

心臓収縮調節に関わるアセチルコリンおよび アドレナリン受容体種の解明

— 摘出マウス心房筋を用いての解析 —

北 澤 多喜雄・浅 川 幸 一・原 田 奈 央
越 智 建 太・高 橋 礼 奈・Zhang SHUANGYI*

Regulation of cardiac contractility by autonomic nerves and their neurotransmitters
in the isolated mouse atrium

Takio KITAZAWA, Koichi ASAKAWA, Nao HARADA,
Kenta OCHI, Rena TAKAHASHI and Zhang SHUANGYI*
(Accepted 9 December 2021)

1) はじめに

心臓は規則正しく収縮と弛緩を繰り返すことにより生体の各部位に酸素分圧に富んだ動脈血を供給し各組織の機能を維持している。心臓機能（収縮力、収縮頻度および伝導速度）は、自律神経や種々のホルモンにより調節されているが、その中でも主となるのは交感神経、副交感神経による拮抗性調節である。胸髄から出る交感神経節前神経は神経節で神経を乗り換え節後神経線維から放出されるノルアドレナリンは、心臓の $\beta 1$ アドレナリン受容体に作用し、adenylate cyclase を活性化して cAMP を産生し protein kinase A (PKA) 系を刺激する。PKA は、 Ca^{2+} チャネルと筋小胞体 Ca^{2+} ポンプのホスホランパンをリン酸化することにより、興奮時の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を増大し心収縮増加に寄与する (Broadley, 1982; Brodde and Michel, 1999)。一方、副交感神経では頭部 (脳) から出る節前神経が心臓に到達すると心臓組織内の心臓神経節で内在性節後神経 (コリン作動性神経) に乗り変える。この節後神経線維から放出されるアセチルコリンは心筋細胞に存在する M2 ムスカリン受容体を興奮させる。M2 ムスカリン受容体は Gi/o とカップルしているので、adenylate cyclase を抑制し cAMP を低下させるとともに、カリウムチャネルを活性化し過分極を誘起し心収縮を抑制する (Brodde and Michel, 1999; Dhein et al., 2001)。まとめると、交感神経はノルアドレナリン— $\beta 1$ アドレナリン受容体を介して心機能を興奮させ、副交感神経はアセチルコリン

— M2 ムスカリン受容体を介して心機能を抑制している (図 1 の上部の二経路)。

しかしながら、生体においてノルアドレナリンには、 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, アセチルコリンには M1, M2, M3, M4, M5 とそれぞれ 5 種類の受容体サブタイプが存在することが報告されているので、 $\beta 1$, M2 以外の受容体が心臓収縮調節に関与する可能性は否定できない。実際に心臓には量的な差はあるが 5 種類全部のムスカリン受容体が存在することがわかっている (Wang et al., 2001; Krejci and Tucek, 2002)。また $\alpha 1$ アドレナリン受容体の存在も示唆されている (Wagner and Brodde, 1978; Steinfath et al., 1992; Myagmar et al., 2017)。加えて、アセチルコリンで心収縮が増大するという報告 (Nadler et al., 1993; Du et al., 1995; Nishimaru et al., 2000) や $\alpha 1$ 受容体作動薬により心収縮が増大するという報告もある (Brückner et al., 1984; Chess-Williams et al., 1990)。そこで、本報文では、心臓に存在し機能する非 M2 受容体と非 $\beta 1$ 受容体の機能について我々の研究成績を中心にして紹介する。また、心臓に存在する内在性神経 (従来は副交感神経後線維, コリン作動性) についても実験成績を基に考察する。なお、今回紹介する内容の大部分は既に公表されている (Kitazawa et al., 2009; Harada et al., 2012; Ochi et al., 2013; Zhang et al., 2018)。

2) 摘出心房筋標本

心臓機能の解析には生体を用いる *in vivo* の方法 (心電図, 心拍数, 心血流量) と摘出した心臓の収縮

* 酪農学園大学獣医学群 069-8501 江別市文京台緑町 582
School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

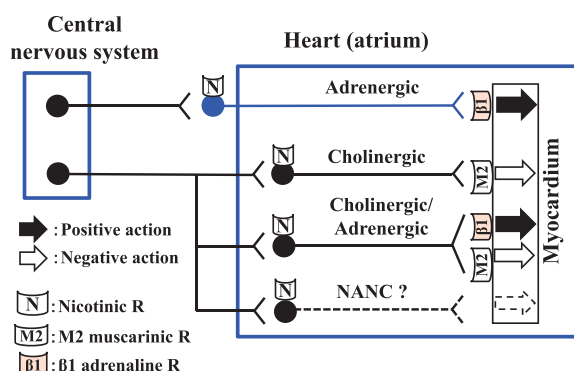


図1 心臓の神経支配と自律神経受容体について（従来の考え方）

一般的には、心臓は交感神経の節後神経（アドレナリン作動性, adrenergic）と副交感神経の節前神経により支配されている。副交感神経は心臓内（心臓神経節）で節後神経（コリン作動性, cholinergic）に乗り換え伝達物質アセチルコリンがM2受容体を介し心収縮を抑制する（negative action）。一方、交感神経からのノルアドレナリンはβ1受容体を介し心収縮を興奮させる（positive action）。ところが、免疫組織化学的な解析により心臓神経節には、アセチルコリンとノルアドレナリンが共存する内在性神経（cholinergic/adrenergic）や伝達物質がアセチルコリンでもノルアドレナリンでもない神経（non-adrenergic, non-cholinergic 神経, NANC）も存在し機能の調節に関与すると考えられているが、これら神経の機能は良くわかっていない。

や心内圧、分離した心筋細胞の電気的性質や細胞内 Ca^{2+} を測定する *in vitro* の方法がある。生体では心臓機能は圧受容器、化学受容器による自律神経反射や中枢神経による影響を受けるために、*in vivo* では心筋に直接作用する薬物の詳細な解析は困難である。一方、*in vitro* では薬物の心臓機能自体に対する作用を直接観察することができるという利点がある。それゆえ、心臓の薬物反応性の解明は多くの場合 *in vitro* の実験によるところが大きい。これまで、心臓におけるアセチルコリンやノルアドレナリンの機能検討は心筋の収縮力、活動電位・電流変化および細胞内シグナル変化（ Ca^{2+} , cAMP）等を指標に行われている。この中で、比較的容易な実験方法として摘出心臓がある。ラット、モルモットやウサギでは大動脈から冠動脈を灌流するランゲンドルフ灌流法を用いて心電図、灌流圧、灌流量、左室圧などが測定されている（中村ら, 2012）。この方法では、摘出心臓を十分に酸素飽和した Krebs 液で灌流することにより冠動脈からはほぼ完全に血液を取り除き、心筋細胞に十分な酸素を供給することで心収縮が長時間維持される。マウス心臓はサイズが小さいためにランゲンドルフ灌流を行うのには適していないが、更に簡便な心収縮測定の方法が知られている（田中と重信, 2001）。この方法では、安楽致死させたマウスの心臓を摘出した後、心室部と心房部を分離して、顕微鏡下で心房内腔に注射針を差し込

み新鮮な Krebs 液で内腔を数回洗浄することにより血液を洗い流す。マウス心房標本は壁が薄いため冠動脈灌流を行わずに直接浴槽内に心房筋を懸垂しても Krebs 液中の溶存酸素で十分に機能が持続される。マウス心房は形状と自発収縮の有無で右心房（自発収縮あり、台形）と左心房（自発収縮なし、三角形）とに分けることができる。右心房では自発収縮の変化を指標にして変時作用（心拍数変化）と変力作用（収縮力変化）の検討を行う事ができるが、心拍数の変化が心収縮力に影響を与えるので通常は変時作用の解析のみに用いられる。一方、左心房筋は自発収縮がないため電気刺激（1 Hz, 2 ms 刺激幅）を加え誘起される収縮の大きさに対する効果、いわゆる変力作用の検討に用いられる。すなわち、マウス摘出心房筋標本は極めて簡便に心収縮に対する薬物の変時作用、変力作用を評価することができる特徴がある。また、種々の受容体欠損マウスを用いた研究にも応用可能である。なお、マウス心房筋を用いた実験装置の概略を図2に示した。

