

## カルシトニン遺伝子関連ペプチドの心血管系に対する作用の電気生理学的解析

Electrophysiological analysis of the effect of calcitonin gene-related peptide on the cardiovascular system

代表研究者 国立衛生試験所主任研究官 小野景義  
Senior Res., National Institute of Health Sciences  
Kageyoshi Ono

Mechanisms of ion-channel regulation in the heart by calcitonin gene-related peptide (CGRP) was investigated. The author has reported that CGRP strongly increases calcium current ( $I_{Ca}$ ) and delete delayed rectifier potassium current ( $I_K$ ) in both amphibian and mammalian cardiac muscle cells through a GTP-binding protein- and cAMP-dependent mechanism. The present study was aimed at further elucidating the physiological role of CGRP, especially concerning its current specificity and the underlying intracellular mechanisms. Emphasis was put on comparison of the effects of CGRP and adrenergic  $\beta$ -receptor stimulants, as well as on temperature-dependency of the effects. CGRP activated  $I_{Ca}$  in guinea-pig atrial myocytes without significant change in its voltage-dependence of either activation or inactivation. On the other hand, the peptide increased  $I_K$  with a significant leftward shift of the voltage-dependence of activation. CGRP at very low concentrations increased both  $I_{Ca}$  and  $I_K$  to almost the same extent, whereas an  $\beta$ -adrenergic agonist, isoproterenol, somewhat preferentially increased  $I_{Ca}$ . Thus, the current specificity of the two agonists differed significantly. The current specificity changed dramatically with change in temperature: at low temperature such as 20°C, CGRP preferentially activated  $I_{Ca}$ . Intracellular application of cAMP gave results suggesting this temperature-dependency was attained at a step peripheral to the cAMP production. Further study is now under progress concerning the intracellular mechanisms for the regulation of cardiac ion-channels by CGRP. Some additional findings about electrophysiological action of endothelin is also reported briefly.

### 研究目的

当研究の目的は、近年心臓血管系における新しい神経伝達物質として注目されているカルシトニン遺伝子関連ペプチド (Calcitonin Gene-Related Peptide, CGRP) の持つ強力な心筋収縮力増大・心搏数増大作用および冠血管拡張作用の作用機序を、電気生理学的手法を用いて解明し、細胞膜の各種イオン電流に対する作用を明らかにすることである。

CGRP は当初カルシトニン遺伝子の近傍に未知のペプチドがコーティングされていることからその存在が予測された、ユニークな発見経緯を持つペプチドである。CGRP を含む神経線維は、心

臓ではペースメーカー領域 (SA node) および心房筋に高密度に存在する。また、心室では冠血管の周囲に密に存在することが知られている。CGRP はこの神経から遊離され、心搏数と心房筋収縮力を増大させる。虚血その他の組織環境の変化に対し、反射性に CGRP が遊離されることが知られており、CGRP 含有神経が交感神経・副交感神経とともに心血管系の機能調節に重要な役割を担っていると考えられるようになった。この CGRP 含有神経の生理的役割を解明することにより、虚血に伴う不整脈をはじめとするさまざまな病態や老化に伴う心機能の変化を理解し、関連する疾患に対する有効な治療法や治療薬を開発す

るための重要な基礎が得られる。本研究では、心筋に対する CGRP の強力な生理作用の機序を、単離心筋細胞を用いた電気生理学的手法により解明する。また、その細胞内メカニズムも併せて解明する。

## 研究経過

心筋細胞のカルシウム電流 ( $I_{Ca}$ ) および遅延性カリウム電流 ( $I_K$ ) に対する CGRP の効果に関し、当初の研究計画に沿って検討した。モルモットの心房筋細胞を酵素処理により単離し、単一ガラス吸引電極を用いた whole-cell clamp 法を用いてイオン電流を記録、解析した。以下の各項目につき検討を行い、それぞれ CGRP の電気生理学的作用を理解するうえで興味ある結果を得た。

