

学 位 論 文 題 名

レニンとアンジオテンシン変換酵素の mRNA
および蛋白のヒト心臓での局在について

学位論文内容の要旨

レニン-アンジオテンシン系（RAS）は血管を収縮させ、水分貯留に働き最終的に昇圧をひきおこす系である。RAS を抑制するアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬が心肥大を退縮させると報告されているように、RAS は循環器疾患の病態に深く関与しているとの報告がなされてきた。また、高血圧患者のうち治療前の血中レニン活性が高値であった患者に心筋梗塞の発症率が高かったとの報告もある。遺伝子レベルでも、ACE の遺伝子発現の変化が心筋梗塞の危険因子であることが報告されている。近年、循環 RAS に対して、特定の臓器で産生されその場で作用する paracrine / autocrine system としての組織 RAS の存在がマウス、ラットなどの脳、副腎、肝臓、精巣、卵巣、心臓などで証明されてきた。しかしヒト心臓での存在についてはいまだ解明されてなく、生理学的にあるいは病理学的にどのような意義があるのか不明である。本研究は RAS の重要な構成要素であるレニンと ACE について着目し、正常ヒト心臓でのこれらの mRNA および蛋白の存在について、剖検心を用いて検討した。

研究方法

対象：対象は北海道大学医学部附属病院および関連病院での剖検例のうち非心疾患15例で、死後3時間以内に摘出した心臓（右心房、左心室）、腎臓、肺である。これらは直ちに液体窒素で急速凍結後、 -80°C で保存し、RAS と蛋白の抽出に用いた。免疫組織学的検索のために臓器はパラホルムアルデヒド固定後、パラフィン包埋した。

レニンおよび ACE mRNA の安定性の検討：死後時間の mRNA に対する影響を調べるため、手術材料の腎臓および肺を用いて細分し、摘出直後から経時的に57時間後までに分けて組織を液体窒素で急速凍結し RAS の抽出に用いた。これらの RAS を用いてレニン、ACE mRNA が増幅されるかどうか、reverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR）により調べた。

RASの抽出：各臓器から acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction 法に従い RAS を抽出した。また、ribonuclease protection assay (RPA) のために oligotex column にてポリ (A)⁺RNA を調製した。

RPA によるレニン mRNA の検出：ヒトレニン cRNA プローブを作製し、ポリ (A)⁺RNA にハイブリダイズさせ、ribonuclease 処理の後、電気泳動し、確認した。

RT-PCR 法によるレニン mRNA の検出と確認：total RNA 1 μ g を reverse transcriptase により反応後、レニン遺伝子 exon 8 から 9 の領域について作製したプライマーを用い、DNA 変成に 93°C \times 2 分、アニーリングに 63°C \times 2 分、DNA の伸長に 72°C \times 3 分の条件で PCR を 30 サイクル施行した。さらに、ヒトレニン cDNA プローブを作製して Southern blot を行い確認した。

レニン蛋白の存在の検討：蛋白を粗抽出し、SDS-PAGE 後、ウサギ抗ヒトレニンポリクローナル抗体を用いて、Western blot 法を行った。

RT-PCR 法による ACE mRNA の検出と確認：ACE 遺伝子 exon 7 から 8 の領域について作製したプライマーを用い、DNA 変成に 93°C \times 2 分、アニーリングに 68°C \times 2 分、DNA の伸長に 72°C \times 3 分の条件で RT-PCR を 30 サイクル施行した。さらに、ヒト ACE cRNA プローブを用いて Southern blot にて確認した。

ACE の免疫組織学的検討：パラフィン切片をウサギ抗ヒト ACE ポリクローナル抗体を用いて Avidin-biotin-peroxidase complex 法により免疫染色した。

結 果

1. 摘出57時間後の手術材料の腎および肺から抽出した RNA からでもレニン mRNA が摘出直後と同程度検出された。
2. RPA では心臓でレニン mRNA は検出されなかった。
3. レニンについての RT-PCR では検討した15例全例でポジティブコントロールの腎臓と同様に右心房にレニン mRNA が検出されたが、左心室では検出されなかった。
4. レニン蛋白についての Western blot では右心房、左心室、腎臓の全てで50kD 付近に免疫反応陽性バンドを認めた。
5. ACE についての RT-PCR では検討した15例全例でポジティブコントロールの肺と同様に右心房、左心室ともに ACE mRNA が検出された。
6. ACE 蛋白の分布について右心房、左心室の組織で検討したところ、心外膜の冠動脈、心筋

内の冠動脈、小動脈、静脈、毛細管の内皮で免疫反応が陽性であった。

考 案

ヒト心臓において RAS の要素であるレニン、ACE について mRNA および蛋白のレベルでの存在が確認された。特にレニンについては、左心室でなく右心房に mRNA が検出されたことから、正常心では右心房で特に重要な役割を果たしていると考えられた。左心室では mRNA は認められず蛋白のみが存在するという解離が生じた点は、血中レニン蛋白を同時に検出した可能性があり、今後解決すべき点として残された。いずれにせよ、アンジオテンシノーゲンが右心房に特に多く存在し、アンジオテンシンⅡと生理的に拮抗する心房性利尿ペプチドも心房に多いことから、これらの要素が組織で未知の相互作用を行っていると考えられた。また、心臓の血管内皮に ACE が広く分布しているという結果から、心不全の治療に広く用いられている ACE 阻害薬が血管内皮に直接作用し心筋における微小循環の改善等に貢献している可能性も考えられた。アンジオテンシンⅡは心臓に対して、陽性変力作用、陽性変時作用、細胞成長促進作用、線維化作用があるといわれており、心臓での組織 RAS が心病変の成立ちになんらかの関係がある可能性がある。本研究は心疾患と心臓の組織 RAS の関係を今後解明していくための基礎になると考えられた。

