

氏名	藤田修一
(ふりがな)	(ふじた しゅういち)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成25年1月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Atrial natriuretic peptide exerts protective action against angiotensin II-induced cardiac remodeling by attenuating inflammation via endothelin-1/endothelin receptor A cascade (心房性ナトリウム利尿ペプチドはエンドセリン-1/エンドセリンA受容体を介する炎症カスケードの活性化を抑制することによりアンジオテンシンIIによる心臓リモデリングに対して保護的に働く)
論文審査委員	(主) 教授 朝 日 通 雄 教授 浮 村 聡 教授 勝 間 田 敬 弘

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 《背景と目的》

レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAAS 系) は血圧を調整する因子である。心不全においては RAAS 系が亢進し、血中アンジオテンシン II (Ang II) 濃度が増加する。ラットへの Ang II 投与により心臓、血管のリモデリング、心筋肥大、線維化、酸化ストレス、動脈硬化を促すことが知られている。

炎症とは有害刺激による局所の損傷から組織の再生・修復に至る過程であり、関与する細胞の一つにマクロファージがある。ラットの大動脈縮窄高血圧モデルでは、心筋の血管周囲へのマクロファージの集簇およびマクロファージを誘導する MCP-1 の心筋での発現

増加が認められる。マクロファージは TGF- $\beta$ 、線維芽細胞増殖因子等を産生し、線維芽細胞を遊走させる。抗 MCP-1 抗体を投与すると心筋の TGF- $\beta$  の発現が減少し線維化が改善することから、炎症は TGF- $\beta$  を介して線維化のトリガーになると報告されている。

テネイシン C (TN-C) は細胞外マトリックスに局在する糖蛋白であり、炎症、組織障害などが存在する部位で発現が亢進する。我々は、TN-C のノックアウトマウスを用い、薬剤 (concanavalin A) 投与による肝炎が抑制されること、左冠動脈の結紮による心筋梗塞後の心筋線維化が抑制されることを報告した。

急性心筋梗塞患者に心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) を投与すると、Ang II、アルドステロン、エンドセリン-1 (ET-1) の血中濃度が減少することから、ANP による RAAS、ET-1 の抑制が示唆される。我々は、ラットの心筋培養細胞において、Ang II による ET-1 の発現増加を ANP が抑制することを報告した。

今回、我々は Ang II 投与によるラット高血圧リモデリングモデルを作製し、ANP 投与により、心筋の炎症、線維化が抑制されるか否か *in vivo* で検討し、TN-C については免疫染色による評価、mRNA の発現を検討した。また、炎症、線維化における ANP の作用機序に関して、*in vitro* での解析を行った。

## 《方 法》

8 週齢の Wistar-Kyoto ラットを用いて Control 群 (N=10)、Ang II 群 (N=10)、Ang II+ANP 群 (N=10)、ANP 群 (N=5) の 4 群を作製した。Control 群は生理食塩水をインフュージョンポンプにより経静脈的に 14 日間投与した。Ang II 群は皮下に埋め込んだ浸透圧ミニポンプにより Ang II を 1 $\mu$ g/kg/min で 14 日間投与した。Ang II+ANP 群は同量の Ang II に加えて ANP を 0.1 $\mu$ g/kg/min で経静脈的に 14 日間投与した。ANP 群は同量の ANP のみを 14 日間投与した。14 日間の経過中、血圧、心拍数、体重を 5 回測定した。14 日目に心エコーを施行し、収縮能、拡張能を評価した後屠殺し、心重量を測定し試料を採取した。組織学的検討として、HE 染色で心筋細胞横径、Sirius Red 染色で心筋の線維化率を計測した。また、抗 CD68 抗体による免疫染色を行い、マクロファージの数を計測

し炎症の評価を行った。抗 TN-C 抗体による免疫染色を行い、TN-C の発現細胞を検討するため抗 TN-C 抗体と抗  $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ SMA) 抗体、抗 TN-C 抗体と抗 CD68 抗体の二重蛍光染色を行った。Real-Time RT-PCR により collagen type I(coll-I)、collagen type III(coll-3)、TN-C、MCP-1、ET-1 の mRNA の発現を測定した。また、ラットの心臓線維芽細胞を用いて、Ang II、ANP 投与による ET-1、TN-C の mRNA の発現、ET-1 投与による TN-C の mRNA の発現を測定した。また、Ang II 投与下で、非選択性の ET-1 ブロッカー (bosentan)、エンドセリン A 受容体の選択的ブロッカー (BQ123) およびエンドセリン B 受容体の選択的ブロッカー (BQ788) を用いて、各々 TN-C の mRNA の発現を測定した。