- ①  $I_{Ca}$  の活性化および不活性化に対する CGRP の作用——膜電位依存性の変化の有無
- ②  $I_K$  の活性化および不活性化に対する CGRP の作用——膜電位依存性の変化の有無
- ③ CGRP の作用のチャネル選択性に関する検討——交感神経  $\beta$  受容体刺激薬との相違
- ④ cAMP の細胞内直接適用による  $I_{Ca}$  および  $I_K$  の活性化——両電流の増大率などの比較
- ⑤ CGRP の両イオン電流に対する作用の温度依存性に関する検討

以上の各項目につき、当初の計画どおり研究を進め、必要な実験結果を得ることができた。それらの成果を次項に記す。一方、当初計画した以下の項目については、必要な酵素などの精製が計画どおりに進まず、今後の検討課題として残された。

- ⑥ A-kinase の catalytic subunit の調製およびその細胞内投与によるイオン電流の変化
- ⑦ 各種抗体の作成およびそれらの細胞内投与の効果に関する検討

本研究の助成期間中、本研究に密接に関連してエンドセリンの作用に関する極めて興味深い知見を得ることができた。エンドセリンは心血管系をはじめとする多くの組織でその作用が注目されている重要な内因性生理活性ペプチドである。この成果は本助成に負うところ大ゆえ、当初の研究計画からは外れるが次項末に概略を付記する。

## 研究成果

### (1) CGRP の $I_{Ca}$ 活性化および不活性化の膜電位依存性に対する効果

CGRP は交感神経  $\beta$  受容体刺激薬である Isoproterenol (ISO) と同様、 $I_{Ca}$  の活性化曲線、不活性化曲線共にその膜電位依存性を変化させず、電流の活性化と不活性化の狭間に生じるいわゆる window current も生じさせなかった。このことは不整脈の発現に関連して重要であり、CGRP が心筋活動電位プラトー相における異常興奮を惹起する可能性は低いと考えられる。

### (2) CGRP による $I_K$ の活性化・脱活性化とその膜電位依存性の変化

CGRP は極めて低濃度 (3 nM) で強力に心房筋細胞の  $I_K$  を増大させ、その作用は用量依存的であった。CGRP は  $I_K$  活性化の膜電位依存性を有意に左方へ移動させ、より深い膜電位で  $I_K$  の活性化が起こるようになることが明らかとなった (control;  $V_{1/2} = 16.9 \pm 2.4$  mV, CGRP 300 nM;  $V_{1/2} = 12.5 \pm 3.0$  mV,  $n = 5, p < 0.05$ )。この結果、心筋活動電位プラトー相の早い時期において  $I_K$  電流がより強く活性化され、再分極速度が加速されることとなる。

### (3) CGRP による $I_{Ca}$ , $I_K$ それぞれの活性化の用量依存性の比較および、これらと交感神経 $\beta$ 受容体刺激薬の作用との相違について

CGRP と交感神経  $\beta$  受容体刺激薬イソプロテレンオール (ISO) は共に心臓の adenylylate cyclase を活性化し、cAMP 産生を増大させることが知られている。しかし、これまでの筆者および他の研究者の研究成果を併せて考察すると、CGRP は極めて低い濃度から  $I_{Ca}$ , cAMP 産生共に増大させるのに対し、ISO は  $I_{Ca}$  を増大させるよりはるかに高濃度で初めて cAMP 産生を増大させると推察された。この推察が正しいならば、CGRP は極めて低濃度で  $I_{Ca}$ ,  $I_K$  共に強力に活性化させ、ISO は低濃度で  $I_{Ca}$  のみを選択的に活性化させるはずである。なぜなら、 $I_K$  の活性化は  $I_{Ca}$  の活性化に比較して細胞内 cAMP 量の変動に依存性がより高いからである。事実、筆者は frog の心筋細胞において低濃度 (5 nM) の ISO が  $I_{Ca}$  のみを選択的に

