

心肥大の基礎的研究  
(発現機序と肥大心筋の特性)

## 1. 目的

心臓は圧負荷、容積負荷に対して心肥大をおこし、この代償機転を働かせて、全身に血液を送り出すポンプ機能を維持している。しかし、心肥大を生じるのに、心筋細胞がどんな形で刺激を受け、どんな生化学的、電気生理学的変化を経て生じて行くのか解明されていない。一方、心肥大はマイナス面も持っており、心室の拡張障害、虚血などによる心筋の収縮性の低下、更には心不全を発現する素地ともなっている。

上述した適応による心肥大の他に、肥大型心筋症では、心肥大をおこして来る原因すら明らかになっていない。また、心室に一樣におこるのではなく、心室中隔に強い症例など偏在している点も奇異である。

これら心肥大に関する諸問題を、各分野の専門家が協力して解明したい。

## 2. 組織

研究組織は細田瑛一以下7名で構成した。

細田 瑛一	東京女子医科大学	心肥大と myosin isozyme への交感神経の役割
戸嶋 裕徳	久留米大学医学部	生理的肥大心と SHR における肥大心機序の対比検討
矢崎 義雄	東京大学医学部	心肥大形成の生化学的機序
大地 陸男	順天堂大学医学部	心肥大とイオンチャネル (昭和 63 年度)
岡田 隆夫	順天堂大学医学部	心肥大とイオンチャネル (平成元年度)
豊岡 照彦	東京大学医学部	肥大心筋細胞の Ca 代謝
武田 信	東京慈恵会医科大学	心筋の収縮力、energetics より見た肥大心の病態生理の解析

## 3. 計画及び材料と方法

材料別に計画と方法を述べる

### 1) ラット培養心筋細胞

機械的伸展負荷、或いはカテコラミン、アンギオテンシンなどの体液性刺激による肥大の形成過程における、細胞内の応答系につき生化学的、分子生物学的方法で検討した。即ち、アミノ酸の蛋白への取り込み、e-fos の発現を測定した。

次に、プロテインキナーゼによる心室筋ミオシン軽鎖遺伝子の発現調節プロモーター領域の機能調節を CAT アッセイ法により解析した。この調節に対する TPA、フォースコリンの作用を検討した。また、細胞内 Ca 濃度を画像表現できる装置を作り、カフェイン、PDGF などの影響を調べた。

### 2) モルモット単離心室筋

パッチクランプ法により、単一、又は多チャネル Ca 電流及び他のカチオンチャネルの開確率、利用率、平均電流、開孔時間、単位コンダクタンスを検討し伸展又はカテコールアミンやアデノシンによる影響をみた。

### 3) Wistar ラット及び SHR

Wistar ラットの腹部大動脈縮窄及び SHR を用い、高血圧性心肥大において血中エピネフリン、ノルエピネフリンを測定し、心筋内  $IP_3$  と  $\alpha_1$  受容体の radio binding assay を行い、受容体数と解離定数を算出した。

また、長期水泳トレーニングによる心肥大で乳頭筋の等尺性発生張力を測定、心筋のミオシンアイソザイムを測定した。

- 4) 家兔の圧負荷による心肥大に関して、イソプロテレノール負荷及び除神経を行い血中及び心筋のノルエピネフリン含有を測定、ミオシンアイソザイム、Sarcoplasmic reticulum の CaATPase 遺伝子発現を調べた。

#### 4. 成果及び考察

心臓肥大の発現機序と病態に関して電気生理学的、分子生物学的および薬理的に検討し次の点を明らかにすることが出来た。

##### (A) 心肥大の生成とイオンチャネルの関係について

- 心筋細胞の伸展、100mmHg までの陰圧、または陽圧を加えると、1) 伸展受容チャネルの透過性が変化し、Ba と K を透過させる非選択的陽イオンチャネルの可能性が見出された。2) Ca チャネル電流も陰圧で変化した。
- $\beta$  受容体刺激により Ca チャネルを燐酸化すると Ca 電流が増大した。
- K 脱分極やアンギオテンシン II で Ca チャネルは刺激されるが、細胞の成長表現型によりチャネルの発現が異なる。

##### (B) 心肥大発現の生化学的機序について

- 心筋細胞を伸展するとアミノ酸の蛋白への取り込みが促進され、その時核内癌遺伝子 (c-fos) の発現が増強される。
- 心筋細胞を伸展する時にプロテインキナーゼの活性化により心筋蛋白をコードする遺伝子が発現されると考えられる。C キナーゼによっても A キナーゼによっても、心室ミオシン軽鎖 I の遺伝子の転写活性が高められることが判明した。
- 心肥大の原因の一つである交感神経系刺激又は圧負荷では  $\alpha$  ミオシンが増加し同時に sarcoplasmic reticulum のカルシウム ATPase 遺伝子発現が低下しており、Ca の利用速度調節との関係を示唆した。

##### (C) 肥大心の情報伝達系について

- 大動脈狭窄による圧負荷肥大心では  $\alpha_1$  受容体数が増加していたが、NE 減少を代償する二次的 up-regulation と考えられた。
- 先天性高血圧心肥大では心筋  $IP_3$  が NE 上昇と共に増加し  $\alpha_1$  受容体機能亢進を示した。
- 運動訓練による肥大心は、圧負荷・容量負荷による肥大心とは違って張力発生最大速度が上昇した。

##### (D) 心肥大の退縮について

- 負荷の除外によって肥大が退縮すると、ミオシン、アイソザイムの分布も復元した。

研究の詳細を以下研究者毎に記述する。

#### 6. 発表

「本事業により作成した印刷物」

1) 矢崎義雄

- (1) M. Kurabayashi, H. Tsuchimochi, F. Takaku, I. Komuro, Y. Yazaki: Molecular cloning and characterization of human cardiac  $\alpha$ - and  $\beta$ -form myosin heavy chain complementary DNA clones: regulation of expression during development and pressure overload in human atrium. *J. Clin. Invest.* 82:524-531, 1988.
- (2) M. Kurabayashi, I. Komuro, H. Tsuchimochi, F. Takaku, Y. Yazaki: Molecular cloning and characterization of human atrial and ventricular myosin alkali light chain cDNA clones. *J. Biol. Chem.* 263:13930-13936, 1988.
- (3) I. Komuro, M. Kurabayashi, Y. Shibazaki, F. Takaku, Y. Yazaki: Molecular cloning and characterization of a  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -dependent adenosine triphosphatase from rat cardiac sarcoplasmic reticulum: regulation of its expression by pressure overload and developmental stage. *J. Clin Invest.* 83:1102-1108, 1989.
- (4) Y. Yazaki, H. Tsuchimochi, M. Kurabayashi, I. Komuro: Molecular adaptation to pressure overload in human and rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 21:91-101, 1989.
- (5) I. Komuro, T. Kaida, Y. Shibazaki, M. Kurabayashi, Y. Katoh, E. Hoh, F. Takaku, Y. Yazaki: Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. *J. Biol. Chem.* 265:3595-3598, 1990.
- (6) I. Komuro, Y. Shibazaki, M. Kurabayashi, F. Takaku, Y. Yazaki: Molecular cloning of gene sequences from rat heart rapidly responsive to pressure overload. *Circ. Res.* 66:979-985, 1990.

