

ラット心虚血再灌流モデルの非虚血領域心筋において アデノシンA₁受容体遺伝子の発現は増加する

大矢 俊之* 日台 智明** 中山 智祥**
風間 宏美** 上松瀬勝男* 國分眞一朗**

要 旨：ラット心虚血再灌流モデルを作成し、心室筋におけるアデノシンA₁受容体(A1R)遺伝子の発現量の変化を検討した。A1R遺伝子発現は虚血再灌流後5分から有意に増加し、特にその増加は虚血領域(左心室)よりも非虚血領域(右心室)において著明であった。この知見はアデノシンの心筋保護作用におけるA1Rの新たな役割を示唆するものである。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, 44: 29-34)

Key words: Adenosine A₁ receptor, Heart, Ischemic preconditioning

序 文

心臓は短時間の虚血に暴露されることで、引き続いて起こる虚血に対する耐性を獲得する。虚血プレコンディショニングと呼ばれるこの現象は、1986年にMurryらによって報告された¹⁾。その後の研究により、プレコンディショニングが虚血性心疾患の予後を改善することが証明され、虚血性心疾患の新たな治療戦略の対象として注目を浴びている²⁾。プレコンディショニングとは、すなわち虚血に対する新たな心臓保護機構を形成するものであり、その成立機序には、アデノシン、K_{ATP}チャンネル、reactive oxygen species、熱性ショック蛋白などの関与が推測されている³⁻⁶⁾。アデノシンは、心筋においてアデノシンA₁受容体(A1R)と結合し、Giと共役して細胞内のアデニルシクラーゼを抑制することで、虚血や心不全などの病的状態において心筋保護作用を示すと考えられている⁷⁾。事実、A1R遺伝子の過剰発現マウスは虚血刺激に対して高い耐性を示し、A1Rが虚血に対する心筋保護に有効であることが示された⁸⁾。また、心室筋におけるA1R遺伝子発現が虚血再灌流後ごく早期に増加することが報告され、A1Rはプレコンディショニング成立にも主要な役割を果たすことが示唆された⁹⁾。一方で、単離培養心筋細胞やLangendorffの手法を用いて心臓全体に低酸素刺激を加えた場合には、アデノシンの心筋保護作用はわず

かであり、A1R遺伝子の発現が変化しないという報告もある¹⁰⁻¹¹⁾。そこでわれわれは、虚血再灌流後に生じるA1R遺伝子発現の変化について検討するために本研究を行った。

対象と方法

1. ラット冠血流結紮とRNA抽出

動物実験はRecommendation from the Declaration of Helsinki and Guiding Principles in the Care and Use of Animalsに基づき、手術手技は主に三浦らの方法に従った¹²⁾。雄ウィスターラット(350~400g)の左冠状動脈前下降枝に絹糸をかけ、Heads等の方法に従い5分間冠動脈の血流を遮断し、10分間再灌流した後に心臓を摘出し、TRIzol(Invitrogen)を用いて心筋よりtotal RNAを抽出した(虚血再灌流群)³⁾。対象群は左冠動脈前下降枝に絹糸をかけ放置し、15分後に心臓を摘出し同様にtotal RNAを抽出した。

2. ノーザンプロット法

Sambrookらの方法により、A1R遺伝子のノーザンプロット解析を行った¹⁴⁾。プローブの作成、ハイブリダイゼーション、撮像はAikPhos DIRECT labeling kit Gene image(Amersham Pharmacia Biotech)とHyperfilm(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて行った。画像はNIH imageを用いて解析した。A1R遺伝子のmRNA量は内部コントロールのβ actin遺伝子のmRNA量に対する比

