

学 位 論 文 題 名

肥大心における心筋線維化へのアンジオテンシンⅡの関与：
培養心筋線維芽細胞を用いての検討

学位論文内容の要旨

心肥大では心筋細胞の肥大と間質の線維化が生じるが、間質のコラーゲン線維の蓄積は、心室の拡張機能に障害をきたすと報告されている。心筋組織に存在する線維芽細胞（心筋線維芽細胞）がコラーゲンの産生を担っているが、心筋線維芽細胞の増殖因子やコラーゲン代謝の調節因子に関する研究はこれまでほとんど行われていない。一方、心臓において組織レニン-アンジオテンシン系（R-A系）の存在が証明され、この心臓R-A系遺伝子の発現は肥大心において亢進し、アンジオテンシンⅡ（AngⅡ）は血管収縮作用以外に細胞の増殖や成長に影響を与え、肥大心筋のコラーゲン含量はアンジオテンシン変換酵素阻害薬で減少すると報告され、心臓R-A系が肥大心における心筋の線維化に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、培養心筋線維芽細胞における AngⅡ の細胞増殖、コラーゲン生合成への影響を追求し、さらに高血圧自然発症ラットの肥大心を用い、心肥大の心筋線維化における AngⅡ の関与を検討した。

方 法

1) 正常血圧ラット由来の心筋線維芽細胞における AngⅡ のコラーゲン合成に及ぼす影響

細胞培養； 4 週齢 Wistar ラットの左心室筋より Eghbali らの方法を改変して心筋線維芽細胞の培養を行った。

コラーゲン合成の分析； confluent に達した心筋線維芽細胞を24時間無血清の DME 培地で培養し細胞を quiescent の状態にし、培地を0.1mM アスコルビン酸を含む DME 培地に交換し、AngⅡ もしくは saralasin を添加し8時間培養し、 $[^3\text{H}]$ proline で標識しさらに16時間培養を続けた。その後、培養上清および細胞層を回収し、protease inhibitor を含む50mM 酢酸に対して十分透析を行った後、凍結乾燥した。試料の一部は Peterkofsky らの方法に従ってコラーゲナーゼ消化を行い、コラーゲン合成量を測定した。また、残りは塩酸により加水分解しアミノ酸分析器を用いて $[^3\text{H}]$ hydroxyproline の定量を行い、コラーゲナーゼ消化法で得られたコラー

ゲン合成量と対比した。

コラーゲンの型分析；試料を0.5M酢酸で溶解し、pepsin 消化後、Sykes らの方法に従い SDS-PAGE を施行し、その後 fluorography を行った。

DNA 合成の分析；Ang II で刺激した心筋線維芽細胞を [^3H] thymidine で標識し、トリクロロ酢酸不溶性物質の放射活性を測定した。

2) 遺伝的高血圧ラット由来の心筋線維芽細胞における Ang II のコラーゲン合成に及ぼす影響
10週齢の spontaneously hypertensive rat (SHR) と同週齢の Wistar-Kyoto ラット (WKY) の左心室より心筋線維芽細胞を分離し、コラゲナーゼ消化法でコラーゲン合成を調べた。

結 果

心筋線維芽細胞のコラーゲン合成に対する Ang II の作用

心筋線維芽細胞のコラーゲン合成は Ang II 刺激により濃度依存性に増加した。Ang II 濃度 1 nM よりコラーゲン合成は増加し、1 μM で最大となり、Ang II を加えない状態より細胞 1 個当たりでみると、 $107 \pm 19\%$ 増加した。Ang II は非コラーゲン蛋白の合成も亢進させたが、Ang II はコラーゲン蛋白の合成をより強く刺激した。合成されたコラーゲンの約85%は培地中に存在し、その割合は Ang II 刺激にても変化が認められなかった。コラーゲン合成は Ang II を添加して8時間後より増加し始め、40時間後に最大に達した。アミノ酸分析による [^3H] hydroxyproline の放射活性は Ang II 刺激で増大し、コラゲナーゼ消化法による結果と一致した。また、Ang II のコラーゲン合成に与えた効果は saralasin 添加により抑制された。

