

学位論文題名

アンジオテンシン II は骨格筋酸化ストレスを増加させることにより運動能力を低下させる

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

レニン・アンジオテンシン系の活性化、特にアンジオテンシン II (Ang II) の増加は、心不全をはじめとする多くの心血管病において病態の形成・進展に深く関わっていることが示されている。また最近、心筋梗塞後の心不全モデルマウスや高用量の Ang II を持続投与したマウスにおいて骨格筋の萎縮が認められ、この骨格筋の萎縮には蛋白融解やアポトーシスに関わっていることが報告された。運動能力の低下は心不全の主要な病態であり、予後と密接に関係する因子である。運動能力低下には心機能より骨格筋の関与が大きいと考えられている。複数の臨床研究において、アンジオテンシン変換酵素阻害薬での治療により心不全患者の運動能力が改善したと報告されている。このような報告は、Ang II が直接骨格筋機能を障害し運動能力を制限する可能性を示唆するものである。しかしながら、これまでに心不全において骨格筋異常を引き起こす作用機序についてはよく分かっていない。

Ang II は NAD(P)H oxidase を介してスーパーオキシドアニオン (O_2^-) 産生を導く。また、心不全モデルマウスの骨格筋で O_2^- 産生が亢進することや、増加した O_2^- が骨格筋エネルギー代謝を障害することが報告されている。これらの結果から、運動能力低下のメカニズムに Ang II 増加を介した O_2^- 産生亢進が関与している可能性がある。しかしながら、Ang II が血圧上昇や骨格筋萎縮をきたさない低用量で直接的に骨格筋機能を障害させ運動能力を低下させるかどうかは明らかではない。

本研究の目的は、低用量の Ang II (50ng/kg/min) を慢性投与したマウスの運動能力は低下しているか、さらに骨格筋エネルギー代謝は障害されているか、を検討することである。さらに O_2^- の抑制によってこれらの障害が改善するかどうかを検討した。

【材料と方法】

12~16 週齢のオス C57BL/6J 野生型マウスを無作為に 2 群に分け、皮下に植え込んだ浸透圧ミニポンプを用い、Ang II (50ng/kg/min) あるいは生理食塩水 (Saline) を 7 日間持続投与した。それぞれの処置を行ったマウスをさらに無作為に 2 群に分け、ポンプでの投与と同時に NAD(P)H oxidase 活性化の抑制剤であるアポサイニン (Apocynin; Apo) 水溶液 (10mmol/L) あるいは水を経口投与した。本研究では、Saline 群、Saline+Apo 群、Ang II 群、Ang II+Apo 群の 4 群で実験を行った。n は各群とも 9 であった。

非観血的 tail-cuff システムを用いて、覚醒下で血圧と心拍数を測定し、麻酔下に経胸壁心エコーを行った。運動能力の評価には小動物用トレッドミルを用い、速度漸増負荷を行った。運動量の指標として、マウスの体重を考慮した垂直方向の仕事量 (= 体重 × 重力加速度 × 垂直方向の走行距離) を用い、運動中の呼気ガスを mixing chamber 法で分析し最大酸素摂取

量、最大二酸化炭素産生量を計測した。骨格筋ミトコンドリア呼吸能は、両下肢骨格筋よりミトコンドリアを単離した後、クラーク型酸素電極を用いて、NADH（グルタミン酸+リンゴ酸）を基質とした ADP 存在下（State 3）および ADP 非存在下（State 4）の酸素消費速度を計測した。同様に単離したミトコンドリアから電子伝達系複合体 III 活性を吸光度計で測定した。下肢骨格筋 O_2 産生量および NAD(P)H oxidase 活性は、ルシジェニン化学発光法により測定した。