* 日本大学医学部内科学講座内科二部門

** 同先端医学総合研究センター受容体生物学部門

2003年5月9日受理 2003年9月18日受理

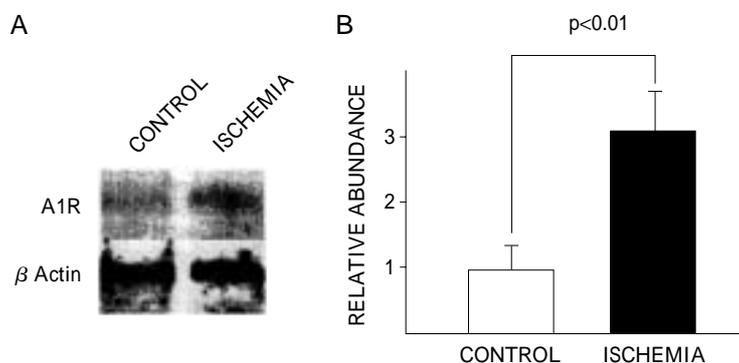


Figure 1 Northern blot analysis of adenosine A₁ receptor mRNA in the control and the ischemia reperfusion rat hearts. Total RNA was prepared from ventricular region of the heart and Northern blot analysis was performed. β -actin gene was employed as an internal control (A). The amount of A1R mRNA, expressed by the ratio to that of β -actin mRNA, is normalized to the value obtained in control hearts. n = 6. Columns and bars indicate mean \pm SD. **: p<0.01 (B)

で表した。結果は平均 \pm 標準偏差で表し、マン・ホイットニー検定を行い、p<0.01の場合有意差ありとした。

3. インサイツハイブリダイゼーション

虚血5分、再灌流10分後に摘出心をO.C.T.コンパウンドを用いて凍結包埋し、5 μ mの切片を作製して4%パラフォルムアルデヒドで固定後、GenPoint kit (DAKO)を用いてハイブリダイゼーションおよび発色反応を行った。

4. 比較定量PCR

心室筋を虚血部(左心室前壁および側壁)と非虚血部(右心室自由壁)に切り分けた後にtotal RNAを調整した。Super Script II (Invitrogen)を用いてcDNAを合成したのち、ABI PRISM 7700 sequence detecting system Express (Applied Biosystems)を用いてTaqMan PCR法を行った。A1R遺伝子のmRNA量は内部コントロールのGAPDH遺伝子のmRNA量に対する比で表した。結果は平均 \pm 標準偏差で表し、マン・ホイットニー検定を行い、p<0.01の場合有意差ありとした。

成 績

1. 虚血再灌流心におけるA1R遺伝子発現

心室筋では虚血再灌流群におけるA1R遺伝子発現量は対象群の約3倍に増加していることがノーザンブロット法により示された(Fig. 1)。

2. 虚血部位の同定とA1R遺伝子発現

冠動脈結紮時に経静脈的に100Mのdi-8-ANEPPS (Molecular probes)を0.3ml注入したところ、虚血再灌流ラットにおいて左心前壁から側壁にかけてdi-8-ANEPPSの取り込みのない領域を認め、その部位を虚血部位と同定した(Fig. 2A, B)。A1R遺伝子発現量はその部位より、非虚血領域である左室後壁や右室全体で明らかに増加していることが示された(Fig. 2C, D, E, F)。

3. A1R遺伝子発現量の部位による経時的変化

虚血再灌流群の左室虚血領域では虚血開始後5分で発現量が約5倍に増加したが、再灌流後は虚血前のレベルまで低下した(Fig. 3)。非虚血域である右室ではA1Rの遺伝子発現量が再灌流後5分で約4倍に増加し、10分後にはさらに増加して約6倍になった。一方、対象群では有意な変化は認められなかった。

考 案

虚血刺激の直後の心筋では数多くの遺伝子の転写が活性化する。Deindlらの報告によれば、最も早期にmRNA量が増加するのはc-fos等の早期反応性遺伝子群であり、10分間の虚血により増加が認められる¹⁵⁾。早期反応性の転写因子の増加に引き続き、熱ショック蛋白やカルシウム結合蛋白の遺伝子が活性化される。低酸素刺激に反応して種々の遺伝子発現を誘導するhypoxia inducible factor (HIF)も、早期反応性の転写因子に

