

学位論文題名

VEGF-mediated Angiogenesis is impaired
by Angiotensin type 1 Receptor Blockade
in Cardiomyopathic Hamster Hearts

(心不全モデルハムスターにおいて)

アンジオテンシン受容体拮抗薬は血管新生を抑制する)

学位論文内容の要旨

I. 背景

慢性心不全は心疾患の末期像であり、心移植のドナー数が限られる中、その病態の解明、治療法の検討は重要であると考えられる。心筋梗塞、心筋炎などの心筋障害後、心筋リモデリングを通じて次第に心不全は進行する。心筋リモデリングの過程にはレニン・アンジオテンシン系 (RAS 系) の活性化が強く関与し、心筋細胞肥大、線維芽細胞増殖、細胞外基質の産生を伴い、心室拡大が進行する。そして、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACE 阻害薬) を用いて RAS 系を阻害することでリモデリングの抑制、生命予後の改善が認められるといわれている。アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) は今までの Randomized Control Trial から単独で ACE 阻害薬を超える効果は無いものの忍容性に優れ、ACE 阻害薬が使用できない場合に代用できるというのが現時点での一般的な認識である。一方、アンジオテンシン II は強力な血管新生誘導作用を持ち、その作用はアンジオテンシン type 1 (AT1) 受容体から vascular endothelial growth factor (VEGF) の活性化を介することがわかっている。しかし、心血管系において RAS 系を阻害する薬剤を使用した場合、血管新生が抑制されるか否かはいまだ定説はない。

また、慢性心不全モデルとして BIO T02 がモデル動物として広く使用されてきた。このモデルでは、ジストロフィン関連糖タンパク複合体を構成する δ -サルコグリカンが欠損しており、週令とともに心筋細胞壊死が進み、13週令で全例に明らかな心機能障害を認め、20週令で心不全兆候を認める。心筋細胞壊死の生ずる原因として δ -サルコグリカンが欠損するために生ずる微小血管レベルで血管攣縮による虚血や再灌流障害、細胞内 Ca^{2+} ハンドリングの異常など複合的な原因によると考えられる。我々が今までに BIO T02 を用いて 5, 13, 20 週令で心不全の進行と血管新生との関係を検討してきた。その結果、心不全進行とともに、毛細血管密度は低下し、血管周囲のみならず心筋細胞間にも線維化が亢進し、血管から心筋細胞までの拡散距離が増加し、心筋細胞環境が悪化するにも関わらず、VEGF・Flt-1・アンジオポイエチン 1・アンジオポイエチン 2 などの血管新生分子の発現は増加せず、相対的に血管新生障害が起きていることを報告してきた。

II. 目的

ACE 阻害薬と ARB を心不全モデルハムスター BIO T02 に投与し、その治療効果と有効性の機序、特に血管新生という観点から両薬剤の差異を検討する。

III. 方 法

心不全モデルハムスターBIO T02に6週令から薬剤の経口投与を開始した。ACE阻害薬は、心不全治療薬としてもっとも一般的なエナラプリルを選択し、30mg/kg/dayで投与した。ARBは、AT1選択性の強いバルサルタンを選択し、40mg/kg/dayで投与した。コントロール群を含め3群で以降の検定を行った。各群は24匹より成り、その中で12匹は生命予後を確認するため死亡するまでの自然予後を観察、2匹は20週令で血管造影を行うために、10匹は39週令で心機能解析、組織学的、生化学的検討を行うため、犠牲死させた。

(1) 心体重比の測定、血清中の asparaginate amino transferase, クレアチニンを酵素法で、アンジオテンシン II を RIA 法で測定した。(2) 心エコー図法、心カテテル法で心機能の測定を行った。(3) ノーザンプロット法で collagen I, VEGF の発現を検討した。(4) アザン染色を行い線維化率を算出した。レクチンによる免疫染色を行い毛細血管密度を算出した。(5) SPring8 での放射光を用いて微小血管造影を行い、血管密度を視覚的に判定した。(6) 自然予後を観察し Kaplan-Meier analysis により生存率の検定を行った。

