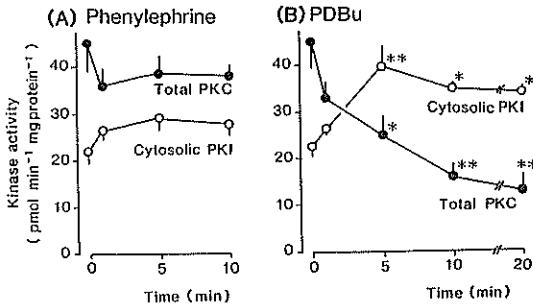


図2. 摘出ラット左心室筋頭筋における、フェニレフリンまたはホルボールエステル投与後のPKC活性およびPKI活性の変動

PKC活性(上段): フェニレフリンおよび活性型ホルボールエステル(PDBu)により膜分画(Particulate, ●, ■)でのPKC活性は、それぞれ10倍および4倍に増大した。Ca<sup>2+</sup>/リン脂質非依存性プロテインキナーゼ活性(下段PKI): フェニレフリン(左図, ○)ではほとんど変化しなかったが、活性型ホルボールエステル(右図, ○)では著明に増大した。

これに対して、ホルボールエステルを作用させた場合には、陰性変力効果が認められ、膜結合型PKC活性の増大は対照の約4倍にとどまるが、細胞質内PKI活性は顕著に増大した(図2)。このように、心筋収縮調節機構におけるPKCの役割は、PKC活性化様式により異なることが示された。

### C. 持続性陽性変力効果と細胞膜イオン交換機構

報告者らはすでに、 $\alpha_1$ 受容体刺激による持続性

陽性変力効果がPKC阻害薬のみならず細胞膜Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換およびNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換阻害薬であるアミロライドとその誘導体によっても抑制されることを報告した。この知見は持続性陽性変力効果発現にこれらイオン交換機構の亢進が関与する可能性を示唆している。Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換機構はH<sup>+</sup>を細胞外に放出し、Na<sup>+</sup>を細胞内に取り込む結果、①細胞内アルカリ化および②細胞内Na<sup>+</sup>濃度の上昇を介してNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換を作動させ、間接的に細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を増加させる。細胞内pHと細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変動はいずれも心筋の収縮力に影響を与えることが知られている。

そこで、コラゲナーゼ処理により単離調整した成熟ラット心室筋細胞に、Ca<sup>2+</sup>指示色素Fura-2 AMまたはpH指示色素BCECF-AMを負荷し、電気刺激駆動による拍動に対応した細胞内Ca<sup>2+</sup>、細胞内pHの変化を、顕微測光システム(オリンパス社製)を介して経時的に測定した。フェニレフリン投与による $\alpha_1$ 受容体刺激により三相性変力効果の発現の時間経過にほぼ対応して、三相性の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変動(一過性上昇、一過性減少さらに持続性上昇)が観察された。同時に細胞内アルカリ化も認められこれらの反応はいずれも、PKC阻害薬であるH-7およびスタウロsporinにより有意に抑制され、またNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換阻害薬であるアミロライドおよびその誘導体によりほぼ完全に抑制された。これらの結果から、PKCの活性化はNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換系の活性を亢進させその結果、細胞内アルカリ化、および細胞内Na<sup>+</sup>濃度上昇によるNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換系を介した細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入が、持続性陽性変力効果を惹起する、との結論が導かれた。

### 研究成果

A. 心筋の $\alpha_1$ 受容体を刺激した際の持続性陽性変力効果の発現には、受容体刺激に連結した細胞膜結合型PKCの活性化が関与する可能性が示された。一方、PKCの直接活性化薬であるホルボールエステル投与では、 $\alpha_1$ 受容体刺激時とは異なり、陰性変力効果が見られ、また膜結合型PKCの分解産物であるCa<sup>2+</sup>/リン脂質非依存性プロテインキナーゼの活性が上昇することが明らかに

なった。これらの知見から、PKCの活性化様式の違いにより、心筋収縮力は増強、もしくは減弱されることが判明した。

この研究成果は、1991年薬理学会総会で発表し、さらに最近 British Journal of Pharmacology で掲載された(1992年, 107, p. 22-26)。

B.  $\alpha_1$ 受容体刺激時、イノシトールリン脂質代謝に伴い発現する三相性の変力効果(一過性上昇、一過性減少さらに持続性上昇)のうち、一過性の陽性変力効果は、 $IP_3$ による細胞内貯蔵部位からの $Ca^{2+}$ 動員により惹起されることが判明した。

この研究成果は、1992年薬理学会総会シンポジウムで発表し、さらに外国雑誌への投稿に向け現在論文作成中である。

#### 今後の課題と発展

$\alpha_1$ 受容体は虚血心筋再灌流時にその数が増加することが報告され、致死性不整脈発生への関与が指摘されている。本研究から得た成果をもとに、その発生の背景を推察すると、 $\alpha_1$ 受容体刺激に連結したPI応答に続き、2次情報伝達物質として作動するイノシトール3リン酸とプロテインキナーゼCは、チャンネルを通じての $Ca^{2+}$ 流入すなわち $Ca^{2+}$ 電流の過剰増加をもたらし、その

結果、心筋細胞膜の電気生理的活動に異常を来たし不整脈を誘発する可能性がある。さらに最近、PKCの活性化に伴い $Ca^{2+}$ 電流のみならず、 $K^+$ 電流や $Cl^-$ 電流も変化することが明らかになりつつある。これらのイオンはいずれも心筋の電気活動の制御に重要な役割を果たしている。

今後、 $\alpha_1$ 受容体刺激により種々のイオン電流が受ける変化と、2次情報伝達物質との関連性について検討をしたいと考えている。こうした研究は現在社会的関心の高い再灌流時不整脈の病態解明と治療方法の開発に重要な手掛かりを与えらると思われる。

#### 発表論文リスト

- 1) H. Otani, M. Hara, and C. Inagaki: Mechanisms for  $\alpha_1$ -adrenergic regulation of cardiac contractility. *Japan. J. Pharmacol.*, 58, 31 (1992).
- 2) H. Otani, M. Hara, X. T. Zeng, K. Omori, and C. Inagaki: Different patterns of protein kinase C redistribution mediated by  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation and phorbol ester in isolated rat left ventricular papillary muscle. *Brit. J. Pharmacol.* 107, 22-26 (1992).
- 3) H. Otani, M. Hara, T. Tanabe, and C. Inagaki: Mechanism for  $\alpha_1$ -adrenoceptor-mediated inotropic effect: roles of intracellular  $Ca^{2+}$  and pH in modulating cardiac contractility. In Preparation.