

学 位 論 文 題 名

肥大型心筋症における肥大促進因子に関する研究

－組織レニン－アンジオテンシン系および細胞成長因子 TGF β 1

（Transforming Growth Factor β 1）の心肥大への関与について－

学位論文内容の要旨

（緒 言）

特発性肥大型心筋症（HCM）は原因不明の心肥大の進行を特徴とする。その原因の解明に際して、ヒトでは心筋生検時の少量の検体を直接検討する他に手段が乏しいため、最近では、HCM のモデルハムスターである BIO 14.6 を用いて様々な検討が行われている。その結果、 β 受容体-GTP 結合蛋白質、および、 α 受容体-ホスファチジルイノシトール系の細胞情報伝達系の異常が、心筋肥大の発症、進展に関与しているとの報告がなされている。

一方、近年、心筋組織局所でレニン－アンジオテンシン系（R－A系）の存在が報告され、末梢循環系の R－A系とは独立して心筋細胞の機能、成長、増殖に関与している可能性が示されている。すなわち、圧負荷心筋ではアンジオテンシノーゲン（ATN）の増加が観察され、心肥大との関連が指摘されている。しかし、圧負荷によらない特発性の心筋肥大への R－A系の関与については、いままでに詳細な検討はなされていない。また、細胞成長因子の一種である形質転換因子 β 1（TGF β 1）は、線維芽細胞から細胞外基質蛋白質の産生を促進することが知られているが、心筋間質組織の線維化への関与については不明である。本研究では、肥大型心筋症の心筋肥大発症要因を心筋実質細胞の肥大と間質の線維増生の二つに分けて考えて、肥大型心筋症モデル動物 BIO 14.6 を用い、培養心筋細胞における A II に対する細胞内イノシトールリン脂質代謝の変化、左心室心筋における ATN m-RNA の発現、ACE 活性、さらに TGF β 1 m-RNA の発現を分析し、組織 R－A系および細胞成長因子 TGF β 1 の心肥大への関与を検討した。

（材料と方法）

実験対象動物として、発症前期 4 週齢、肥大型 20 週齢の BIO 14.6 ハムスターと正常対照群と

して同週齢の FI β ハムスターを用いて次の実験を行った。① 対象動物の左心室から抽出された RNA をサンプルとして、TGF β 1 とアンジオテンシノーゲン (ATN) の m-RNA の左心室における発現を、各々、ノーザンブロット法またはボヌクレアーゼプロテクションアッセイ法 (RPA) により検討した。② 左心室粗細胞膜分画を調整してサンプルとして用い、[3 H] Bz-Gly-Gly-Gly を基質とした TESS らの方法に従って、左心室 ACE 活性を測定した。③ 単離心筋細胞を調整して、培養心筋細胞における A II 刺激に対するイノシトールリン脂質 (PI) 代謝の変化を検討した。これらはジアシルグリセロール (DAG) とイノシトール 1, 4, 5, トリン酸 (IP $_3$) の産生を測定して、ホスファチジルイノシトール (PI-), ホスファチジルイノシトール 4, 5, トリン酸 (PIP $_2$ -) 特異的ホスホリパーゼ C 活性 (PLC) を評価することにより検討した。

(結 果)

TGF β 1, ATN の m-RNA は、BIO 14.6, FI β の各群、さらに各週齢の左心室で発現していることが確認された。TGF β 1 m-RNA の発現量は、BIO 14.6 で FI β に較べて各週齢で有意に亢進しており、さらに BIO 14.6 群の中では、20週齢で 4 週齢に較べて有意に増大していた。その一方で、ATN の発現には群間、週齢間で発現に有意差がみられなかった。心筋 ACE 活性は、20週齢の BIO 14.6 群で同週齢の FI β 群に較べて、有意な高値を示した。また A II 刺激に対する心筋細胞の IP $_3$, DAG の産生量、並びに PI-, PIP $_2$ -特異的 PLC の活性は、20 週齢の BIO 14.6 群で同週齢の FI β に較べて有意に亢進していた。

(考 察)

