

論文の内容の要旨

論文題目 Protective Effects of Endogenous Adrenomedullin on Cardiac Hypertrophy and Fibrosis.

和訳 アドレノメデュリンの心肥大、線維化に対する保護作用

指導教官 永井良三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 鈕 培

研究の背景

血管作動物質には血管を弛緩させる、また、血管を収縮させる一連の因子が存在する。Adrenomedullin (AM) は血管作動物質として血管を弛緩させる因子の一つで、血管内皮細胞、平滑筋細胞から産生される。AM は 1993 年にヒト褐色細胞腫より発見された強力な降圧作用を有する生理活性ペプチドであり、循環生理に深く関与していると考えられている。AM は副腎髄質以外に、心血管系組織を含め広く全身の組織で生合成されている。広汎な組織分布から推測されるように、AM の作用は多彩であり、血管拡張作用以外にもナトリウム利尿、アルドステロン分泌抑制、細胞増殖制御、エンドセリン分泌抑制、飲水活動抑制、気管支拡張などの多彩な薬理作用を持つことが報告されている。

本態性高血圧症、心不全、腎不全などの循環器疾患においては、その重症度に比例して血中の AM 濃度が上昇することが報告されている。しかし血中 AM 濃度の上昇が、病態を修飾する原因となっているのか、あるいは代償する方向に

働いているのなのかは議論のあるところである。

心肥大は種々の循環器疾患において認められ、心不全、虚血性心疾患などにおいて一つの独立した危険因子である。心筋細胞は、圧負荷などの機械的ストレスに加え、Angiotensin II (Ang II)をはじめとした液体因子により、肥大を誘発される。本研究では、AM ノックアウト (AMKO) マウスを用いて、大動脈縮窄モデル、Ang II 持続投与モデルを作成し、内因性の AM が心肥大、心線維化に及ぼす影響を検討した。

対象と方法

1. AM のエクソン 1 から 4 をつぶすターゲティングベクターを用いて作成した AMKO マウスを使用した。
2. AMKO マウスのホモ接合体は、胎生 14 日で致死のため、ヘテロ接合体を用いて腹部大動脈の縮窄モデル、AngII 持続投与モデル (3.2 mg/kg/日) を作成した。
3. 心エコーによる左室壁厚と心機能評価 (左心室中隔、後壁、左心室拡張期径、収縮期径) を行い、心肥大 (心体重比、心筋細胞サイズ)、心線維化 (冠動脈周囲線維化部分の面積/血管内腔の面積比、Proliferation cell nuclear antigen の発現) を病理学的に評価した。
4. 更に心肥大関連遺伝子の発現 (アンジオテンシノーゲン、アンジオテンシン変換酵素遺伝子、Transforming growth factor (TGF) β 、I 型コラーゲン遺伝子、c-fos、SERCA2) を検討した。
5. 次に AMKO マウス及び野生型 (WT) マウス新生児より心筋細胞、心線維芽細胞を初代培養して、AngII 投与時の心筋細胞のタンパク合成能、Extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化、線維芽細胞の増殖能などを比較した。
6. 最後に AngII 刺激した培養心筋細胞への AM 投与、あるいは Protein kinase C (PKC) 阻害剤、Protein kinase A (PKA) 阻害剤投与の影響を検討した。

結果

1. アドレノメデュリンの心肥大、線維化抑制作用

ヘテロ接合体では、野生型と比較して心臓、腎臓などの発現量の多い臓器で AM のレベルは半分まで低下していることを確認した。大動脈の縮窄モデルは手術してから 4 週間で心肥大を検討した。AngII を mini ポンプで 2 週間持続投与して心肥大を構成した。圧負荷モデル及び、AngII を持続投与したモデルにおいては、WT マウス、AMKO マウスとも心体重比の増加と左室壁肥厚が認められたが、WT マウスに比較して AMKO マウスでより顕著であった。心エコーで圧負荷後共に左心室中隔、後壁の肥厚が認められたが、AMKO マウスで有意に厚くなっていた。

