

Thesis

# モノクロタリン心不全モデルにおける レニン-アンジオテンシン系遮断の効果

埼玉医科大学大学院臨床医学研究系 循環器内科学専攻

(指導：西村 重敬 教授)

堀田 ゆりか

## Upregulated Neurohumoral Factors Play the Most Important in Left Ventricular Remodeling in Rats with Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension

Yurika Hotta (Department of Cardiology, Saitama Medical University, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Left ventricular remodeling might occur in patients with right ventricular hypertrophy and/or failure due to pulmonary hypertension, although LV is not under mechanical stress. We used rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension whether upregulated neurohumoral factors act to induce left ventricular remodeling and/or contribute to prognosis. Morphologic studies revealed a significant increase in left ventricle/body weight and right ventricle/body weight ratio in monocrotaline rats, indicating biventricular hypertrophy. RNase protection analysis clearly demonstrated upregulated mRNA of  $\beta$  myosin heavy chain, skeletal  $\alpha$ -actin, and brain type natriuretic peptide (BNP) and downregulated mRNA of  $\alpha$  myosin heavy chain in the free wall of left ventricle as well as in right ventricle, while the expressions of SERCA-2 and Na-Ca exchanger were not significantly changed. Plasma angiotensin II (ANG II), noradrenaline, and BNP levels were significantly increased. And also plasma BNP level was positively and significantly correlated with heart weight/body weight and plasma ANG II in monocrotaline rats. Kaplan Meier survival curve with Logrank analysis revealed that valsartan (AT1 blocker) significantly improved the prognosis of monocrotaline rats while carvedilol ( $\alpha$   $\beta$  blocker) did not significantly.

We concluded that upregulated neurohumoral factors not direct mechanical stress played the most important role in the pathogenesis of left ventricular hypertrophy and remodeling in right ventricular pressure overload model. ANG II appears to be the number one contributor among the various upregulated neurohumoral factors in our mode.

**Keywords:** Monocrotaline, Ventricular Remodeling, Angiotensin II, BNP, Valsartan, Carvedilol

## 緒言

心臓は生体において最も重要な臓器のひとつであり、自律運動により血液を全身に送り出している。全身の血液要求性に見合った働きをするために、心筋細胞の力学特性はカテコラミン、エンドセリンやアンジオテンシンIIなどの神経性因子や液性因子による制御を受けている。

また、同時に、レニン-アンジオテンシン(RA)系は  
医学博士 乙第1016号 平成18年3月24日(埼玉医科大学)

血圧や体液、電解質バランスの調節に関与する体循環調節系でもある。この系の主役は最終的な活性物質であるアンジオテンシンIIとその標的細胞の細胞膜上に存在するアンジオテンシン受容体である。近年の分子生物学の発展によりRA系の基本構成要素であるアンジオテニンノーゲン、レニン、アンジオテニン変換酵素(ACE)などの遺伝子構造が明らかにされてきている。

アンジオテニンIIは血管の収縮や腎臓でのナトリウム・体液貯留、副腎でのアルドステロン遊離に関与するが、血中のRA系が亢進していない病態において

もRA系阻害薬は降圧作用や臓器保護作用を示す。すなわち、血中RA系以外に局所の組織中にRA系が存在し、その局所でアンジオテンシンIIが産生されている。心臓局所RA系については多くの動物実験モデルを用いた検討が行われている。高血圧モデルラット、糖尿病モデルラット、心筋梗塞モデルラット、大動脈縮窄による圧負荷モデルなど様々な心疾患モデルで血中のRA系ではなく心臓RA系の亢進が病態に関与していることが明らかにされた。

最近の多くの大規模介入試験により、RA系の阻害薬であるACE阻害薬の心肥大や心臓リモデリングに対する改善効果、心不全に対する予後改善効果がすでに証明されている。さらに近年、アンジオテンシンIIに特異的な受容体のひとつであるアンジオテンシン1型受容体(AT1受容体)の拮抗薬としてアンジオテンシンII受容体遮断薬(ARB)が開発され、ACE阻害薬とは作用機序の異なるRA系の阻害薬としてその心保護作用が示された。

一方、心肥大は心不全の前段階であり、心臓が唯一呈しうる代償機構として、過剰の血行力学的負荷や様々な液性因子などのストレスが加わったときの対応の形態である。心肥大は高血圧症、弁膜症、心筋梗塞、肥大型心筋症、代謝異常など、多くの循環器疾患において認められ、心肥大を引き起こすこれらの要因が持続して存在すると最終的には心不全に至る。

心筋細胞は胎児期に活発に分裂増殖を続けるが、出生後速やかに分裂能を喪失し、以後成長とともにその容積を増大させて循環血液量の増加に適応する。これを生理的心肥大といい、スポーツ心などで認められる。生理的範囲を超えた過剰な物理的負荷ならびに液性因子による刺激により心筋細胞が肥大することを病的な心肥大(リモデリング)といい、最終的には心不全に導くとされる。病的な心肥大は心不全死や突然死の独立した危険因子であり、心疾患の予後を増悪させる重要な因子となっており、RA系と深く関わっている<sup>1)</sup>。

