

氏名・(本籍)	にし お よし ひこ 西 尾 善 彦 (滋賀県)
学 位 の 種 類	医学博士
学 位 記 番 号	医博第 55 号
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与年月日	平成元年 3 月 24 日
学 位 論 文 題 目	ストレプトゾトシン糖尿病ラット心筋細胞 $\beta$ -アドレナリン受容体分布 異常とアドレナリン作用不全について

審 査 委 員	主査 教授	戸 田 昇
	副査 教授	繁 田 幸 男
	副査 教授	木之下 正 彦

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

糖尿病患者は心不全の発症頻度が高いことが知られ、その一因として心収縮力のアドレナリン反応性低下を指摘した。ストレプトゾトシン糖尿病ラットでもこの心アドレナリン反応性低下が報告され、我々は心筋細胞膜における  $\beta$ -アドレナリン受容体数 ( $\beta$ -AR) の低下及び GTP 結合タンパク質の変化によるアデニルシクラーゼ活性化不全の重要性を明らかにした。今回、私はこの糖尿病における心筋細胞膜  $\beta$ -AR 数減少が受容体の細胞内分布異常に基づくことを明らかにし、更に短期受容体数調節機構とその異常についても検討した。

### 〔方 法〕

動物：雄性 SD 系ラット (150-200g) にストレプトゾトシン (65 mg/kg) を投与した群を糖尿病群 (n=8)、同週令未処置ラットを対照群とした (n=8)。8-10 週後に実験に用い、一部は実験 48 時間前よりインスリン治療した (n=6) (1 日目 60 単位、2 日目 30 単位)。心筋細胞の単離：既報のコラゲナーゼ灌流法によった。Percoll の密度勾配により桿状心筋細胞を分離し、その 95% 以上がトリパンブルーに染まらなかった。心筋細胞膜の単離：Jonse らの方法 (J. Biol. Chem. 1979) によった。 $\beta$ -AR の測定：細胞表面  $\beta$ -AR の測定は単離心筋細胞を [ $^3$ H] CGP12177 (0.1-1.5 nM) と 37℃ で 90 分間孵置し、全  $\beta$ -AR 数は [ $^{125}$ I] iodocyanopindolol ([ $^{125}$ I] ICYP) (25-400 pM) と 37℃ で 60 分間孵置して行い、非結合リガンドの分離は Whatman GF/B フィルターを用いた。プロプラノロール 1  $\mu$ M 存在下の結合を非特異結合とし、受容体数及び解離定数は Scatchard 解析より求めた。アデニルシクラーゼ活性の測定：心筋細胞膜を用い、既報の方法に準じて 30℃ 15 分間に生成された c-AMP を RIA-

Kitにて定量した。In vitroでの細胞表面 $\beta$ -AR数の変動: 8nM インスリン、600mg/dl グルコース、10mM 3ヒドロキシ酪酸、50mM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)を単離心筋細胞と37℃2時間孵置後 [ $^3$ H] CGP12177 結合で検討し、また、10 $\mu$ M イソプロテレノールと37℃10分間孵置後 [ $^3$ H] CGP12177 結合の変化を検討した。

#### 〔結 果〕

1) 血糖値は糖尿病群、対照群各々 $582 \pm 20$ ,  $144 \pm 8$  mg/dl (means  $\pm$  SEM)と糖尿病群で高値 ( $P < 0.01$ )であったが、血清  $T_3$  値、尿中カテコラミン排泄値に差はなかった。48時間のインスリン治療により血糖値は  $122 \pm 10$  mg/dl に低下した。2) [ $^3$ H] CGP12177 で測定した細胞表面 $\beta$ -AR数は糖尿病群、対照群各々 $91 \pm 6$ ,  $155 \pm 16$  fmole/ $10^6$  cellsと糖尿病群で対照群の51% ( $P < 0.01$ )に低下したが、解離定数には差はなかった。 [ $^{125}$ I] ICYP で測定した全細胞 $\beta$ -AR数は糖尿病群、対照群各々 $430 \pm 59$ ,  $445 \pm 45$  fmole/ $10^6$  cellsと差はなく解離定数も差がなかった。3) アデニルシクラーゼ活性の基礎値及びホルスコリン最大刺激値は両群間に差はなかったが、10 $\mu$ M イソプロテレノール存在下では対照群、糖尿病群各々 $129 \pm 14$ ,  $86 \pm 4$  pmole/mg prot./minと糖尿病群で56%低下 ( $P < 0.05$ )した。4) 48時間のインスリン治療により細胞表面 $\beta$ -ARは $125 \pm 11$  fmole/ $10^6$  cellsと未治療群に比し増加した ( $P < 0.05$ )。5) in vitro インスリン処置は糖尿病単離心筋細胞表面 $\beta$ -AR数に影響しなかったがPMAはそれを18% ( $P < 0.05$ )増加させた。対照単離心筋細胞を高濃度グルコース及び3ヒドロキシ酪酸は細胞表面 $\beta$ -AR数を低下させなかった。6) イソプロテレノールでの心筋細胞表面 $\beta$ -ARのdown regulationは糖尿病群で対照群の69%に低下し ( $P < 0.05$ )、その後2時間の回復は糖尿病群で対照群の33% ( $P < 0.05$ )にとどまった。

