

## 論文の内容の要旨

Angiotensin II 投与高血圧ラットに対し glutamine、geranylgeranylacetone 及び quercetin を投与した時の心臓の iNOS 発現量の抑制と心臓の線維化や心筋細胞の肥大の抑制との関係

指導教員 永井良三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入(進)学

医学博士課程

内科学専攻

松崎 弦

### 序文

今回 angiotensin II (Ang II) 投与の高血圧モデルラットを用い、Ang II 投与ラットの心筋障害が非必須アミノ酸の 1 つでストレス反応に対する細胞耐性を増強する glutamine (Gln)、抗炎症作用の物質として考えられる geranylgeranylacetone (GGA)、そして抗酸化物質の一つである quercetin (Que) を Ang II とそれぞれ共投与しその障害が抑制されるかどうかの検討を行った。

以前の私達の研究で、Ang II 投与群では glomerular filtration rate (GFR) の減少と尿蛋白量の増加を認めたが NE 投与群では対照群と有意差を認めず、また Ang II と非特異的毛

血管拡張薬である hydralazine の共投与群では Ang II 群と有意差はなかった。しかし Ang II と AT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である losartan との共投与群では Ang II 群と比較し GFR、尿蛋白共に有意に改善していた。これらの結果から Ang II 高血圧モデルラットの腎臓障害は高血圧という単に物理的な障害によるものよりは Ang II 経路に関係する物質により引き起こされる障害である可能性が考えられた。

更に Ang II 投与ラットに鉄キレート剤である deferoxamine (DFO) や free radical scavenger である T-0970 を投与すると Ang II により発現亢進した心臓の TGF- $\beta$  の mRNA や collagen type I や type III の mRNA を抑制し、また Ang II 投与ラットの腎臓でも DFO や T-0970 を投与すると Ang II により発現亢進した腎臓の TGF- $\beta$  の mRNA や collagen type I や type IV の mRNA を抑制することを示した。更に同様に Ang II 投与ラットの肝臓においても DFO や losartan 投与により TGF- $\beta$  の mRNA や collagen type I の mRNA を抑制、またラットの大動脈では NE 高血圧投与群よりも同程度の昇圧作用を示す Ang II 高血圧投与群の方が酸化ストレスマーカーの 1 つである 4-hydroxynonenal (NHE)-修飾蛋白を有意に増加させまた更に昇圧効果を示さない低濃度の Ang II 濃度群でも対照群と比較し有意に NHE 修飾蛋白を増加させた。一方 Ang II+DFO 群の NHE 修飾蛋白や MCP-1 が Ang II 群より有意に抑制されることを示した。以上これらの実験結果から以下のことが考察出来る。

- 1) Ang II 投与群の心臓、腎臓、大動脈や肝臓等の各臓器において、対照群と比べ有意に線維化やそれに伴う臓器障害が起き、その Ang II の障害は単に昇圧作用による物理的障害よりはむしろ Ang II 関連経路により引き起こされると考えられる。

- 2) Ang IIにより酸化ストレスが亢進し、また free radical scavenger である T-0970 や AT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である losartan 投与により酸化ストレスが抑制されることから、Ang II が引き起こす臓器障害の主な原因として酸化ストレス作用が考えられる。
- 3) 以上 1) と 2) から、Ang II による臓器障害は Ang II 経路や酸化ストレス関連経路の何れかを阻害することにより抑制され、またその障害抑制は降圧効果とは関係なく起こるものと考えられる。

以上から、Ang II による炎症作用や酸化ストレス反応を降圧作用とは別の機序で抑制することが可能ではないかと考えた。そこで Ang II 投与高血圧モデルラットの心臓を用い、Gln、GGA や Que を Ang II と共投与し、heat shock protein の一つである Hsp70 や iNOS をマーカーとしてそれらの発現の増減と心臓の線維化や心筋細胞の肥大の程度を基に Gln、GGA や Que の抗炎症作用や抗酸化作用を評価する実験を行った。

## 方法

### 動物モデル

Ang II 投与の高血圧ラットは、体重 280-320 g のオスの Sprague-Dawley ラットを用い皮下に osmotic minipump を植え込み、Val<sup>5</sup>-Ang II (0.7 mg/kg/day) を 1、3、5、7 日間 (Day 1, 3, 5, 7) 投与した。収縮期血圧は tail-cuff plethysmography で測定した。

### Gln、GGA 及び Que の投与

Gln (0.75 g/kg/day)、GGA (400 mg/kg/day) や Que (4 mg/kg/day) は、Ang II 投与に

加え 1、3、5、7 日間経口投与した。

#### ラット心臓の摘出及び蛋白精製

まず各薬剤を投与したラットにジエチルエーテルを用い吸入麻酔後心臓を摘出しホモジエナイズした。遠心分離後抽出蛋白は原液（1 倍希釈）と 5 倍希釈液を $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### Western Blot 分析