本研究の結果、A II は、20週齢の BIO 14.6 から得られた心筋細胞において、PLC を活性化し、DAG および IP $_3$ の遊離を増大させた。このことは、A II が、イノシトールリン脂質代謝を亢進させ、セカンドメッセンジャーである IP $_3$, DAG を介して細胞膜への刺激を細胞内へ情報伝達するというを示すとともに、20週齢の BIO 14.6 では、プロテインキナーゼ C (PKC) を介して蛋白質合成を亢進する可能性を示している。また、R-A 系の気質である ATN が m-RNA レベルで心筋組織内に発現していることから、シリアンハムスターの心室筋においても、組織 R-A 系が存在することが明らかとなった。さらに、左心室筋における ACE 活性が、20 週齢の BIO 14.6 において亢進していたことから、この組織 R-A 系は活性化されていると考えられる。以上の結果より、イノシトールリン脂質代謝および組織 R-A 系の亢進状態は、心肥大の

発症よりむしろ進展、経過に影響をあたえていると考えられた。最近、動脈壁において、A IIが TGF β 1 やプロトオンコジーンの c-fos, c-myc を介して、動脈平滑筋の肥大や間質の線維化を誘導することや、さらに、培養心筋由来線維芽細胞において、A II 刺激によりコラーゲン合成が促進されることが報告されている。心臓においても、心筋細胞のみならず間質細胞に作用して、コラーゲン合成能、蛋白質合成能を亢進させ、肥大型心筋症における心肥大の発症に関与する可能性が考えられる。一方、Sporn らのグループは、心筋組織において、細胞成長因子 TGF β 1 が心筋細胞、血管内皮細胞および平滑筋細胞に存在していることを確認している。彼らは、その分布から TGF β 1 が間質線維の増生のみならず、心筋収縮蛋白質の産生のコントロールや心筋細胞の分化を抑制する因子である可能性を推測している。従って、TGF β 1 の産生異常が心筋蛋白質の質的異常、量的異常を招いて心筋肥大を生じる可能性が考えられる。本研究では、TGF β 1 の産生が心肥大発症前から増加しているため、肥大型心筋症の発症要因である可能性が示された。今後は、TGF β 1 と組織 R-A 系との相互関係についても検討が必要であると考えられた。

(結 語)

肥大型心筋症モデルハムスター (BIO 14.6) を用いて、肥大型心筋症の心肥大における組織 R-A 系と TGF β 1 の関連を検討して、以下の結果を得た。

- ① 20週齢の BIO 14.6 から得た培養心筋細胞では、A II 刺激に対応して PLC 活性が亢進し、DAG および IP₃ の遊離が増大していた。
- ② シリアンハムスターの左室心筋において、ATN の m-RNA の発現を確認した。BIO 14.6 と FI β の各群間で発現の程度に有意差は見られなかった。週齢に対応して有意な発現の変化は見られなかった。
- ③ BIO 14.6 の心筋細胞膜分画の ACE 活性は、4 週齢では FI β と差を認めないが、20週齢では亢進していた。
- ④ BIO 14.6 の心筋では、FI β と比較にして、4 週齢より TGF β 1 m-RNA 発現の増大を認め、さらに、20週齢では 4 週齢に比較して発現が亢進していた。

以上の結果より、肥大型心筋症モデルハムスターにおいて、組織 R-A 系が存在し、A II はイノシトールリン脂質代謝を介して心肥大に関与する可能性が示された。また、R-A 系のみならず、ハムスター心筋に TGF β 1 が m-RNA レベルで発現していることを初めて証明した。その発現量の変化から、心筋症発症への関与が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕
副 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 本 間 研 一

特発性肥大型心筋症（HCM）は原因不明の心肥大の進行を特徴とし、その原因の解明に際して、HCM モデルハムスターである BIO 14.6 を用いた検討から、これまでにカテコルアミン受容体と膜情報伝達系の異常が心筋肥大の発症進展に関与しているとの報告がなされている。一方、近年、心筋組織でレニン-アンジオテンシン系（R-A系）の産生が確認され、圧負荷時の心肥大の成立と組織 R-A系の関連が指摘されているが、圧負荷によらない HCM の心肥大への関与については不明である。さらに、形質転換成長因子 $\beta 1$ （TGF $\beta 1$ ）は、種々の細胞の増殖、分化を調節するほか強力な間質線維化促進因子であるが、HCM の心肥大への関与については検討されていない。そこで、本研究では、HCM の心肥大発症要因を心筋実質細胞の肥大と間質の線維増生の二つに分けて考えて、肥大型心筋症モデル動物 BIO 14.6 を用い、培養心筋細胞における A II に対する細胞内イノシトールリン脂質代謝の変化、左心室心筋における ATN m-RNA の発現、ACE 活性、さらに TGF $\beta 1$ m-RNA の発現を分析することにより、組織 R-A系および細胞成長因子 TGF $\beta 1$ の心肥大への関与を検討した。