2) 大地陸男、岡田陸夫

- (1) Kawashima, Y., Kato, M., Murakami, H. and Ochi, R.: Depression of calcium channel current by acetylcholine and adenosine in cardiac muscle. In *Biosignalling in Cardiac and vascular System.* eds. Fujiwara, M., Narumiya, S. and Miwa, S. Pergamon Press, pp 256-259 (1989)
- (2) 川島優子、大地陸男: 心筋の Ca チャネルのゲート機構の修飾、医学のあゆみ 148, 229 (1989)
- (3) 大地陸男、川島優子: 心筋 Ca 電流の神経性調節. *自律神経* 26, 226-269、(1989)
- (4) 大地陸男: 心筋カルシウムチャネルの利用可能性に関する研究. 昭和 63 年度文部省科学研究費一般研究 C 研究成果報告書 (1989)
- (5) 大地陸男、川島優子、加藤理: 心筋細胞の Ca チャネル制御機構——自律神経 伝達物質・Ca チャネル阻害剤、文部省科学研究費重点領域研究「心筋細胞障害の成因と防御に関する基礎的研究」研究経過報告書 (平成元年度), 7 (1989)
- (6) 加藤理、村上仁、大地陸男: イソプロテノール処理心室筋におけるアデノシンによる単一 Ca チャネル電流の抑制. *心臓*, 21 (Supple), 9-11 (1989)
- (7) Ochi, R. and Kawashima, Y.: Modulation of slow gating process of calcium channels by isoproterenol and nitrendipine in cardiac muscle. *Recent Advances in Calcium Channels and Calcium Antagonists.* ed. by Yamada, K. and Shibata, S. pp11-17,

Pergamon Press (1990)

- (8) Ochi, R. and Kawashima, Y. : Modulation of slow gating process of calcium channels by isoprenaline in guinea-pig ventricular cells. J. Physiol. (Lond.), 424:187-204(1990)
- (9) Kato, M., Yamaguchi, H. and Ochi, R. : Mechanism of adenosine-induced inhibition of calcium current in guinea-pig ventricular cells. Circulat. Res. (in press)

### 3) 戸嶋裕徳

#### (1) ADRENERGIC RECEPTORS IN PRESSURE-INDUCED MYOCARDIAL HYPERTOPHY

Kiminori Kajiyama, Yoshinori Koga, Tsutomu Otuski, Haremi Sufu, Hironoti Toshima,

J.Molecular and cellular cardiology. 21C Suppl (III) S.14, 1989.

#### (2) ROLE OF ADRENERGIC RECEPTORS IN EXPERIMENTAL CARDIAC HYPERTROPHY

Yoshinori Koga, Kiminori Kajiyama, Gensho Iwami, Hironori Toshima.

J.Molecular and cellular cardiology. 21C Suppl (III) S.13, 1989.

#### (3) Role of Adrenergic Receptor Systems in Canine Left Ventricular Hypertrophy

Michio Chiba, Masanori Shida, Yoshitaka Miyazaki, Yoshinori Koga and Hironori Toshima

J Mol Cell Cardiol 21, (Supplement V), 39-47 (1989)

#### (4) 実験的圧不可肥大心筋におけるミトコンドリア機能

大月 努、梶山公則、周布晴美、岩崎弘志、中田真詩、坂梨俊彦、野津原昭、古賀義則、戸嶋裕徳

心筋の構造と代謝 11:605, 1788

#### (5) 圧負荷肥大心の発生における $\alpha_1$ 受容体系の役割

大月 努、梶山公則、周布晴美、岩見元照、岩橋弘志、辻ゆかり、加来秀基、古賀義則、戸嶋裕徳

心筋の構造と代謝 12:1989(in press)

#### (6) アルコール性心筋障害における $\beta$ 受容体系機能の変化

周布晴美、梶山公則、大月 努、辻ゆかり、岩橋弘志、西 宏文、古賀義則、戸嶋裕徳

心筋の構造と代謝 12:1989 (in press)

### 4) 武田信彬

#### (1) Takeda N, Nakamura I, Hatanaka T, Ohkubo T, Nagano M (1988)

Myocardial mechanical and myosin isoenzyme alteration in streptozotocin-diabetic rats. Jpn Heart 29:455-463

#### (2) Takeda N, Nakamura I, Ohkubo T, Hatanaka T, Nagano M (1988)

Effects of physical training on the myocardium of strepto-zotocin-induced diabetic rats. Basic Res Cardiol. 83:525-530

#### (3) Takeda N (1990) Effects of thyroid hormones on myocardial contractility and

ventricular myosin isoenzymes. Jikeikai Med 37 (suppl 1) in press

5) 豊岡照彦

- (1) Collagen-stimulated human platelet aggregation is mediated by endogenous calcium-activated neutral protease.  
Circulation Research 64:407-410, 1989. Tokyo-oka, T., Shin, W.S., Okai, Y., Morita, M., Iizuka, M. and Sugimoto, T.
- (2) Synergistic deleterious effect of micromolar Ca ions and free radicals on respiratory function of heart mitochondria at cytochrome C and its salvage trial.  
Biochemical and Biophysical Research Communications 163:1397-1403, 1989. Toyo-oka, T., Arisaka, H., Sanma, H., Shin, W.S., Dan, Y. and Sugimoto, T.
- (3) A critical review of NMR imaging and spectroscopy for the evaluation of cardiac hypertrophy in humans and experimental animals.  
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 21 (Suppl, V):141-147, 1989. Toyo-oka, T.
- (4) In vivo  $^{31}\text{P}$ -NMR SPECTROSCOPY AT EPICARDIUM UNDER HYPOXIA.  
Japanese Circulation Journal 53:1098-1099, 1989. Arisaka, H., Toyo-oka, T. and Hosoda, S.
- (5) Response of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transients in cultured vascular smooth muscle cell to angiotensin II, vasopressin, acetylcholine and atrionatriuretic peptide  
Japanese Heart Journal 30:77-83, 1989. Shin, W.S., Toyo-oka, T., Naitoh, T., Dan, Y., Okai, Y., Iizuka, M. and Sugimoto, T.
- (6) In vivo  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy of heart in hypoxia and identification of biochemical factors responsible for the contractility loss.  
in Muscle Energetics (Paul, J. ed.) Alan R. Liss Publ., New York, pp567-579, 1989. Toyo-oka, T., Arisaka, H., Takayasu, T., Tezuka, T. and Hosoda, S.
- (7) 多次元画像解析法による血管平滑筋細胞内の遊離 Ca 動態の検討 豊岡照彦 心筋の構造と代謝 11: 437-453、1989.
- (8) 心筋細胞と Ca. 豊岡照彦 Annual Review 循環器 1-5, 1989.