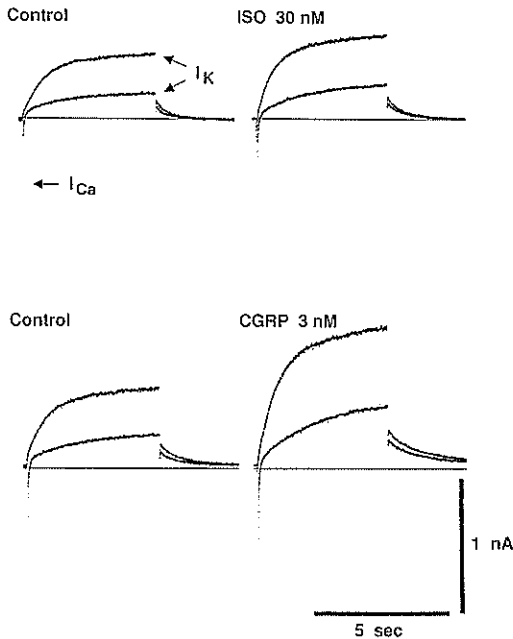


図1. カルシウム電流 ( $I_{Ca}$ ) および遅延性カリウム電流 ( $I_K$ ) に対する, Isoproterenol (ISO) および CGRP の増強効果の比較. モルモットの心房筋細胞を用い, 膜電位を  $-40$  mV に固定し,  $+10$  mV または  $+50$  mV への5秒間の脱分極パルス間に流れる  $I_{Ca}$  と  $I_K$  とをそれぞれ記録した. 典型的な記録例を示す. 図上段は ISO 30 nM の効果を, 下段は CGRP 3 nM の効果を示す. ISO は  $I_{Ca}$  を 150.3% 増強する濃度で  $I_K$  をわずかに 20.5% しか増強しなかった. これに対し, CGRP は  $I_{Ca}$  を 73.3% 増強する濃度で  $I_K$  も 66.3% 増強し, 両電流をほぼ同程度に増強した. 両薬物の作用を比較すると, ISO と CGRP とでは電流選択性が異なることがわかる. 実験は  $26^\circ\text{C}$  にて行った.

増大させることを見だし, 報告している (Giles *et al.*, 1989).

実験では, 特に低濃度の CGRP および ISO の作用に焦点を絞り, 各濃度における  $I_{Ca}$  と  $I_K$  との増大率を比較した. 保持電位は  $-40$  mV とし,  $I_{Ca}$  は  $+10$  mV に 100 msec の間, また  $I_K$  は  $+50$  mV に 5 sec の間, それぞれ膜電位固定することにより記録した. その結果, ISO は低濃度で  $I_{Ca}$  のみを特異的に増大させ, CGRP は極めて低濃度から  $I_{Ca}$ ,  $I_K$  共に強力に増大させることが判明した (図1). 言い換えれば ISO による  $I_{Ca}$  の活性化と  $I_K$  の活性化との用量-作用曲線にはずれがあ

るのに対し, CGRP の場合は両者がほぼ一致する. すなわち, 同様に細胞内 cAMP 産生を介すると考えられてきた CGRP と ISO とに細胞内機序の点で相違があることが明らかとなった. 今後, 局所の cAMP 量の変動を検出するために, 最近開発された共焦点レーザー顕微鏡・画像解析装置を用いた光学的測定法を駆使して検討を進める計画である.

次に, この ISO と CGRP との細胞内機序の違いが受容体からイオンチャネルに至る細胞内情報伝達経路のどこに起因するのかを知るため, 以下の実験を行った.