3) ムスカリン受容体

心臓には5種類のムスカリン受容体のうちM2タイプが優勢に存在して収縮機能の抑制に関与していることは良く知られていた（Brodde and Michel, 1999; Dhein et al., 2001）。M2の興奮はGi/o蛋白質のαサブユニットを活性化してadenylylate cyclaseを抑制しcAMPを低下させる。また、βγサブユニットは外向きのカリウム電流を活性化して細胞膜を過分極する。これらの作用は心臓の収縮機能を抑制的に調節する。しかしながら、薬理的、生化学的、免疫組織化学的および分子生物学的な解析からM2以外の受容体が心臓に存在する可能性が示された。例えばGallo et al. (1993)は、モルモットの心室筋細胞でM1受容体を介した Ca^{2+} 電流の増加と膜リン脂質代謝の増加を確認している。Myslivecek et al. (2008)もラットにおいてムスカリン受容体作動薬により膜リン脂質代謝が亢進すること、結合解離実験の解離曲線が複数のコンポーネントから成ること（複数のムスカリン受容体が存在）および各ムスカリン受容体に特異的な抗体を用いた免疫沈降法によりM2以外の受容体が存在することを明らかにした。各受容体に特異的な抗体は免疫組織化学的検討にも用いられており、心筋細胞上にはM2が、介在板にはM3が発現していることがわかっている（Wang et al., 2007）。ラットでは遺伝子レベルで心臓に発現するムスカリン受容体の解析が行われており、M2受容体mRNAが心室筋でも心房筋でも最

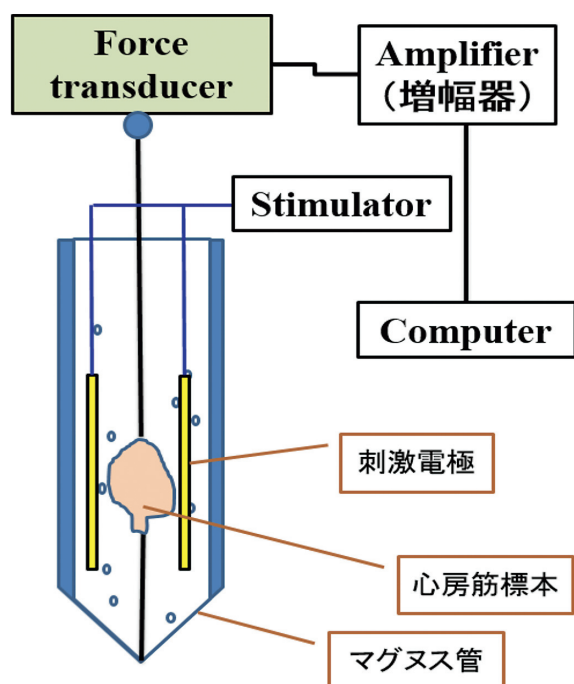


図2 心房筋収縮測定記録装置の概略

マウス心臓から作製した各心房筋標本を浴槽中に懸垂してその収縮活性を force transducer で感知して増幅器で増幅後、Power Lab 2/25 を介して computer に記録保存した。左心房筋では電気刺激装置 (stimulator) を用いて電気刺激 (1 Hz, 2 ms 刺激幅, 閾値以上) を行った。収縮の解析 (収縮張力, 収縮頻度) は、Lab Chart Ver.6.1.1. (日本バイオリサーチセンター, 名古屋) を用いた。尚、薬物は所定の濃度のものを浴槽中に滴下して作用させた。

も多いが、M1, M3, M4, M5 受容体の mRNA も少ないながら確かに発現することが示されている (Krejci and Tucek, 2002)。同様な結果はヒトにおいても報告 (Wang et al., 2001) されており、非 M2 受容体が幅広い動物種の心臓に存在することがわかっている。

このように M2 サブタイプ以外の受容体が心臓に存在することは比較的容易に明らかにされたが、これら非 M2 受容体の機能に関する検討は進まなかった。Gallo et al. (1993) は、モルモットの心筋細胞で M1 受容体興奮が細胞膜の L-type Ca^{2+} チャネルを活性化して正の変力作用を示すこと、Sharma et al. (1996) は、ラットの心筋細胞で同じく M1 受容体の興奮が細胞内 store からの Ca^{2+} 放出を増加させて収縮を増大することを明らかにしている。また、ヒトやマウスにおいても M1 または M3 受容体を介した心収縮増大作用が報告されている (Du et al., 1995; Nishimaru et al., 2000)。しかしながら、心臓の非 M2 受容体の解析には以前より以下の問題が指摘されていた。1) 5 種類のカリウム受容体の特異的な作動薬や遮断薬がない。選択的と言われる遮断薬は存在するが、濃度を増加させると他の受容

体サブタイプにも作用する。2) 5 種類のカリウム受容体の中で奇数の M1, M3, M5 はいずれも Gq/11 とカップルしており同じ細胞内情報伝達系を駆動する。一方、偶数の M2, M4 は Gi/o 蛋白質とカップルし同じ情報伝達系を駆動する。そのため情報伝達系の検討では関与する受容体サブタイプを特定するのが困難である。これらのことは心臓に限らず胃腸管や種々の平滑筋器官においても機能的なカリウム受容体の解析の妨げになっていた。このカリウム受容体サブタイプ研究上の問題点を克服するために 2000 年代になり各種のカリウム受容体欠損マウスが作製されてカリウム受容体の機能研究は飛躍的に発展した (Matsui et al., 2004; Wess, 2004)。Stengel et al. (2000) は、摘出マウス右心房においてカルバコールの自発収縮抑制作用 (心拍数抑制) が M2 受容体欠損マウスでは消失することを報告し、心臓に M2 受容体が存在し陰性変時作用に関与することを再確認したが、非 M2 受容体の機能検討は行っていない。一方、自発収縮が起きないマウス左心房標本では、電気刺激により心房筋収縮を誘起してその収縮に対するカリウム受容体刺激の作用 (変力作用) を検討することができる。マウス左心房ではアセチルコリンにより初期に収縮抑制が起き、その後収縮増大が起きるという 2 相性反応が報告されている (Nishimaru et al., 2000; Tanaka et al., 2001)。M2 受容体がカップルする Gi/o 蛋白質を抑制する百日咳毒素 (PTX) 処置では、アセチルコリンの初期抑制相は消失し収縮増大反応のみに変化した。このことは、陽性変力作用を起こす非 M2 受容体、即ち、M1/M3/M5 受容体が存在する可能性を示唆している (Nishimaru et al., 2000)。そこで我々は、マウス心房筋での非 M2 受容体の機能を明らかにすることを目的に M2 受容体欠損マウス (M2KO), M3 受容体欠損マウス (M3KO) および M2/M3 受容体欠損マウス (M2M3KO) を用い以下の解析を行った。

まず、野生型マウスを用いて real time PCR 法を行い、心臓ならびに各種臓器におけるカリウム受容体サブタイプの発現量を測定した。心室筋、心房筋には M1—M5 受容体まですべてのカリウム受容体サブタイプが発現していた。受容体の大部分 (99%) は M2 タイプであったが、他の受容体サブタイプの mRNA も発現していた。発現比率は $\text{M2} \gg \text{M3} \geq \text{M1}$, M4, M5 となった (Kitazawa et al., 2009)。一方、脳では M1 と M4 受容体の発現が優勢であり、消化管や子宮では M2, M3, M4 受容体の発現が確認された。

