圧負荷肥大心における拡張機能障害の 分子生物学的機序

Molecular Mechanism of Diastolic Dysfunction in Pressure Overload Cardiac Hypertrophy

東京大学第三内科¹ 朝日生命成人病研究所²

塩島 一朗¹・小室 一成¹・家城 恵子²

永井 良三¹・矢崎 義雄¹

The 3rd Department of Internal Medicine, University of Tokyo.¹ The
Institute for Adult Disease, Asahi Life Foundation² Ichiro Shiojima¹,
Issei Komuro¹, Keiko Ieki², Ryozyo Nagai¹, and Yoshio Yazaki¹

1. はじめに

高血圧のような慢性の圧負荷が加わると、心筋は肥大を形成し心機能を代償する事が知られており、また、圧負荷により形成された肥大心においては、収縮機能低下が出現する以前の負荷後比較的早い時期から拡張機能障害が出現することが明らかになっている¹⁾。

一般に拡張機能障害は、心筋の Relaxation の遅延と心室の Stiffness の増大の2つの要素にわけて考えることができるが、心筋の Relaxation の遅延に関しては筋小胞体の機能低下による拡張期の細胞内 Ca 濃度の上昇が、また、心室の Stiffness の増大

に関しては心肥大にともなう心筋間質の線維化が、それぞれその原因として重要であると考えられる。そこで、圧負荷肥大心における拡張機能障害の機序として、①筋小胞体の機能低下、②心筋間質の線維化の2点を取りあげ、これらについて分子生物学的手法を用いて解析を行なった。

2. 筋小胞体の機能低下

筋小胞体は収縮期に Ca を放出して細胞内 Ca 濃度を上げ、拡張期には逆にこれを取り込んで細胞内 Ca 濃度を下げる機能を持っており、拡張期に細胞内の Ca を筋小胞体へ取り込む Ca ポンプ蛋白は Ca-ATPase と呼ばれている。我々はラット心筋の

図1 圧負荷肥大心における Ca-ATPase 遺伝子の発見

図2 圧負荷心における筋小胞体重量、Ca-ATPase 蛋白量、および筋小胞体への Ca 取り込み量

cDNA library から筋小胞体 Ca-ATPase の cDNA をクローニングし、これを probe に用いて Ca-ATPase の遺伝子発現動態を検討した²⁾。

まず、Rat の腹部大動脈狭窄モデルを用いて、圧負荷肥大心における Ca-ATPase の遺伝子発現を検討した(図 1)。図に示すように Ca-ATPase の mRNA level は負荷後の時間経過とともに徐々に減少していくことが明らかになった。

次に、筋小胞体の乾燥重量、Ca-ATPase の蛋白量、筋小胞体による Ca の取り込み量を測定し、肥大心におけるこれらの変化を検討した(図 2)。図に示すように、筋小胞体の重量は圧負荷によっても有意な変化は認められないが、Ca-ATPase の蛋白量および筋小胞体への Ca 取り込み量は圧負荷後 4 週間で有意に減少しており、筋小胞体の機能低下を反映しているものと考えられた。

以上の結果から、圧負荷肥大心においては負荷後の時間経過とともに Ca-ATPase の発現量が減少し、筋小胞体の機能低下が出現してくることが明らかになった。このような筋小胞体の機能低下が、拡張期における細胞内 Ca 濃度の上昇をきたし、心筋の Relaxation を遅延させることにより、拡張機能障害の原因の 1 つとなっているものと考えられた。

3. 心筋間質の線維化

高血圧性心疾患、特発性心筋症、虚血性心疾患など種々の心疾患において、心筋間質におけるコラーゲン線維の増生が報告されている。このような間質

における異常なコラーゲンの増生は、心室の Stiffness 増大をきたし、拡張機能障害の 1 つの重要な要因となっていると考えられる³⁾。そこでラットの圧負荷肥大心のモデルを用いて、心筋間質線維化の機序について検討を行なった。

図 3 は圧負荷後 4 週間の心筋組織の Azan 染色を示したものである。左側のコントロールにおいても血管壁周囲を中心にある程度のコラーゲン線維が認められるが、右側の圧負荷心では血管壁周囲のコラーゲン線維が増加し、さらに血管から周囲の間質へむかうコラーゲン線維の増生が認められる。左心室重量およびコラーゲン線維の重量を比較してみると、圧負荷心では体重当りの左心室重量はコントロールの約 1.5 倍に増加しているのに対し、Hydroxyproline で定量した単位心室重量当りのコラーゲン含有量は約 2 倍に増加しており、左室重量の増

図 4 圧負荷肥大心における左室重量(左)左室内コラーゲン含有量(右)

Sham PO

図 3 心筋間質のコラーゲン線維 (PO: Pressure Overlead)

加の程度を上回るコラーゲン含有量の増加が認められた(図4). 圧負荷心ではこのような過剰なコラーゲンの増生があり, それが心室 Stiffness を増大させ, 拡張機能障害をきたす原因となっていると考えられた.

