

学位論文題名

Beneficial effect of myocardial angiogenesis
on cardiac remodeling process
by amlodipine and MCI-154

(アムロジピンと MCI-154は血管新生を促し
心筋再構築過程に対して有効である)

学位論文内容の要旨

I. 背景

拡張型心筋症 (DCM) の病因は不明である。その疾患モデルとして DCM モデルハムスター (Bio 53.58) がモデル動物として広く使用されてきた。このモデルの病因として、微小血管レベルでの血管攣縮による虚血や再灌流障害、細胞内 Ca^{2+} ハンドリングの異常、また最近ではジストロフィン関連糖タンパク複合体を構成する δ -サルコグリカンの遺伝子欠損が報告されている。組織学的に、壊死した心筋細胞が線維化・石灰化物質に置換され左室収縮能が低下し、最終的に心不全死するが、これまでカルシウム拮抗薬の有効性が報告されている。アムロジピンは長作用時間型の第三世代のカルシウム拮抗薬であり、大規模臨床試験である PRASE 研究で非虚血性的心筋症の予後を改善することが明らかにされ、また Bio 53.58 の心筋再構築を抑制して左室収縮能を改善することを我々は報告した (*J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32:248-259)。一方、新しい抗心不全薬の Ca^{2+} センシタイザーである MCI-154 は、心筋繊維の Ca^{2+} に対する感受性を増加させ、フォスフォジエステラーゼ-III を抑制することから血管拡張作用を有し、心筋酸素消費を増加することなく心機能を改善させる。臨床・実験レベルでその効果は報告されているが、長期投与による心筋再構築に対する効果は不明である。さらに、冠微小血管構築は心筋再構築に影響を与えると考えられるが、心筋症でのその役割についての報告は少ない。虚血心筋の場合、種々の増殖因子の発現が亢進し、血管新生が促進されるが、心筋症と血管新生との関連の報告はない。

II. 目的

本研究の目的は、アムロジピンと MCI-154 の DCM モデルハムスターの心筋再構築に対する効果を明らかにし、さらに微小血管構築、特に血管新生との関連を検討することである。

III. 方法

5 週齢の Bio 53.58 ハムスターを無作為に、非投与群 (C 群)、アムロジピン投与群 (A 群: 10mg/kg/day)、MCI-154 投与群 (M 群: 5mg/kg/day) に割り付け、15 週間観察した。20 週齢時に 7.5Mhz のプローブを用いて心エコー図検査を施行し、M モード法から左室拡張末期径 (LVDd)、左室収縮末期径 (LVDs) を計測して左室短径率 (%FS) を算出し、パルス・ドプラ法から等容拡張時間

(IRT) を計測した。その後人工呼吸管理下において、左室心尖部より 2.0F の micro-tip catheter manometer を挿入して、左室内圧から the rate of the maximum velocity of shortening of unloaded contractile element (V_{max}) と左室拡張時定数 (τ) 算出した。摘出した心臓は組織検討用とノーザンブロット解析用にわけ、組織学的には凍結切片を作成して、アルカリ・フوسفターゼとジペプチジル・ペプチダーゼ IV を用いた二重染色法により、静脈性毛細血管は赤色に、動脈性毛細血管は青色に染色し毛細血管数を検定した。一般に血管新生は静脈性毛細血管より起こると言われ、静脈性毛細血管の増加は血管新生の促進を意味すると考えられる。ノーザンブロット解析は従来法で行い、左室より RNA を抽出して、1 サンプル 20 μ g の RNA を使用した。プローブは血管内皮増殖因子 (VEGF) と、インターナル・コントロールとして GAPDH の cDNA を用いた。

IV. 結果

心室重量・体重比は各群で有意差はなかった。心エコー図では A 群、M 群ともに LVDD と ($C: 6.9 \pm 0.4$ mm, $A: 5.8 \pm 0.4$ mm, $M: 5.8 \pm 0.3$ mm)、LVDs が有意に減少し ($C: 5.3 \pm 0.4$ mm, $A: 4.0 \pm 0.3$ mm, $M: 3.9 \pm 0.3$ mm)、%FS が有意に増加したことより ($C: 23 \pm 3\%$, $A: 32 \pm 2\%$, $M: 32 \pm 3\%$)、左室収縮能の改善が示された。また、A、M 群とも拡張能の指標の一つである IRT が有意に減少した ($C: 29.2 \pm 4.5$ msec, $A: 23.6 \pm 1.1$ msec, $M: 21.3 \pm 2.1$ msec)。血行動態的検討では、A、M 群ともに左室拡張末期圧は有意に減少し ($C: 14 \pm 7$ mmHg, $A: 5 \pm 3$ mmHg, $M: 5 \pm 3$ mmHg)、左室収縮能の指標である V_{max} は有意に増加した ($C: 264 \pm 12$ /s, $A: 294 \pm 40$ /s, $M: 297 \pm 15$ /s)。左室拡張能の指標である τ は A 群でのみ減少した ($C: 9.4 \pm 4.6$, $A: 6.7 \pm 1.5$, $M: 8.8 \pm 1.9$)。二重染色法による毛細血管密度は A、M 群で有意に増加し ($C: 1268 \pm 183$ /mm², $A: 1842 \pm 168$ /mm², $M: 1853 \pm 288$ /mm²)、静脈性毛細血管の割合も A、M 群で有意に増加した ($U: 3.1 \pm 2.1\%$, $A: 12.1 \pm 4.6\%$, $M: 8.6 \pm 3.3\%$)。VEGF の mRNA の発現は、A、M 群ともに C 群に比較して有意に増加していた ($A: +30.1\%$, $M: +30.1\%$)。