表1 カルバコールより誘起される2相性変力作用の薬理学的性質（電気刺激マウス左心房筋）

	初期陰性変力作用	後期陽性変力作用
アトロピン	抑制	抑制
M2KO	抑制	影響なしまたは増大
M3KO	影響なし	抑制
M2M3KO	抑制	抑制
インドメタシン	未検討	抑制
SC-560(COX-1 阻害薬)	影響なし	影響なし
NS-398(COX-2 阻害薬)	影響なし	抑制
百日咳毒素(PTX)処置	抑制	影響なしまたは増大
内皮除去	影響なし	抑制
発現機序	心房筋上の M2 ムスカリン受容体	心房内皮に存在する M3 ムスカリン受容体- COX-2-prostaglandins 経路

機能的解析ではまず右心房筋を用いムスカリン受容体を介する変時作用について検討した。カルバコール（コリンエステラーゼ非感受性コリンエステル）は、野生型マウスの右心房筋で心拍数を濃度に依存して低下させた。この抑制は、PTX 処置で消失し、逆に心拍数は増加傾向を示した。14 例の心房筋標本の検討において 9 例では心拍数が 350 回/分以上であり、カルバコールで著明な心拍数の変化は認められなかったが、心拍数が 350 回/分以下の 5 例では濃度により心拍数の増加が認められた。カルバコールによる心拍数低下作用は M2KO マウスでも消失していたが、この場合も心拍数が 350 回/分以下の 3 例ではカルバコールで心拍数は増加したが、心拍数が高い残りの 5 例では増加は認められなかった。一方、M3KO マウスでは心拍数に関わらず常に心拍数の低下が認められた。また、M2M3KO マウスでは心拍数の高い、低いに関わらずカルバコールによる変時作用は起きなかった。この成績はマウスの右心房筋には陰性変時作用を起こす M2 受容体と陽性変時作用を起こす M3 受容体が存在していること、M3 受容体を介する陽性変時作用は正常状態では観察されないが、M2 受容体が遮断され心拍数が低い場合にのみ機能を発現すると考えられた。次いで電気刺激左心房標本を用いて心収縮高に対するカルバコールの作用を検討した。カルバコールは、アセチルコリンで報告されているように（Nishimaru et al., 2000）、野生型の心房では電気刺激誘発性収縮を初期には抑制し（陰性変力作用）、その後ゆっくりと増大（陽性変力作用）させるという 2 相性反応を引き起こした。表 1 は、この 2 相性変力作用の薬理学的性質をまとめて比較したものである。初期の収縮抑制相は M2KO マウスで、後期の収縮増大相は M3KO マウスでそれぞれ消失し、M2M3KO マウスではいずれのタイプの変力作用も

出現しなかった。このことから、初期の陰性変力作用には M2 受容体が、後期の陽性変力作用には M3 受容体が関与することが示唆された。また、陰性変力作用、陽性変力作用の濃度反応曲線を比較し、それぞれの反応の EC50（半分効果濃度）を推定すると、M2 を介する陰性変力作用では 700 nM、M3 を介する陽性変力作用では 3 μ M となった。すなわち、陽性変力作用の出現には陰性変力作用の発現よりも高濃度のアセチルコリンが必要ながわかった（Kitazawa et al., 2009）。

免疫組織化学的方法により特異的な抗体を用いマウス心房筋における M2、M3 受容体の分布を検討したところ、M2 は主に心房筋細胞上に M3 は心房筋細胞に加えて心房内皮細胞にも存在することがわかった。M2KO、M2M3KO マウスでは抗 M2 抗体の陽性像が認められないこと、M3KO、M2M3KO マウスでは抗 M3 抗体の陽性像が認められないことから抗体の特異性も確認された（Harada et al., 2012）。綿棒を用いて心房内腔を rubbing して内皮を削ってしまうと M3 受容体を介する陽性変力は消失した。また、この陽性変力作用はインドメタシン、シクロオキシゲナーゼ 2（COX-2）阻害薬（NS-398）やプロスタグランジン（PG）受容体の遮断薬で抑制されること（Kitazawa et al., 2009; Hara et al., 2009; Harada et al., 2012）、PGE2 および PGF2 α が陽性変力作用をおこすことから（Tanaka et al., 2001）、陽性変力作用を誘起する M3 受容体は心房内皮細胞上に存在しその下流に COX-2 と PGE2、PGF2 α 経路があることが推察された（図 3）。すなわち、低濃度のアセチルコリンは心房筋の M2 受容体に作用して心収縮を抑制するが、高濃度になると内皮細胞の M3 受容体にも作用し、COX-2-PG 系を駆動し陽性変時作用・変力作用を誘起し心臓収縮が過度に抑制されないようにブレーキをかけていると考えられる

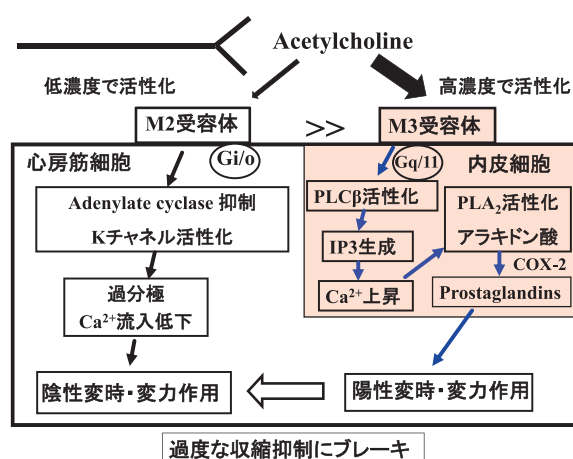


図3 副交感神経—アセチルコリン—ムスカリン受容体経路による心収縮調節機構

副交感神経節後神経から放出されるアセチルコリン (acetylcholine) は、心房筋に優勢に存在する M2 受容体を興奮させ陰性変時・変力作用 (心収縮抑制) を誘起する。アセチルコリン濃度が高くなると心房内皮上に存在する M3 受容体も興奮し、一連のカスケードが興奮しシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) を介して prostaglandins が合成され、陽性変時・変力作用 (心収縮の増大) が誘起され M2 受容体を介した過度な抑制作用にブレーキをかける。心収縮の抑制と考えられていた副交感神経系の経路に収縮増大系があることが示された。

(図3)。M3 受容体興奮は細胞内 Ca^{2+} 増加を誘起するが、この増加が COX-2-PG 合成系の上流にある Ca^{2+} 依存性 PLA2 (Murakami and Kudo, 2002) を活性化すると考えられる。しかしながら、今回の検討では心房筋に存在する M3 受容体の機能については明らかにすることができなかった。今後、野生型と M3KO マウスの心房筋から作製した分離心房筋細胞を用いムスカリン受容体刺激の反応を比較するなどの検討が必要である。

4) アドレナリン受容体

心筋における非 β_1 アドレナリン受容体 (α 受容体) の機能に関する研究は、これまでヒト、ラット、モルモット、ネコ、ウサギ、イヌおよびマウスの心室筋、心房筋および乳頭筋において選択的な α_1 および α_2 アドレナリン受容体作動薬により誘起される反応を解析することで行われている。この中でイヌを除く動物種では α 受容体の興奮により陽性変力作用や陽性変時作用が起きることが明らかになっている。この α 受容体を介した作用には著明な部位差 (心室筋、乳頭筋、右心房、左心房) が認められる (Schumann et al., 1974; Mugelli et al., 1976; Wagner and Brodde, 1978; Brückner et al., 1984; Williamson and Broadley, 1987; Chess-Williams et al., 1990)。 α 受容体のサブタイプに関しては、ヒト (Brückner et al., 1984)、ラット (Williamson and