心筋肥大を誘発する因子は大きく分けて機械的因子と液性因子、遺伝的因子が考えられ、この3者は相互に関わり合いながら心筋肥大を導く。高血圧性心疾患や大動脈弁狭窄症などでみられる心肥大は、左室壁にかかる圧負荷という機械因子が誘因となっている。また、流血中に存在して細胞膜受容体刺激により細胞外シグナルを細胞内シグナルに変換する液性因子も重要な役割を果たしている。この液性因子にはインスリン様成長因子(IGF-I)、線維芽細胞成長因子(FGF)などの細胞増殖因子、インターロイキン(IL)-6、カルディオトロフィン-1(CT-1)などのサイトカイン、エンドセリン(ET)-1、アンジオテンシンII、ノルアドレナリンなどがあり、内因性心血管作動物質の一次伝達物質としての関与が種々の心肥大動物モデルで実験的に示されている。

生体において血圧を上昇させない低濃度のカテコラミンが心肥大を引き起こし、培養心筋細胞ではノルエピネフリンの直接刺激により肥大が生じることが知られている。Simpsonらはラット新生仔心筋細胞をノルエピネフリンで刺激すると細胞へのアミノ酸の取り込みが増加することを示し、さらにβ遮断薬propranololによってもこのアミノ酸の取り込みは変化せず、α1遮断薬による前処置で初めてアミノ酸の取り込みが抑制されたことからノルエピネフリンによる心肥大形成はα1受容体を介した反応であり、その情報伝達系はα1受容体遮断によるホスホリパーゼCの活性化→イノシトールリン酸の代謝促進→ジアシルグリセロールによるCキナーゼの活性化という過程を経ると報告している<sup>2)</sup>。また、アンジオテンシンIIが交感神経末端や副腎髄質からカテコラミンの分泌を促し、二次的に心肥大作用を示すことも以前から指摘されているが、心筋細胞膜にもアンジオテンシンII受容体が存在することが証明され、*in vitro*の培養心筋細胞ではアンジオテンシンII刺激によりRNA含量の増加や蛋白合成が促進することから、アンジオテンシンIIの直接作用により心肥大が生じ得ることが判明している<sup>3)</sup>。

今回心不全ラットを作成するのに用いたモノクロタリン(MCT)は、*Crotalaria spectabilis*の種子から抽出されるpyrrolizidine alkaloidである。1961年にLalichらがラットにこの種子を経口投与し、肺動脈炎が起こることを報告したのがMCT誘発性肺高血圧モデルの始まりである<sup>4)</sup>。その後MCTの単回皮下注射で肺動脈炎が発生すること、ラットは用量依存性に、また雌より雄の方に病変ができやすいことなどが明らかとなった。この肺高血圧発症機序を検討することが原発性肺高血圧症の病態解明にもつながるものと注目されている<sup>5)</sup>。

MCTは肝のチトクロームP-450によって脱水素化されてmonocrotaline pyrrole (MCTP)となり、このMCTPが肺血管に対する炎症を惹起する。病理組織学的にはMCT投与早期に肺動脈内皮細胞の障害と血管周囲を中心とした炎症細胞の浸潤がみられ、その後中膜の肥厚とtropoelastin, type I collagenなどの細胞外マトリクスの増生、平滑筋細胞の増加を呈することが分かっている。また、変化した血管内皮では透過性が亢進しており、内皮細胞由来血管収縮因子であるET、トロンボキサンA2や内皮細胞由来血管弛緩因子である一酸化窒素、プロスタサイクリンなど生理活性物質の関与も変化していることが示唆される。

MCT誘発性肺高血圧モデルにおける肺血管リモデリングの機序として、MCTPの直接血管作用や二次的なマクロファージなどの細胞接着から始まるシグナル伝達、さらに各種キナーゼ活性からの遺伝子発現が血管作動物質や増殖因子を導引し、肺高血圧が起こると考えられている。

MCT誘発性肺高血圧動物モデルは真の原発性肺高血圧のモデルではないとの指摘もあるが、肺血管リモデリングの進展過程には血管作動物質や細胞接着などのさまざまな要因が重なり合っており、広く使用されているモデルである。

今回我々が用いたMCT誘発性肺高血圧モデルの他に、数多くの実験的心不全動物モデルが作成され、そのモデルによって様々な分析がなされている。心不全や心筋症などのモデルには、圧負荷、容量負荷、心筋虚血、心筋障害誘発物質、栄養欠乏、そしてその他の心筋症モデルとして慢性心房・心室ペーシング、DCショック繰り返しなどがある<sup>611)</sup>。

現在最も広く使用されているモデルは犬右心室高頻度ペーシングモデルとラット心筋梗塞モデルである。犬右室高頻度ペーシングモデルは開胸手術などの侵襲を生じることなく安定して高率に慢性心不全を作成できる点に特徴がある。低心拍出量、Frank-Starlingメカニズムの破綻による両心室拡大を特徴とする。また、ヒト心不全と同様に神経体液性因子、 $\beta$ アドレナリン細胞内伝達系の障害、末梢血管収縮が認められることから、このモデルはヒト慢性心不全の病態とかなり近いことが想像される。この高頻度ペーシング心不全モデルを使った基礎研究の成果により慢性心不全の病態生理の理解が深まりつつある。近年、ANP拮抗薬が開発され、この心不全モデルに投与したところ、血液中レニン、アルドステロン、ノルエピネフリンを増加させ、尿量及び尿中ナトリウム排泄を減少させたとの報告がある<sup>12)</sup>。このことより心不全においてANPはRA系、カテコラミン系を抑制し、ナトリウム貯留、尿量保持と反対の方向に働いていることが示唆され、ANPは慢性心不全の病態進展に対して代償的に作用することが明らかになった。