## 《結 果》

Control 群と比べて、Ang II 群と Ang II+ANP 群では血圧の上昇が認められた。Ang II 群と Ang II+ANP 群では血圧に差は認められなかった。心エコーの結果より ANP による心機能の改善が示唆された。Ang II 投与により心筋細胞横径が増大し、ANP 投与により縮小した。Ang II 投与により心筋線維化率が増加し、ANP 投与により減少した。Ang II 投与により coll-1、coll-3 の mRNA の発現亢進が認められ、ANP 投与により抑制された。Ang II 投与により心筋に浸潤したマクロファージの数が増加し、ANP 投与により減少した。Ang II 投与により TN-C 陽性の面積率が増大し、ANP 投与により縮小した。Ang II 投与により TN-C、MCP-1 の mRNA の発現が亢進し、ANP 投与により抑制された。蛍光二重染色ではほとんどの  $\alpha$ SMA 陽性細胞は抗 TN-C 抗体では染色されず、CD68 陽性のマクロファージは全く染色されなかった。ラットの心臓線維芽細胞を用いた *in vitro* での解析で、Ang II 投与により ET-1、TN-C の mRNA の発現が亢進し、ANP 前投与によりそれらが抑制された。また、ET-1 投与により TN-C の mRNA の発現が用量依存性に亢進した。Ang II により亢進した TN-C の発現が、非選択性の ET-1 ブロッカー (bosentan)、エンドセリン A 受容体の選択的ブロッカー (BQ123) により抑制され、エンドセリン B 受容体の選択的ブロッカー (BQ788) では抑制されなかった。

## 《考 察》

本研究において、Ang II 投与によるマクロファージの心筋内での集簇が ANP により抑制された原因として、TN-C の発現の抑制が関与した可能性がある。また、TN-C のノックアウトマウスでは肝線維化や心筋梗塞後の線維化が抑制されることから、TN-C は線維化を促進すると考えられる。本研究において、Ang II 投与後に TN-C を投与する群と TN-C を投与しない群との比較はしていないが、Ang II 投与による線維化が ANP により抑制された原因に、TN-C の発現抑制が関与した可能性が考えられる。

本研究では、培養細胞において ET-1 刺激により TN-C の発現が亢進する結果が得られた。TN-C の発現亢進が、非選択性の ET-1 ブロッカーおよびエンドセリン A 受容体の選択的ブロッカーにより抑制され、エンドセリン B 受容体の選択的ブロッカーでは抑制されなかったことから、ET-1 がエンドセリン A 受容体を介して TN-C の発現を亢進させると考えられた。

現在まで、ANP が TGF- $\beta$ 、Smad3 の経路の抑制を介して線維化を抑制するとの報告がある。今回、Ang II による心臓リモデリングを抑制するメカニズムの一つとして ANP がエンドセリン A 受容体を介した ET-1 シグナルを減弱させることにより、炎症および線維化を抑制することが考えられた。

## 《結 論》

心房性ナトリウム利尿ペプチドはエンドセリン - 1/エンドセリン A 受容体を介する炎症カスケードの活性化を抑制することによりアンジオテンシン II による心臓リモデリングに対して保護的に働く。

## 論文審査結果の要旨

申請者はラットへアンジオテンシン II を持続投与し、高血圧を発症させ、心筋の肥大や壊死、線維化などの「リモデリング」が生じるモデルを作製した上で、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)の投与が、アンジオテンシン II による心筋の変化を抑制することが可能であるかどうかを検討している。また、心筋の炎症性変化や組織障害に密接に関連していることが知られているタンパク質であるテネイシン C(TN-C)の心臓における発現について、mRNA の定量と免疫組織染色による局在の 2 つの方向から検討している。

その結果、ANP 投与はアンジオテンシン II 投与による心筋細胞の肥大、線維化、炎症を改善することが確認されたが、ANP による血圧の変化は微弱であった。このことから、アンジオテンシン II は、昇圧作用とは独立して心筋リモデリングを惹起すること、ANP はこの現象を抑制することの 2 点が示唆される。申請者は、この点をさらに確認すべく、培養細胞系を用いて、血圧に影響されない実験系で検討している。その結果、培養細胞においても、アンジオテンシン II 刺激により TN-C の mRNA の発現亢進が認められること、また、ANP 投与によりエンドセリン-1(ET-1)および TN-C の mRNA の発現も抑制されることを示している。また、エンドセリン A/B 受容体非選択性の ET-1 ブロッカーやエンドセリン A 受容体の選択的ブロッカーではアンジオテンシン II による反応が抑制されることから、アンジオテンシン II がエンドセリン A 受容体を介したエンドセリンシグナルの活性化を通して心臓リモデリングを惹起するということが推定される。また、そのリモデリングに TN-C が関与している可能性が示唆された。本研究は、アンジオテンシン II による障害に対しても、ANP が抑制的に働くことを直接示したのものとして、意義がある検討であると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Heart and Vessels 2013, in press