The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ラット単離心筋細胞におけるアドレナリンα1受容体およびフォスファチジールイノシトール代謝回転に対する低酸素の影響
Author(s)	岩倉, 克臣
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36049
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【35】

氏名・(本籍)	岩倉克臣（いわくら かつおみ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8605 号
学位授与の日付	平成元年3月24日
学位授与の要件	医学研究科内科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ラット単離心筋細胞におけるアドレナリンα_1受容体およびフォスファチジールイノシトール代謝回転に対する低酸素の影響**
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 多田 道彦　教授 吉田 博

論文内容の要旨

〔目的〕

近年，冠動脈閉塞後再灌流時の致死性不整脈や細胞障害にアドレナリン α_1 受容体活性が関与していることが報告され，そのメカニズムに α_1受容体の変動が重要な役割を果していることが示唆されている。そこで，本研究では低酸素状態が，心筋細胞の α_1 受容体およびその細胞内セカンドメッセンジャーであるフォスファチジールイノシトール（PI）代謝回転反応に与える影響について，交感神経活性や血中カテコラミンなどの体液因子の影響を受けないラット単離心筋細胞を用いて検討した。

〔方法〕

1）アドレナリン α_1 受容体の測定

Wistar系雄性ラット（200－250gm）の摘出心より0.06％collagenase処理によって心筋細胞を単離した。Ca^{2+}(+)HEPES－Tyrode 液中に浮遊させた心筋細胞を95％N_2＋5％CO_2下（低酸素群）および95％O_2＋5％CO_2下（対照群）に，37℃にて30分間 incubate した後，直ちに両群細胞を，4℃の条件下に移し，α_1 受容体のラジオリガンド〔^{3}H〕prazosin（0.25－2.48nM）存在下に，4℃にて24時間 incubate した。その後，GF／Fグラスフィルターにて結合リガンドを分離，測定した。なお非特異的結合はphentolamine 10^{-5} M存在下に決定した。

2）フォスファチジールイノシトール（PI）代謝回転の測定

ラット単離心筋細胞を〔^{3}H〕myo－inositol 10μCi／ml存在下に37℃，30分間 incubate した後，再びHEPES－Tyrode液中に浮遊，95％N_2＋5％CO_2または95％O_2＋5％CO_2 条件下にて30分間 incubate した。両群細胞を10^{-5}Mノルエピネフリン（NE）にて15分間刺激，chroloform／methanol

（1：2）にて反応を停止，抽出した〔^{3}H〕inositolphosphate（InsP）をBerridgeらの方法によって定量した。

また一部の細胞では95％O_2＋5％CO_2 または95％N_2＋5％CO_2 にて incubation後，直ちにNE(10 M）にて15秒間刺激し，反応を15％TCAにて停止させた後，抽出した水溶成分中の inositol（1，4，5）trisphosphate（Ins（1，4，5）P_3 ）を，Ins（1，4，5）P_3 specific binding protein を用いた binding assay にて定量した。

その他細胞内Ca^{2+}は細胞内Ca^{2+}指示薬 fura－2／AMを，細胞内pHはBCECF（2，7－biscarboxyethyl－5(6)－carboxyfluorescein）／AMを用いて測定，また細胞よりのアデノシン遊出量は radioimmunoassay（RIA）法を用いて定量した。

〔成績〕

95％N_2＋5％CO_2 の条件下（pO_2 46.8±6.4mmHg）にて30分間 incubate することによって，細胞内pHは対照群の 7.04±0.16から 6.82±0.06（n=5：p＜.05)に低下し，またアデノシンの遊出も有意に増加した（5.45±2.08→9.93±5.03 pmol／10^4 cells, p＜.05：n＝5）。一方，細胞内Ca^{2+}は30分間の低酸素状態では有意な変化を認めず（213.8±9.0nM vs 236.8±31.6nM，n＝5），本実験条件下では心筋細胞の不可逆性変化は生じていないことが示された。

この様な低酸素条件下（30分間）で単離心筋細胞の α_1 受容体数は51.6％増加し（9.7±2.5→14.6±3.3 10^4 binding sites／cell：n＝4，p＜.01），解離定数（Kd）は低下傾向を示した。（0.33±0.09→0.17±0.05nM：p＜.05）。一方，30分間の低酸素状態によって，α_1 刺激による〔^{3}H〕InsP の蓄積は有意に増加（16.2±0.4→18.4±0.3 fmol／min／10^6cells：n＝4，p＜.01）し，α_1 受容体刺激によるPI代謝回転速度が促進することが示された。また，NE刺激後の Ins（1，4，5）P_3 の産生量も有意な増加（46.5％）を示した（1.88±0.94→2.81±1.17 pmol／sample：n＝4，p＜.01）。なお，刺激前の basal value はいずれも有意な変化を認めなかった。

〔総括〕

1）30分間の低酸素状態によってラット単離心筋細胞のアドレナリン α_1 受容体数は有意に増加（51.6％）した。

2）30分間の低酸素状態は，〔^{3}H〕InsP蓄積量および Ins（1，4，5）P_3 産生量を有意に増加させたことより，低酸素条件下で増加した α_1 受容体は細胞内情報伝達機構に共役していることが明らかになった。

論文の審査結果の要旨

近年，虚血性心疾患におけるアドレナリン α_1 受容体の役割が注目されつつあるが，本研究は低酸素状態が心筋の α_1 受容体，および α_1 受容体刺激に共役した細胞内情報伝達系であるphosphatidylinositol代謝回転（PIresponse）に与える影響について，ラット単離心筋細胞を用いて検討したものであ

る。30分間の低酸素状態によって α_1 受容体数は有意に増加し，これに対応して α_1 刺激によるPIresponse も，亢進していることを明らかにした。

本研究は低酸素条件下における α_1 受容体反応の亢進に対して細胞内情報伝達機構の立場から基礎的知見を与えるものであり，虚血性心疾患の病態における α_1 受容体の意義を考える上で寄するところが大きく，学位に値するものと認める。