一方、臨床との関連及び比較的簡単に作成できることから小動物の心筋梗塞による心不全モデルも広く用いられているが、開胸が必要であること、作成初期における高い死亡率のため、軽度の心不全にとどまることが多い。しかし、臨床でみられる慢性心不全のうち、ほぼ半数は陳旧性心筋梗塞などの虚血性心不全であることを考えると、重要な慢性心不全モデルであると考えられる。

この他に、冠血管にマイクロスフェアを反復投与して生じさせる犬心不全モデルも程度の異なった心不全を作成できる点において優れた実験モデルであるが、9週にわたって麻酔下に5~6回の冠微小血栓の投与を必要とするなど作成テクニックが要求され、作成までに時間がかかることなどが難点である。しかし、この実験モデルを用いて $\beta$ 受容体遮断薬やACE阻害薬が左室拡大、左室駆出率低下の進行を遅らせ、digoxinは駆出率の低下を防ぎ、左室拡大に影響を与えないことが明らかとなっている<sup>13)</sup>ことなど、心不全

治療薬剤の特徴が明らかになっていることは評価されるところと考えられる。

MCTは肺高血圧症のモデル作成のために現在広く使用されているが、今回我々はこのモノクロタリン誘発性肺高血圧ラットモデルを用いて、右室のみならず左室への影響、右室・左室それぞれの遺伝子発現の差、液性因子や薬剤との関係などについて検討した。本研究の目的は、直接的な左室への血行力学的負荷によらない神経体液性因子を介しての左室リモデリングが生じるとするという仮説の検証にある。

## 方法

### 動物実験の認定

今回の実験についてはUS National Institutes of Healthにより認証されたGuide for the Care and Use of Laboratory Animalsに準じて行い、埼玉医科大学動物実験認定委員会(認定番号000017)の認定のもとに行った。

### 心不全ラットの作成

MCT(和光純薬、日本)150 mgを2.5 ml 1N HCl溶液に溶解し、1N NaOH溶液で滴定し中性としたものを用いた。

6週齢雄性Wistar rat(体重128~138 g, n=103)にMCT60 mg/kg body weight腹腔内注射し、MCT投与6週後に体重を測定し、その後心臓を取り出した。心臓は、まず右心室を切り出し、左心室は中隔部分を除いて左室自由壁のみとし、それぞれの重量を測定した。さらに、肺、肝臓の重量も測定した(sham群 n=31, MCT群 n=34)。また、これとは別にMCT投与6週後に血圧、心拍数を測定した。

### 血液生化学的測定法

ラットの心臓を取り出す際に下大静脈から採血を行った(sham群 n=38, MCT群 n=43)。採血した血液は氷冷したethylenediaminetetraacetic acid(以下EDTAと略す)2Na入り採血管(5 ml)に注入し、4°C、3000回転で12分間遠心分離後、上清を採取し、測定まで-20°Cで凍結保存し、BNP(brain natriuretic peptide)、アンジオテンシンII、アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミンを測定した。

### 経胸壁心臓超音波検査

Sham群およびMCT群に心臓超音波検査を施行した。検査は東京大学循環器内科研究室で施行し、そのためラットを東京大学へ搬送した。搬送数はSham群 n=3, MCT群 n=15であったが、MCT群で検査施行できたのは最終的にn=3であった。

清潔操作麻酔下(xylazine 5 mg/kg, ketamine 100 mg/kg iv.)にHP Image Point(Hewlett Packard Co.)を使用し、プローブは12 MHzトランスデューサーを用いた。記録中の実験条件を一致させるため、Mモードエコーに対しては心拍数を250-300 bpmの範囲に保って測定した。

## ノーザンブロッティング

摘出された心臓の断片をTRIZol (GIBCO) に入れ、ホモジナイザーで細かくし、解説書に従って右心室、左心室よりmRNAを抽出した。筋小胞体Ca<sup>2+</sup>ポンプ (sarcoplasmic reticulum: SERCA2),  $\alpha$ - $\beta$ -myosin heavy chain (MHC), ANP, BNP, skeletal  $\alpha$ -actinに対するプローブでRNase protection assay (RPA IIIキット, Ambion) を使用した。リボプローブに対するすべてのプラスミドは制限酵素によってantisense strandの3'末端にリニライズされる。フラグメントはSERCA2の333-bp, MHCの300-bp, ANPの210-bp, BNPの180-bp,  $\alpha$ -actinの195-bp, GAPDH (Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) の134-bpを用いた。mRNAはMaxiscriptキット (Ambion) を用いた放射性同位元素 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTPで標識し、5  $\mu$ gずつ分注した。RNA-probe 混合体を一晚42°Cに保温した後、37°Cで30分間RNase A/T1 (1:25, RPA II, Ambion) においた。フラグメントは6%ポリアクリルアミドゲルに分離した。コントロールとしてGAPDHを用い、Instant-Imager Electronic Autoradiography System (Paceard Instrument) を用いて定量化した。また、それぞれのmRNAのシグナルをGAPDHで標準化し、グラフ化した (n=4)。

## 薬剤投与方法

アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) である valsartan 4.2 g を 0.1N NaOH 200 ml で溶解し、これに 0.1N HCl を加えて pH 6.8~7.2 とし、水で全量 3500 ml とした。また、 $\alpha$ - $\beta$  遮断薬 carvedilol 1.4 g を DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 35 cc で溶解し、それに 10% 酢酸 14 cc を加えて pH 6.8~7.2 とし、水で全量 3500 ml とした。それぞれを飲水用の水としてラットに投与し、また、これらの薬剤を溶解しない水を投与したラット