実験材料として、発症前期 4 週齢、肥大型 20 週齢の BIO 14.6 ハムスターと正常対照群として同週齢の FI β ハムスターを用いて次の実験を行った。① 対象動物の左心室から抽出した RNA をサンプルとして、TGF $\beta 1$ とアンジオテンシノーゲン（ATN）の m-RNA の左心室における発現を、各々、ノーザンブロット法またはリボヌクレアーゼプロテクションアッセイ法（RPA）により検討した。② 左心室粗細胞膜分画を調整してサンプルとして用い、TESS らの方法に従って、左心室 ACE 活性を測定した。③ 単離心筋細胞を調整して、培養心筋細胞における A II 刺激時のジアシルグリセロール(DAG)とイノシトール 1, 4, 5, 三リン酸 (IP₃) の遊離量を測定して、ホスファチジルイノシトール、特異的ホスホリパーゼ C 活性 (PI-PLC) を評価した。以上の実験から次の成績が得られた。TGF $\beta 1$ 、ATN の m-RNA は、BIO 14.6、FI β の各群、さらに各週齢の左心室で発現していることが確認された。TGF $\beta 1$ m-RNA の発現量は、BIO 14.6 で FI β に較べて各週齢で有意に亢進しており、さらに BIO 14.6 群の中では、20 週齢で 4 週齢に較べて有意に増大していた。その一方で、ATN の発現には群間、

週齢間で発現に有意差がみられなかった。心筋 ACE 活性は、20週齢の BIO 14.6 群で同週齢の FI β 群に較べて、有意な高値を示した。また A II 刺激に対する心筋細胞の IP $_3$ 、DAG の産生量、並びに PI-特異的 PLC の活性は、20週齢の BIO 14.6 群で同週齢の FI β に較べて有意に亢進していた。

HCM の心肥大における組織 R-A 系と TGF β 1 の関連を、モデル動物を用いて検討し、以下の結論を得た。① 20週齢の BIO14.6 から得た培養心筋細胞では、A II 刺激に対応して PLC 活性が亢進し、DAG および IP $_3$ の遊離が増大していた。② シリアンハムスターの左室心筋において、ATN の m-RNA の発現を確認した。BIO 14.6 と FI β の各群間で発現の程度に有意差は見られなかった。週齢に対応して有意な発現の変化は見られなかった。③ BIO 14.6 の心筋細胞膜分画の ACE 活性は、4 週齢では FI β と差を認めないが、20週齢では亢進していた。④ BIO 14.6 の心筋では、FI β と比較して、4 週齢より TGF β 1 m-RNA 発現の増大を認め、さらに、20週齢では 4 週齢に比較して発現が亢進していた。以上から、肥大型心筋症モデルハムスターにおいて、組織 R-A 系が存在し、A II はイノシトールリン脂質代謝を介して心肥大の進展に関与する可能性が示された。また、R-A 系のみならず、ハムスター心筋に TGF β 1 が m-RNA レベルで発現していることを初めて証明し、その発現量の変化から、心筋症の発症、進展への関与が示唆された。

口頭発表の審査会において、葛巻暹教授より、BIO 14.6 の組織病変の出現と TGF β 1 の発現亢進との因果関係、並びに BIO 14.6 におけるイノシトールリン脂質代謝亢進に関与する A II 受容体-イノシトールリン脂質情報伝達系の具体的なステップについて質問がなされた。本間研一教授からは、A II 血中濃度と生体への効果、並びに心室組織 A II 濃度について質問がなされた。また、皆川知紀教授より、BIO 14.6 の病理組織所見に対する炎症性変化の関与について質問がなされた。さらに、古館正徳教授から、組織 R-A 系や TGF β 1 の発現の変化と肉眼病理変化の進行との相関関係について質問がなされた。これらに対し申請者は概ね妥当な回答を行い、その後行われた葛巻、本間両副査教授との試問においても、概ね適切な回答がなされた。

本研究は、HCM モデル動物の心筋組織を用いて詳細な分子生物学、生化学的解析を行い、肥大型心筋症の心肥大への組織 R-A 系ならびに TGF β 1 の関与を示した最初の試みであり、有意義な研究と考えられ、学位授与に値する。