よる新たな蛋白合成を経て働く¹⁶⁾。本研究では、虚血刺激後5分という非常に早い時期からA1R遺伝子の虚血領域での発現増加が観察された。この結果はA1R遺伝子が早期反応性転写因子と同様に、虚血刺激時に最も早く反応する遺伝子であることを示している。

虚血刺激に対する反応性が同様であることから、A1R遺伝子とc-fos遺伝子の転写調節機構も類似している可能性がある。虚血刺激直後に観察されるc-fos遺伝子の転写亢進は、L型カルシウムチャンネルから流入するカルシウムがカルシウムカルモジュリン依存性キナーゼを活性化し、それによってcAMP-responsive element binding protein-1 (CREB-1) がリン酸化を受けることが引き金になる¹⁷⁾。c-fosのプロモーター領域に存在するcAMP-responsive element (CRE) やserum responsive element (SRE) がcis elementとして機能する。特にSREは必須であり、この部位に変異を加えるとc-fos遺伝子の低酸素に対する反応性は消失する。一方、A1R遺伝子のプロモーターにはAとBの2種類があり、プロモーターBにはSREが存在する^{18, 19)}。このSREがA1R遺伝子の虚血刺激への反応に関与している可能性が高い。また、A1R遺伝子のプロモーターBにはAP-1 siteもあり、c-fos蛋白の増加がA1R遺伝子の素早い反応の増幅に寄与しているのかもしれない。

非虚血領域におけるどのような変化がA1R遺伝子の転写を亢進させるのだろうか。本研究では、5分間の虚血により虚血部位の左室においてA1R遺伝子の発現が増加した。続いて再灌流後に非虚血領域の右室で反応が起こった。この時間的なずれからいくつかの可能性が考えられた。一つは、虚血部位から生ずるreactive oxygen speciesをはじめとするさまざまな物質が再灌流により非虚血部位へ到達し、A1R遺伝子の発現を誘導する可能性である²¹⁾。この可能性については実際にreactive oxygen speciesがこのように短い時間でA1R遺伝子の発現を誘導できるか、また、その拮抗薬により反応を阻止できるかを実験することで明らかになると思われる。また、再灌流を行わなければ、reactive oxygen speciesの循環は起こらないため、非虚血領域の反応