更に大動脈縮窄モデルにおける術後の死亡率は AMKO マウスで高値であった。特に術後一週間目の死亡率は AMKO マウスで顕著であった (AMKO マウス, 38% vs. WT マウス, 18%; $p < 0.05$)。AMKO マウスでは心臓での Brain natriuretic peptide (BNP) の発現の亢進を認め、術直後の急性期、慢性期とも血中 BNP 濃度が高いことから、心機能に問題があると考えられた。実際心エコーによる検討では、AMKO マウスにおいて心機能の低下が確認された。更に病理所見の検討でも、負荷後の心筋細胞のサイズの増大は AMKO マウスでより顕著であった。

次に、心線維化の検討を進めたところ、AMKO マウスでは、双方のモデルにおいて心臓の間質の線維化及び冠動脈周囲の線維化の増強が認められた。冠動脈周囲線維化部分の面積/血管内腔の面積比 (PVF/VA) の検討では、AMKO マウスで有意な上昇が確認された。増殖細胞のマーカーである Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞の数は、AMKO マウスでより増加していた。

AMKO マウスは WT マウスに比較して、負荷前に既に血圧上昇を認めるが、ヒドララジン投与を行って血圧を低下させた AMKO マウスにおいても、WT に比べて臓器障害が強く認められた。このため、AMKO マウスにおける臓器障害は、血圧上昇による二次的なものではなく、AM の発現量低下そのものによると考えられた。

次に、心臓において各遺伝子の発現を検討した結果、圧負荷前には AMKO マウスと WT マウスの間で有意な差を認めなかったが、圧負荷後の心臓においては、心肥大関連遺伝子としてアンジオテンシノーゲン、アンジオテンシン変換酵素遺伝子の発現亢進、また線維化関連遺伝子として Transforming growth factor (TGF) β 、I 型コラーゲン遺伝子の発現亢進を AMKO マウスの方でより強く認めた。術後 2 時間の急性期の心臓では、初期反応遺伝子である c-fos の発現亢進も AMKO マウスでより著明であった。逆にカルシウムハンドリングに関わる SERCA2 の発現は AMKO マウスで低下していた。

心筋細胞を初代培養し、AngII 刺激を行ったところ、タンパク合成能、Atrial

natriuretic peptide (ANP)の発現亢進が認められたが、その変化は AMKO マウスで顕著であった。更に心線維芽細胞の培養系での検討でも、心線維芽細胞の増殖能、I型コラーゲンの発現などは AMKO マウスでより亢進していた。

2. アドレノメデュリンの心肥大抑制作用のメカニズム

AMKO マウスの新生児の心筋細胞を初代培養し、これを用いて AM の心肥大抑制作用のメカニズムを検討した。AMKO マウスでは WT に比較して、圧負荷後急性期の心臓及び AngII 刺激した心筋細胞共に、ERK の活性化亢進が認められた。一方、PKC の阻害剤である H7 を投与したところ、ERK の活性化は AMKO マウスも WT マウスも同じ程度まで抑制された。つまり、AMKO マウス においては、PKC pathway を介した ERK 活性化が亢進していると考えられた。

更に、ERK の活性化について PKA pathway の関与を、ラット培養心筋細胞を用いて検討した。AngII 刺激により上昇した ERK 活性化は、recombinant AM を添加することにより抑制された。この AM の ERK 活性化抑制作用は PKA 阻害剤である H89 を添加する事により減弱した。以上から、AM の心肥大抑制作用は、PKC pathway の抑制に加えて、PKA pathway の亢進を介した ERK 活性化抑制によると考えられた。

考 察

1. AM ノックアウトマウスを用いて、Ang II 持続投与モデル、大動脈縮窄モデルを作成し、内因性の AM が心肥大、心繊維化に対して保護的に働いていることを示した。
2. PKA 及び PKC pathway を介した ERK 活性化抑制が、AM の心肥大抑制作用の一つと考えられた。

結 語

1. 本研究から、AM は血管拡張作用に加えて、臓器保護作用を有する生理活性物質であることが明らかとなった。
2. AM は高血圧に伴う臓器障害に対して、治療薬の候補となる可能性が考えられる。