Broadley, 1987; Chess-Williams et al., 1990)、モルモット (Wagner and Brodde, 1978) およびウサギ (Schumann et al., 1974; Aass et al., 1982) で α_1 タイプであることがわかっている。一方、 α_2 受容体の機能については選択的な作動薬 (UK14304) により作用が認められなかったという報告がある (Williamson and Broadley, 1987)。また、放射性リガンド ($[^3\text{H}]$ —プラゾシン, α_1 受容体遮断薬) を用いた結合実験においても心室筋に特異的結合部位 (α_1 受容体) が存在することが示唆されている。この研究では α_1 受容体量には種差があり、ラット心室筋にはモルモット、マウス、ウサギ、ブタ、ウシ、ヒトに比べ 5-6 倍高い密度の受容体が発現していることがわかっている (結合親和性には動物種差なし) (Steinfath et al., 1992)。これまで心臓の α 受容体に関する研究ではラット心臓を用いた報告が多いが、ラットでは受容体発現量が高く α 作用が発現しやすいのが理由のひとつと考えられた。

これまで心臓で α 作用が検討されてきた動物種の中でマウスは極めて興味深い動物種である。その理由として若齢マウス心室筋では α 受容体を介した陽性変力作用が出現するが、成獣では α 受容体を介した陰性変力作用に変化すること (Tanaka et al., 1995)、この陰性変力作用の大きさが実験温度により影響を受けることがあげられる (Nishimaru et al., 1999)。心臓では部位により α 受容体を介する変力作用に差があることがラットやモルモットで示唆されているが (Williamson and Broadley, 1987; Chess-Williams et al., 1990)、これまでマウスでは心室筋を用いた研究が主であり、心房筋での α 受容体の機能について検討した報告は全くないのが現状であった。そこで、マウスの心房筋を用いて α 受容体の機能を解析することを企図した。

右心房標本の自発収縮は選択的 α_1 受容体作動薬、フェニレフリンによりその頻度と収縮高が濃度依存性に増大した。この陽性変力・陽性変時作用は β 受容体遮断薬のプロプラノロールにより部分的に有意に抑制された (Zhang et al., 2018)。このことは、既報 (Chess-Williams et al., 1990) にあるようにフェニレフリンによる作用には一部 β_1 受容体の興奮が関与していることを示している。プロプラノロール下で残存するフェニレフリンの陽性変力・変時作用は α_1 受容体遮断薬のプラゾシンの処置によって有意に抑制された。左心房標本の電気刺激誘発性収縮もフェニレフリンによって増大したが、この作用もプロプラノロールで減弱し、残存する反応はプラゾシンで有意に抑制された。これらのことか

ら、マウス心房筋には陽性変力・陽性変時作用を誘起する $\alpha 1$ アドレナリン受容体が存在する可能性が示唆された。近年、 $\alpha 1$ 受容体は、 $\alpha 1A$ 、 $\alpha 1B$ および $\alpha 1D$ の3つのサブタイプに分類されている。過去には $\alpha 1C$ の存在も提唱されたが、現在では $\alpha 1A = \alpha 1C$ であることがわかり分類から取り除かれた (Civantos Calzada and Aleixandre de Artiñano, 2001)。Hattori and Kanno (1998) は哺乳動物の心臓に $\alpha 1A$ 、 $\alpha 1B$ が存在することを報告している。 $\alpha 1$ 受容体を介した陽性変力作用のメカニズムには違いがあり、 $\alpha 1A$ は筋小胞体からの Ca^{2+} 放出の増加、 $\alpha 1B$ は筋フィラメントの Ca^{2+} 感受性の増加を誘起する。Wang et al. (1997) は、ラット左心房と乳頭筋で観察されるフェニレフリンの変力作用に $\alpha 1D$ の関与がないことを報告している。最近、Myagmar et al. (2017) は、 $\beta 1$ や $\alpha 1A$ など、種々のアドレナリン受容体サブタイプの発現をマウス心臓で検討し $\beta 1$ と $\alpha 1B$ は全ての心室筋で発現すること、 $\beta 2$ と $\beta 3$ の発現はないこと、 $\alpha 1A$ は約半分の心室筋細胞で発現していることを報告している。そこで次にマウス心房筋に存在し陽性変力作用を媒介する $\alpha 1$ 受容体のサブタイプの解析を試みた。まず、各受容体のサブタイプに特異的なプライマーを用いてマウス心房筋に発現するアドレナリン受容体サブタイプ mRNA の発現量を検討した。その結果、心室、心房筋いずれにおいても最も多いアドレナリン受容体は $\beta 1$ であり、 $\alpha 1$ の発現量はサブタイプ合計でもその2-5%程度であった (Zhang et al., 2018)。すなわち、心臓に存在するアドレナリン受容体は、 $\beta 1$ サブタイプが主でありノルアドレナリンは $\beta 1$ 受容体に作用して陽性変力・変時作用を誘起するという事実を裏付けるものであった。一方、 $\alpha 1A$ 、 $\alpha 1B$ および $\alpha 1D$ の発現比較においては心房、心室筋いずれの部位においても $\alpha 1B > \alpha 1A = \alpha 1D$ であった (Zhang et al., 2018)。これまでの心臓における検討では、 $\alpha 1A$ と $\alpha 1B$ は心筋細胞に、 $\alpha 1D$ は心臓を支配する血管の平滑筋細胞上に発現するとされているので (Jensen et al., 2011, 2014; Myagmar et al., 2017)、心筋細胞上に存在するタイプとしては $\alpha 1A$ と $\alpha 1B$ が推定されたが、その中で $\alpha 1B$ mRNA の発現が高いことが示された。プラゾシンは $\alpha 1$ 受容体サブタイプを区別できない非選択的遮断薬なので、マウス心房の機能的 $\alpha 1$ 受容体サブタイプを明らかにするために本研究ではシロドシンの作用を検討した。シロドシンは、前立腺や尿道の平滑筋に存在する $\alpha 1A$ タイプを選択的に遮断することにより排尿障害を改善する薬物でそれぞれのサブタイプに対す

る乖離定数 (pKd) は10.4 ($\alpha 1A$)、8.12 ($\alpha 1B$) および8.64 ($\alpha 1D$) となっている (Murata et al., 1999)。すなわち、低濃度シロドシンで抑制が認められなければ、 $\alpha 1$ サブタイプは非 $\alpha 1A$ であると推察することができる。マウス右心房筋の検討において10 nM-100 nM のシロドシンは、プロプラノロール処置下でフェニレフリンによる陽性変時作用に著明な影響を与えなかったが、1 μ M シロドシンは陽性変時作用を有意に抑制した。このことから、心房筋におけるフェニレフリンの作用には $\alpha 1B$ 受容体が関与すること明らかになった (Zhang et al., 2018)。これまでマウス心室筋では $\alpha 1$ 受容体を介した陰性変力作用が報告されているが、この反応には $\alpha 1A$ タイプが関与する (Tanaka et al., 1995; Nishimaru et al., 1999)。それゆえ、心房筋と心室筋で観察された $\alpha 1$ 作用の差は受容体サブタイプとそれにカップルする細胞内情報伝達系の差に起因すると推察されるが、詳細は不明である。

α 受容体のもう一つのサブタイプ、 $\alpha 2$ 受容体の心臓収縮調節への関与を明らかにするために摘出心房筋で選択的 $\alpha 2$ 受容体作動薬、キシラジンの作用を検討した。キシラジンは右心房標本で10-100 μ M の高濃度でのみ心拍数を低下させるとともに心収縮力の増大を誘起した。キシラジンにより誘起される心拍数の低下は、作用出現濃度が明らかに高いこと ($\alpha 2$ 受容体への作用は通常10 nM-1 μ M で出現, Musgrave et al., 1987)、 α および β 受容体遮断薬の処置では影響されなかったことから、アドレナリン受容体が関係しない非特異的反応と考えられた。一方、電気刺激左心房標本では、キシラジンは高濃度でも心収縮高に著明な影響を与えなかった。これらのことから、キシラジンによる作用は右心房で特異的に発現し、その機序としては高濃度の $\alpha 2$ 受容体作動薬が非特異的に心房ペースメーカーの興奮を抑制し、心拍数が低下し、その代償的反応として心収縮高の増強が起きるものと推察した (心拍数の低下と収縮高の増大の間には負の相関が認められた)。 $\alpha 2$ 受容体は交感神経節後神経終末に存在しノルアドレナリン放出を抑制的に制御すると考えられているが、Musgrave et al. (1987) は [3H]-ノルアドレナリンを取り込ませたマウス心房筋で電気刺激誘発性のノルアドレナリン放出がクロニジンにより抑制されることを報告している。この成績は心臓を支配する交感神経終末にノルアドレナリン放出を抑制的に調節する $\alpha 2$ 受容体が存在することを示唆する。しかしながら、今回の検討では自発収縮や電気刺激誘発性収縮の高さや頻度を主に観察しており、神経