#### (4) cAMP の細胞内への直接投与による $I_{Ca}$ , $I_K$ 両電流の活性化作用について

記録電極内に高濃度の cAMP ( $100 \mu\text{M}$ ) を含ませ, 記録電極が細胞に刺さった瞬間 (whole-cell clamp 成立の瞬間) から  $I_{Ca}$  と  $I_K$  との両膜電流の変化を観察した. その結果, 次の二つのことが明らかとなった. 第1に, cAMP の細胞内灌流により  $I_{Ca}$ ,  $I_K$  共に活性化されるがその時間経過は前者が数10秒程度先行すること, 第2に, cAMP の作用が平衡に達した時点では,  $I_{Ca}$ ,  $I_K$  共に同程度の増大率に達することである. これらの結果は, cAMP 以降両イオンチャネルに至る経路に, ①介入する酵素 (群) の反応速度に違いがあるか, あるいは②それら酵素 (群) の cAMP 感受性自体に差がある可能性を想定しなければ説明がつかない. この点につき, 現在種々の濃度の cAMP を直接細胞内に適用することによる両電流の増大率を定量的に詳細に比較検討中である.

一方, 平衡状態における実験結果は, cAMP 濃度さえ十分に上昇すれば両チャネル共に同程度の活性化を受け得ることを示唆している. これらの事実は, CGRP が ISO に比較してはるかに低濃度から adenylate cyclase を活性化させるという報告を裏付けるものである. 細胞内2次メッセンジャーである cAMP 濃度の上昇を介する経路は ISO よりむしろ CGRP の方に密接に関連している可能性が示唆された.

#### (5) イオン電流活性化の温度依存性について

$I_{Ca}$  と  $I_K$  は共に細胞内 cAMP により活性化さ

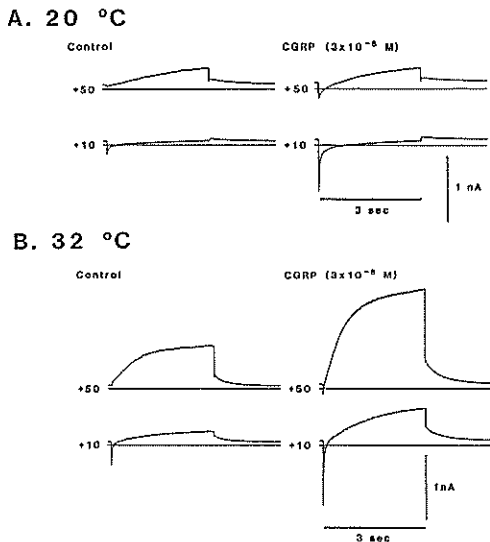


図2. CGRPの作用の温度による変化。 $I_{Ca}$ と $I_K$ に対するCGRP 30 nMの増強効果は、温度変化に伴い著しく変化した。20°C(上段, A)においてCGRPは $I_{Ca}$ (+10 mVにおける記録を参照)を強く増強したのに対し、 $I_K$ (+50 mVにおける記録を参照)は極めて軽度が増強するのみであった。これに対し、32°C(下段, B)ではCGRPは $I_{Ca}$ 、 $I_K$ 共に著しく増強した。実験にはモルモット心房筋細胞を用い、-40 mVに膜電位固定の後、+10 mVまたは+50 mVへの3秒間の脱分極パルスを与え、その間に流れる $I_{Ca}$ および $I_K$ を、それぞれ観察した。

れることが知られている。一方、 $I_{Ca}$ の電位依存的活性化は温度変化の影響を受けにくいのに対し、 $I_K$ のそれは強い温度依存性を示す。このことより、CGRPによるcAMPを介する活性化は $I_{Ca}$ 、 $I_K$ 両電流系で温度依存性を異にし、異なる経路を介する可能性が推察される。この点を明らかにするため、20°Cと32°CとにおけるCGRPの効果を比較した。まず、各イオン電流自体の温度依存性を調べた。 $I_{Ca}$ は実験温度によらず膜電位依存的に活性化されたが、 $I_K$ は低温(20°C)では脱分極(+50 mV)による活性化が極めて小さくかつ遅いのに対し、高温(32°C)では電流量、活性化速度共に増大した(図2)。CGRPの効果も両電流の間で明らかな温度依存性の違いが観察された。 $I_{Ca}$ は温度によらずCGRP(30 nM)により3~5倍に増

