

学 位 論 文 題 名

Chronic Effects of Enalapril and Amlodipine on Cardiac Remodeling in Cardiomyopathic Hamster Hearts

(心筋症ハムスターにおける心筋リモデリングに対する
エナラプリルとアムロジピンの慢性効果)

学位論文内容の要旨

〔緒言〕 心機能低下を代償する機序として神経体液性調節因子が過剰に動員されるが、一方でそれが心筋細胞死、心筋細胞肥大、心筋間質への線維性コラーゲンの蓄積を起こし、心不全の増悪因子となる。この組織形態学的変化は心筋リモデリングと呼ばれる。組織レニン・アンジオテンシン系の心筋リモデリングへの関与を示す幾つかの証拠がある。アンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACEI）による左室肥大退縮効果、心筋間質のコラーゲン退縮効果が報告され、アンジオテンシンIIが心臓における心筋細胞、その他の細胞の増殖因子として作用していると考えられる。アンジオテンシンIIは心筋細胞の肥大と細胞死を引き起こすと同時に線維芽細胞の増殖、コラーゲン産生促進効果がin vitroで報告されている。しかし、重症心不全におけるACEIの効果および作用機序に関しては十分に解明されていない。心筋小胞体（SR）輸送蛋白の異常が代償期から心不全への移行において重要なメカニズムになっている。不全心筋においては細胞内カルシウムサイクリングが障害され、カルシウム過負荷の状態にあり、持続性に心筋細胞死が生じている。カルシウム拮抗薬は異常なカルシウム動態を緩和する可能性が期待されるが、心不全への使用に関しては議論が多い。ベラパミル、ジルチアゼム、ニフェジピンはうっ血性心不全を増悪する。最近、臨床試験でアムロジピンによる非虚血性拡張型心筋症患者の生命予後延長効果が報告されたが、その機序は不明である。本研究では、拡張型心筋症における組織形態学的変化およびSR輸送蛋白の発現異常と心機能低下との関連について調べ、病態を明らかにする。さらにACEIであるエナラプリルとカルシウム拮抗薬であるアムロジピンを慢性投与し、組織形態学的変化へ与える影響を解析し、両薬剤の効果および作用機序について比較検討する。

〔方法〕 5週齢の拡張型心筋症モデルハムスター（BIO53.58；BIO）、正常対照ハムスター（F1b）に15週間、エナラプリル（20 mg/kg/日；E群）または、アムロジピン（10 mg/kg/日；A群）を経口投与し無治療群（C群）と比較した。経胸壁的に心エコ

一図検査を経時的に施行し左室内径短縮率(%FS)と左室拡張末期内径(LVDd)を測定し心機能を評価した。20週齢で心臓を摘出しホルマリン固定後、連続切片を作成しマッソン・ゴールドナー法で染色し、系統的サンプリング法により組織形態学的解析を行い、コラーゲン容積率を求めた。左室最大径切片をパス・ヘマトキシリン染色し直接鏡検下に心筋細胞核の数密度を求め心筋細胞数密度とした。アムロジピン投与群に関しては左室心筋を凍結し全RNAを抽出しリアノジン受容体(RyR)、ホスホランバン(PLN) cDNAを使用しノーザンブロット解析により各遺伝子発現を調べた。2群間の比較は対応のないt-testで、3群間の比較は分散分析で行った。2変数間の相関はPearsonの相関係数で評価した。P値5%以下を有意とした。

〔結果〕 BIO-C群において5週齢から20週齢にかけて進行性にLVDdは増加し、%FSは減少した。組織形態学的には20週齢BIOでは左室内腔の拡大と壁の菲薄化、左室壁に細胞浸潤を伴う心筋細胞壊死巣を認めた。び慢性コラーゲン増生、および巣状のコラーゲンおよび石灰化が混在する領域を認めた。残存心筋細胞は肥大化し、細胞間質へのコラーゲン沈着を認めた。F1b-C群では心機能、組織形態に有意な変化を認めなかった。5週齢BIO-C群の心機能、組織形態はF1b-C群と変わらず正常であった。BIOにおいて%FSの減少はE群($P<0.05$)およびA群($P<0.001$)で抑制され、コラーゲン容積率および石灰化容積率の増加および心筋細胞数密度の減少はE、A群で抑制された。心機能、組織形態ともにBIO-A群の方がBIO-E群よりも改善効果は強かった。心筋細胞数密度と%FSとの間には正の相関を認めた。RyR mRNAはF1b-C群に比べBIO-C群において減少しており

($P<0.01$)、BIO-C群とBIO-A群間およびF1b-C群とF1b-A群間で差はなかった。PLN mRNAは全ての群間で差はなかった。

〔考察〕 BIOは5週齢以後に心筋細胞死とともに心機能低下が進行する。5週齢ではBIOとF1b間に%FS、組織形態上差がなく、SR機能も正常であると推定される。心筋症の発端に関して文献上幾つかの機序が考えられる。BIOでは形質膜構成蛋白 δ サルコグリカンの遺伝的欠損が報告され、これがカルシウム透過性異常をきたし、カルシウム過負荷による心筋細胞壊死、微少血管スパズムによる心筋虚血による心筋細胞死を生じている可能性がある。心機能低下を代償する機序として神経体液性因子が過剰に動員され心筋リモデリングが進行し心不全を増悪する。20週齢でRyR mRNAは減少し、心筋細胞収縮能低下の原因となる。一方、PLN mRNAは減少しない。SRの Ca^{2+} ATPase (SERCA2a) mRNAは5週齢でF1bと比べ差がないが、20週齢で減少することを追加実験で確認しており、20週齢ではSERCA2aはPLNに比べ相対的に低下し、SERCA2aのカルシウム取込み機能はより強く障害されている可能性があり、心筋細胞の拡張能も低下する。心筋細胞数減少、間質のリモデリングおよび個々の心筋細胞の収縮拡張不全が総合して心機能低下を起こす。異常なSR機能は正常化しないが、両薬剤は神経体液性因子を過度に活性化せず、さらにエナラプリルはアンジオテンシンIIによるカルシウム動員作用を抑制し、アムロジピンは形質膜からの Ca^{2+} 流入を抑制し、カルシウム過負荷を緩和し心筋細胞壊死を軽減したと