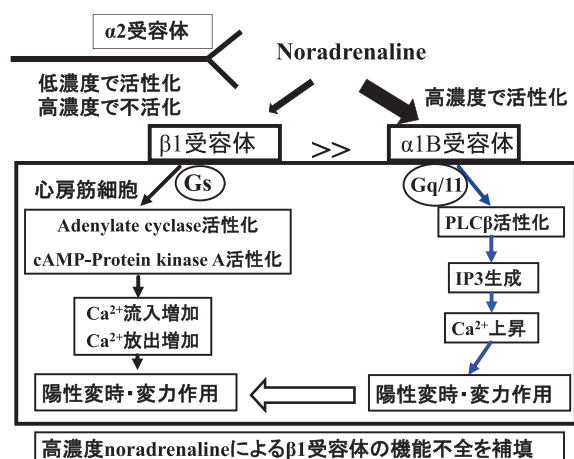


図4 交感神経—ノルアドレナリン—アドレナリン受容体経路による心収縮調節機構

交感神経節後線維から放出されるノルアドレナリン (noradrenaline) は、優勢に存在する $\beta 1$ 受容体に作用し adenylylase を活性化し cAMP-protein kinase A を介して収縮時の Ca^{2+} 動員を増加させ心収縮力を増大する。心不全などで心収縮が抑制されると反射的に交感神経が活性化され高濃度のノルアドレナリンが放出されるが、 $\beta 1$ 受容体は高濃度ノルアドレナリンにより容易に脱感作されて機能不全になる。この現象は心不全を増悪させるが、高濃度のノルアドレナリンは $\alpha 1\text{B}$ 受容体を活性化することにより心収縮を増大させて $\beta 1$ 受容体の機能不全を改善する。 $\alpha 1\text{B}$ 受容体の経路は $\beta 1$ 受容体の機能を補填するものであることが示された。

線維刺激、ノルアドレナリン測定などを行っていないので神経終末に存在する $\alpha 2$ 受容体の作用は解明できなかった。

アドレナリン作動性神経と心臓に存在する受容体との関係を図4に示した。心臓が機能不全(心不全)に陥った場合、交感神経が活性化されてノルアドレナリン放出量が増える。高濃度のノルアドレナリンは $\beta 1$ 受容体を脱感作して、陽性変時・変力作用を減弱化し心不全をさらに悪化させると考えられている (Jensen et al., 2014)。この高濃度ノルアドレナリンによる $\beta 1$ 受容体機能不全下において $\alpha 1\text{B}$ 受容体が興奮して $\beta 1$ 受容体に代わって陽性変時・変力作用を誘起すると考えられる。それゆえ、 $\alpha 1\text{B}$ 受容体は病態時に重要になる受容体と推察できる。加えて $\alpha 1$ 受容体は、心臓では肥大や虚血性の病変に対して保護作用を示すことも知られており (Jensen et al., 2011, 2014)、病態生理学上興味ある受容体種と考えられた。

5) 心臓内在性神経

一般に心臓機能は交感神経と副交感神経により二重の拮抗支配を受けている。すなわち交感神経は、胸椎から出た後、交感神経幹でシナプス後線維に乗り換え心臓を支配する。一方、副交感神経(迷走神経)は延髄の迷走神経核を出たのちに心臓内で神経

節を作り、コリン作動性のシナプス後線維が心臓を支配し、心筋のムスカリン受容体に作用すると考えられている(図1の上部の二経路)。心臓内の神経節には本当にコリン作動性神経しか存在しないのか? に関しては機能的な研究よりも組織化学的解析が先行しており、哺乳類の心房と心室を支配している内在性神経で優勢なのはコリン作動性神経であるが、コリン作動神経の40~50%は、アドレナリン作動性神経の特徴となる酵素(tyrosine hydroxylase, dopamine β -hydroxylase)と輸送体である vesicular monoamine transporter type 2 を有することが明らかになっている (Weihe et al., 2005)。同様なコリン/アドレナリン作動性神経の性質を有する神経の存在は、Hoard et al. (2008) によってマウス心房でも報告されている。また、コリン作動性、アドレナリン作動性神経に加えて、マウスとラットの心臓においては結節状神経節の周りに neuropeptide Y (NPY) や calcitonin-gene related peptide (CGRP) などのペプチドを含む神経の存在も知られている。このなかで NPY は、NPY に対する抗体と tyrosine hydroxylase および dopamine β -hydroxylase に対する抗体を用いた染色においてノルアドレナリンと共存している可能性が報告されている (Gu et al., 1984; Saito et al., 1986)。これら神経の機能的な役割を明らかにする試みとして心房筋自体を電気刺激する方法が適用されラットやモルモット右心房において、神経刺激によって陽性変時作用が誘起されること、この作用の一部には交感神経が関与しているが、反応の一部にはアトロピン、アテノロール、交感神経切除術により抑制されない非アドレナリン非コリン(non-adrenergic, non-cholinergic nerve, NANC) 作動性神経の興奮が関与することが示されている (Saito et al., 1986)。すなわち図1に示したように従来の交感神経節後神経支配、副交感神経節前神経、節後神経(コリン作動性)以外にコリン/アドレナリン作動性節後神経支配、NANC 神経支配の可能性が提唱されている。

我々はマウス心房筋収縮に対する神経節ニコチン受容体興奮薬(DMPP, 1, 1-dimethyl-4-phenylpiperazinium)の作用を検討して心臓に存在する内在性神経の薬理学的性質について解析を試みた。自発収縮のあるマウス右心房標本で DMPP (100 μM) は初期(投与後20秒)に陰性変時・変力作用を、後期には陽性変時・変力作用という2相性の反応を誘起した。後期の陽性変時・変力作用は、刺激後30秒程度から発現して60~70秒でピークになった後、ゆっくりと減衰した(図5A, B)。

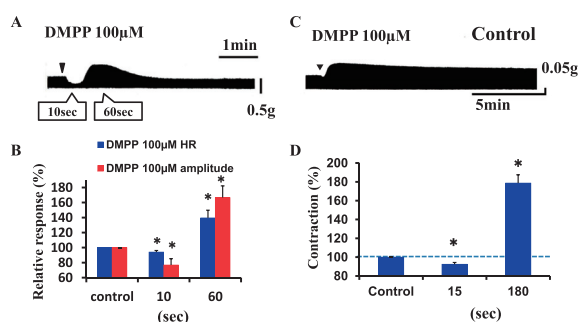


図5 右心房標本および左心房標本における神経節興奮薬の典型的反応

自発収縮が発現する右心房標本に DMPP を加えると初期に収縮抑制、その後収縮増大という 2 相性の反応が誘起された (A)。DMPP 投与後、10 秒と 60 秒で収縮の抑制作用と興奮作用を収縮高と心拍数で評価するといずれも有意な抑制、増大であることがわかった。なお、心拍数よりも収縮高の方が抑制も増大も著明であった (B)。左心房標本に電気刺激を加えて収縮を誘起してその収縮に対する DMPP の作用を検討した。収縮高は DMPP により一過性に抑制されたが、その後は増大しゆっくりと減弱した (C)。DMPP 適用後、15 秒、180 秒の収縮高は有意に抑制または増大していた。各カラムは、5-7 例の実験の平均と標準誤差で、DMPP 投与前の値 (control) を 100% として相対反応として示した。* は、DMPP 適用前の値に比べて有意差があることを示している ($p < 0.05$)。