をコントロールとした (valsartan 群 n=15, carvedilol 群 n=15, MCT control 群 n=15)。

## データ処理

データの解析および図作成にはソフトウェア (Microcal Origin) を使用した。データは平均値±標準誤差で表示し、群間比較を行い、統計上 P<0.05 を有意差ありとした。

## 結果

### 1. 遺伝子発現の検討

#### (1) 心臓・他臓器重量

薬物処理をしないラット (sham 群) と MCT60 mg/kg 投与したラット (MCT 群) で体重、心臓、肺、肝臓重量を測定し、比較した。その結果、体重は sham 群では 287.67 ± 3.81 g (n=31), MCT 群では 164.22 ± 4.64 g (n=34) であり、sham 群よりも MCT 群で有意に軽くなっていた (P<0.001)。また、肺重量は sham 群 0.98 ± 0.01 g, MCT 群 1.14 ± 0.04 g (P<0.01) であり、肝臓重量は sham 群 7.29 ± 0.36, MCT 群 10.68 ± 0.18 g (P<0.001) であり、肺、肝臓ともに MCT 群で有意に重くなっていた。肺/体重比および肝臓/体重比は MCT 群で有意に大きくなっていた (P<0.001) (Table 1)。

心臓に関しては、心臓全体の重量は sham 群 0.82 ± 0.0095 g, MCT 群 0.78 ± 0.02 g で、両群間で有意差は認められなかった。左心室と右心室に分けてそれぞれの重量を測定したところ、左室 sham 群 0.41 ± 0.081 g, MCT 群 0.33 ± 0.0093 g (P<0.001) で、右室 sham 群 0.12 ± 0.0044 g, MCT 群 0.18 ± 0.092 g (P<0.001) であり、体重あたりの重量は、右室、左室とも MCT 群で有意に増加した (Table 1)。

#### (2) 体液性因子による評価

体液性因子との関係を調べるため、下大静脈より採

**Table 1.** Alterations in Heart, Lung, and Liver 6 weeks after MCT Injection

	sham(n=31)	MCT(n=34)	
Body Weight(g)	287.67 ± 3.81	164.22 ± 4.64	<0.001
Lung(g)	0.98 ± 0.01	1.14 ± 0.04	<0.01
Liver(g)	10.68 ± 0.18	7.29 ± 0.36	<0.001
Lung/BW	0.0034 ± 0.00007	0.0071 ± 0.0004	<0.001
Liver/BW	0.037 ± 0.0006	0.044 ± 0.0013	<0.001
Heart weight(g)	0.82 ± 0.0095	0.78 ± 0.020	n.s.
LV(g)	0.41 ± 0.081	0.33 ± 0.0093	<0.001
RV(g)	0.12 ± 0.0044	0.18 ± 0.092	<0.001
LV/BW	0.0014 ± 0.00004	0.002 ± 0.00006	<0.05
RV/BW	0.0004 ± 0.00006	0.001 ± 0.0001	<0.05

体重は sham 群よりも MCT 群で有意に軽くなっていた (P<0.001)。また、肺、肝臓は MCT 群で有意に重くなっており、肺/体重比および肝臓/体重比も MCT 群で有意に大きくなっていた (P<0.001)。

RV: right ventricular free wall, LV: left ventricular free wall

BW: Body weight

血を行い血中体液性因子を調べた。

その結果、BNPはsham群  $53.44 \pm 3.36$  pg/ml, MCT群  $184.24 \pm 17.24$  pg/mlであり、MCT群で有意に高く ( $P < 0.01$ , sham  $n=38$ , MCT  $n=43$ )、アンジオテンシンIIはsham群  $144.08 \pm 29.48$  pg/ml, MCT群  $642.05 \pm 275.76$  pg/ml ( $P < 0.05$ )、ノルアドレナリンはsham群  $757.42 \pm 136.44$ , MCT群  $2488.48 \pm 328.36$  ( $P < 0.001$ )であり、MCT群で有意に上昇していた。アドレナリン、ドーパミンでは有意差は認められなかった (Fig. 1)。

### (3) 左心室における遺伝子発現

心臓超音波検査では、sham群と比べてMCT群では左室の中隔のみ厚くなっており、左室肥大の有無を遺伝子解析から検討した。Skeletal  $\alpha$ -actinは右室、左室ともにMCT群で発現増加が認められた (Fig. 2a, b, c)。 $\alpha$ MHC、 $\beta$ MHCは、右室、左室ともにMCT群で $\beta$ MHC発現の増加が認められ、 $\alpha/\beta$ MHC比はMCT群で有意に低値であった。BNP、ANPは右室、左室ともにMCT群で発現増加が認められた。

## 2. 臨床的指標の評価

### (1) 血行動態の差異について

左室への圧負荷の有無を調べるために、ラットの血圧を測定した。その結果、血圧ではsham群  $127 \pm 4$  mmHg, MCT control群  $126 \pm 9$  mmHg, valsartan

群  $120 \pm 8$  mmHg, carvedilol群  $116 \pm 5$  mmHgであり有意差は認められなかったが、carvedilol群ではMCT control群と比較して血圧が低下している傾向が認められた (Table 3)。

心拍数では、sham群  $467 \pm 16$ , MCT control群  $402 \pm 9$ , valsartan群  $447 \pm 12$ , carvedilol群  $330 \pm 15$ であり、MCT control群と比較してvalsartan群で心拍数増加が認められた (Table 3)。