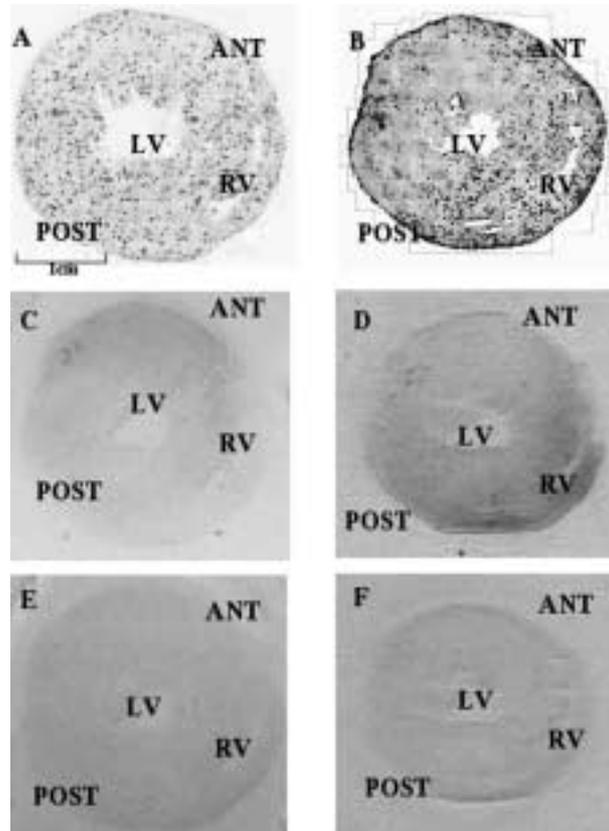


Figure 2 The distribution of di-8-ANEPPS and the expression of A1R gene in myocardium of the control (A, C, E) and the ischemia reperfusion hearts (B, D, F). Iv-injected 100 M di-8-ANEPPS is equally distributed in the whole area of the control myocardium (A), whereas in the ischemic myocardium the area in which the agent is not distributed is observed, indicating that perfusion in this area during ligation of the left coronary artery was limited (ischemic area) (B). *In situ hybridization* with the anti-sense probe (C, D) and sense probe (E, F) is shown. The sequences of probes for *in situ hybridization* are as follow. Antisense; 5, -CTGGCAGCGGAAATGGTCATTCCAAATCTT-3, Sense; 5, -AAGATTTGGAATGACCATTTCCGCTGC CAG-3. LV: left ventricle; RV: right ventricle; ANT: anterior; POST: posterior.

も誘発されないであろう。別の可能性として、左室心機能低下により肺動脈圧が上昇し、拡張した右室心筋が伸展し、それがc-fos遺伝子の転写を促進することがA1R遺伝子の転写活性化につながる可能性もある²²⁾。加えて、多様な神経体液性の変化が非虚血部位の心筋に作用すると思われる。例えば、A1R遺伝子のプロモーター領域にはglucocorticoid responsive element (GRE)があり、ストレス下で増加するステロイドホルモンにプロモーターBが反応してA1R遺伝子の転写を

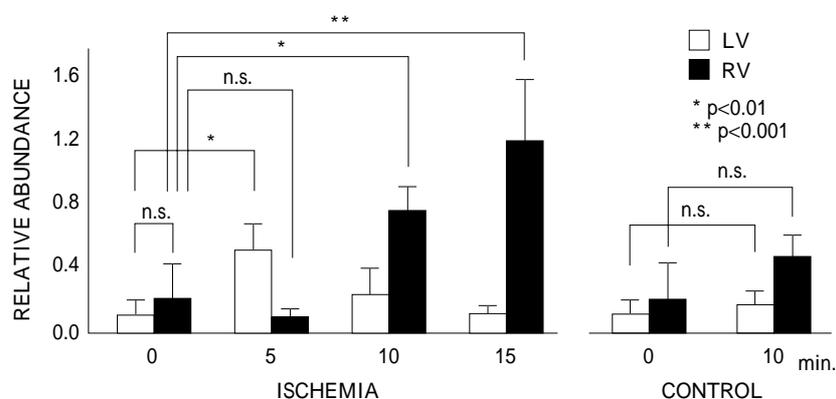


Figure 3 The time course of the production of A1R mRNA in ischemic and non-ischemic area evaluated by RT-PCR. The total RNA was prepared from the ischemic left ventricle area and the non-ischemic right ventricle area, respectively. The primer pair and TaqMan probe used in TaqMan PCR are 5'-CACTTCGCGATGCCACCT-3' (Forward) and 5'-CCAACGGCCACATCAGC-3' (Reverse), and 5'-FAM-CTGCTTCATCGTGTCTACTGGCGGT-TAMRA-3' (TaqMan probe), respectively. A1R mRNA expression is expressed by the ratio of GAPDH mRNA expression. n = 6. Columns and bars indicate mean \pm SD. *, p < 0.01, **, p < 0.001. LV: left ventricle; RV: right ventricle.

促進する¹⁸⁾。このように間接的に反応が誘導されると考えるには、虚血後10分という反応時間では短すぎると思われるが、補助的な役割を果たしているかもしれない。いずれにしても、非虚血領域でのA1R遺伝子の発現亢進は二次的な現象と考えられ、虚血特異的な反応ではない可能性もある。虚血以外の心疾患におけるA1R遺伝子の関与も興味深い²³⁾。

