

学位論文題名

心筋梗塞後リモデリングにおける
レニン・アンジオテンシン系の意義

- Angiotensin II type 2 receptor knock out mice を用いた検討 -

学位論文内容の要旨

I. 緒言

心筋梗塞における左室リモデリングは梗塞初期の梗塞部位伸展と急性期以降の非梗塞部位の反応性肥大の二つの機序からなる。梗塞心において Ang II の局所産生増加が線維芽細胞の増殖やコラーゲン合成亢進に寄与することがリモデリングを引き起こす。これまでの研究から、AngII の受容体は主に 2 つの isoform があり、1 型受容体 (AT1) と 2 型受容体 (AT2) では組織分布及び生理学的作用に違いがあることが報告されている。AT1 と AT2 は相反する作用を持ち、その発現バランスによって心筋リモデリング進展が調節されていることが示唆される。しかし、AT2 の役割は十分に解明されていない。AT2KO マウスにおいて心筋梗塞を作製した場合、早期リモデリング過程がより進行するかどうか、また、どのような遺伝子が発現し、変化するかについては十分な検討がなされていない。

II. 目的

心筋梗塞後早期リモデリングにおける RA 系の意義、ことに AT2 の役割を明らかにすることにある。

III. 方法

1. 実験動物

12-16 週齢の雄性 AT2KO マウス (*Agtr2*^{-/-}) 及び同腹の Wild type マウス (*Agtr2*^{+/+}) を用い、それぞれ心筋梗塞作製と sham 手術を行い 2 群に分けた。

2. 心筋梗塞の作製

マウスは腹腔麻酔後、経口的に気管内挿管し、人工呼吸器に接続した。心筋梗塞は左前側胸部を開胸し、左冠動脈近位部で 7-0 絹糸を用いて結紮することにより作製した。虚血の確認は心電図の ST 上昇、結紮部より末梢の壁運動低下、色調変化により判断した。sham 群は開胸のみ施行した。両群とも術中・術後の生存率を記録し、術後 7 日もしくは 14 日後に心臓を摘出した。

3. RNA の抽出及び cDNA microarray 解析

手術 7 及び 14 日後に心臓を摘出し、心筋梗塞群では「梗塞部」、「非梗塞部」及び「梗塞周囲部」に分離された。組織は速やかに液体窒素で凍結し RNA を抽出した。抽出した「梗塞部」及び「非梗塞部」の total RNA より mRNA を精製し、cDNA microarray 解析を施行した。

4. 組織病理学的評価

手術 7 及び 14 日後で心臓を摘出し、10%中性ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋し、薄切標本を Hematoxylin-eosin(H-E)染色及び Azan 染色を施行し、光学顕微鏡にて形態、線維化を評価した。

5. MRI 解析

動物用 MRI 撮像装置を用いて、心筋梗塞群の手術前、手術 7 及び 14 日後で MRI を撮像し、各群の形態的变化、心機能の変化を評価した。短軸方向で 1mm 毎に撮像し、得られた最大拡張期及び収縮期の画像を NIH image で処理して左心室面積及び、外周径、内腔径を計測し左心室体積を求めた。

6. 統計学的解析

各群の cDNA microarray, MRI 解析より得られた結果は ANOVA と SPSS を用いて統計学的比較検討を行った。AT2KO 及び Wild type の心筋梗塞後生存率は Kaplan-Meier 解析を行った。

IV. 結 果・考 察

AT2KO マウスで冠動脈を結紮することにより心筋梗塞を作成し、その後の行動、形態学的変化、遺伝子発現の差異を観察し、Wild type マウスと比較した。その結果、AT2KO マウスでは、摂食行動と活動性の低下、死亡率の増加を認めた。超急性期における心室頻拍等の致死性不整脈の出現率及び亜急性期の心破裂も AT2KO で有意に高頻度であった。AT1aKO マウスの心筋梗塞モデルでは、Wild type と比較し、活発で、死亡率も低下すると報告されていることから、活動性の点でも AT1 は AT2 と相反すると考えられる。また、心筋梗塞ラットにおいて AT1 受容体拮抗薬を投与した場合、コラーゲンの蓄積が減少し線維化が抑制され、左室拡張末期径が減少し、駆出率が増加することが報告され、AT1 受容体の抑制は、心筋梗塞後の生存率を改善し、逆に AT2 受容体抑制は生存率を低下させることが推測されていた。MRI の結果にて、心筋梗塞後の AT2KO で内径が拡大し、梗塞部が脆弱化していた。手術前の左室収縮終期容積は Wild type と比較して AT2KO が有意に小さいが、心筋梗塞後 14 日目には有意に増加していた。AT2KO では心筋梗塞後 14 日目の心尖部に瘤が形成され、血栓が付着している像が観察されたが、Wild type には同様の所見は無かった。心破裂以外の早期死亡率増加の原因として、前述の心室性不整脈の出現のほかに、血栓塞栓の可能性が示唆される。

cDNA microarray の結果、AT2KO の梗塞部では Wild type と比較して転写因子である Ets-1 や IL-11Ra, IL-2Ra, IL-15 などのサイトカイン及びアポトーシスに関連する Bcl-2 が 7 日目より発現していた。14 日目では有意差がないことより、心筋梗塞慢性期よりも、むしろ心筋梗塞発症早期に AT2 の存在することが予後に影響する可能性がある。Ets-1 が早期に発現する機序は、心筋梗塞後に局所の壁張力の増加、局所心筋の伸展という機械的刺激を介して賦活化された心組織 RA 系からの AngII が増加することが直接刺激となることが考えられる。さらに虚血の結果としての組織低酸素も Ets-1 を誘導する原因となると考えられた。AT2KO マウスでは早期に Ets-1 の発現が亢進することで MMPs の早期発現を引き起こし、細胞外マトリックス代謝回転の不均衡が出現することが推測される。そのために不完全なコラーゲン蓄積、リモデリング進行がみられ心室瘤、心破裂、心室性不整脈を発症すると考えられた。