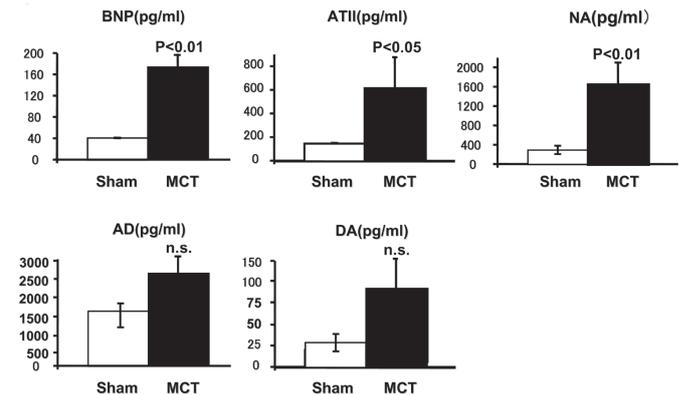


Fig. 1. BNP, アンジオテンシンII, ノルアドレナリンはMCT群で有意に上昇していたが、アドレナリン、ドーパミンはsham, MCT両群間で有意差は認められなかった。

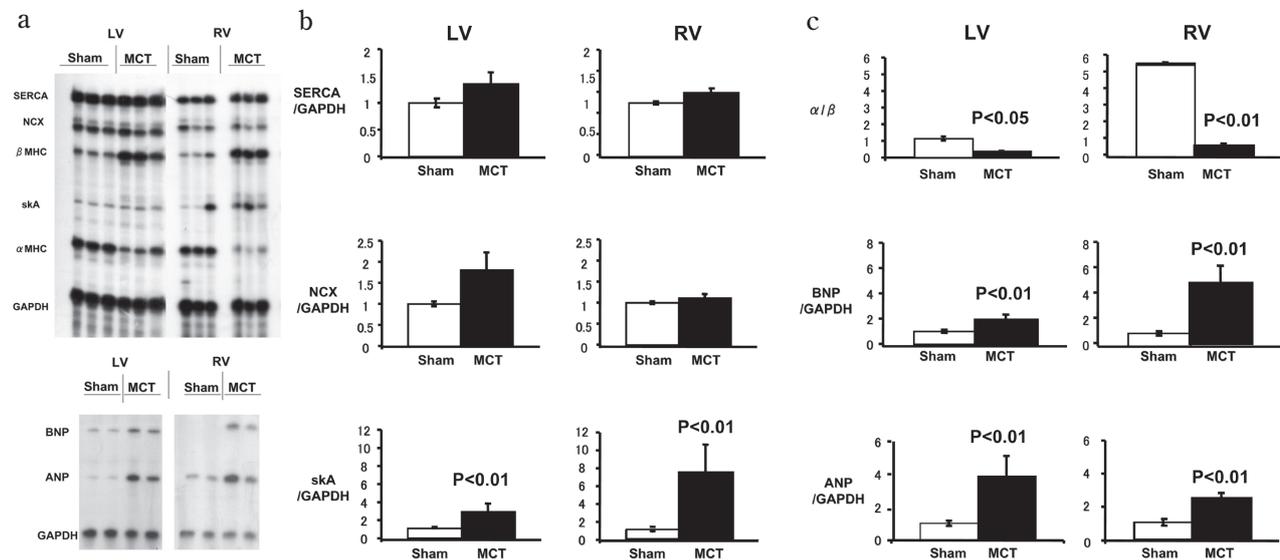


Fig. 2. a) SERCA, NCXの発現は両群間で有意差は認められなかったが、Skeletal  $\alpha$ -actinは右室、左室ともにMCT群で発現増加が認められた。 $\alpha$ MHC、 $\beta$ MHCに関しては、右室、左室ともにMCT群で $\beta$ MHC発現の増加が認められ、 $\alpha/\beta$ MHC比はMCT群で有意に低くなっていた。BNP、ANPは右室、左室ともにMCT群で発現増加が認められた。GAPDHをコントロールとした。SERCA: sarcoplasmic reticulum CaATPase, NCX: Na/Ca exchanger, MHC: myosin heavy chain, ANP: atrial natriuretic peptide, BNP: brain natriuretic peptide, GAPDH: Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. b) SERCA, NCXではsham群、MCT群で右室、左室ともに有意差は認められなかったが、Skeletal  $\alpha$ -actinは右室、左室ともにMCT群で発現増加が認められた。GAPDHをコントロールとした。c)  $\alpha$ MHC、 $\beta$ MHCに関しては、右室、左室ともにMCT群で $\beta$ MHC発現の増加が認められ、 $\alpha/\beta$ MHC比はMCT群で有意に低くなっていた。BNP、ANPは右室、左室ともにMCT群で発現増加が認められた。GAPDHをコントロールとした。

## (2) 心臓超音波検査による肥大評価

経胸壁心臓超音波検査を施行し中隔および後壁径を測定した。心室中隔壁厚は sham 群  $0.167 \pm 0.0073$  cm, MCT 群  $0.195 \pm 0.0049$  cm ( $n=3$ ,  $P<0.05$ ) であり, MCT 群の中隔で有意な肥厚を認めた。後壁は sham 群  $0.178 \pm 0.018$  cm, MCT 群  $0.178 \pm 0.0098$  cm であり, 有意差は認められなかった (Table 2)。

## 3. 薬剤投与による延命効果について

次に体液性因子の中でアンジオテンシン II との関連に着目し, アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 Valsartan 及び  $\beta$  遮断薬 Carvedilol をラットの飲料水に溶解し, 投与した。投与 6 週間後, それぞれの群の生存率を比較したところ, sham 群に比べて Valsartan 群, Carvedilol 群で生存期間が延長した (Fig. 3)。