6) 細田瑳一

- (1) Toshio KURODA, Akira SHIINA, Osamu SUZUKI, Toshihiro FUJITA, Toshitaka NODA, Masao TSUCHIYA, Toshio YAGINUMA and Saichi HOSODA : Predication of Prognosis of Patients with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy : A Comparison of Echocardiography with Cardiac Catheterization.  
Japanese Journal of Medicine 28(2)180-188, 1989.
- (2) 荷見源成、豊崎哲也、藤田直也、永田まこと、天沼澄子、仁木清美、堀江俊伸、細田瑳一、長尾博明、廣江道昭、太田淑子、笠島 武、増田昭博：突然性心筋症における

アドレナリン受容体の意義：心筋生検組織のオートラジオグラフィーによる検討 心臓 22(6), 1990. 別刷

- (3) 黒田敏男、椎名 明、鶴田貴志夫、藤田俊弘、山沢正則、三橋武司、鈴木 修、柳沼淑夫、細田瑛一：循環器系住民検診における断層心エコー図法の意義  
Journal of Cardiology. 19(3):933-943, 1989.
- (4) Tetsuo Takayasu, Teruhiko Toyooka and Saichi Hosoda: RAPID COMMUNICATION: Waste of ATP for Tension Development in Myocardial Acidosis: Chemomechanical Uncoupling at Myofibrillar Level. J mol Cell Cardiol 22:127-130, 1990.
- (5) Masatoshi Kawana, Shin-ichi Kimata: The Effect of Cardiac Sympathetic Nerve Activity on Heart Proteins. J Mol Cell Cardiol. 22 (Supplement II), 1990.

## 1) 心肥大形成の生化学的機序に関する検討

矢崎 義雄

心肥大の形成機序を分子生物学的に解析するために、ラット培養心筋細胞を用いて機械的な負荷あるいはカテコラミン、レニン・アンジオテンシン系などの体液性因子による心肥大形成の細胞内応答系について、プロテインキナーゼの活性化とヒト心室筋ミオシン軽鎖 I 遺伝子の発現機序を中心に検討をすすめた。

### i) 負荷による心肥大のシグナリング

Vandenburgh らは、ニワトリ胎児骨格筋細胞をシリコン膜上に培養し、シリコン膜を伸展させたところ、蛋白生合成の増加をみた。筋肉の収縮-弛緩のサイクルにおいて、膜の形態変化が起こるといふ報告や、筋細胞の核を抽出して静水圧をかけたところ mRNA の生合成が増加したといふ報告もあり、機械的な刺激による個々の心筋細胞におけるストレスの増大が、直接蛋白生合成を増加させる可能性は十分考えられていた。

そこでわれわれは、培養デッシュそのものをシリコンで作製して、多数の心筋細胞に伸展刺激を加える方法を考案し、ストレスに対する心筋細胞の反応を分子生物学的に検討した。その結果、シリコン培養デッシュを伸展すると、ラット新生児期の心筋細胞ではアミノ酸の蛋白への取り込みが促進されること、また伸展する割合に従って、核内癌遺伝子の *c-fos* の発現が増強されることを明らかにした (図 1)。この反応系がプロテインキナーゼ C を直接活性化するフォルボールエステル (TPA) で促進されること、またその阻害薬で抑制されることから、C キナーゼ系がこの様なストレスによる心肥大形成にも重要な役割を担っていることを示した (図 2)。

一方、Morgan らはラットの灌流心を用いて検討した結果、左室内圧を上昇させると、cAMP の含量が心筋内で増加し、蛋白の生合成も亢進することを示し、機械的な負荷に対する心肥大の反応も、cAMP-A キナーゼ系が関与するとしている。

このように、心肥大形成の生化学的機序に A キナーゼ系が、あるいは C キナーゼ系が主として機能しているか結論は得られていないが、一般の細胞内応答系に認められる代謝経路がやはり重要な役割を担っていることが示されたことになり、その相違は検討した心筋細胞の個体発生の過程による可能性がある。C キナーゼ系はまだ増殖能が残存している胎児や新生児期の心筋細胞で主に働き成長後に分化した心筋細胞では A キナーゼ系が応答系に主に関与しているのかも知れない。

それでは、このように活性化された C キナーゼ、あるいは A キナーゼがどのような機序で、心肥大を形成する蛋白の生合成を亢進させるのか検討をすすめた。

### ii) プロテインキナーゼによる遺伝子発現調節機序

プロテインキナーゼの活性化により、心筋蛋白をコードする遺伝子がどのような機序で発現されて心肥大を形成するかは、負荷によりその発現が up-regulate される遺伝子をクローニングし、その発現調節を行うプロモーター領域の機能を解析する必要がある。そこで、われわれは負荷によりその発現が亢進する心室筋ミオシン軽鎖 I 遺伝子をヒト遺伝子ライブラリーからクローニングし、その発現調節を行うプロモーター領域の機能解析を CAT アッセイ法を基礎に検討を行った。

ヒト心室筋タイプミオシン軽鎖 I (VLCI) 遺伝子のプロモーター領域には、遺伝子の発現に働く数多くの、特徴的な塩基配列が存在している (図 3)。まず転写開始点 (キャッ



プ部位とも呼ばれる)の上流 30 塩基さかのぼったところに、TATA で示される塩基配列、いわゆる TATA box がある。この部位を欠くと転写活性が全く失われることから、転写開始に必須であり、しかも転写開始部位を正確に規定する働きも有している。さらに上流には CCAT で示される CAT box、また GC が豊富に含まれる GC box などの塩基配列が存在し、転写活性を促進する機能を行っている。特に重要なのが、CC (A+T rich) <sub>6</sub>GG という特異的な塩基配列を有する CArG box で筋肉細胞に特有の遺伝子発現に重要な役割を担っていることも CAT アッセイ法により明らかにした。これらの塩基配列には対応する低分子の核内蛋白が存在し、それぞれが結合することによって、mRNA が生合成され転写活性が発現するところとなる。

このようなプロモーター領域の構造を有する VLCI の遺伝子の転写活性は、一方では TPA やフォルスコリンにより促進されることを CAT アッセイ法により示した。すなわち、C キナーゼによっても、A キナーゼによっても VLCI の遺伝子の転写活性が up-regulate されることを示している。このような発現調節を行っている塩基配列を、プロモーター領域を順次欠落する変異株を用いて検討すると、転写開始部位より上流 57 塩基と 46 塩基の間のわずかな部位に存在しており、その塩基配列を検討すると、A キナーゼとも C キナーゼとも反応する AP2 蛋白の結合する特有の塩基配列の存在することが新たに判明した。すなわち、AP2 蛋白 hzA キナーゼによっても、C キナーゼによっても反応してリン酸化され、これが対応する VLCI 遺伝子のプロモーター領域に結合してその転写活性を促進することを我々の検討によって初めて明らかにすることができた。このことは、A キナーゼまたは C キナーゼが活性化された時に起こる遺伝子の発現機序を直接解明したことになり、心肥大形成の生化学的機序を解明する新たな発展が得られるところとなった。そして、細胞レベルで問題となった心肥大のシグナリングとしては、C キナーゼも A キナーゼも VLCI 遺伝子の検討からみれば、ともにそのプロモーター領域に作用してその発現調節を行いうることを示し大変興味深い。図 4 は、このような心肥大形成のシグナル伝達系をまとめたものである。