Ang II のコラーゲンの型に与える影響

Ang II を加えない状態では、心筋線維芽細胞の産生するコラーゲンの大部分は I 型であり、残りは III 型と V 型と考えられる成分が占めた。Ang II 刺激にて全体のコラーゲン量は増加したが、コラーゲンの型の比率には有意な変化は見られなかった。

Ang II の DNA 合成に及ぼす影響

100pM から10 μM の Ang II では [^3H]thymidine の取り込みには有意な変化はみられなかった。また、心筋線維芽細胞の細胞数は Ang II を暴露した24時間の間に変化はみられなかった。

遺伝的高血圧ラット由来の心筋線維芽細胞における Ang II のコラーゲン合成に及ぼす影響

収縮期血圧および左心室重量／体重比は SHR で有意に増加していた。Ang II を加えない状態では、SHR の心筋線維芽細胞は WKY の細胞に比べて1.6倍コラーゲン合成が増加していた。

SHR および WKY の細胞とも Ang II はコラーゲン合成を増加させたが、それは SHR の細胞で顕著であった。100nM の Ang II 刺激ではコラーゲン合成の増加は SHR の細胞では $185 \pm 18\%$ であったのに対し、WKY の細胞では $128 \pm 19\%$ であった ($p < 0.01$)。

考 察

従来の研究から R-A 系が高血圧性肥大心におけるコラーゲン代謝に関与することが示唆されているが、Ang II が心筋のコラーゲン代謝に直接影響を与えていることの証明はなかった。本研究の結果、Ang II は心筋線維芽細胞のコラーゲン合成を促進した。合成されたコラーゲンの大部分は I 型であり、他に III 型と V 型が含まれていたが、Ang II はコラーゲンの型に有意な影響を与えなかった。また、合成されたコラーゲン蛋白の大部分は細胞内でなく培養液中に存在した。その作用は Ang II の受容体拮抗剤である saralasin で抑制され、Ang II 受容体を介すると考えられた。一方、Ang II は DNA 合成に影響を及ぼさなかった。さらに、SHR の心筋線維芽細胞では Ang II に対する反応性が亢進していることが示された。

Ang II が心筋線維芽細胞のコラーゲン合成を促進する受容体以下の細胞内情報伝達機序は、心筋細胞や血管平滑筋細胞における従来の報告から、イノシトールリン脂質代謝の亢進、protein kinase C の活性化および核内癌遺伝子や細胞成長因子遺伝子の賦活化を介するものであると考えられる。Ang II のコラーゲン合成刺激作用は SHR 由来の心筋線維芽細胞で著明であり、SHR においては、Ang II 受容体数の増加、受容体の upregulation および受容体以下の情報伝達系の亢進が生じていると考えられる。心筋細胞における Ang II の蛋白合成促進に関する従来の報告と本研究の結果から、Ang II は肥大心において心筋細胞と線維芽細胞の双方に作用し、心筋細胞の肥大と間質の線維化、すなわち心筋の remodeling を惹起すると考えられる。従って、Ang II の作用を直接的あるいは間接的に阻害する薬剤には、心筋細胞肥大とともに心筋の線維化を抑制する効果を期待できる。

結 論

Ang II はコラーゲン代謝を介し高血圧性肥大心における心筋の線維化に深く関与していることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 小 山 富 康

副 査 教 授 阿 部 和 厚

肥大心では心筋細胞の肥大と間質の線維化が生じるが、間質のコラーゲン線維の蓄積は、心室の拡張機能に障害をきたすと報告されている。心筋組織は心筋細胞の他に、線維芽細胞、血管平滑筋細胞、内皮細胞、さらに間質のコラーゲン線維などで構成され、コラーゲン線維の産生はこの心筋線維芽細胞が担っていることが証明されている。しかし、その増殖因子やコラーゲン代謝の調節因子に関する研究はほとんど行われていない。一方、血管収縮物質であるアンジオテンシンⅡ (AngⅡ) が心筋細胞や血管平滑筋細胞の蛋白合成を促進することが報告され、また、肥大心筋のコラーゲン含量がアンジオテンシン変換酵素阻害薬で減少することから、AngⅡが肥大心における心筋の線維化に関与していることが予想される。そこで、本研究では、正常血圧および遺伝的高血圧ラット由来の培養心筋線維芽細胞を用いて、コラーゲン合成、DNA合成に及ぼす AngⅡの影響を検討した。

