

学 位 論 文 題 名

A role of myofilament Ca^{2+} sensitivity in enhanced vascular reactivity in cardiomyopathic hamsters

(心筋症ハムスターにおいて認められる血管収縮反応の
亢進に対する筋フィラメントの Ca^{2+} 感受性の役割)

学位論文内容の要旨

心不全の病態では、心筋の収縮性の低下が心拍出量の低下を起し、その一方では交感神経、renin-angiotensin 系、および arginine vasopressin の放出の活性化が促進され、心収縮性の異常に対する代償機構として作用するが、これが逆に心収縮を増悪させる結果となっている。さらに、上記の亢進した系により血管収縮物質 (norepinephrine、angiotensin II、arginine vasopressin) の過剰産成を生じ、これにより全身血管の収縮が亢進し、血管抵抗の増大を招くことになる。血管収縮性の増大には、収縮物質の過剰放出ばかりではなく、血管平滑筋の収縮物質に対する反応性が増強していることもその一因と考えられる。

実際、さまざまな実験的心不全モデルにおいて、種々の血管作動性物質による血管収縮反応が増強しているという報告がなされているが、必ずしも一致した見解は得られておらず、またその血管収縮反応の増強する機構についても不明なままである。

心筋症ハムスターは遺伝的に作成された、心筋症を呈して最終的に心不全へと至る動物であり、ヒトにおける心筋症のモデルとして長く使用されてきた。この動物における心筋の異常についてはよく知られているが、血管の収縮性の変化についての詳細な検討についてはなされていない。本研究では心筋症ハムスターの摘出血管標本を用いて、種々の血管作動性物質に対する収縮性を検討し、さらにその血管反応性の変化の機構を明らかにしようとした。

心エコーにて有意な心筋収縮低下を確認されている 20-22 週令の心筋症ハムスター (BIO53.58) および同週令の対照ハムスター (F1b) の胸部大動脈をエーテル麻酔下で摘出し、輪状標本を作成して生理的塩類液で満たした器官槽に懸垂して等尺性張力変化を測定した。さらに上腸管膜動脈を摘出し、 β -escin (50 μM) にてスキンドファイバーを作成し、その Ca^{2+} 感受性を測定した。

心筋症ハムスターの大動脈では、対照ハムスターのそれに比較して、phenylephrine、

angiotensin II、高濃度 K^+ 溶液による収縮反応は、著明に増強していた。この収縮力増強反応の特徴は最大反応の増大であり、収縮物質に対する感受性 (EC_{50}) は変化を認めなかった。また内皮除去あるいは cyclooxygenase 阻害薬である indomethacin、NO 合成酵素阻害薬である N^G -nitro-L-arginine の処理によっても収縮反応の増強の程度は変わらなかった。すなわち心筋症ハムスターの血管収縮反応の亢進は血管平滑筋の収縮性の変化であり、内皮由来の prostanoids や nitric oxide (NO) の産成の変化である可能性は否定された。Protein kinase C (PKC) を直接活性化する phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu) の収縮も心筋症ハムスターで亢進しており、また phenylephrine の収縮反応は。PKC 抑制薬である staurosporine および calphostin C により心筋症ハムスターでより著明な抑制を受けた。すなわち心筋症ハムスターの血管平滑筋の収縮性の変化には PKC が情報伝達系として関与していることが推定された。一方、心筋症ハムスターでの phenylephrine の収縮反応増強に対して、ryanodine、cyclopiazonic acid、nifedipine は影響を与えないことから、細胞内貯蔵部位での Ca^{2+} 取り込み放出機構および細胞膜の電位依存性 Ca^{2+} チャネルの関与は否定された。

上記 PKC の血管平滑筋に対する作用の一つとして、血管平滑筋収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性の亢進作用が考えられている。そこでスキンド処理を行った上腸管膜動脈を用いて Ca^{2+} による収縮反応を比較検討したところ、心筋症ハムスターでの Ca^{2+} 感受性は対照ハムスターに比較して有意に亢進していた。さらに PDBu は心筋症ハムスターにおいてのみ有意な Ca^{2+} 感受性の増強効果を認めることができた。

以上の結果より、心筋症ハムスターの血管収縮性は著明に亢進をしており、その機序として血管平滑筋収縮蛋白における Ca^{2+} 感受性が増強していることが考えられ、PKC はさらにその Ca^{2+} 感受性増強機構を促進していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 北 畠 顯
副 査 教 授 菅 野 盛 夫

学 位 論 文 題 名

A role of myofilament Ca^{2+} sensitivity in enhanced vascular reactivity in cardiomyopathic hamsters