IV. 結 果

(1) 心体重比はコントロール群 (C 群) バルサルタン群 (V 群) で有意に大きく、エナラプリル群 (E 群) では有意に小さかった。asparaginate amino transferase, クレアチニンの血中濃度は三群とも有意差を認めなかった。アンジオテンシン II の血中濃度は C 群に比較し、V 群では有意に高値を示し、E 群では有意に低値であった。(2) 心エコー図では左室拡張末期径は V 群で E 群よりも有意に大きく、左室短縮率は E 群で C 群より改善を認めたものの、V 群は E 群、V 群より悪化を認めた。僧帽弁流入血流では C 群、V 群ともに一峰性の flow を認め、著明な拡張障害が示唆された。E 群では二峰性の flow を認め、拡張障害が改善されていることが示唆された。いずれの指標も心拍数や血圧の影響を受けるとされるが、心拍数は三群間で有意差を認めず、左室内圧は薬剤投与群では若干低下するものの、V 群と E 群では有意差を認めなかった。左室拡張末期圧は V 群で C 群、E 群と比較して有意に高値を示した。左室 dP/dt max と dP/dt min は V 群で C 群、E 群よりも悪化を示した。(3) VEGF mRNA の発現は E 群は C 群と有意差を認めないものの、V 群では C 群より有意に低下していた。Collagen I mRNA の発現は V 群で E 群、C 群より有意に高値を示し、E 群では C 群よりも低値を示した。(4) 線維化率は V 群で C 群より有意に高値を示し、E 群では C 群より有意に低値を示した。心筋細胞密度は V 群で C 群より有意に低値を示し、E 群で C 群より有意に高値を示した。毛細血管密度は逆に V 群で E 群、C 群より低値を示した。E 群と C 群では有意差を認めなかった。(5) 微小血管造影でも V 群は C 群より血管は粗に観察できた。(6) 死亡した個体は解剖し、うっ血肝・胸水・有意な肺重量の増加を全例で確認し、心不全死であったことを確認した。E 群では有意に生存率が改善したものの、V 群では有意に生存率が悪化した。

V. 考 察

RAS 系は血管新生と密接に関係しており、阻害する方向に働くか、あるいは促進する方向に働くのかは使用する薬剤によって、また臓器によっても異なる。ACE 阻害薬はアンジオテンシン I からアンジオテンシン II への変換を阻害するばかりでなくブラディキニンの分解も阻害する。ブラディキニンは B1 受容体、B2 受容体を活性化するがいずれもノックアウトマウスを用いた研究より血管新生を促進する方向に働くとされる。今回の検討ではエナラプリルは血管新生に対して有意な影響を与えなかったが RAS 系阻害に伴う血管新生阻害作用とブラディキニンによる血管新生促進作用がうち消しあったものと推測した。ARB は AT1 受容体を阻害するがフィードバックによりアンジオテンシン II は増加し、AT2 受容体を刺激するといわれている。AT2 受容体は拮抗薬を用いた研究から血管新生阻害に働くとされている。今回の検討でバルサルタンは血管新生を阻害したが、AT1 受容体阻害と AT2 受容体刺激の相互作用によるものと推察した。

VI. 結 語

本研究において、バルサルタンは血管新生を抑制した結果、リモデリングに悪影響を与え心機能の悪化、生存率の悪化を認めた。エナラプリルは血管新生には有意な影響を与えず、従来の報告通りリモデリングを抑制し、生命予後を改善する事を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 川 口 秀 明
副 査 教 授 北 畠 顕

学 位 論 文 題 名

VEGF-mediated Angiogenesis is impaired by Angiotensin type 1 Receptor Blockade in Cardiomyopathic Hamster Hearts

(心不全モデルハムスターにおいて

アンジオテンシン受容体拮抗薬は血管新生を抑制する)