4週齢 Wistar ラット、10週齢の高血圧自然発症ラット (SHR) と同週齢の Wistar-Kyoto ラット (WKY ラット) の左心室筋より Eghbali らの方法を改変して心筋線維芽細胞の培養を行った。confluent に達した心筋線維芽細胞を無血清の DME 培地で24時間培養後、培地を0.1 mM アスコルビン酸を含む DME 培地に交換し AngⅡを加え8時間培養し、その後 [^3H] proline で標識しさらに16時間培養を続けた。培養上清および細胞層を回収し、プロテアーゼ阻害剤を含む50mM 酢酸に対して透析を行った後、凍結乾燥した。試料の一部は Peterkofsky らの方法でコラゲナーゼ消化を行い、コラーゲン合成量を測定した。また、残りは塩酸により加水分解しアミノ酸分析で [^3H] hydroxyproline の定量を行い、コラゲナーゼ消化法で得られたコラーゲン合成量と対比した。また、コラーゲンの型分析のため、試料をペプシン消化後、Sykes らの方法でポリアクリルアミド電気泳動を施行し、フルオログラフィを行った。さらに、DNA合成の分析のため、AngⅡで刺激した細胞を [^3H] thymidine で標識し、酸不溶性物質の放射活性を測定した。

その結果、正常血圧ラットである Wistar ラットの心筋線維芽細胞のコラーゲン合成は AngⅡ刺激により濃度依存性に増加した。AngⅡ濃度 1 nM よりコラーゲン合成は増加し、1 μM で

最大となり、AngⅡを加えない状態より細胞1個当たりでみると $107 \pm 19\%$ 増加した。AngⅡは非コラーゲン蛋白の合成も促進したが、AngⅡはコラーゲン蛋白の合成をより強く刺激した。合成されたコラーゲンの85%は培地中に存在し、その割合はAngⅡ刺激にても変化が認められなかった。コラーゲン合成はAngⅡを添加して8時間後より増加し始め、40時間後に最大に達した。アミノ酸分析による $[^3\text{H}]$ hydroxyprolineの放射活性はAngⅡ刺激で増大し、コラーゲナーゼ消化法による結果を裏付けた。また、AngⅡのコラーゲン合成に与えた効果はAngⅡ受容体拮抗剤であるサララシンにより抑制された。心筋線維芽細胞の産生するコラーゲンの大部分はⅠ型であり、残りはⅢ型とⅤ型と考えられる成分が占めた。AngⅡ刺激にて全体のコラーゲン量は増加したが、コラーゲンの型の比率は変化しなかった。AngⅡは $[^3\text{H}]$ thymidineの取り込みに有意な変化を与えなかった。一方、SHRでは収縮期血圧と左心室重量/体重比は有意に大きかった。AngⅡを加えない状態では、SHRの心筋線維芽細胞はWKYラットの細胞に比べて1.6倍コラーゲン合成が大きく、さらにAngⅡに対する反応も亢進していた。

以上の結果より、AngⅡはコラーゲン代謝を介し肥大心における心筋の線維化に関与していることが示唆された。

口頭発表の審査会において、小山教授により、AngⅡによるコラーゲンの遺伝子発現の有無について、大動脈の圧負荷後の血管内皮細胞でのコラーゲン合成促進と今回のAngⅡ刺激との比較、運動による心内膜側の動脈性毛細血管の増加との関連、さらにAngⅡがコラーゲン合成のどの段階に影響を与えるかについての質問がなされた。また、阿部教授より、心筋由来の線維芽細胞と他臓器由来の線維芽細胞の違いについて、高血圧自然発症ラットでAngⅡ刺激を加える前よりコラーゲン合成が亢進し、さらにAngⅡ刺激に対する反応性も高まっていたことの意義についての質問がなされた。これらに対し、申請者は概ね妥当な回答を行った。その後行われた小山、阿部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。

本研究は、心筋線維芽細胞におけるAngⅡのコラーゲン合成促進作用を示し、肥大心における心筋線維化へのAngⅡの関与の可能性を明らかにしたものであり、有意義な研究と考えられ、学位授与に値する。