## 2) 心室筋のイオンチャネルの機械的進展および磷酸化による修飾

岡田 隆夫

目的 心臓壁の負荷増大による伸展は心肥大の一因である。伸展をシグナルとして受容する機序には形質膜にあるイオンチャネルを想定しうる。伸展によりチャネルが開孔して細胞内に流入する Na や Ca イオンは、細胞内での蛋白合成に影響しえよう。本研究ではまず、電位依存性 Ca チャネルに対する伸展の影響を調べた。これに関連して Ca 電流の磷酸化による増大のチャネル機序を調べた。さらに新しい試みとして、伸展により開孔する伸展受容性チャネルを検索した。

方法 モルモットの心臓をランゲルドルフ法でコラゲナーゼ処理し、単一心室筋をえた。100mM Ba の入ったピペットで顕微鏡下に細胞接着型のパッチを形成した。単一または多チャンネル Ca チャネルの電流は 100ms の脱分極パルスを  $2H_z$  で反復して記録した。チャネルの伸展はピペットに陰圧または陽圧を加えて行った。圧は圧トランジューサーにて測定した。カテコルアミンやアデノシンは還流液中に添加した。データの解析にはパソコンを使用し、開確率（脱分極時間中のチャネルが開孔している割合）、利用率（反復刺激時の開孔を伴う掃引の割合）、平均電流、開孔時間、単位的コンダクタンスを検討した。

### 1. Ca チャネルに対する伸展の影響

ピペット内部を 20mmHg 陰圧にし、その前後で約 500 回の脱分極刺激を行い、えられた電流より平均 Ba 電流を求め、比較した。18 例の多 Ca チャネル電流の平均電流は 30% 程度の変化を示した。可逆的に変化したものは増大 5 例、減少 2 例であった。図 1 はイソプレナリンと陰圧で平均電流が増大した例である。イソプレナリンにより電流は増大しさらに陰圧により電流は可逆的に増大した。開確率とチャネルの数の積 ( $N_{po}$ ) がこれに伴って変化している。単一チャンネル電流の平均電流は 6 例について解析されたが、増大が 2 例、減少が 4 例で可逆的变化は得られなかった。増大例では開確率の増大を伴った。以上よりチャネルが陰圧で伸展されると Ca 電流は増大または減少する。パッチ形成時の圧が測定されなかったが、おそらくそのときの最初の陰圧は一定ではなく、種々の伸展度のパッチが形成されたとおもわれる。チャネルの開確率を最大にする最適の伸展度があるとする、パッチ形成でそれ以下の伸展であった場合は次の伸展が電流を増大させるのであろう。これまで Ca チャネルに対する伸展の効果についての報告は皆無であるが、本研究で軽度の変化の可能性が示唆された。

### 2. Ca チャネルの磷酸化による修飾

カテコルアミンは  $\beta$  受容体に結合し、アデニルシクラーゼを活性化して cAMP 濃度を増加し、ついで A-キナーゼを活性化して Ca チャネルを磷酸化する。Ca チャネルの磷酸化は Ca 電流を増大するが、この増大のチャネル機序を単一 Ca チャネル電流記録で解析した。イソプレナリンは脱分極ステップの反復でえられる利用率を 0.4 から 0.7 に増大した。速いゲート過程の修飾による開確率の変化は見られなかった。脱分極パルスを多数反復した際の、ブランク掃引とノンブランク掃引の連続数のヒストグラムから、Ca チャネルの遅いゲート過程を解析した。チャネルの状態には利用可能状態 (S) と電位依存性不活性化状態 ( $F_1$ ) と電位非依存性不活性化状態 ( $F_2$ ) 二つの利用不可能状態がある。イソプレナリンは  $F_1SF_2$  モデルでの S と  $F_1$  および S と  $F_2$  の間の遷移を修飾してチャ

ネルが S にある割合を増し、利用率を増大した。即ち、リン酸化は遅いゲート過程の電位依存性および電位非依存性の両方のゲート過程を修飾することが明らかになった（文献 8）。

交感神経からの  $\beta$  刺激物質の作用下に、迷走神経からのアセチルコリンや、低酸素下の代謝で生ずるアデノシンは Ca 電流を抑制することが知られている。アデノシンの抑制作用のチャネル機序を解析した。アデノシンはイソプレナリンで増大した平均電流を減少した。この減少はテオフィリンで除去されたので、A1 アデノシン受容体結合による。減少に際して開確率は不変であり、イソプレナリンで増大した利用率がアデノシンによって対照時の程度に、減少した。このように、アデノシンはイソプレナリンの効果を除去したが、これはアデノシンによる cAMP 減少によく対応する（文献 9）。

### 3. 伸展受容チャネルの検索

100mMBa ピペットでチャネル電流の生じないパッチに、100mmHg 以下の陰圧または陽圧を加え伸展受容性チャネルの存在を追求した。図 2 は 30mmHg の陽圧に応じて生じた内向向き電流を示す。-50mV で 2pA 程度の電流である。ゲート過程は膜電位によらない。開孔時間のヒストグラムは指数関数的で時定数は 1ms であった。振幅は脱分極でほぼ直線的に減少し、0mV 近くで逆転し、コンダクタンスは約 50pS であった。Ba と K を透過させる非選択的カチオンチャネルの可能性はある。正常イオン環境では Na や Ca が流入し細胞に影響しうる。しかし、人工的な膜の可逆的破壊の可能性もあり、この判別のためにもイオン選択性などのさらなる研究が必要である。

### 3) 心肥大における情報伝達系の検討

戸嶋 裕徳

#### 目的

心肥大の発生には交感神経-カテコラミン系が関与している可能性は古くから推測されている。一方圧負荷肥大心においては圧受容体を介しての細胞内情報伝達系の関与が考えられている。そこで我々は生理的肥大心である圧負荷肥大心および先天的肥大心である SHR を用い以下の二研究により心肥大と交感神経系、情報伝達系の関連および変化について検討した。

[研究 1] 生理的肥大心である圧負荷 (復部大動脈縮窄 3 週間) 肥大心における交感神経および情報伝達系の変化。

[研究 2] 先天的心肥大素因を有する SHR の心肥大は発生過程および退縮における情報伝達系の変化

#### 方法

対象: [研究 1] 10 週齢 Wistar 系雄性ラットを用い、腹部大動脈の上腸間膜動脈分岐部より上部を 50% に縮窄 (aortic constriction; AC) し圧負荷肥大心を作成した。対照には縮窄以外は同様な手術 (sham operation; sham) を、施行した rat を用い、3 週間後に実験に供した。

[研究 2] 5 週齢 (5W) の SHR、WKY、Wistar 3 群間および SHR 5 週齢 (5W) と 14 週齢 (14W) の 2 群間での心肥大に関与するといわれる情報伝達系について検討し、加えて SHR 10 週齢から 4 週間  $\alpha_1$  遮断薬 (bunazosin) を 1mg/kg (B-1)、2mg/kg (B-2) 投与した動物を用いて心肥大の退縮と  $\alpha_1$  受容体情報伝達系の変化を比較検討した。

測定項目: 研究 1、研究 2 において以下の項目を測定した。

#### (1) 大動脈圧測定

大動脈圧の測定はペントバルビタール麻酔後右総頸動脈よりミラーカテーテル (2F) を挿入し測定した。

#### (2) 血清および心筋エピネフリン、ノルエピネフリンの測定。

血清エピネフリン (E)、ノルエピネフリン (NE) は大動脈圧測定と同様に麻酔し、右総頸動脈より採血した。心筋内 E、NE は左室摘出直後液体窒素にて急速に凍結し、5% TCA で除蛋白後、血清と共に高速液体クロマトグラフィーにて分析定量した。