DMPP を洗浄し一時間経過後に同じ濃度の薬物刺激を加えたが、再現性がある反応は起きなかった。反応が減弱する要因としては神経節ニコチン受容体の脱感作、刺激により放出される伝達物質の枯渇が考えられた。それゆえ、ひとつの標本で DMPP の適用回数を 1 回とした。自発収縮が認められる右心房標本なので DMPP の変時作用に注目してその薬理学的性質について解析した。初期の陰性変時作用は、アトロピン (ムスカリン受容体遮断薬) とヘキサメトニウム (ニコチン受容体遮断薬) により有意に抑制されたが、 $\beta 1$ 受容体遮断薬のアテノロール、メトプロロール処置によっては影響を受けなかった。また、PTX 処置マウスおよび M2KO、M2M3KO マウスから摘出した右心房では DMPP

の初期陰性変時作用は観察されなかった (表 2)。これらのことから初期の陰性変時・変力作用には内在性コリン作動性神経から放出されたアセチルコリンと M2 受容体が関与することがわかった。一方、ゆっくりと発現する陽性変時作用は、ヘキサメトニウム、アテノロール、メトプロロールにより抑制されたが、アトロピンでは影響を受けなかった。また、M2KO、M2M3KO マウスの右心房では陽性変時作用の増大が認められた。レセルピン処置したマウスから摘出した心房筋では後期の陽性変時作用の減少と前期の陰性変時作用の増強が観察された。これらの検討結果から初期の陰性変時作用にはアセチルコリン—M2 受容体の興奮が、陽性変時作用にはノルアドレナリン— $\beta 1$ 受容体が関与していることが示唆された。いずれの変時作用もヘキサメトニウムで抑制されることから内在性神経の興奮が関与すると考えられた (Ochi et al., 2013)。すなわち、心臓には従来のコリン作動性の節後神経 (副交感節後線維) に加えてノルアドレナリンを含む内在性神経も存在し、ゆっくり出現する陽性変時作用に関与すると考えられた。レセルピン処置マウスの心房筋で初期の抑制が増大するのは、後期に出現するアドレナリン作動性の増大作用が消失することによると考えられた。また、M2KO や M2M3KO で後期の陽性変時作用が増大したのは、M2 受容体を介する初期抑制が消失して増大作用が顕在化したためではないかと考えられた。形態学的な証拠があるため (Weihe et al., 2005)、コリン/アドレナリン作動性内在神経と表記しているが、アドレナリン作動性内在神経が存在する可能性も完全には否定できない。

次いで電気刺激をした左心房標本で DMPP の変力作用について検討した。マウス左心房筋標本に DMPP (100 μM) を適用すると直後に一過性の小さな収縮抑制作用が起きたのち増大作用が誘起され

表2 DMPP によりマウス右心房標本で認められる二相性変時作用の薬理学的性質の比較

処置	初期陰性変時作用	後期陽性変時作用
出現時間 反応の大きさ	10-15 秒 10%低下	60-70 秒 40%増大
ヘキサメトニウム	抑制	抑制
アトロピン	抑制	影響なし(増大傾向)
アテノロール	影響なし	抑制
メトプロロール	影響なし	抑制
百日咳毒素(PTX)処置	抑制	影響なし
レセルピン処置	増大	抑制
M2KO	抑制	増大
M3KO	影響なし	影響なし
M2M3KO	抑制	増大
発現機序	ニコチン受容体—アセチルコリン—M2 受容体	ニコチン受容体—ノルアドレナリン— $\beta 1$ 受容体

表3 DMPPによりマウス左心房標本に発現する二相性変力作用の薬理学的性質の比較

処置	初期陰性変力作用	後期陽性変力作用
出現時間 反応の大きさ	20 秒 収縮高 10%低下	60-70 秒 収縮高 80%増大
ヘキサメトニウム	抑制	抑制
アトロピン	抑制	抑制
アテノロール	影響なし	抑制
メトプロロール	影響なし	抑制
百日咳毒素(PTX)処置	抑制	影響なし
レセルピン処置	影響なし	抑制
M2KO	抑制	影響なし
M3KO	影響なし	抑制
M2M3KO	抑制	抑制
発現機序	ニコチン受容体—アセチルコリン—M2 受容体	ニコチン受容体—ノルアドレナリン— $\beta 1$ 受容体 ニコチン受容体—アセチルコリン—M3 受容体

た。適用 15 秒後における相対収縮高と抑制作用の平均持続時間はそれぞれ 92.5% (7.5%抑制), 23.2 秒であった。一方, 収縮増大作用はおよそ 180 秒で最大となり (180%) となりその後 15 分間持続していた (図 5C, D)。左心房に DMPP を一時間の間隔で適用し再現性を検討したが, 右心房での観察と同様に DMPP 作用の再現性は低く, 投与後二回目以降は一回目と比較し反応が有意に減少していた。それゆえ, 各標本において DMPP の適用は一回として右心房標本と同様に初期の陰性変力作用と後期の陽性変力作用の性質を比較した (表 3)。表 3 から, 初期の陰性変力作用は, 内在性コリン作動性神経から放出されるアセチルコリンが M2 受容体に作用し誘起されることがわかった。一方, 後期に出現する陽性変力作用は, アトロピンと $\beta 1$ アドレナリン受容体遮断薬, レセルピンで抑制されたことから, 右心房で得られた結論とは異なり, アドレナリン作動性に加えてコリン作動性神経が興奮し生じると推察された。更に, 後期陽性変力作用が M3KO, M2M3KO マウスで減弱したことから, コリン作動性の陽性変力作用には M3 受容体が関与していることがわかった。M3 受容体を介する陽性変力作用は, 浴槽中に滴下したムスカリン作動薬だけでなく, 内因性アセチルコリンによっても出現することが示された。

後期に出現する陽性変力作用の一部 (20-30%) は, レセルピン処置マウスや M3KO, M2M3KO マウスでも残存していた。このことは, 形態学的検討で明らかになっている NANC 内在性神経が陽性変力作用の一部に関与している可能性を示唆しており, どのような活性物質が関与するのか今後検討が必要である。今回のムスカリン受容体, アドレナリン受容体および心臓内在性神経の結果をまとめて示すと図 6 のようになった。

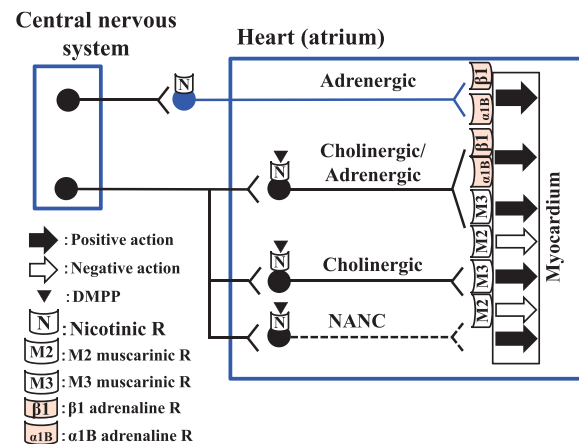


図6 心臓の神経支配と自律神経受容体について (仮説)

図1にマウス心房筋で得られた成績を組込み心臓の神経支配と自律神経受容体についての新しい模式図を作成した。マウス心房での検討から, 以下の4点が明らかになった。①興奮性の M3 受容体が存在する。②興奮性の $\alpha 1B$ 受容体が存在する。③内在性のアドレナリン作動性神経 (adrenergic) が存在する。④非アドレナリン, 非コリン (NANC) 作動性の興奮経路が存在する。図では, 組織化学的検討の結果 (コリン作動性神経に内にアドレナリン作動性成分が存在) から, コリン・アドレナリン作動性の内在性神経 (cholinergic/adrenergic) が存在する可能性も否定できない。心臓収縮は, 交感神経—ノルアドレナリン— $\beta 1$ 受容体—心臓興奮, 副交感神経—アセチルコリン—M2 受容体—心臓抑制という単純な経路ではなく, 種々の内在性神経, 自律神経受容体によって複雑巧妙に制御されている。なお, ▼は, 摘出心房標本での DMPP の作用点を示している。