精製蛋白 5 倍希釈液を用いた蛋白濃度測定を行い各サンプルの蛋白量を  $20\ \mu\text{g}$  になるように投与量を調節した。蛋白成分を電気泳動で分離し、一次抗体は Hsp70 (1,000 倍希釈), inducible nitric oxide synthase (iNOS) antibody (1,000 倍希釈) を用いた。その後 2 次抗体浸漬後バンドを可視化した。

#### 病理研究

ラットの心臓をホルマリン固定後パラフィンで包埋し厚さ  $3\ \mu\text{m}$  に切り、スライドガラス上で Masson trichrome 染色を行った。線維化部位の pixel 数と組織全体の pixel 数の比で線維化率を計算し、% コントロール比としてグラフ化した。

#### 心筋細胞の肥大測定

心臓のパラフィン切片に対し hematoxylin-eosin 染色を行い、光学顕微鏡（倍率 400 倍）で各サンプルの右室と左室それぞれの 10 視野を選び各視野 5 つの心筋細胞（合計 50 個）を選択し短径を測定しその平均値を各視野の値とした。

#### 免疫組織学的染色

対照群、Ang II 群、Ang II +Gln 群、Ang II +GGA 群の心臓両室の Hsp70 (200 倍希釈) の免疫染色を行った。

## 統計分析

データは、mean±SEM で表示し%コントロール比としてグラフ化し ANOVA で解析した。

P<0.05 を有意差があるとみなした。

## 結果

### 1. 血圧と体重

Ang II 群の血圧は対照群と比較し Day 1 以降有意に増加し、Gln、GGA や Que 共投与群の血圧は、何れのどの投与期間においても Ang II 群と有意な差を認めなかった。

また心臓摘出時の体重は、実験開始時と比較し Day 3, 5, 7 の Ang II 群や各共投与群で有意に減少した。また Gln 群や GGA 群においても投与後 5, 7 日目で、各同日の対照群と比較しその増加は有意に抑制されていた。

### 2. Hsp70 の所見

Ang II 投与群の Hsp70 発現は、対照群と比べ Day 1 から Day 5 まで時間的に相関し有意に増加したが、Day 7 では急速に低下し同日の対照群と有意差のない値まで低下した。Gln 共投与群では、Day 3 で対照群と比べ有意に増加し、その後低下し Day 5 以後対照群と有意差のない値まで低下した。GGA 共投与群では、Day 3 から Day 5 まで対照群と比べ有意に増加したが、同様に Day 7 で対照群と有意差のない値まで低下した。Que 共投与群では、対照群と比べ Day 3, 7 で有意に低下しており、特に Day 7 では対照群の値の約 6 割 (65±13%) まで低下していた。

### 3. 線維化の所見

Day 3 以降の Ang II 群の心臓の線維化は両室とも対照群と比較し有意に増加、Day 5 以降の Gln や GGA 共投与群の線維化は両室とも Ang II 群と比較し有意に抑制されていた。

### 4. iNOS の所見

Ang II 群 (Day 5) の iNOS 発現は、対照群と比較し有意に増加した。同日の Gln、GGA や Que 共投与群の何れの iNOS 発現とも、Ang II 群と比較し有意に抑制されていた。

### 5. 心筋細胞径

Ang II 群 (Day 7) においては、心筋細胞径は両室共に対照群と比較し有意に増大し、各共投与群の何れも Ang II 群に比べ両室共に心筋細胞の肥大が有意に抑制されていた。

### 6. 免疫組織学的染色

Ang II 群、Gln 群や GGA 群では心臓の血管周辺部位が染色され、また Ang II 群の心臓の血管周囲の染色部位の方が、血管内皮細胞より濃染していた。Gln や GGA 共投与群の血管周囲と同程度に血管内皮細胞も染色された。

## 考察

今回の目的は Ang II 投与高血圧モデルラットの心臓を用い、抗炎症作用物質である Gln や GGA、そして抗酸化物質である Que を Ang II と共投与し、Hsp70 や iNOS の発現の増減と心臓の線維化や心筋細胞の肥大の程度を基に Gln、GGA や Que の抗炎症作用や抗酸化作用を評価することである。今回の実験では Gln、GGA や Que 各共投与により Ang II による心筋障害に対しても何らかの保護作用が働き、またその保護作用が iNOS の発現抑制と何らかの関

係があることが示唆された。

## 結論

Ang II 投与高血圧ラットに対し Gln、GGA 及び Que 各共投与時のラット心臓の iNOS や Hsp70 の発現量と心臓の線維化や心筋細胞肥大の抑制との関係を研究した。Ang II 群で心臓の線維化や心筋細胞肥大が促進し iNOS や Hsp70 の発現も亢進したが、各共投与群ではその線維化や心筋細胞肥大は抑制されまた同時に iNOS 発現も抑制された。Hsp70 発現については Gln や GGA の共投与群では Ang II 群と有意差はなく、一方 Que 共投与群では Ang II 群に比べ有意に抑制された。また血圧は各共投与群と Ang II 群との有意差は認めなかった。これらの結果から Gln、GGA 及び Que 共投与による心臓の線維化や心筋細胞肥大の抑制は降圧効果と無関係に起こり、またその抑制は iNOS 発現の抑制と関連していることが示唆された。