#### (3) 心筋 $\alpha_1$ 受容体の測定

心筋  $\alpha_1$  受容体の測定は左室心筋より Raum らの方法により粗膜分画を調節し、 $(^{125}\text{I}-4\text{-hydroxyphenyl})\text{-ethyl-aminomethyl-tetraol one (HEAT)}$ にて radio binding assay を行い、Scatchard plot にて最大結合数 (Bmax; 受容体数) と解離定数 (Kd; 親和性) を算出した。

#### (4) 心筋 inositol 1,4,5-triphosphate 含量

心筋 inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) は左室を約 50mg 切除後、液体窒素で凍結した後す速く 0.4M PCA にて抽出し、D-my- [<sup>3</sup>H] inositol 1,4,5-trisphosphate を用い抽出した IP<sub>3</sub> と競合的に IP<sub>3</sub> 結合蛋白に結合させ測定した。

#### (5) 心筋 protein kinase C 活性

心筋 protein kinase C (PK-C) は 50mM Tris-HCL buffer を用いて抽出し、グリセオー

ル中で $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。その活性は $50\mu\text{M}$  [ $^{32}\text{P}$ ] r-ATP を用いて行った。

#### 結果および考察

研究 1) 手術後 3 週で測定した収縮期大動脈圧 (mmHg) は sham 群  $121\pm 11$  に対し AC 群では  $188\pm 26$  と約  $70\text{mmHg}$  上昇した ( $p<0.001$ )。一方心拍数は sham 群  $379\pm 32$  に対し AC 群では  $405\pm 17$  と両群間に差はなかった。心重量、左室重量、左室/体重比は表 1 に示すようにいずれも AC で有意に増加し、腹部大動脈を 50% 縮窄した動物では 3 週間後に十分な圧負荷がみられ心肥大の形成が認められた。心筋内 E (ng/gw.w.) は sham 群  $8.83\pm 2.40$  に対し AC 群  $10.70\pm 1.81$  と変化はみられなかったが一方心筋 NE (ng/gw.w.) は sham 群  $643\pm 77$  に対し AC 群  $495\pm 52$  と有意に低下した ( $p<0.001$ )。これは従来の報告と一致した結果で心肥大に伴う交感神経の dilution 効果に加え交感神経での turn over の亢進 reuptake の低下なども考慮する必要がある。一方心筋  $\alpha_1$  受容体数 (Bmax: fmol/mg protein) は図 1 に示すように sham 群  $33\pm 7$  に対し AC 群  $47\pm 8$  と AC で有意に増加し、親和性 ( $K_d$ ; pM) には両群間に差はなかった。このことは肥大心の NE 減少に伴う二次的な変化 (up-regulation) が心肥大の発生と関連する一次的な変化が問題になるために心筋内  $\text{IP}_3$  を検討した。心筋内  $\text{IP}_3$  (pmol/mg w.w.) の含量は sham 群  $12.7\pm 2.7$  に対して AC 群  $12.8\pm 3.4$  と両群間に差はみられず本モデルでは総体的な  $\alpha_1$  受容体系の機能は亢進していないものを考えられた。また圧負荷肥大心における  $\alpha_1$  受容体数の増加は NE 減少を代償するための二次的な up-regulation であることを示唆する所見と考えた。

以上より生理的心肥大である圧負荷肥大心では心肥大の発生には  $\alpha_1$  受容体系の役割は少ないものと考えられた。

研究 2) SHR、WKY、Wistar の各 5W の左室重量/体重比は表 2 に示すように SHR では 5W で既に左室重量/体重比の増加を示し、同時に心筋  $\text{IP}_3$  含量は有意差はないものの増加傾向を示し、PK-C 活性は WKY、Wistar に比べ有為に増加していた。したがって血圧の充分な上昇がみられない 5W では SHR は WKY、Wistar に比べ既に左室重量/体重比が増加し心肥大を認めた。心筋  $\text{IP}_3$  含量は turn over などの問題もあり今回有意差はみなかったが増加傾向、かつ PK-C 活性は有意に増加しており、 $\alpha_1$  受容体機能は亢進しているものと考えられた。

SHR 5W に対し 14W を比較すると体重 (g) は 5W は  $107\pm 9$  に対して 14W は  $285\pm 14$  と増加、左室重量 (mg) は 5W は  $318\pm 14$  に対して 14W は  $760\pm 42$  と増加しているものの左室重量 (mg) / 体重 (g) 比は 5W は  $2.9\pm 0.2$  に対して 14W は  $2.6\pm 0.2$  と低下した。これは従来の報告と同様に心重量の伸びに対して体重の伸びが上回ることによるもので文献的にもこの時期では心肥大がみられており我々のデータでも Wistar、WKY に比較して SHR では心肥大を認めた。表 3、に示すように血清 E には差はなく、血清 NE は 14W で有意に増加した。一方心筋 E 及び NE は 14W で有意に低下した。心筋  $\text{IP}_3$  含量は 14W で 2 倍と有意に増加した。このように血圧が上昇しかつ心筋肥大を認めた。14W において心筋  $\text{IP}_3$  が血清 NE の上昇に伴って増加しており、SHR において 14W は 5W に比較して心筋  $\alpha_1$  受容体系機能の亢進が推測された。

表 4 に示すように  $\alpha_1$  遮断薬は SHR に対し投与量依存性に平均大動脈圧、左室重量を減少させた。一方心拍数に対して  $\alpha_1$  遮断薬は影響を与えなかった。血清 NE および E は表 5 に示すように  $\alpha_1$  遮断薬投与量に依存して増加したが、心筋 NE および E は 4 群間に差はみら

れなかった。また図 2 に示すように心筋  $IP_3$  含量は WKY は  $11.9 \pm 1.2$ 、SHR は  $10.8 \pm 1.6$  に対して SHR B-1 は  $8.2 \pm 0.5$ 、SHR B-2 は  $6.1 \pm 1.2$  と  $\alpha_1$  遮断薬投与群では投与量依存性に  $IP_3$  含量は減少した。したがって SHR における心肥大の抑制には十分な降圧と共に  $\alpha_1$  受容体系の抑制が重要であることが推測された。

以上より SHR での心肥大の発生過程において  $\alpha_1$  受容体機能の亢進が深くかかわっていることが推測された。

#### 4) 心筋の収縮中および energetics の面からみた肥大心の病態生理の解析

武田 信

心肥大は持続する負荷に対してポンプ機能を維持するための適応と考えられる。しかし同じ心肥大でも原因が異なる場合、心筋の機能や生化学の面からみて違いがあるかどうか、また心肥大で変化した心筋の収縮力や生化学が肥大の退縮とともに可逆性を有するかどうかを検討するのが本研究の目的である。肥大心を便宜上生理的肥大心と病的肥大心に分け、生理的肥大心はラットに長期水泳トレーニングを施して作成。病的肥大心はラットの腹部大動脈狭窄による圧負荷肥大心、腹部大動脈、下大動脈シャントによる容量負荷肥大心を作成した。心肥大の退縮は腹部大動脈狭窄のクリップを開いて圧負荷を除去したもの、Goldblatt ラットの腎血管狭窄側腎摘出によるもの、また自然発症高血圧ラット (SHR) に対する降圧剤投与によって得た。心筋収縮力は左室乳頭筋の等尺性発生張力を測定、心筋生化学はピロリン酸ゲル電気泳動で分離した左室心筋ミオシンアイソザイムで表される心筋 energetics について検討した。