【結果】

Saline 群と Ang II 群で、体重・左室重量・骨格筋重量・血圧・左室径・左室短縮率および左室壁厚に変化がなかった。トレッドミルテストでは、Saline 群と比較して Ang II 群で仕事量が 73%まで低下し、この時最大酸素摂取量の低下を伴っていた。また骨格筋ミトコンドリア呼吸能では、State 4 呼吸能が Ang II 群で増加したが、State 3 呼吸能は変化がなく、結果として呼吸調節能（State 3/State 4）は低下した。また、ミトコンドリア電子伝達系複合体 III 活性は Ang II 群で 72%まで低下した。さらに骨格筋での O_2 産生量および NAD(P)H oxidase 活性は、Saline 群と比べて Ang II 群でそれぞれ 2.5 倍、3.6 倍増加した。一方、アポサイニン投与により、Ang II による骨格筋 O_2 の過剰産生および NAD(P)H oxidase 活性が有意に抑制され、運動能力・骨格筋ミトコンドリア呼吸能が有意に改善した。

【考察】

今回の研究で最も重要な所見は、Ang II 投与によりマウスの運動能力が有意に低下したことであった。このことは最大酸素摂取量の低下を伴っていた。さらに Ang II 群より摘出した下肢骨格筋ミトコンドリアの State 4 呼吸能の増加および電子伝達系複合体 III 活性の低下を認めた。また Ang II 群における運動能力低下と骨格筋ミトコンドリア機能障害は NAD(P)H oxidase の活性化を阻害するアポサイニンの投与によって抑制された。この時 Ang II 群の骨格筋における O_2 産生および NAD(P)H oxidase 活性の増加は、アポサイニン投与によって抑制された。したがって、NAD(P)H oxidase 由来の O_2 がミトコンドリア機能障害を引き起こし、Ang II 群の運動能力低下に重要な役割を果たしていると考えられた。

本研究で用いた Ang II 濃度の 10 倍量の Ang II を用いた報告では、血圧上昇・体重減少および骨格筋萎縮が認められた。我々は Ang II の血行動態や全身に及ぼす影響を除外するために低用量の Ang II を用いて実験をした。実際に、本研究では血圧・体重・骨格筋重量は Saline 群と違いがなかった。また、組織学的にも骨格筋細胞径に変化がなかった。本研究で観察された Ang II 投与による運動能力低下には骨格筋萎縮の関与は除外できると考えられた。持続的な運動能力は運動筋のミトコンドリアにおける酸化的リン酸化に依存している。本研究において、骨格筋ミトコンドリアの State 4 呼吸能は Ang II 群で有意に増加し、さらに電子伝達系複合体 III 活性が低下した。State 4 の増加はエネルギー産生に関与しない酸素消費の増加を意味している。したがって、酸素が浪費され、酸素摂取量が同じでも骨格筋でのエネルギー産生が低下し、運動能力が低下すると考えられる。また、電子伝達系複合体 III 活性の低下は最大酸素摂取量が低下したことを支持するものである。Ang II 刺激による NAD(P)H oxidase の活性化を介した O_2 の過剰産生がミトコンドリア機能障害および運動能力低下に重要な役割を果たしていた。

【結論】

今回の研究において、Ang II マウスで運動能力が低下し、骨格筋ミトコンドリア機能が障害され、さらに骨格筋における NAD(P)H oxidase 由来の O_2 産生が重要な役割を果たしていることを明らかにした。心不全をはじめとする様々な心血管病において、Ang II の抑制および骨格筋 O_2 の制御は運動能力の改善に有効な治療法となり得ると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 筒 井 裕 之

副 査 教 授 川 口 秀 明

副 査 教 授 松 居 喜 郎

学 位 論 文 題 名

アンジオテンシン II は骨格筋酸化ストレスを 増加させることにより運動能力を低下させる

レニン・アンジオテンシン系の活性化、特にアンジオテンシン II (Ang II) の増加は、多くの心血管病において病態の形成・進展に深く関わっている。運動能力の低下は心不全の主要な病態であり、予後と密接に関係する因子である。運動能力低下には骨格筋の関与が大きいと考えられている。複数の臨床研究において、アンジオテンシン変換酵素阻害薬での治療により心不全患者の運動能力が改善したと報告されている。このような報告は、Ang II が直接骨格筋機能を障害し運動能力を制限する可能性を示唆するものである。