V. 考案

DCM モデルハムスターにアムロジピン、MCI-154 を長期間投与すると、左室収縮能のみならず拡張能も改善した。さらに毛細血管密度と静脈性毛細血管が増加し、VEGF の mRNA の発現が亢進していることより、微小血管構築の改善とともに血管新生が促進されたことが示された。この機序として、両薬剤による前負荷・後負荷軽減、また直接的な心筋細胞減少抑制により、心筋細胞保護作用が働き、血管新生促進因子の発現が増加して微小血管構築が改善したと考えられた。心筋症と微小血管構築の関連を示した報告はこれが初めてであり、今後の心筋症治療の一つの戦略として、微小血管構築の改善を促すことも治療法の一つとして示唆された。

VI. 結語

アムロジピンと MCI-154 は微小血管構築を改善し、血管新生を促進し、DCM モデルハムスターの心筋再構築を抑制する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 菅 野 盛 夫

副 査 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 阿 部 和 厚

学 位 論 文 題 名

Beneficial effect of myocardial angiogenesis on cardiac remodeling process by amlodipine and MCI-154

(アムロジピンと MCI-154は血管新生を促し
心筋再構築過程に対して有効である)

ヒト拡張型心筋症 (DCM)の病因は未だ不明である。DCM 発症ハムスター (Bio 53.58)を疾患モデル動物に用いて研究が盛んに行われているものの、この疾患の病因と治療法が確立したとは言い難いのが現状である。このモデル動物では、微小血管レベルでの血管攣縮に起因する虚血と再灌流障害による心筋細胞壊死が引き金となって進行する心筋再構築が DCM との関連で論議されている。心筋が虚血に陥った際には、種々の増殖因子の発現が亢進して血管新生が促進されると報告されているが、心筋症と血管新生との関連、さらに、冠微小血管構築が進行する心筋再構築に与える影響についての報告は少ない。そこで、申請者は、DCM における微小血管構築、特に血管新生と心筋再構築との関連を明らかにするとともに、心筋繊維の Ca^{2+} 感受性の増加作用とフォスフォジエステラーゼ-III の抑制による血管拡張作用を有し、心筋酸素消費の増加を伴わずに心機能を改善させると報告されている Ca^{2+} センシタイザーである MCI-154 の長期投与による心筋再構築に対する効果を、既に臨床的にも、また、このモデル動物においても心筋再構築の制御に有用とされているアムロジピンを陽性対照薬物に用いて明らかにしようとした。方法は、5週齢の Bio 53.58 ハムスターを、非投与群、アムロジピン投与群(10mg/kg/day)、MCI-154 投与群 (5mg/kg/day)に割り付け、15週間観察した。20週齢時に心エコー図、血行動態測定で心機能を解析し、組織学的に二重染色法により毛細血管構築を検討し、またノーザンブロット解析で血管増殖因子の発現を観察した。アムロジピンと MCI-154 の投与により左室拡張期内径、左室内径短縮率、等容拡張時間が改善し、また左室拡張期圧と $V_{\max}$ は有意に改善し、左室拡張時定数はアムロジピン投与で減少した。すなわち両薬剤は左室収縮能と左室拡張能を改善することが示された。二重染色法による毛細血管密度と静脈性毛細血管の割合も両薬剤で増

加した。一般的に血管新生は毛細血管の静脈側から起こると言われ、申請者は細静脈性毛細血管の増加は血管新生を示していると推察している。血管内皮増殖因子(VEGF)の mRNA の発現も、両薬剤の投与で増加した。この機序として、両薬剤による前負荷・後負荷軽減、また直接的な心筋細胞減少抑制により、心筋細胞保護作用が働き、血管新生促進因子の発現が増加して微小血管構築が改善したと申請者は推論し、今後の心筋症治療の戦略として、微小血管構築の改善を促すことも治療法の一つとして示唆した。

論文発表に際し、副査の阿部教授からは、タイプIIIコラーゲンの mRNA 発現の変化について、心筋内毛細血管密度の測定法について、薬剤投与による血管密度が増加の意味について、毛細血管の分布の変化について、また、副査の北畠教授からは、心不全における微小血管構築の異常の過去の報告例について、心筋症モデル動物での結果の臨床応用への可能性について、ACE 阻害薬とアムロジピンと MCI-154 の作用機序の違いについて、アムロジピンと MCI-154 の共通する薬理作用について、アムロジピンの一酸化窒素の産生増加の機序について、また、主査の菅野教授から、心筋症モデル動物と臨床との関連性について、 δ -サルコグリカンの遺伝子欠損と冠血管攣縮の関連性について、MCI-154 と他の強心薬との違いについて、アムロジピンと MCI-154 の心筋細胞に対する作用について、MCI-154 の心筋保護作用について質問がなされた。申請者は研究結果に基づいて、あるいは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。

本論文は、綿密かつ精緻な組織形態学的解析を駆使して DCM モデルハムスターの心筋再構築と微小血管構築の関連を明らかにした最初の報告であることに加えて、臨床有用性が期待される薬物の作用を解析し、今後の心不全治療薬研究に示唆と方向性を与えた点が高く評価される。

審査員一同は、これらの研究成果と申請者の豊富な知識ならびに科学に対する識見などをあわせ、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。