##### (方法)

水泳トレーニング：9 週齢の雄の Wistar ラットに毎日 180 分、4 週間水泳トレーニングを施行。

腹部大動脈狭窄：10 週齢の雄の Wistar ラットの腹部大動脈にシルバークリップで狭窄を作成、6 ヶ月放置。

腹部大動脈・下大静脈シャント：10 週齢の雄の Wistar ラットに顕微鏡下でシャントを作り 10 週間放置。

心肥大の退縮：7 週齢の雄の Wistar ラットの腹部大動脈にシルバークリップで狭窄を作成、10 週を経た時点でクリップを開き、さらに 4~5 週放置。また 6 週齢の雄の Wistar ラットの一側腎動脈にシルバークリップで狭窄を作り腎血管性高血圧ラットを作成、血圧上昇後 4 週の時点で狭窄側腎摘出を行い血圧を下降せしめた。一方、20~22 週齢の雄の SHR に対して bunitrolol (30~40mg/kg/日)、verapamil (30~40mg/kg/日)、hydralazine (80~90mg/kg/日)、captopril (50~60mg/kg/日) をそれぞれ 8~10 週間経口投与。

心筋収縮力の測定：顕微鏡下で左室乳頭筋を切除し灌流槽内に垂直につるした。95%O<sub>2</sub>・5%CO<sub>2</sub>の混合ガスで通気した Tyrode 液 (Ca<sup>2+</sup>1.1mM、pH7.4、32°C) で灌流、刺激頻度 0.2Hz で等尺性収縮を行わせ、また 10<sup>-7</sup>M の isoproterenol、10<sup>-5</sup> M の DBcAMP に対する収縮力の反応性も測定した。

心室筋ミオシンアイソザイム：左室自由壁からミオシンを抽出、ピロリン酸ゲル電気泳動でアイソザイムに分離、デンシトメーターでアイソザイムパターンを決定した。ゲルは 3.8%アクリルアミド、0.12%N,N'-メチレンビス・アクリルアミドから成り、泳動液は 10%グリセロール、20mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (pH8.8) を含む。泳動は 2°C で 25 時間行った。

##### (結果)

水泳トレーニングによる肥大心では心室重量/体重比は非トレーニング群より約 26% 増加、最大発生張力 T、張力発生最大速度 +dT/dtmax はいずれもトレーニング群で有意ではないが約 10% 増加していた。カテコラミンに対する反応性はトレーニング群の方が有意に高く、左室心筋ミオシンアイソザイムは水泳トレーニングによって VM-1 (V<sub>1</sub>) が増加した。腹部大動脈狭窄による圧負荷肥大心では 6 ヶ月の負荷によって心室重量は正常群より

約 50% 増加、心筋収縮力も最大発生張力には有意な変化を認めなかったが  $+dT/dt_{max}$  は低下、カテコラミンに対する反応性も有意に低下し、さらに DBcAMP に対する反応性も同様に肥大心で低下した。左室心筋ミオシンアイソザイムは VM-3 ( $V_3$ ) が増加した。容量負荷である腹部大動脈・下大静脈シャント群では 10 週間の負荷で約 60% の心室重量増加を示し、左室乳頭筋の等尺性収縮では最大発生張力は有意差がなかったが、 $+dT/dt_{max}$  は腹部大動脈狭窄圧負荷肥大心と同様低下した。カテコラミン及び DBcAMP に対する心筋収縮力の反応性は、容量負荷肥大心で低下傾向をみせたが有意ではなかった。左室心筋ミオシンアイソザイムも圧負荷肥大心と同様 VM-3 ( $V_3$ ) が増加した。

腹部大動脈狭窄ラットの狭窄を解除した群では、そのまま狭窄を続けた群に比べて約 20% 心室重量は低下し正常ラットと有意差はなかった。また最大発生張力は変わらないものの張力発生最大速度  $+dT/dt_{max}$  は肥大心で有意に低下、圧負荷の解除によって再び上昇し正常群に近づいた。(図 1. AC (0) : クリップを開いた群)。左室心筋ミオシンアイソザイムについても、肥大心での VM-3 の増加に対して正常パターンに近い VM-1 ( $V_1$ ) 有意のものに変化した(図 2. AC' : クリップを開く時点のもの)。Goldblatt ラットでも同様に、途中で狭窄側の腎摘出を行うことによって血圧は正常に近いところまで低下(図 3)、心室重量も減少した。低下傾向を示した張力発生最大速度  $+dT/dt_{max}$  は腎摘出による降圧でほぼ正常に回復(図 4)、左室心筋ミオシンアイソザイムも圧負荷で増加していた VM-3 ( $V_3$ ) が腎摘出群では減少し、ほぼ正常のアイソザイムパターンに復した(図 5)。

SHR に降圧剤を投与した場合、bunitrolol、verapamil 投与群は血圧、心室重量、左室心筋ミオシンアイソザイムへの影響は著明ではなかったが、hydralazine、captopril 投与群を比べてみると、どちらも血圧は投与前に比べて約 35% の低下を認めたが、心室重量/体重比の変化は hydralazine は非投与群と有意差はなく、captopril 投与群では約 18% の低下を認めた。左室心筋アイソザイムは hydralazine 投与群も VM-1 が増加したが、captopril 投与群での VM-1 の増加が著明であった。

#### (考察)

本研究ではラットの各肥大心において摘出左室乳頭筋の最大発生張力はそれぞれの対照群である正常ラット心筋と有意差はなく、張力発生最大速度  $+dT/dt_{max}$  はトレーニング肥大心では上昇傾向を、圧負荷、容量負荷肥大心では低下した。このことはトレーニング肥大心と圧負荷あるいは容量負荷肥大心とでは心筋々小月体 (SR) の動きを始めとした心筋収縮力に関する機能も異なった反応をすることが推測される。後で述べるようにトレーニング群では心筋ミオシンアイソザイムは VM-1 ( $V_1$ ) が増加、圧負荷、容量負荷肥大心では VM-3 ( $V_3$ ) が増加したことを考え合わせると、速度パラメーターは発生張力の大きさよりも心筋の構造的変化の影響を受け易いという考えと一致する (1, 2)。圧負荷肥大心で心筋収縮力のイソプロテレノールに対する反応性が低下し、さらに DBcAMP に対する反応性も低下していたことは受容体後の反応過程の関与も考えられ、心筋細胞の cAMP で制御される系がミオシンアイソザイムパターンの変化に影響される (3) ということから考えると、ミオシンアイソザイムの変化も受容体後の反応過程の一つとして何か役割を有している可能性もある。受容体後の反応過程の関与については糖尿病ラット、水泳トレーニングを施した糖尿病ラット、甲状腺ホルモン過剰あるいは欠乏ラットなどの動物モデルでも推測してきた (4, 5, 6)。