結 語

ヒト部検症例のうち非心疾患例15例について心臓でのレニンと ACE の mRNA および蛋白の存在の有無を検討し以下の結果が得られた。

1. RT-PCR 法によりレニン mRNA は全例で右心房で検出され、左心室では検出されなかった。
2. レニン蛋白は Western blot 法で右心房、左心室に認められた。
3. RT-PCR 法により ACE mRNA は全例で右心房、左心室でともに検出された。
4. ACE 蛋白は免疫組織学的検討により心臓においては心外膜の冠動脈、心筋内の冠動脈、小動脈、静脈、毛細管の内皮に局在していることが判明した。

以上の結果は今後心臓での組織 RAS が心疾患とどのように関わっていくのかを研究していくうえで重要な基礎になると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 阿 部 和 厚

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

循環器疾患の病態にレニン-アンジオテンシン系 (RAS) が深く関与しているとの報告がなされてきた。近年、循環 RAS に対して、特定の臓器で産生されその場で作用する paracrine/autocrine system としての組織 RAS の存在がマウス、ラットなどの諸臓器で証明されてきた。しかし、ヒト心臓での存在についてはいまだ解明されてなく、その意義については不明である。本研究では RAS の構成要素であるレニンとアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の mRNA および蛋白の正常ヒト心臓における存在について、剖検心を用いて検討した。

材料と方法：対象は剖検例のうち非心疾患例15例から死後3時間以内に摘出した心臓（右心房、左心室）、肝臓、肺である。各臓器から RAS を抽出し、ヒトレニン mRNA の検出には ribonuclease protection assay (RPA) および reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を、ヒト ACE mRNA の検出には RT-PCR 法を用いた。さらに、ヒトレニン cDNA プローブおよびヒト ACE cDNA プローブを作製して Southern blot 解析を行い RT-PCR の結果を確認した。レニン蛋白の検討には、蛋白を粗抽出し、SDS-PAGE 後、ウサギ抗ヒトレニンポリクローナル抗体を用いて、Western blot 解析を行った。ACE 蛋白の検討にはパラフォルムアルデヒド固定のパラフィン切片をウサギ抗ヒト ACE ポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。

結果：レニンについての RT-PCR 法では検討した15例全例でポジティブコントロールの腎臓と同様に右心房にレニン mRNA が検出されたが、左心室では検出されなかった。レニン蛋白についての Western blot 解析では右心房、左心室、腎臓の全てで50kD 付近に免疫性反応陽性バンドを認めた。一方、ACE についての RT-PCR 法では検討した15例全例でポジティブコントロールの肺と同様に右心房、左心室ともに ACE mRNA が検出された。ACE 蛋白の分布について右心房、左心室の組織で検討したところ、心外膜の冠動脈、心筋内の冠動脈、小動脈、毛細管の内皮で免疫反応が陽性であった。

考案：ヒト心臓においてレニン、ACE について mRNA および蛋白のレベルでの存在が確認され心臓に組織 RAS が存在することが判明した。特にレニンについては、左心室でなく右心房に

mRNA が検出されたことから、正常心では右心房で特に重要な役割を果たしていると考えられた。左心室では mRNA は認められず蛋白のみが存在するという解離が生じた点は、血中レニン蛋白を同時に検出した可能性があり、今後解決すべき点として残された。いずれにせよ、アンジオテンシノーゲンが右心房に特に多く存在し、アンジオテンシンⅡと生理的に拮抗する心房性利尿ペプチドも心房に多いことから、これらの要素が組織で未知の相互作用を行っていると考えられた。また、ACE が心臓の血管内皮に広く分布していたことから、心不全の治療に広く用いられている ACE 阻害薬が血管内皮に直接作用し心筋における微小循環の改善等に貢献している可能性も考えられた。

結語：ヒト部検症例のうち非心疾患例15例について心臓でのレニンと ACE の mRNA および蛋白の存在の有無を検討し以下の結果が得られた。RT-PCR 法によりレニン mRNA は全例で右心房で検出され、左心室では検出されなかった。レニン蛋白は Western blot 法で右心房、左心室に認められた。RT-PCR 法により ACE mRNA は全例で右心房、左心室でともに検出された。ACE 蛋白は免疫組織学的検討により心臓においては心外膜の冠動脈、心筋内の冠動脈、小動脈、静脈、毛細管の内皮に局在していることが判明した。

口頭発表に当り、阿部教授より対象に右心房と左心室を選んだ理由、レニンの免疫染色、刺激伝導系での RAS の局在、心臓内膜側と外膜側での ACE の分布の差、ACE 阻害薬投与例での RAS の動態について、石橋教授よりレニンの mRNA と蛋白の分布の解離、酵素活性についての検討の有無、心臓内でのネガティブコントロールとなる部位の有無について、小林教授よりレニンが右心房に多く左心室に少ないことの普遍性と発生学的影響について、古舘教授よりレニンを radio immuno assay で測定したかどうかについての質問がなされたが、発表者は概ね適切な回答をした。その後行われた阿部、石橋両審査教授との試問においても概ね妥当な回答がなされた。

以上、本研究はヒト心臓に組織 RAS が存在することを明らかにし、今後心臓での組織 RAS と心疾患との関係を解明していく基礎を築いたものであり、有意義な研究と考えられ、学位授与に値する。