(心筋症ハムスターにおいて認められる血管収縮反応の
亢進に対する筋フィラメントの Ca^{2+} 感受性の役割)

心不全状態では末梢血管抵抗の増大が認められ、これによって後負荷の増大を来して心不全のさらなる増悪を招く。この末梢循環抵抗の増大については内因性の収縮物質の血中濃度亢進（アンジオテンシン II, バソプレッシン）、交感神経の亢進（ノルエピネフリン等）あるいは血管内皮由来弛緩因子の低下がその機序の一つと考えられているが、血管平滑筋の収縮性に異常があるか否かの検討はこれまで十分になされて来なかった。本研究は、ヒトの心不全モデルとして頻用される心筋症ハムスター(TO2)から摘出した大動脈輪状標本を用い、 α_1 受容体刺激薬（フェニレフリン）、アンジオテンシン II、KCl 溶液および Protein kinase C (PKC) 活性化物質（ホルボールエステル）による血管収縮反応を、対象標本のそれらと比較検討し、薬理的な解析を加えている。すなわち、上記血管輪状標本を 37℃ の生理的塩類液中に懸垂し、上記物質に対する等尺性張力変化を記録した。さらに上記の動物より摘出した上腸間膜動脈をスキンド処置し、血管平滑筋収縮に対する Ca^{2+} 感受性の測定も行っている。得られた結果については以下のように要約される。心筋症ハムスターの血管収縮反応は、フェニレフリン、アンジオテンシン II、細胞外 K^+ 濃度上昇による脱分極反応において正常ハムスターに比して著明に亢進していることを認めた。フェニレフリンに対する収縮増強についてはカルシウムチャネル阻害薬であるニフェジピン、筋小胞体内の Ca^{2+} を枯渇するライアノジン、同じく筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害薬であるシクロピアゾニックアシッドに影響されず、PKC 阻害物質であるスタウロスポリンおよびカルフォスチン C にて著明な抑制を受けたことを明らかにした。さらに PKC 活性化物質（ホルボールエステル）に対する収縮も心筋症ハムスターで亢進しており、この収縮反応については細胞外 Ca^{2+} の有無による影

響を受けなかった。これらの事実から、上記心筋症ハムスターの血管平滑筋収縮反応の亢進は PKC を介した細胞内シグナルの影響を強く受けていることを明らかにした。申請者はこの PKC を介するメカニズムをさらに詳細に検討するため、上記スキンドファイバーを用いて血管平滑筋収縮に対するカルシウム感受性の測定を行ったところ、心筋症ハムスターではもともと Ca^{2+} 感受性が正常ハムスターに比して亢進しており、PKC 活性薬のホルボールエステルは心筋症ハムスターに対してこの Ca^{2+} 感受性をさらに亢進させることを明らかにした。すなわち上記の実験結果から、心筋症ハムスターにおける血管平滑筋収縮については、受容体刺激による PKC の活性化を介して収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性増強効果が生じ、この反応が正常ハムスターに比してより強力であることが血管収縮反応増強のメカニズムのひとつであると考察している。そして心不全時における末梢血管抵抗増大のメカニズムとして上記 PKC を介する血管平滑筋収縮反応亢進が関与している可能性が考えられると結論している。学位論文の公開発表に際して副査の北畠教授から、心筋症ハムスターの血管平滑筋収縮に対する内皮由来弛緩反応の関与、副査の菅野教授からは、他の心不全モデル動物の血管においても PKC の活性化は認められるか否か、および本モデルの心不全発症前の血管収縮反応について、主査の安田教授からは血管張力測定と Ca^{2+} 感受性測定で血管種類を違えた理由および心不全ハムスターにおいて心臓体重比が減少する理由について、また、本モデル動物の血管収縮に対する遺伝的異常の可能性について、循環器内科佐久間博士からは、心筋症ハムスターにおける遺伝子異常についての他の文献的事実を例として挙げ、今回の実験結果とこの遺伝子異常の関与についておよび今回のモデル動物の血管内皮由来弛緩因子についての質問があったが、申請者は実験結果に基づいて、また文献的知識を駆使して誠実にかつ、概ね適切に回答し得た。

心不全の代償機序でありかつ増悪因子でもある末梢循環抵抗の機序を示唆した本研究は、現在においても極めて予後不良である心不全治療の今後の展開に重要な寄与をしようるものと評価される。

審査員一同は、申請者の豊富な学識に併せて、この研究が関連領域研究の進展に与える成果を評価し、申請者が博士（医学）を受けるに十分な資格を有するものと判定した。