本研究において、虚血により増加した左室虚血領域でのA1R遺伝子発現は、再灌流後には減少してしまった。これは、再灌流障害のため心筋細胞の生理的機能が著しく低下したためと考えた。再灌流後のA1R遺伝子の増加はもっぱら非虚血領域において観察された。非虚血領域におけるA1Rの発現は、心臓という臓器全体にとってどのような意味があるだろうか。A1Rを介する情報伝達は交感神経系に対して拮抗的に働く。心筋梗塞患者に対する β 遮断薬の投与に心筋保護作用があることが報告されている²⁴⁾。アデノシンは心臓において陰性変力作用があり、A1Rの活性化は β 遮断薬の投与と同様な効果が推察される。本研究に用いた左冠動脈の結紮による虚血再灌流モデルでは、右室心筋の収縮が抑制されることで、機能の低下した左室にとっての前負荷を軽減し循環を維持するのに役立つと思われる。また、左室非虚血領域の収縮を制御することで、虚血境界域での代謝バランスを改善することも心筋保

護につながるであろう。

A1R遺伝子の発現は、虚血プレコンディショニングにおいて重要な働きをしていると考えられている⁸⁾。しかし虚血プレコンディショニングがA1Rを介して誘導されることについて、単離培養心筋や心臓全体への虚血刺激を用いた実験系では否定的な報告が多かった^{10, 20)}。A1R遺伝子の転写が活性化されるのが主に非虚血領域であるならば、非虚血領域が存在しない実験系では、アデノシンとA1Rの関与を正しく評価するのは困難であろう。同時に、それらの報告は非虚血域におけるA1Rが虚血プレコンディショニングに、何らかの意味を持っていることを示唆している。その視点から考えると、非虚血領域でA1R蛋白も増加しているのか、また、虚血プレコンディショニングにおいてA1Rの活性化に引き続いて観察されるK_{ATP}チャンネルなどの賦活化が起こっているのかなどの機能的実験を行う必要がある。また、右室の影響を取り除いた灌流モデルでの虚血プレコンディショニングにおけるアデノシンの影響を評価することも重要と思われる。

非虚血領域においてA1R遺伝子発現が増加するという事実は、アデノシンの心臓への作用が心筋組織単位ではなく臓器全体でとらえられるべきであることを示唆している。われわれの実験結果は、そこでのA1Rの新たな役割を示唆するものである。