心室筋ミオシンはラットではピロリン酸ゲル電気泳動で三つのアイソザイムに分離され (7, 8)、VM-1、2、3 ( $V_{1,2,3}$ ) の順に泳動度、ATPase 活性が高い。圧負荷肥大心における心室筋ミオシンアイソザイムの VM-3 ( $V_3$ ) への移行は心筋収縮のエネルギー効率を良くして発生張力を保持するための適応と考えられる (9, 10, 11, 12)。本研究で腹部大動脈狭窄および Goldblatt ラットの圧負荷肥大心で摘出左室乳頭筋の最大発生張力は変わらず、心室筋ミオシンアイソザイムが VM-3 ( $V_3$ ) に移行したのも適応であろうし、負荷が取れて肥大が退縮すると元の VM-1 ( $V_1$ ) 優位のパターンに戻ったものと思われる。

アンジオテンシン II (AT) 等の血管作動性物質が心筋や血管細胞内  $Ca^{2+}$  動態機構を変化させる事を昨年度は示した。今年度はこれを更に細胞分化の過程で検討するため以下の実験を行った。

[方法] 血管平滑筋細胞を収縮型と分泌型分化にさせるために①収縮型として分離直後の細胞と  $G_0$  期で細胞周期の停止した二種の状態で、②分泌型として対数増殖期細胞を用いた。③また今年度後期の実験で細胞分裂を強制的に起こさせるために血小板由来成長因子 (PDGF) を加えた。④ $Ca^{2+}$  感受性蛍光色素を負荷後、 $Ca^{2+}$  分布の二次元画像を演算処理で求めた。

[結果] ①K 脱分極と AT II に対して収縮型の血管平滑筋は全て反応し、②増殖期のみ一過性に全ての反応性が低下した。③カフェインに対しては分離直後の収縮型の細胞のみ反応したが以後急速に反応する細胞の割合が低下した。④しかしその反応強度自体は培養末期の収縮型で増強した。⑤また PDGF を加えた結果では細胞分裂が始まると同時に上記 3 種の刺激に対する反応がやはり低下した。

[考察] 以上の結果は①各種 Ca チャネルの発現が細胞の成長の表現型に依存する。②血管作動性物質の作用が細胞の置かれた状態で反応性が異なることを示し、今後の動脈硬化病変における血管の収縮性の検討に作用を受ける平滑筋の側にも多様性を考える必要があることが示唆された。

## 心肥大に伴う心筋収縮蛋白の変化とこれに対する交感神経活性の影響

東京女子医大心研内科 細田 瑛一

共同研究者： 木全 心一

川名 政敏

心筋細胞は負荷に対して肥大という形で適応し、生化学的には収縮蛋白、Ca 調整蛋白などの構造蛋白発現の促進または抑制、isoform の変換などが起こるといわれている。特に心筋 myosin については以前より研究が進んでおり、圧負荷により myosin isozyme の  $\alpha$  type から  $\beta$  type へ蛋白レベルも遺伝子レベルも変換を起こすことが知られ (1) (2)、我々もヒト心筋において同様の变化が起こることを報告してきた (3) (4)。更に近年心肥大に伴い細胞内 Ca 濃度の調節に重要な役割を果たしている sarcoplasmic reticulum (SR) の Ca ATPase の遺伝子発現が変化することが報告されている (5) (6)。

一方心肥大形成時には交感神経活性が重要な役割を演じるとされており、急性の交感神経受容体刺激は A-kinase 系または C-kinase 系を介して種々の細胞内 Ca 調節機構を変化引き起こすことが知られている (7)。しかし心肥大形成に必要な“日”あるいは“週”の単位で交感神経活性が変化した場合に心筋細胞の主な構造蛋白がどの様に生化学的に変化を受けるかどうかについては未だに明らかではない。

そこで今回我々は心臓交感神経活性自身が心筋代謝にどのような影響を与えるかを明らかにし、ひいては心肥大に及ぼす影響を明らかにする目的で、心筋の主な構造蛋白であり、収縮・拡張特性を規定する重要な因子である myosin および SR Ca ATPase が、交感神経活性によりどのような発現調節を受けるかについて検討した。

### [対象と方法]

日本家兎 34 羽を以下の 4 群に分けて実験を行った。a) 除神経群 (n=12) ; 頸部切開により両側星状神経節切除を施行。b) sham 群 (n=10)。c) Isoproterenol (Iso) 投与群 (n=7) ; Iso 1mg/kg/day の皮下注を 1、3 週間施行。d) 圧負荷群 (n=5) ; 腹部大動脈に coarctation (CoA) を作成。a、s、d 群は 3 週間後、b 群は投与終了後に心臓を摘出して、以下の項目について検討した。

#### 1) 心筋 norepinephrine 含量 :

高速液体クロマトグラフィー・電気検出器 (HPLC-ECD) を用いて測定。

#### 2) 心筋 myosin isozyme の分離・定量 :

Hoh らの方法に準じてピロリン酸ゲル電気泳動により心筋 myosin isozyme を分離、laser densitometru 法により %V1、V2、V3 の定量を行った。これにより %  $\alpha$  myosin = % V1 + 1/2%V2、%  $\beta$  = 1/2%V2 + %V3 の式により  $\alpha$  タイプと  $\beta$  タイプの相対含量とした。

#### 3) 心筋 SR Ca-ATPase 遺伝子発現 :

心筋細胞より hot phenol 法により total RNA を抽出し、agarosegel 電気泳動後 nylon filter に transfer した。32P にて label した SR Ca-ATPase に対する DNA probe を用いて、northern blotting を行い、mRNA の発現を検討した。

#### 4) 血中 norepinephrine、epinphrine、thyroxine を radioimmunoassay にて測定した。

## [結果]

- 1) 除神経、Iso 投与前後で血圧には変化はなかった。心拍数は Iso 群で  $242 \pm 27$  から  $289 \pm 45 \text{ beat/min}$  へ増加した。CoA により  $44 \pm 15 \text{ mmHg}$  常勝した。
- 2) 心重量/体重 (%) は除神経群では Iso 群で  $0.24 \pm 0.03\%$  であり対象群と差はなかったが、Iso 群では  $0.31 \pm 0.03\%$ 、圧負荷群では  $0.34 \pm 0.06\%$  と有意に心重量の増加が見られ ( $p < 0.01$ ) 肥大が形成された。
- 3) 血中 norepinephrine、epinephrine、thyroxine レベルには 4 群間で差はみられなかった。
- 4) 心筋 NE 含量は除神経群で  $6 \pm 14 \text{ ng/g}$  であり対照群  $2016 \pm 578 \text{ ng/g}$  に比べて著明に低下していた ( $p < 0.01$ )。
- 5) Myosin isozyme :

図 1 に除神経群のピロリン酸ゲル電気泳動を示す。図のように除神経群では V1 のピークが消失し、圧負荷と同様の V3 のみの泳動パターンになっている。これに対して Iso 群では V1 のピークが大きくなり相対的に V3 のピークが減少している (図 2)。