V. 結 語

心筋梗塞後早期リモデリング過程において、AT2 発現抑制は、心室瘤、心破裂を引き起こし、生存率を低下させた。その機序には AT2, Ets-1, MMPs の発現が影響する可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 筒 井 裕 之
副 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 川 口 秀 明

学 位 論 文 題 名

心筋梗塞後リモデリングにおける レニン・アンジオテンシン系の意義

－ Angiotensin II type 2 receptor knock out mice を用いた検討－

心筋梗塞における左室リモデリングは梗塞初期の梗塞部位伸展と急性期以降の非梗塞部位の反応性肥大の二つの機序からなり、梗塞心において Ang II の局所産生増加がリモデリングを引き起こす。AngII の受容体には 1 型受容体 (AT1) と 2 型受容体 (AT2) があり、その発現バランスによって心筋リモデリング進展が調節されていることが示唆される。AT2KO マウスにおいて心筋梗塞を作製した場合、早期リモデリング過程がより進行するかどうか、また、どのような遺伝子が発現し、変化するか検討した。12-16 週齢の雄性 AT2KO マウス及び Wild type マウスを用い、それぞれ心筋梗塞作製と sham 手術を行った。処置後 7 及び 14 日目に心臓を摘出し、心筋梗塞群では「梗塞部」及び「非梗塞部」に分離後 RNA を抽出し、cDNA microarray 解析を施行した。また、MRI を撮像し、各群の形態的变化、心機能の変化を評価した。

AT2KO マウスでは、摂食行動と活動性の低下、死亡率の増加を認めた。超急性期における心室頻拍等の致死性不整脈の出現率及び亜急性期の心破裂も AT2KO で高頻度であった。MRI にて、心筋梗塞後の AT2KO で内径が拡大し、梗塞部が脆弱化していた。左室駆出率は Wild type と比較して AT2KO の梗塞後 14 日目で有意に低下していた。

cDNA microarray の結果、AT2KO の梗塞部では Wild type と比較して Ets-1 や炎症性サイトカイン及び Bcl-2 が 7 日目より発現していた。14 日目では有意差がないことより、心筋梗塞慢性期よりも、むしろ心筋梗塞発症早期に AT2 の存在することが予後に影響する可能性がある。Ets-1 が早期に発現する機序は、局所の壁張力の増加、局所心筋の伸展という機械的刺激による AngII の増加、組織低酸素による誘導が考えられた。AT2KO マウスでは早期に Ets-1 の発現が亢進することで MMPs の早期発現を引き起こし、細胞外マトリックス代謝回転の不均衡が出現することで不完全なコラーゲン蓄積、リモデリング進行がみられると考えられた。

副査安田慶秀教授から、活動性低下について定量的な評価法の有無、及び他論文での一般的な検討方法について質問があり、飲水量、摂食量の計量、電気刺激に対する反応、植え込み型無線心電図装置による比較等が挙げられるが、今回は行っていない旨解答した。また、梗塞の範囲、死亡例の組織変化についても質問があり、梗塞の範囲については MRI 及び H-E 染色にて二群間で差はなかったが、摘出心の梗塞巣の脆弱化が顕著であり、瘤様

の形態変化もみられたこと、今後免疫染色等で更なる検討が必要であることを解答した。他に AT2 の胎児での意義付けについて質問があり、KO マウスでも正常な発育を遂げていることより発生の主体ではないが、心筋形成、支持組織増減に関与する可能性が考えられていると解答した。

副査川口秀明教授より AT2KO で形態的变化があるにもかかわらず、AT2 発現に関する遺伝子に大きな変化は無く、Ets-1、MMP については変化が出ているが、同様の報告が今までのレポートでもあるのか、と質問があり、他の心筋梗塞モデルでも AT1 及び AT2 の発現は増加、普遍いずれも報告があること、また Ets-1 及び MMP についてそれぞれ虚血による遺伝子発現増加及びタンパク増加の報告があるが、一連の流れとして報告したものは無い、と解答した。また、Ets-1 を抑制しているのが AT2 という可能性があるか、との質問に対し、直接 AT2 から Ets-1 につながる報告は無く、AngII が Ets-1 を誘導する報告のみであり、可能性はあるが検討が必要である、と解答した。更に、治療について、AT1 blocker がよいのか、AT2 blocker がよいのか、また治療薬として AT2 blocker の可能性はあるのか、との質問に対し、AT1 blocker の有用性についてはすでに大規模試験も行われているが、AT2 blocker についてはむしろ害になる可能性が今回の検討からも予測される、と解答した。

主査より AT2 から Ets-1 へのシグナル及び Ets-1 から MMP へのシグナルについて報告があるか、そのメカニズムについては解明されているか、と質問があり、細胞と細胞外基質との接着刺激が Ets-1 の mRNA を発現し、Ets-1 蛋白が転写因子として MMPs を制御することが報告されていること、低酸素刺激や AngII が Ets-1 の発現を直接的に誘導すると報告されていること、MMP-2 KO マウスや MMP 阻害薬が心筋梗塞後心破裂を抑制すること、それぞれ単独では報告があるが、それぞれを結びつけた研究報告が無いことより今後検討が必要である、と解答した。病理も含めてメカニズムについて今後検討をすすめるように指摘された。

この論文は、心筋梗塞後の早期リモデリング過程において、AT2、Ets-1、MMPs の発現が影響する可能性を見出した点で高く評価され、今後のリモデリング機序解明への足掛かりとして期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過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。