6) ま と め

自律神経とその受容体による心臓収縮の調節は交感神経— $\beta 1$ 受容体—興奮, 副交感神経—M2 受容体—抑制という単純なものではなく, 他に $\alpha 1B$ 受容体, M3 受容体, 内在性アドレナリン作動性神経, 内在性 NANC 神経が収縮調節に関与している可能性が示唆された (図 6)。 $\beta 1$ 受容体は, ノルアドレナリン濃度が上がる心不全病態では down regulation されてその機能が低下するが, このような病態

時には $\alpha 1B$ 受容体が活性化され、交感神経による心収縮興奮作用を補完すると考えられる。一方、ムスカリン受容体では低濃度のアセチルコリンでは M2 受容体を介した抑制作用が出現するが、過度の副交感神経の興奮により内皮に到達するような高濃度アセチルコリンが放出されると M2 受容体に加えて M3 受容体も興奮することにより、心収縮抑制作用にブレーキをかける。このように、心臓の興奮作用にはそれを補完する受容体が、抑制作用にはそれに拮抗する受容体が存在することにより自律神経系の過度な興奮が起きても心臓収縮調節機構が破たんしないような仕組みが備わっていると推察される。また、神経節の興奮により抑制と興奮の両方の反応が起きることは、受容体レベルだけでなく、内在性心臓神経のレベルでもノルアドレナリンとアセチルコリンの両方の放出が起き、心臓の過度な抑制と興奮を相互に調節していると考えられた。このような受容体、自律神経の仕組みは血液を送り出すポンプとしての心臓の役割が損なわれないように心臓収縮を極めて巧みに調節すると考えられた。

参 考 文 献

1. Aass, H., Skomedal, T., Osnes, J. B. 1982. Demonstration of an α adrenoceptor-mediated inotropic effect on norepinephrine in rabbit papillary muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 226: 572-578.
2. Broadley, K.J. 1982. Cardiac adrenoceptors. *J. Auton. Pharmacol.*, 2: 119-145.
3. Brodde, O.E., Michel, M.C. 1999. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol. Rev.*, 51: 651-690.
4. Brückner, R., Meyer, W., Mügge, A., Schmitz, W., Scholz, H. 1984. Alpha-adrenoceptor-mediated positive inotropic effect of phenylephrine in isolated human ventricular myocardium. *Eur. J. Pharmacol.*, 99: 345-347.
5. Chess-Williams, R.G., Williamson, K.L., Broadley, K.J. 1990. Whether phenylephrine exerts inotropic effects through alpha- or beta-adrenoceptors depends upon the relative receptor populations. *Fundam Clin Pharmacol.*, 4: 25-37.
6. Civantos Calzada, B., Aleixandre de Artiñano, A. 2001. Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol. Res.*, 44: 195-208.
7. Dhein, S., van Koppen, C.J., Brodde, O.E. 2001. Muscarinic receptors in the mammalian heart. *Pharmacol. Res.*, 44: 161-182.
8. Du, X.Y., Schoemaker, R.G., Bos, E., Saxena, P.R. 1995. Characterization of the positive and negative inotropic effects of acetylcholine in the human myocardium. *Eur. J. Pharmacol.*, 284: 119-127.
9. Gallo, M.P., Alloatti, G., Eva, C., Oberto, A., Levi, R.C. 1993. M1 muscarinic receptors increase calcium current and phosphoinositide turnover in guinea-pig ventricular cardiocytes. *J. Physiol.*, 471: 41-60.
10. Gu, J., Polak, J.M., Allen, J.M., Huang, W.M., Sheppard, M.N., Tatemoto, K., Bloom, S.R. 1984. High concentrations of a novel peptide, neuro-peptide Y, in the innervation of mouse and rat heart. *J. Histochem. Cytochem.*, 32: 467-472.
11. Hara, Y., Ike, A., Tanida, R., Okada, M., Yamawaki, H. 2009. Involvement of cyclooxygenase-2 in carbachol-induced positive inotropic response in mouse isolated left atrium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 331: 808-815.
12. Harada, N., Ochi, K., Yaosaka, N., Teraoka, H., Hiraga, T., Iwanaga, T., Unno, T., Komori, S., Yamada, M., Kitazawa, T. 2012. Immunohistochemical and functional studies for M3 muscarinic receptors and cyclooxygenase-2 expressed in the mouse atrium. *Auton. Autacoid Pharmacol.*, 32: 41-52.
13. Hattori, Y., Kanno, M. 1998. Role of $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes in production of the positive inotropic effects in mammalian myocardium: implications for the $\alpha 1$ -adrenoceptor subtype distribution. *Life Sci.*, 62: 1449-1453.
14. Hoard, J.L., Hoover, D.B., Mabe, A.M., Blakely, R. D., Feng, N., Paolocci, N. 2008. Cholinergic neurons of mouse intrinsic cardiac ganglia contain noradrenergic enzymes, norepinephrine transporters, and the neurotrophin receptors tropomyosin-related kinase A and p75. *Neuroscience*. 156: 129-142.
15. Jensen, B.C., O'Connell, T.D., Simpson, P.C. 2011. Alpha-1-adrenergic receptors: Targets for agonist drugs to treat heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51: 518-528.
16. Jensen, B.C., O'Connell, T.D., Simpson, P.C. 2014.