#### 〔考 察〕

本研究で糖尿病ラット心筋細胞表面 $\beta$ -ARの低下を明らかにした。これは細胞全 $\beta$ -AR数の減少に基づくものではなく受容体の細胞内分布異常に依ることが示された。アデニルシクラーゼ活性はこれを直接刺激するホルスコリン存在下では両群に差はなく、イソプロテレノール存在下でのみ糖尿病群で低下したことから細胞表面 $\beta$ -AR低下が糖尿病心筋でのカテコラミン反応性低下に重要と考えられた。 $\beta$ -ARは甲状腺ホルモン及びカテコラミンによって調節を受けるが、慢性糖尿病ラットでこれらの値に対照群と差を認めず、短期インスリン治療でもこれらホルモン値と関係なく改善したことから細胞表面 $\beta$ -AR数の低下は糖尿病に特異的な変化と考えられた。 $\beta$ -ARは細胞表面と細胞内プール間をリサイクリングしており、糖尿病心筋での受容体の細胞内分布異常は受容体の細胞表面への出現率の低下もしくは細胞内への消失率の増加で説明される。糖尿病群でイソプロテレノールによるdown regulationは亢進せず回復が有意に低下していた。これは $\beta$ -ARの細胞内から細胞表面への移動の過程での異常を示唆し、PMAが糖尿病心筋細胞表面 $\beta$ -AR数を増加させたことからこの異常にC-キナーゼ系の関与も示唆された。

#### 〔結 語〕

ストレプトゾトシン糖尿病ラット心筋細胞でのカテコラミン反応性低下には細胞表面 $\beta$ -AR

の低下が重要である。この低下は糖尿病状態と密接に関連し、短期インスリン治療にて可逆的な $\beta$ -ARの細胞内プールより細胞表面への転送異常に基づくことが示唆された。

#### 学位論文審査の結果の要旨

糖尿病患者において心筋のカテコラミン反応性の異常が何故ひき起こされるかを明らかにする目的で、ストレプトゾトシン糖尿病ラットモデルにおけるカテコラミンのシグナル伝達機構について検討を加えた。糖尿病ラットより単離した心筋細胞において、親水性リガンド [ $^3\text{H}$ ] CGP-12177 結合にて測定した細胞表面 $\beta$ -アドレナリン受容体数は対照ラットの59%に低下したが、脂溶性リガンド [ $^{125}\text{I}$ ] ICYP 結合にて測定した細胞全体の $\beta$ -アドレナリン受容体数は両群で差を認めなかった。コレラ菌毒素及び百日咳菌毒素による $^{32}\text{P}$ -NAD 取り込みにより測定した心筋細胞膜の促進性及び抑制性GTP結合蛋白は糖尿病ラットにおいてともに有意に増加した。アデニルシクラーゼ活性の $\beta$ -受容体刺激薬に対する反応性は糖尿病ラットで著しく低下したが、フォルスコリンに対する反応性は対照との差を認めなかった。48時間のインスリン治療は、血清トリヨードサイロニン値及び尿中カテコラミン排泄量を変化することなしに細胞表面の $\beta$ -アドレナリン受容体数を37%増加させた。 $\beta$ -刺激薬により細胞表面 $\beta$ -アドレナリン受容体はdown regulationを受け、その回復は糖尿病で対照の52%に低下した。以上の成績より、糖尿病ラット心筋におけるカテコラミン反応性低下に細胞膜の $\beta$ -アドレナリン受容体数の減少が関与すると考えられる。また、その機構として同受容体の細胞内より膜への移動の障害が示唆される。この障害は短期インスリン治療により改善されたことより、糖尿病の代謝異常に密接に関連していると考えられる。

この研究は、興味ある基礎データに加えて臨床面でも役立つすぐれた内容を有するものであり、学位を授与するに値すると判断された。