## 考 察

MCT 誘発性肺高血圧症ラットを用いて, 右室及び左室肥大, 胎児型遺伝子の発現, 体液性因子や, アンジオテンシン受容体拮抗薬との関係を調べた。MCT による肺高血圧症発症のメカニズムについては現在のと

ころ完全には解明されていないが, MCT 投与による血管内皮細胞傷害の後, 末梢血管の muscularization, 筋性動脈の中膜肥厚といった血管構造のリモデリングが惹起され, 徐々に肺動脈圧が上昇し, エラスターゼやサイトカインなどが関与して肺高血圧をきたすと考えられている。

今までの研究でも, MCT を用いた肺高血圧症ラットにおいて, 右室重量の増加や, 肺重量の増加, 肺/体重比が増大することが示されている<sup>14,16)</sup>。

今回我々は, MCT を投与し右心不全モデルを作成したが, 右室だけでなく左室重量の増加, 体重あたりの右室, 左室重量の増加を認めたことより, MCT 投与により右室肥大だけでなく左室肥大もきたしている可能性が考えられた。

以前の実験では, MCT 投与による肺高血圧によって右室重量が増加していることは示されているが, 左室重量には変化が認められなかった, との報告がある<sup>14,17)</sup>。

今回の我々の実験では, 右室重量だけでなく, 左室重量も増加していた。MCT 投与により肺高血圧をきた

Table 2. Echocardiographic analysis

	Sham(n=3)	MCT(n=3)	
LVDd(mm)	0.667 ± 0.007	0.477 ± 0.071	n.s.
LVDs(mm)	0.342 ± 0.010	0.198 ± 0.03	<0.01
IVS(mm)	0.167 ± 0.0073	0.195 ± 0.0049	<0.05
PWT(mm)	0.178 ± 0.01762	0.178 ± 0.00981	n.s.

経胸壁心臓超音波検査では MCT 群で中隔が有意に厚くなっていたが, 後壁では有意差は認められなかった。LVDd: left ventricular diastolic dimension, LVDs: left ventricular systolic dimension, IVS: inter-ventricular septal wall thickness, PWT: left ventricular posterior wall thickness

Table 3. Blood pressure and Heart rate 4 weeks after MCT injection (=2 weeks after starting drugs)

Drugs	Sham (n=6)		MCT	
		control(n=6)	Val (n=5)	Car (n=5)
Systolic BP (mmHg)	127 ± 4	126 ± 9	120 ± 8	116 ± 5
HR (/min)	467 ± 16	402 ± 9	447 ± 12	330 ± 15
		*	**	*
			*	

\*p < 0.01, \*\* p < 0.05

血圧では有意差は認められなかったが, carvedilol 投与群では MCT control 群と比較して血圧低下傾向が認められた。

HR では, MCT control 群と比較して valsartan 投与群で HR 増加が認められた。

Val: valsartan, Car: carvedilol

し、右室肥大を呈することは以前の実験により認められている<sup>18)</sup>が、今回の結果より左室肥大をきたしていることも示唆された。

また、以前の報告では低酸素性肺高血圧により右室だけでなく左室の肥大も引き起こすとの報告もある<sup>19)</sup>。これには低酸素状態におけるAT1, AT2受容体発現が関与していると考えられている。

アンジオテンシン受容体は大きく1型(AT1), 2型(AT2), 4型(AT4)の3種類に分けられる。このうち心臓においてはAT1とAT2が重要な役割を果たしていると考えられる。正常な状態においてAT1は心筋細胞、心線維芽細胞に存在し、AT2はおもに心筋細胞に存在しているが、肥大心においてはAT2の発現が亢進していることが報告されている<sup>20)</sup>。

ラット心筋細胞は、進展刺激により細胞容積を増大するという形態学的変化に加えて、c-fos, c-jun, c-mycなどのimmediate early geneや $\beta$ 型ミオシン重鎖、骨格筋型 $\alpha$ -アクチンなどの胎児型遺伝子、さらにANP, BNPなどの利尿ペプチドの遺伝子発現を亢進させるが、これらの遺伝子発現の亢進にはプロテインキナーゼC (PKC), Raf-1, mitogen-activated protein kinase (MAPKs)などのリン酸化酵素の活性化が必要である。

心肥大時には、心筋細胞表面にはAT1とAT2の発現がともに亢進している。アンジオテンシンIIは心筋細胞膜に存在するGq蛋白と共役しているAT1を刺激することにより細胞膜にあるホスホリパーゼCが活性化し、それによりイノシトールリン酸代謝物であるジアシルグリセロールの産生亢進がおこり、プロテインキナーゼCを活性化する。プロテインキナーゼCの下流にはMAPキナーゼをはじめとする細胞増殖に重要な細胞内情報伝達系が存在し、それらが次々にリン酸化

されることにより、心筋細胞では肥大が誘発されると考えられている。

さらに、これらのリン酸化酵素の活性化にアンジオテンシンIIやエンドセリン-1などの血管作動物質が関与していることも明らかになっている。また、神経因子による $\alpha$ 受容体,  $\beta$ 受容体を介したシグナルや、カルジトロフィン1 (CT-1)などのサイトカインによるgp130を介したシグナルも心筋肥大に関与していることが明らかになっている。