慢性心不全は心疾患の末期像であり、心移植のドナー数が限られる中、その病態の解明、治療法の検討は重要であると考えられる。心筋リモデリングの過程にはレニン・アンジオテンシン系 (RAS 系) の活性化が強く関与し、心筋細胞肥大、線維芽細胞増殖、細胞外基質の産生を伴い、心室拡大が進行する。アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) はこれまでの Randomized Control Trial から単独でアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEI) を超える効果は無いものの忍容性に優れ、ACEI が使用できない場合に代用できるというのが現時点での一般的な認識である。一方、アンジオテンシン II は強力な血管新生誘導作用があるといわれているが、心血管系において RAS 系を阻害する薬剤を使用した場合、血管新生が抑制されるか否かはいまだ定説はない。

また、慢性心不全モデル BIO T02 ハムスターでは、サルコグリカンが欠損するために生ずる微小血管レベルで血管攣縮による虚血や再灌流障害、細胞内 Ca^{2+} ハンドリングの異常など複合的な原因により、週令とともに心筋細胞壊死が進行するといわれている。そこで、ACE 阻害薬と ARB を BIO T02 ハムスターに投与し、その治療効果と有効性の機序、特に血管新生という観点から両薬剤の差異を検討した。

BIO T02 ハムスターに6週令から薬剤の経口投与を開始、ACEI としてエナラプリルを 30mg/kg/day で、ARB としてバルサルタンを 40mg/kg/day で投与した。心体重比はコントロール群 (C 群) バルサルタン群 (V 群) で有意に大きく、エナラプリル群 (E 群) では有意に小さかった。asparaginate amino transferase, クレアチニンの血中濃度は三群とも有意差を認めなかった。アンジオテンシン II の血中濃度は C 群に比較し、V 群では有意に

高値を示し、E 群では有意に低値であった。心拍数は三群間で有意差を認めず、左室内圧は薬剤投与群では若干低下するものの、V 群と E 群では有意差を認めなかった。心エコー図での左室拡張末期径は V 群で E 群よりも有意に大きく、左室内径短縮率は E 群で C 群より有意に大きく、V 群は E 群、V 群より低下を認めた。僧帽弁流入血流では C 群、V 群ともに一峰性の flow を認め、著明な拡張障害が示唆された。E 群では二峰性の flow を認め、拡張障害が改善されていることが示唆された。Peak positive dP/dt と Peak negative dP/dt は V 群で C 群、E 群よりも低下を示した。ノーザンブロット法で検討を行った VEGF mRNA の発現は E 群は C 群と有意差を認めないものの、V 群では C 群より有意に低下していた。Collagen I mRNA の発現は V 群で E 群、C 群より有意に高値を示し、E 群では C 群よりも低値を示した。アザン染色を行い算出した線維化率は V 群で C 群より有意に高値を示し、E 群では C 群より有意に低値を示した。レクチンを用いた免疫染色を行い算出した毛細血管密度は V 群で E 群、C 群より低値を示した。E 群と C 群では有意差を認めなかった。放射光による心筋内微小血管造影でも V 群は C 群より血管は粗に観察できた。E 群では有意に生命予後が延長したものの、V 群では有意に生存率が低下した。本研究において、バルサルタンは血管新生を抑制した結果、リモデリングに悪影響を与え心機能の低下、生存率の低下を認めた。エナラプリルは血管新生には有意な影響を与えず、従来の報告通りリモデリングを抑制し、生命予後を延長する事を明らかにした。

口頭発表に際し、川口教授から臨床試験との差異、アンジオテンシン 2 型受容体を刺激した際の VEGF の変化、アンジオテンシン 1 型受容体拮抗薬を投与した時の心筋細胞の変化、ハムスターにおける薬物動態についての質問があった。次いで安田教授から心不全モデルハムスター-B10 T02 の心筋障害の機序、ヒトにおける疾患との相同性、放射光を用いた血管造影の臨床応用についての質問があった。最後に北畠教授から使用薬剤の適否、使用量の適否、血中濃度について、また他の動物モデルでの研究結果、アポトーシスの関与についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は過去の実験データや関連論文を引用し、概ね妥当な回答を行った。

この論文は、RAS 系と血管新生との関連と心不全の薬物治療への新しいアプローチとして意義のあるものとして高く評価され、今後この分野における更なる研究の発展が期待される。

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。