加したが、 $I_K$ はCGRP(30 nM)により、20°Cではわずか10数%の増大しか起こさないのに対し、32°Cでは2倍以上の増大を示した(図2)。

次に細胞内にcAMP(100  $\mu$ M)を直接投与し、同様の実験を行った結果、この場合も同様に両電流に温度依存性の違いが観察された。したがってこの温度依存性の相違は主としてcAMP産生以降の機序に起因することが明らかとなった。現在さらにcAMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニット等の細胞内適用の効果を検討中である。

#### (6) その他。エンドセリンの心臓に対する作用の電気生理学的解析

本実験の過程で、エンドセリンが $I_K$ を強く活性化させることを見いだした。また、他のいくつかの電流系にも興味深い変化が観察された。血管内皮細胞から発見され、強力な血管収縮作用を持つことがわかった内因性ペプチド、エンドセリン(ET)は、現在までにさまざまな組織でその分布が確認され、多様な生理作用を担っている。心臓では強力な心収縮力増大および心搏数増大作用を持っている。筆者は本研究助成によりCGRPの電気生理学的作用の解明を進めるうち、ETが電気生理学的には、むしろ心筋収縮力の増大作用などから期待されるのとは逆の作用すなわち心筋の電気的興奮を抑制する作用を持つことを見いだした。以下にその概略を報告する。i) ET-1は極めて低濃度でモルモット心筋の活動電位持続時間を短縮させた。ii) ET-1は心筋のカルシウム電流を単独で強く抑制した。またISOにより増強された $I_{Ca}$ に対しても強い抑制作用を示した。iii) ET-1のこれらの作用はET<sub>A</sub> receptorのblockerにより遮断された。iv) ET-1の作用の発現にはGTP-結合蛋白質が介在していることを示唆する実験結果を得た。これらの研究成果は現在投稿準備中である。

#### 今後の課題と発展

本助成期間中に達成できなかった以下の点につき、今後逐次検討を進める。

- i) A-kinaseのcatalytic subunitの調製および細胞内投与

ii) 各種抗体の作成およびそれらの細胞内投与の効果に関する検討

iii) 結節細胞 (SA node, AV node) の膜電流に対する CGRP の作用

さらに、エンドセリン、アンジオテンシン、心房性利尿ホルモンなどの重要な生理活性ペプチドの心筋に対する作用に関し、電気生理学的手法を用いて解明を進める計画である。

#### 発表論文リスト

- 1) Giles, W., Nakajima, T., Ono, K. and Shibata, E. F.: Modulation of the delayed rectifier  $K^+$  current by isoprenaline in bull-frog atrial myocytes. *J. Physiol.*, 415, 233-249 (1989).
- 2) Ono, K., Delay, M., Nakajima, T., Irisawa, H. and Giles, W.: Calcitonin gene-related peptide regulates calcium current in heart muscle.

*Nature*, 340, 721-724 (1989).

- 3) Ono, K. and Giles, W. R.: Electrophysiological effects of calcitonin gene-related peptide in bull-frog and guinea pig atrial myocytes. *J. Physiol.*, 436, 195-217 (1991a).
- 4) Nakajima, T., Ono, K., Shibata, E. F. and Giles, W.: Modulation of  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  currents by isoproterenol in bull-frog atrial myocytes. *Biophys. J.*, 55, 294a (1989).
- 5) Ono, K., Nakajima, T., Irisawa, H. and Giles, W. R.: Calcitonin gene-related peptide modulates  $Ca^{2+}$  current in bull-frog atrial myocytes. *Biophys. J.*, 57, 308a (1990).
- 6) Ono, K. and Giles, W. R.: Calcitonin gene-related peptide increases  $Ca^{2+}$  and  $K^+$  currents and prolongs the action potential duration in guinea pig atrial myocytes. *Jpn. J. Pharmacol.*, 55(Suppl.), 370P (1991b).