これらの結果をまとめると (表 1)、除神経群では有意に V1 が減少して V3 は増加した。また Iso 投与により有意に V1 は増加、V3 は減少した。

- 6) SR Ca-ATPase mRNA 発現 :

図 3 に除神経群の SR Ca-ATPase mRNA の northern blot を示す。図のように対照群に比べて明らかに mRNA の発現が減少していた。

図 4 に Iso 群の SR Ca-ATPase mRNA の発現について示す。Iso 投与 1 週間では Ca-ATPase mRNA は明らかに抑制されているが、3 週間後の心筋では対照群のレベルまで復していた。

## [考案]

### 1. myosin isoform 変換に対する交感神経活性の影響

今回の研究から *in vivo* の系に於て交感神経の活性低下により心筋 myosin は  $\alpha$  タイプから  $\beta$  タイプへ isoform の変換が起こること、心臓交感神経  $\beta$  受容体刺激により  $\beta$  から  $\alpha$  に変換することが初めて示された。心筋に対する交感神経系の関与については、Simpson らは rat の培養細胞を用いた実験から心筋細胞の蛋白合成の亢進は  $\beta$  受容体刺激でなく  $\alpha$  受容体刺激で起こると報告している (7)。その後この  $\alpha$  受容体刺激は細胞内で PI response を介して C-kinase を活性化して種々の蛋白合成を促進するとされ、心肥大を起こす主要な細胞内情報伝達経路は C-kinase 系であると考えられてきた。しかしこの実験系が rat の新生児期の心筋細胞を用いており、この時期は myosin の isoform を含めた構造蛋白が日を追って変化する時期であり、この系での反応がそのまま adult の心筋細胞でも起こっているかどうかについてはかなり疑問が残る。

今回の adult rabbit を用いた我々のデータでは  $\beta$  受容体刺激はそれ自身生体内で強い心肥大促進因子であり、この時に圧負荷時と対照的に myosin は  $\alpha$  タイプに変換されることが初めて明らかになった。ただしこの研究は *in vivo* の実験であるため、isoproterenol の心外作用—すなわち (1) 血行動態の変化、(2) 副腎に作用して内因性の epinephrine 放出を刺激すること、(3) 甲状腺に作用して甲状腺ホルモンレベルを上昇させることなどが、心臓に対する直接作用とは別に  $\alpha$  myosin の増加を来した可能性は存在する。しかし少

なくとも myosin isoform に影響することが知られている血圧や血中 throxine レベル、さらに血中 norepinephrine、epinephrine レベルには全ての群で差はなかったことからこれらの心外作用の関与は小さいと推定される。今後は adult の心筋培養細胞を用いた検討で  $\alpha$ 、 $\beta$  個々の受容体刺激作用を明らかにする必要がある。

## 2. Ca cycling に対する交感神経の影響

myosin の 2 つの isoform のうち  $\alpha$  タイプは myosin ATPase 活性が高く、速い Ca の動きを必要とするのに対し、 $\beta$  タイプは ATPase 活性は低く対応する Ca cycling の速度が遅いことは no 以前よりよく知られている。さらに SR Ca-ATPase は SR における Ca 取り込みの速度を規定する酵素であり、さらにひいては Ca 放出にも関係する。このため myosin の isoform とこの SR Ca-ATPase は Ca cycling の速度を規定する重要な因子であり、両者の変化は収縮・拡張特性に大きく影響すると考えられている。

今回の実験では圧負荷による肥大心では SR Ca-ATPase の mRNA の発現が低下していた。これは myosin の  $\alpha$  から  $\beta$  への変換と対応して Ca cycling を遅くする方向の変化であり、このことは生理学的に肥大心では収縮・拡張速度が遅くなっている事実を生化学的によく説明するものである (5) (6)。一方この SR Ca-ATPase の遺伝子発現に対する交感神経系の影響を見ると、活性低下 (除神経) 群では明らかに低下しており myosin の  $\alpha$  への変換と対応して、Ca cycling を遅くする方向の変化であった。しかし isoproterenol 投与による  $\beta$  受容体刺激群は時期によって 2 相性の反応を示し、投与後 1 週間で一時低下しその後回復した。 $\beta$  刺激による myosin の変化は投与早期から  $\alpha$  タイプへの 1 方向性の変化であり、SR Ca-ATPase がなぜこのような変化を示すのかについては、未だ不明である。今後より詳細な SR Ca-ATPase 遺伝子発現の時間経過を検討すること、さらに蛋白レベルの検討が必要である。

## [結語]

心臓交感神経活性は心筋 myosin isoform の発現、SR Ca-ATPase の遺伝子発現に関与することが明らかにされ、心肥大における生化学的なレベルにおける心臓交感神経系の重要性が示唆される。

## [文献]

- (1) Nagai R, Pritzl N et al: Myosin isozyme synthesis and mRNA levels in pressure-overloaded rabbit hearts. Circ Res 1987 ; 60:692.
- (2) Izumo S, Lompre AM et al: Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid-induced signals. J Clin Invest 1987 ; 79:970.
- (3) Kawana M, Kimata S et al: Isozymic changes in myosin of human ventricular myocardium induced by pressure overload. Circulation 1986 ; 74 II-82.
- (4) Tsuchimochi H, Sugi H et al: Isozymic changes in myosin of human atrial myocardium induced by overload. J Clin Invest 1984 ; 74:662
- (5) Nagai R, Zarain-Heerzberg A et al: Regulation of myocardial  $Ca^{2+}$ ATPase and

phospholamban mRNA expression in response to pressure overload and thyroid hormone. Proc Natl Acad Sci USA 1989 ; 86:2966.

- (6) Komuro I, Kurabayashi M et al: Molecular cloning and characterization of a  $Ca^{2+}$  +  $Mg^{2+}$  -dependent adenosine triphosphatase from rat cardiac sarcoplasmic reticulum. J Clin Invest 1989 ; 83:1102.
- (7) Simpson P : Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an  $\alpha 1$ -and  $\beta 1$ -adrenergic reseptor interaction. Circ Res 1985 ; 56:884

表 1 交感神経活性の変化及び圧負荷時の心筋 myosin isoform の変化

	V1 ( $\alpha$ )	V3 ( $\beta$ )
対照群	15.6 $\pm$ 6.9%	84.4 $\pm$ 7.0%
除神経群	6.7 $\pm$ 6.81 $\cdot$	93.3 $\pm$ 6.8 $\cdot$
Iso 群	32.5 $\pm$ 10.4 $\cdot\cdot$	67.5 $\pm$ 10.4 $\cdot\cdot$
圧負荷群	1.8 $\pm$ 2.7 $\cdot\cdot$	98.2 $\pm$ 2.7 $\cdot\cdot$

(\*p<0.05, \*\*p<0.01)

図の説明

図 1 : 除神経による心筋 myosin ピロリン酸ゲル電気泳動パターンの変化。

図 2 : Isoproterenol 投与による心筋 myosin のピロリン酸ゲル電気泳動パターンの変化

図 3 : SR Ca-ATPase mRNA の northern blot 解析 ; 除神経による変化

図 4 : SR Ca-ATPase mRNA の northern blot 解析 ; Isoproterenol 投与による変化