そこで, 圧負荷心におけるコラーゲン遺伝子の発現について検討した. 心室内のコラーゲン線維には主として type I と type III のコラーゲンが存在するとされているが, 各々の α_1 chain に対する probe を用いて Northern Blot 法にて解析を行なったところ(図5), type I および type III コラーゲンの両者ともに負荷後の時間経過にしたがって mRNA level が増加しているのが認められた.

次に, コラーゲン生合成の刺激因子としてアンジオテンシン II と TGF- β をとりあげ, 心筋間質細胞に対する作用を in vitro で検討した. 心筋間質細胞を培養し, confluent の状態でアンジオテンシン II を作用させたところ, Proline の取り込みは容量依

存性に増加し, 10^{-6} [M] の濃度で約1.9倍になった. 同様に TGF- β を作用させたところ, やはり Proline の取り込みは容量依存性に増加し, 10^{-9} [M] の濃度で約1.8倍となった(図6). 以上の結果から, アンジオテンシン II および TGF- β が心筋間質細胞に対してコラーゲン合成促進作用をもつことが明らかになった.

そこで, 圧負荷心におけるレニン・アンジオテンシン系について, その遺伝子発現を解析した. まずアンジオテンシノーゲンの mRNA level を RNase protection assay を用いて検討したところ, その mRNA level は圧負荷後12時間でいったんピークとなり, その後やや減少し, 慢性期に再び増加する, という変化を示した. また, Angiotensin Converting Enzyme (ACE) の遺伝子発現を Northern Blot 法にて検討したところ, その mRNA level は, アンジオテンシノーゲンと同様に, 圧負荷後12時間でいったんピークとなり, その後やや減少し, 慢性期

図5 圧負荷心における Type I および Type III コラーゲン遺伝子の発見

図6 TGF- β およびアンジオテンシン II のコラーゲン生合成促進作用

に再び増加するという変化を示した(図7)。以上の結果から、圧負荷肥大心においては心筋組織内のレニン・アンジオテンシン系が賦活化されており、心筋間質のコラーゲン増生に関与している可能性が示唆された。

圧負荷心における TGF- β の発現についても同様に解析を行なった。Northern Blot 法にて mRNA level をみたところ、圧負荷後8時間から有意に増加し、時間経過とともに漸増することが示された(図8)。また、蛍光抗体法で心筋組織内における TGF- β の局在を検討したところ、左側のコントロー

ルにくらべて右側の圧負荷心では血管周囲を中心とした心筋間質に TGF- β の局在が認められ、圧負荷心において増生しているコラーゲン線維とほぼ一致した分布を示した(図9)。以上の結果から、圧負荷肥大心においては TGF- β の発現が亢進しており、心筋間質のコラーゲン増生に関与しているものと考えられた。

4. おわりに

これまで述べた肥大心における拡張機能障害の機序についてまとめると図10のようになる。圧負荷心においては、Ca-ATPase の発現量低下にともなう

図7 圧負荷心におけるアンジオテンシンおよび ACE の遺伝子発現

図8 圧負荷心における TGF- β 遺伝子の発現

図10 圧負荷心における TGF- β の免疫組織染色

図9 圧負荷肥力心における拡張機能障害の機序

筋小胞体の機能低下がみられ、そのため拡張期の細胞内 Ca 濃度が上昇し、Relaxation の遅延をまねいて、拡張機能障害をおこすという機序が考えられる。また、圧負荷にともなう、TGF- β の発現亢進や心筋組織のレニン・アンジオテンシン系の賦活化が認められ、心筋間質におけるコラーゲンの生合成を

促進する結果、間質の線維化が生じ、心室の Stiffness を増大させて拡張機能障害をきたすという機序も考えられる。

肥大心における筋小胞体の機能低下は、筋小胞体の Ca 貯蔵量を減少させ、収縮期に放出される Ca イオンの量を抑制することにより、肥大した心筋が過剰な収縮を起こさないようにする代償機構とみなしうるし、また、コラーゲンの増生も、肥大した心筋細胞を支持するための代償機構の1つとみることができる。従って、肥大心においては、このような代償機構が過剰に働き、かえって心機能を低下させる結果になっていると考えることもできよう。

以上、肥大心における拡張機能障害の機序について、筋小胞体の機能低下と心筋間質の線維化を中心に述べた。このような分子生物学的手法による心機能障害の解析が、心肥大にともなう心不全の予防と治療に役立つことが期待される。

〔文 献〕

- 1) Fouad, F. M. : Left ventricular diastolic function in hypertensive patients. *Circulation*, 75 (Suppl. 1) : 1, 1987.
- 2) Komuro, I. et al. : Molecular cloning and characterization of a Ca^{2+} + Mg^{2+} -dependent adenosine triphosphatase from rat cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Clin. Invest.*, 83 : 1102, 1989.
- 3) Jalil, J. E. et al. : Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ. Res.*, 64 : 1041, 1989.