心筋肥大は血行力学的負荷の増大に対する適応現象の一つであり、その形成過程には二つの側面がある。まず第一は蛋白合成の亢進により心筋細胞のサイズが大きくなる、という量的側面であり、第二は心筋遺伝子の発現変化により心筋細胞の生化学的、生理学的特性が変化するという質的側面である。心筋細胞はこのような量・質両面の変化により力学的負荷の増大に適応しているものと考えられている。

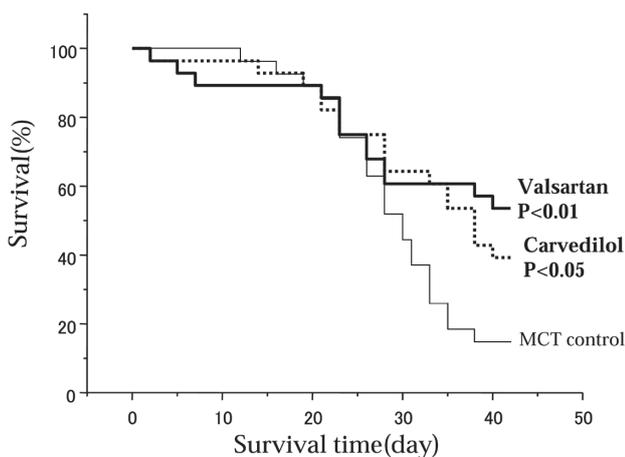
近年、循環器領域の研究における分子生物学的手法の導入により、心肥大の質的側面を明らかにする試みがなされた<sup>21)</sup>。その際に注目されたのが、いわゆる“fetal reprogramming”, すなわち生後発現が抑制されていた、おもに胎生期に発現する遺伝子(胎児型遺伝子)が心肥大に伴って再び発現してくる現象である。

ラットなどの小動物において、圧負荷により心室筋MHCアイソフォームの変換が起こることは、蛋白レベルではかねてからよく知られており、これはCa<sup>2+</sup>やアクチン活性化ATPase活性、心筋収縮速度、エネルギー変換効率の変化を伴っており、機械的負荷の増大に対する適応現象であると考えられていた<sup>22)</sup>。その後、mRNAレベルでの発現の変化が検討された結果、成ラット心室筋においては圧負荷による心筋肥大に伴い、胎児期の主たるアイソフォームである $\beta$ -MHCの発現レベルが再上昇した<sup>23)</sup>。

しかし、このようなMHCアイソフォームの変換はヒトなど大動物の心室筋ではそもそも正常でも $\beta$ -MHC主体であるため認められにくい。それに対し、心房筋では成人でも $\alpha$ -MHC主体であり、圧負荷により $\beta$ -MHCへの変換が起こることが観察されている<sup>24)</sup>。このように、 $\beta$ -MHCは $\alpha$ -MHCとの機能的差異が明らかことや、歴史的経緯より、肥大心に再発現する胎児型遺伝子の代表例とされている。

また、その後の研究でも肥大心において $\beta$ -MHCの発現が優位となっていることが示されており<sup>25)</sup>、今回の我々の実験においても $\beta$ -MHC発現の増加が認められた。以上のことより、MCT誘発性肺高血圧モデルにおいて、右室肥大だけでなく左室肥大もきたしていることが示唆された。

肥大の原因としては、右室に関しては圧負荷が考えられたが、左室に関してはsham群よりもMCT群で血圧が低い傾向が認められたことから圧負荷が影響した



**Fig. 3.** アンジオテンシンII受容体拮抗薬 Valsartan 及び $\beta$ 遮断薬 Carvedilol をラットの飲料水に溶解し、投与した(それぞれの群でn=15). 投与6週間後、sham群と比較し Valsartan群 (P<0.01), Carvedilol群 (P<0.05)で生存期間が延長した。

とは考えにくく、液性因子の関与が考えられた。

液性因子の中では、BNP、アンジオテンシンⅡ、ノルアドレナリンがMCT群で有意に上昇しており、MCT誘発性肺高血圧にこれらの体液性因子が関与していることが考えられた。以前の研究でも、血漿アンジオテンシンⅡ濃度がMCTで有意に高いとの報告<sup>18)</sup>や血漿ノルアドレナリンの濃度はMCTで有意に高いとの報告があり<sup>26)</sup>、今回の実験においても同様の結果が得られた。

MCT誘発性肺高血圧モデルは、MCTを腹腔内投与するのみで右心不全モデルを作成でき、簡便な心不全モデルであり、再現性も高い。今回の実験結果から、左室に対する直接的な負荷のみならず神経液性因子が重要な役割を演じていることを明らかにした。体液性因子を抑制するアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬で延命効果が認められたことは、肺高血圧症に対する薬物治療の可能性も示唆すると考えられる。

## 結 論

MCT誘発性肺高血圧モデルを用いて右室・左室への影響、遺伝子発現の差、液性因子や薬剤との関係について調べた。

肺高血圧であるにもかかわらず、右室重量だけでなく左室重量も増加しており、胎児型遺伝子の発現も増強していたことから、遺伝子発現からも左室肥大を生じていることが示された。

また、血圧は心不全モデルラットの方が低い傾向であり、左室肥大に関しては圧負荷よりもアンジオテンシンⅡ、ノルアドレナリンなどの液性因子の影響が考えられ、神経液性因子を介して左室肥大をきたすことが示された。アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬Valsartan投与により生存期間が延長したことから、左室に対する直接的な負荷だけでなく神経液性因子も重要な役割をしていることが再確認された。