結 論

虚血再灌流モデルラットにおいて，A₁R遺伝子の発現は虚血領域だけでなく非虚血領域において超急性期から増加していた。

文 献

- 1)Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986, **74**: 1124-1136.
- 2)Bolli R: The late phase of preconditioning. *Circ Res*, 2000, **87**: 972-983.
- 3)Takano H, Manchikalapudi S, Tang XL et al: Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbit. *Circulation*, 1998, **98**: 441-449.
- 4)伊達太郎，谷口郁夫，小林道子他：Ischemic preconditioningによる虚血再灌流時の一酸化窒素生成の抑制：ラット摘出灌流心の電極法による一酸化窒素測定．*脈管学*，1999，**39**：489-490．
- 5)Takano H, Bolli R, Black RG Jr et al: A₁ or A₃ adenosine receptors induce late preconditioning against infarction in conscious rabbits by different mechanisms. *Circ Res*, 2001, **88**: 520-528.
- 6)Matherne GP, Linden J, Byford AM et al: Transgenic A₁ adenosine receptor overexpression increase myocardial resistance to ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 6541-6546.
- 7)Shryock JC, Balardinelli L: Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: Biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol*, 1997, **79** (12A): 2-10.
- 8)Liang BT: Direct preconditioning of cardiac ventricular myocytes via adenosine A₁ receptor and K_{ATP} channel. *Am J Physiol*, 1996, **271**: H1769-1777.
- 9)平嶋由美：心筋アデノシンA₁受容体のクローニングおよびIschemic Preconditioning時における発現の増強．*東京女子医大誌*，1998，**68**：843-851．
- 10)Cave AC, Collis CS, Downey JM et al: Improved functional recovery by ischemic preconditioning is not mediated by adenosine in the globally ischemic isolated rat heart. *Cardiovascular Res*, 1993, **27**: 663-668.
- 11)Ganote CE, Armstrong S, Downey M: Adenosine A₁ selective agonists offer minimal protection against ischemic injury to isolated rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 1993, **27**: 1670-1676.
- 12)Miura T, Ishimoto R, Sakamoto J et al: Suppression of reperfusion arrhythmia by ischemic preconditioning in the rat: is it mediated by the adenosine receptor, prostaglandin, or bradykinin receptor? *Basic Res Cardiol*, 1995, **90**: 240-246.
- 13)Heads RJ, Latchman DS, Yellon DM: Differential stress protein mRNA expression during early ischemic preconditioning in the rabbit heart and its relationship to adenosine receptor function. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, **27**: 2133-2148.
- 14)Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T: Molecular cloning a laboratory manual, 2nd edition, Nancy F, Plainview, New York, 1989.
- 15)Deindl E, Schaper W: Gene expression after short periods of coronary occlusion. *Molecular and Cell Biochemistry*, 1998, **186**: 43-51.
- 16)Gopfer T, Eckardt KU, Geb B et al: Oxygen-dependent regulation of erythropoietin gene expression in rat hepatocytes. *Kidney international*, 1997, **51**: 502-506.
- 17)Premkumar DR, Mishra RR, Overholt JL et al: L-type Ca (2+) channel activation regulates induction of c-fos transcription by hypoxia. *J Appl Physiol*, 2000, **88** (5): 1898-1906.
- 18)Ren H, Stiles GL: Dexamethasone stimulates human A₁ adenosine receptor (A₁AR) gene expression through multiple regulatory sites in promoter B. *Molecular Pharmacology*, 1999, **55**: 309-316.
- 19)Ren H, Stiles GL: Characterization of human A₁ adenosine receptor gene. *The Journal of Biological chemistry*, 1994, **269**: 3104-3110.
- 20)Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM: Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 1987, **21**: 737-746.
- 21)Nie Z, Mei Y, Ford M et al: Oxidative stress increases A₁ adenosine receptor expression by activating nuclear factor κB. *Molecular Pharmacology*, 1999, **53**: 663-669.
- 22)Komuro I, Kaida T, Shibazaki Y et al: Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. *J Biol Chem*, 1990, **265**(7): 3595-3598.
- 23)Kitakaze M, Minamino T, Node K et al: Adenosine and cardioprotection in the diseased heart. *Jpn Circ J*, 1999, **63**: 231-243.
- 24)Beta-blocker heart attack study group: The beta-blocker heart attack trial. *JAMA*, 1981, **246**: 2073-2074.

The Expression of Adenosine A₁ Receptor is Accelerated in the Non-ischemic Area of the Ventricle in Ischemia Reperfusion of Rat Hearts

Toshiyuki Ohya*, Chiaki Hidai**, Tomohiro Nakayama**, Hiromi Kazama**,
Katsuo Kanmatsuse*, and Shinichiro Kokubun**

* The 2nd Department of Internal Medicine, Nihon University School of Medicine

** The Research Center of Advanced Medicine, Nihon University School of Medicine

Key words: Adenosine A₁ receptor, Heart, Ischemic preconditioning

Adenosine is one important factor involved in ischemic preconditioning (PC) of the heart. To investigate the molecular event evoked by ischemia, the expression pattern of adenosine A₁ receptor (A₁R) gene was studied in a rat ischemia reperfusion model. Northern blot analysis revealed that the expression level of A₁R gene was higher in the ischemic heart than in the control heart. Following this, in situ hybridization showed that in the ischemic heart, A₁R gene signal was higher in the right ventricular (RV) free wall and left ventricular (LV) posterior wall, both non-ischemic areas, than in the ischemic area. In the last study, the temporal expression pattern of A₁R gene was evaluated by comparative RT-PCR. In the non-ischemic area of RV free wall, the expression of A₁R gene increased within 5 minutes of reperfusion. After 10 minutes of reperfusion, it increased about six fold. On the other hand, the expression of A₁R in LV increased after ischemia and return to the control level after reperfusion. These data suggest that the up-regulation of A₁R gene in the non-ischemic area possibly play an important role in rat ischemia reperfusion model.

(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, **44**: 29-34)