Ang II は NAD(P)H oxidase を介してスーパーオキシドアニオン (O_2^-) 産生を導く。また、心不全モデルマウスの骨格筋で O_2^- 産生が亢進することや、増加した O_2^- が骨格筋エネルギー代謝を障害することが報告されている。これらの結果から、運動能力低下のメカニズムに Ang II 増加を介した O_2^- 産生亢進が関与している可能性がある。しかしながら、Ang II が血圧上昇や骨格筋萎縮をきたさない低用量で直接的に骨格筋機能を障害させ運動能力を低下させるかどうかは明らかではない。

材料と方法：12～16 週齢のオス C57BL/6J マウスを無作為に 2 群に分け、皮下に植え込んだ浸透圧ミニポンプを用い、Ang II (50ng/kg/min) あるいは生理食塩水 (Saline) を 7 日間持続投与した。ポンプでの投与と同時に NAD(P)H oxidase 活性化の抑制剤であるアポサイニン (Apo) 水溶液あるいは水を飲水投与した。本研究では、Saline 群、Saline+Apo 群、Ang II 群、Ang II+Apo 群の 4 群で実験を行った。n は各群とも 9 であった。

覚醒下で血圧と心拍数を測定し、麻酔下に経胸壁心エコーを行った。運動能力の評価には小動物用トレッドミルを用い、速度漸増負荷を行った。運動量の指標として、マウスの体重を考慮した垂直方向の仕事量を用い、呼気ガス分析により最大酸素摂取量、最大二酸化炭素産生量を計測した。骨格筋ミトコンドリア呼吸能、ミトコンドリア複合体 III 活性、骨格筋 O_2^- 産生量および NAD(P)H oxidase 活性を測定した。

結果：Saline 群に比べ Ang II 群では、トレッドミルテストにおける仕事量および最大酸素摂取量の低下を認めた。また、Ang II 群では骨格筋ミトコンドリア呼吸能およびミトコンドリア電子

伝達系複合体 III 活性の低下を認めた。さらに骨格筋 O_2 産生量および NAD(P)H oxidase 活性は、Saline 群と比べて Ang II 群で増加した。一方、Apo 投与により、Ang II による骨格筋 O_2 の過剰産生および NAD(P)H oxidase 活性が有意に抑制され、運動能力・骨格筋ミトコンドリア呼吸能が有意に改善した。

考察：今回の研究で最も重要な所見は、Ang II 投与によりマウスの運動能力が有意に低下したことであった。このことは最大酸素摂取量の低下を伴っていた。さらに Ang II 群より摘出した下肢骨格筋ミトコンドリア呼吸能および電子伝達系複合体 III 活性の低下を認めた。また Ang II 群における運動能力低下と骨格筋ミトコンドリア機能障害は NAD(P)H oxidase の活性化を阻害する Apo の投与によって抑制された。この時 Ang II 群の骨格筋における O_2 産生および NAD(P)H oxidase 活性の増加は、Apo 投与によって抑制された。したがって、NAD(P)H oxidase 由来の O_2 がミトコンドリア機能障害を引き起こし、Ang II 群の運動能力低下に重要な役割を果たしていると考えられた。心不全をはじめとする様々な心血管病において、Ang II の抑制および骨格筋 O_2 の制御は運動能力の改善に有効な治療法となり得ると考えられた。

口頭発表に際し、川口教授から Ang II 慢性投与に対する骨格筋と心筋の反応の差異、運動能力低下における骨格筋血流の影響についての質問があった。次いで松居教授から今回の動物モデルと実際の心不全における差異、ARB 投与による運動能力改善の可能性についての質問があった。最後に主査から NAD(P)H oxidase 由来の O_2 がミトコンドリア機能を障害するメカニズムについての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果および文献的知識により適切な回答を行った。

この論文は、Ang II による NAD(P)H oxidase を介した O_2 産生が運動能力低下に関与することを示したものとして意義あるものと評価され、審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。