考える。アムロジピンがエナラプリルより改善効果が大きかった理由として投与量、投与時期、投与期間の問題があり、心不全を起こす基礎疾患により薬剤に対する反応性が異なる可能性もある。

〔結論〕拡張型心筋症初期からのエナラプリルまたはアムロジピンの慢性投与により、異常なSR機能は正常化されないが、持続性に起きる心筋細胞死を抑制することは可能であり、心機能低下を緩和できる。

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 川 口 秀 明

学 位 論 文 題 名

Chronic Effects of Enalapril and Amlodipine on Cardiac Remodeling in Cardiomyopathic Hamster Hearts

(心筋症ハムスターにおける心筋リモデリングに対する
エナラプリルとアムロジピンの慢性効果)

心不全の治療方法については、低下した心機能を直接亢進する薬物の有用性を否定しないまでも、現在は、慢性に進行する心筋組織の組織形態学的変化を制御する手段により高い関心が寄せられている。不全心筋に認められる心筋細胞肥大、心筋細胞死や間質線維性コラーゲン蓄積などの特徴ある組織形態学的変化は心筋リモデリングと呼ばれ、これには低下した心機能を代償するために動員される様々な神経体液性調節因子の関与が指摘されている。特に、組織レニン・アンジオテンシン系が重要とされていて、アンジオテンシンⅡ産生を阻害するアンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACEI)の臨床有用性の薬理学的基盤となっている。一方、不全心筋では細胞内カルシウム動態異常による Ca^{2+} 過負荷が心筋細胞死の一因と考えられているが、これには、心筋細胞の Ca^{2+} 流入・排出に関わる電位依存性 Ca^{2+} チャンネルや Ca^{2+} ポンプ異常に加えて、心筋収縮・弛緩に関わる筋小胞体(SR)膜上にある Ca^{2+} 輸送蛋白の量的および質的变化の関与も指摘されている。 Ca^{2+} 流入を抑制するカルシウム拮抗薬は不全心筋細胞のカルシウム過負荷を軽減することが期待されるのであるが、その臨床的有効性については議論が分かれる所である。しかしながら、新世代のカルシウム拮抗薬であるアムロジピンが非虚血性拡張型心筋症患者の長期生命予後を延長する効果が最近示されている。このような事実を背景に、申請者は拡張型心筋症モデルハムスター(BIO53.58:以下BIO)を用いて、心機能低下と組織形態学的変化との関係を明らかにした上で、ACEIであるエナラプリル(E)およびアムロジピン(A)の15週間投与による心機能低下および組織形態学的変化に及ぼす影響を比較検討し、さらに、SR膜上にある Ca^{2+} 輸送蛋白(リアノジン受容体:RyR、ホスホランバン:PLN)メッセンジャーRNA量への影響を検討した。得られた結果は、1)BIOでは、5週令から20週令にかけて進行性に左心室拡張期内径の増大と左心室内径短縮率の減少を認め、2)組織形態学的には20週令で左心室内腔の拡大と菲

薄化、心筋細胞死巣、び慢性コラーゲン増生および巣状のコラーゲン沈着と石灰化、心筋細胞の肥大と心筋細胞数の減少を認め、3)E(20mg/kg/日)および A(10mg/kg/日)の長期投与は心機能低下の進行を抑制し、コラーゲン蓄積率および石灰化容積率の減少、心筋細胞肥大と心筋細胞密度減少を抑制すること、しかし、Eの効果はAより劣ること、4) BIOで見られる RyRmRNA 量の減少にはA投与は無影響であること、である。これらの結果に考察を加え、Aの作用機序、および、Eの効果はAより劣る機序を説明し、拡張型心筋症においてエナラプリルまたはアムロジピンの慢性投与により、持続性に起きる心筋細胞死を抑制し心機能低下を軽減できるが、低下した SR Ca^{2+} 輸送蛋白の遺伝子発現は回復しないと結論している。学位発表に際し、主査からの経過説明と紹介の後、申請者はスライドを用いながら約15分にわたって学位論文内容の発表を行った。その後、主査の菅野教授から、実験系の組み立てとその実際について、ことに投与量の設定について、また心筋不全における収縮弛緩性と細胞内 Ca^{2+} 動態との関係について、さらに使用した心筋症モデル動物の遺伝子欠損と病態との関連について、副査の北畠教授から、大規模臨床試験の成績と実験結果との関連について、また、心筋症モデル動物の病態とヒトの心不全との対応について、また、副査の川口教授からは他のカルシウム拮抗薬やアンジオテンシン II 拮抗薬の実験結果について、さらに、カテコラミンの病態への関与について、参加者の小山名誉教授からアポトーシスの関与の有無、リアノジン受容体減少の機序について、阿部和厚教授からは BIO の骨格筋、特に横隔膜の変化の有無、さらに、組織形態学的解析手法について、質問があったが、豊富な文献的知識と過去一連の研究成果に基づいて適切に解答した。

本論文は、綿密かつ精緻な組織形態学的解析手法を駆使して、拡張型心筋症モデルハムスターの心機能低下と心筋組織形態学的変化との関係を明確にした上で臨床有用性が期待される薬物の作用を解析し、アムロジピンの特徴を明らかにしたもので、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）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。