## 謝 辞

本研究の遂行および本論文作成に際し、終始御指導御鞭撻を賜りました埼玉医科大学循環器内科西村重敬教授、同河本修身助教授、埼玉医科大学非常勤講師・東京大学循環器内科八尾厚史助手の御厚意に深く感謝いたします。

この内容の一部は第9回アメリカ心不全学会(平成17年9月)で発表した。

## 文 献

- 1) 八尾厚史, 高橋利之, 永井良三. 心筋肥大. CURRENT THERAPY 2000;18:993-7.
- 2) Simpson PC. Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth. Rev Mol Cell Biochem 1991;104:35.
- 3) Zou Y. Protein Kinase C, but not tyrosine kinases, Src or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes. J Biol Chem 1996;271:33592.
- 4) Lalich JJ, Merkow L. Pulmonary arteritis produced in rats by feeding *Crotalaria spectabilis*. Lab Invest 1961;10:774-80.
- 5) Yamaguchi K. Temporal alterations of endothelial-vasodilator functions in lung injury induced by monocrotaline. Resp Physiol 1997;107:47-58.
- 6) Beth A. Bailey, Steven R. Houser. Calcium transients in feline left ventricular myocytes with hypertrophy Induced by slow progressive pressure overload. J Mol Cell Cardiol 1992;24:365-73.
- 7) Urabe Y, Mann DL, Kent RL, Nakano K, Tomanek RJ, Carabello BA, et al. Cellular and ventricular contractile dysfunction in experimental canine mitral regurgitation. Circ Res 1992;70:131-47.
- 8) Joseph M, Capasso, Peng Li, Piero Anversa. Cytosolic calcium transients in myocytes isolated from rats with ischemic heart failure. Am J Physiol 1993;34:H1953-64.
- 9) Hendrick DA, Smith AC, Kratz JM, Crawford FA, Spinale FG. The pig as a model of tachycardia and dilated cardiomyopathy. Lab Ani Science 1990;40:495-501.
- 10) Volders PG, Sipido KR, Vos MA, Kulcsar A, Verduyn SC, Wellens HJ. Cellular basis of biventricular hypertrophy and arrhythmogenesis in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsade de pointes. Circulation 1998;98:1136-47.
- 11) O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF, Kaab S, Tunin R, Marban E. Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure. Circ Res 1999;84:562-70.
- 12) Wada A, Tsutamoto T, Matsuda Y, Kinoshita M. Cardiorenal and neurohumoral effects of endogenous atrial natriuretic peptide in dogs with severe congestive heart failure using a specific antagonist for guanylate cyclase-coupled receptors. Circulation 1994;84:2232.
- 13) Sabbah HN, Shimoyama H, Kono T. Effects of long term monotherapy with enalapril, metoprolol and digoxin on the progression of left ventricular dysfunction and dilation in dogs with reduced ejection fraction. Circulation 1994;89:2852.
- 14) Kogler H, Hartmann O, Leineweber K, Van PN, Schott P, Brodde O, et al. Mechanical load-dependent

- regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ Res* 2003;93:230-37.
- 15) Korstjens IJ, Rouws CH, Van WJ, Van DZ, STIENEN GJ. Myocardial force development and structural changes associated with monocrotaline induced cardiac hypertrophy and heart failure. *Musc Res Cell Motil* 2002;23:93-102.
- 16) Brunner F, Wolkart G, Haleen S. Defective intracellular calcium handling in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy: protective effect of long-term endothelin-A receptor blockade with 2-benzo[1,3]dioxol-5-yl-3-benzyl-4-(4-methoxyphenyl)-4-oxobut-2-enoate-sodium (PD155080). *JPET* 2002;300:442-9.
- 17) Yoshihara F, Nishikimi T, Horio T, Yutani C, Takishita S, Matsuo H, et al. Chronic infusion of adrenomedullin reduces pulmonary hypertension and lessens right ventricular hypertrophy in rats administered monocrotaline. *Euro Pharmacol* 1998; 355:33-9.
- 18) Brunner F. Cardiac endothelin and big endothelin in right-heart hypertrophy due to monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat. *Cardiovasc Res* 1999;44:197-206.
- 19) Adamy C, Oloviero P, Eddahibi S, Rappaport L, Samuel J, Teiger E, et al. Cardiac modulations of ANG II receptor expression in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 2002;283: H733-40.
- 20) Lopez J, et al. Distribution and function of cardiac angiotensin AT1-and AT2-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol* 1994;267: H844.
- 21) Nadal-Ginard B. Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *J Clin Invest* 1989;84:1693.
- 22) Lompre AM. Myosin isozyme redistribution in chronic heart overload. *Nature* 1979;282:105.
- 23) Izumo S. Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoforms during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest* 1987;79:970.
- 24) Kurabayashi M. Molecular cloning and characterization of human cardiac  $\alpha$ - and  $\beta$ -form myosin heavy chain complementary DNA clones. Regulation of expression during development and pressure overload in human atrium. *J Clin Invest* 1988;82:524.
- 25) Yoshihiko K, Takashi M, Takahiko S, Koichi Y, Nobuyuki M, Katsutoshi G et al. Enhancement of glycolysis in cardiomyocytes elevates endothelin-I expression through the transcriptional factor hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Clinical Science*. 2002; 103(suppl 48):2105-45.
- 26) Leineweber K, Brandt K, Wludyka B, Beilfub A, Ponicke K, Heinroth-Hoffmann I, et al. Ventricular hypertrophy plus neurohumoral activation is necessary to alter the cardiac  $\beta$ -adrenoceptor system in experimental heart failure. *Circ Res* 2002; 91:1056-62.