- Alpha-1-adrenoceptors in heart failure: The adaptive arm of the cardiac responses to chronic catecholamine stimulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 63: 291-301.
17. Kitazawa, T., Asakawa, K., Nakamura, T., Teraoka, H., Unno, T., Komori, S., Yamada, M., Wess, J. 2009. M3 muscarinic receptors mediate positive inotropic responses in mouse atria: a study with muscarinic receptor knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 330: 487-493.
18. Krejčí, A., Tucek, S. 2002. Quantitation of mRNAs for M1 to M5 subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. *Mol. Pharmacol.*, 61: 1267-1272.
19. Matsui, M., Yamada, S., Oki, T., Manabe, T., Taketo, M. M., Ehler, F. J. 2004. Functional analysis of muscarinic acetylcholine receptors using knockout mice. *Life Sci.*, 75: 2971-2981.
20. Mugelli, A., Ledda, F., Mantelli, L. 1976. Frequency dependence of the α -adrenoceptor-mediated positive inotropic effect in guinea-pig heart. *Eur. J. Pharmacol.*, 36: 15-20.
21. Murakami, M., Kudo, I. 2002. Phospholipase A2. *J. Biochem.*, 131: 285-292.
22. Murata, S., Taniguchi, T., Muramatsu, I. 1999. Pharmacological analysis of the novel, selective α_1 -adrenoceptor antagonist, KMD-3213, and its suitability as a tritiated radioligand. *Br. J. Pharmacol.*, 127: 19-26.
23. Musgrave, I., Marley, P., Majewski, H. 1987. Pertussis toxin does not attenuate α_2 -adrenoceptor mediated inhibition of noradrenaline release in mouse atria. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 336: 280-286.
24. Myagmar, B. E., Flynn, J. M., Cowley, P. M., Swigart, P. M., Montgomery, M. D., Thai, K., Nair, D., Gupta, R., Deng, D. X., Hosoda, C., Melov, S., Baker, A. J., Shmpton, P. C. 2017. Adrenergic receptors in individual ventricular myocytes: The beta-1 and alpha-1B are in all cells, the alpha-1A is in a subpopulation, and the beta-2 and beta-3 are mostly absent. *Circ. Res.*, 120: 1103-1115.
25. Myslivecek, J., Klein, M., Novakova, M., Ricny, J. 2008. The detection of the non-M2 muscarinic receptor subtype in the rat heart atria and ventricles. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 378: 103-116.
26. Nadler, E., Barnea, O., Vidne, B., Isakov, A., Shavit, G. J. 1993. Positive inotropic effect in the heart produced by acetylcholine. *Basic Clin Physiol Pharmacol.*, 4: 229-248.
27. 中村裕二, 安東賢太郎, 杉山 篤, 2012. ランゲンドルフ灌流心実験法. 日本薬理学雑誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 140 : 166-169.
28. Nishimaru, K., Sekine, T., Tanaka, Y., Tanaka, H., Shigenobu, K. 1999. Temperature sensitive effects of alpha-adrenergic stimulation in mouse ventricular myocardia. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.*, 104: 173-180.
29. Nishimaru, K., Tanaka, Y., Tanaka, H., Shigenobu, K. 2000. Positive and negative inotropic effects of muscarinic receptor stimulation in mouse left atria. *Life Sci.*, 66: 607-615.
30. Ochi, K., Teraoka, H., Unno, T., Komori, S., Yamada, M., Kitazawa, T. 2013. A ganglionic stimulant, 1, 1-dimethyl-4-phenylpiperazinium, caused both cholinergic and adrenergic responses in the isolated mouse atrium. *Eur. J. Pharmacol.*, 704: 7-14.
31. Saito, A., Ishikawa, T., Masaki, T., Kimura, S., Goto, K. 1986. Pharmacological analysis of autonomic innervation of the right atria of rats and guinea pigs: demonstration of nonadrenergic noncholinergic nerves. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 238: 713-719.
32. Schumann, H. J., Endoh, M., Wagner, J. 1974. Positive inotropic effects of phenylephrine in the isolated rabbit papillary muscle mediated both α - and β -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 284: 133-148.
33. Sharma, V. K., Colecraft, H. M., Wang, D. X., Levey, A. I., Grigorenko, E. V., Yeh, H. H., Sheu, S. S. 1996. Molecular and functional identification of m1 muscarinic acetylcholine receptors in rat ventricular myocytes. *Circ. Res.*, 79: 86-93.
34. Steinfath, M., Chen, Y., Lavicky, J., Magnussen, O., Nosa, M., Rosswang, S., Schmitz, W., Scholz, H. 1992. Cardiac α -adrenoceptor densities in different mammalian species. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 185-188.
35. Stengel, P. W., Gomez, J., Wess, J., Cohen, M. L. 2000. M2 and M4 receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and

- smooth muscle in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292: 877-885.
36. Tanaka, H., Manita, S., Matsuda, T., Adachi, M., Shigenobu, K. 1995. Sustained negative inotropism mediated by alpha-adrenoceptors in adult mouse myocardia: developmental conversion from positive response in the neonate. *Br. J. Pharmacol.*, 114: 673-677.
 37. Tanaka, H., Nishimaru, K., Kobayashi, M., Matsuda, T., Tanaka, Y., Shigenobu, K. 2001. Acetylcholine-induced positive inotropy mediated by prostaglandin released from endocardial endothelium in mouse left atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 363: 577-582.
 38. 田中 光, 重信弘毅 2001. 摘出心房組織標本を用いた心臓作用薬研究法. 日本薬理学雑誌, (Folia Pharmacol. Jpn.) 117 : 203-210.
 39. Zhang, S., Takahashi, R., Yamashita, N., Teraoka, H., Kitazawa, T. 2018. Alpha1B-adrenoceptor-mediated positive inotropic and positive chronotropic actions in the mouse atrium. *Eur. J. Pharmacol.*, 839: 82-88.
 40. Wagner, J., Brodde, O.E. 1978. On the presence and distribution of alpha-adrenoceptors in the heart of various mammalian species. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 302: 239-254.
 41. Wang, S.N., Fontenot, H.J., Kennedy, R.H. 1997. Alpha 1D-adrenoceptors play little role in the positive inotropic action of phenylephrine. *Eur. J. Pharmacol.*, 321: 39-43.
 42. Wang, H., Han, H., Zhang, L., Shi, H., Schram, G., Nattel, S., Wang, Z. 2001. Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart. *Mol. Pharmacol.*, 59: 1029-1036.
 43. Wang, H., Lu, Y., Wang, Z. 2007. Function of cardiac M3 receptors. *Auton. Autacoid Pharmacol.*, 27: 1-11.
 44. Weihe, E., Schütz, B., Hartschuh, W., Anlauf, M., Schäfer, M.K., Eiden, L.E. 2005. Coexpression of cholinergic and noradrenergic phenotypes in human and nonhuman autonomic nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 492: 370-379.
 45. Wess, J. 2004. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44: 423-450.
 46. Williamson, K. L., Broadley, K. J. 1987. Characterization of the alpha- adrenoceptors mediating positive inotropy of rat left atria by use of selective agonists and antagonists. *Arch. Int. Pharmacodyn., Ther.*, 285: 181-198.

Summary

It is well known that cardiac function (contraction force and frequency) is regulated by autonomic nerves including parasympathetic and sympathetic nerves in an opposite manner. Sympathetic nerves release noradrenaline and noradrenaline acts on β 1-adrenoceptor (β 1-ADR) to increase cardiac contraction. On the other hand, parasympathetic nerves release acetylcholine and acetylcholine acts on M2 muscarinic receptor (M2-MR) to decrease cardiac contraction. To investigate the functions of non- β 1-ADR and non-M2-MR, we used isolated atrial preparations from wild-type mice and muscarinic receptor-deficient mice and we examined the effects of adrenergic and cholinergic receptor agonists on contraction amplitude (inotropic action) and contraction frequency (chronotropic action). The effects of 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium (DMPP), a ganglionic nicotinic receptor agonist were also investigated to clarify the intrinsic neurons in the mouse cardiac ganglia.

In left atria from wild-type mice, carbachol decreased the amplitude of electrical field stimulation-evoked contractions (negative inotropic action), but this inhibition was transient and was followed by a gradual increase in contraction amplitude (positive inotropic action). In atria from M3KO mice, the transient negative inotropic action of carbachol changed to a sustained negative inotropic action. In contrast, in atria from M2KO mice, carbachol showed only positive inotropic activity. In atria from M2/M3 double KO mice, carbachol was devoid of any inotropic activity. The concentration eliciting a positive inotropic action was higher than that eliciting a negative inotropic action. The positive inotropic action was decreased by indomethacin and NS-398 (cyclooxygenase (COX)-2 selective inhibitor) and by removal of atrial endothelial cells. These observations demonstrate that atrial M3-MRs located on the endothelium mediate the positive inotropic effects in mouse atria through activation of the COX-2-prostaglandins pathway. Physiologically, this M3 receptor-mediated positive inotropic activity may serve

to dampen the inhibitory effects of M2 receptor activation on atrial contractility.

Phenylephrine (an α 1-ADR agonist) caused positive inotropic and chronotropic actions in the presence of propranolol (a β -ADR antagonist). These responses were decreased by prazosin and a high concentration of silodosin, indicating the involvement of α 1B-ADR. Among α 1-ADR mRNAs, the expression level of α 1B-ADR mRNA was the highest both in the atria and ventricles of mice. α 1B-ADR might function as a cardiac stimulant under the condition of a high concentration of noradrenaline, a condition that weakens the action of β 1-ADR.

DMPP, a nicotinic acetylcholine receptor agonist initially decreased the amplitude and frequency of atrial contraction, but this response was transient and was followed by increase in frequency and amplitude of atrial contraction. Pharmacological analysis indicated that the initial inhibition was due to the activation of intrinsic cholinergic nerves and that the following increase was due to the activation of cholinergic, adrenergic and non-adrenergic/non-cholinergic neurons.

In conclusion, the complex of cardiac intrinsic neurons and MRs and ADRs for regulation of atrial contraction was demonstrated and these mechanisms prevent failure of cardiac contractile functions.