

アンジオテンシンII受容体拮抗薬(TCV-116)の心肥大抑制 効果：自然発症高血圧ラット(SHR)での検討

奈良県立医科大学第1内科学教室

舩田 譲 二

SUPPRESSIVE EFFECT OF AN ANGIOTENSIN II RECEPTOR ANTAGONIST (TCV-116) ON MYOCARDIAL HYPERTROPHY IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS(SHR)

JOJI MASUDA

First Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received January 17, 1996

Abstract: The renin-angiotensin system is an important hormonal system that regulates volume and fluid homeostasis. Recently, it has been suggested that angiotensin II (A II) may directly cause cardiac hypertrophy and fibrosis by acting on myocardial cells. I investigated the preventive effect of an A II receptor antagonist (TCV-116) on the development of cardiac hypertrophy and fibrosis in spontaneously hypertensive rats (SHR) at 16 and 24 weeks of age through histopathological study, an A II receptor assay and studies of type-1 angiotensin II (AT-1) receptor messenger RNA (mRNA) expression. A II receptor density was determined by radiobinding immunoassay. The expression of A II receptor mRNA in myocardial cells was determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (rt-PCR). The groups of treatment with TCV-116, ACE inhibitor (enalapril) and hydralazine at 8, 16 and 24 weeks of age showed significantly lower systolic blood pressure than the no treatment group. The heart weight/body weight ratio, the diameter of myocardium and the percent area of myocardial fibrosis were significantly lower in the group of treatment with enalapril and TCV-116 than the group of treatment with hydralazine and non medicated SHR at 16 and 24 weeks of age. The density of A II receptor and the expression of AT-1 receptor mRNA were significantly higher in the group of treatment with enalapril and TCV-116 than the group of treatment with hydralazine and non medicated SHR at 24 weeks of age. The present study suggests that angiotensin II may be involved in the development of cardiac hypertrophy and fibrosis in SHR, and that the A II receptor antagonist inhibited the progression of cardiac hypertrophy and fibrosis via the A II receptor, and that the density of A II receptor and the expression of AT-1 receptor mRNA may be regulated by the stimulus to A II receptor.

Index Terms

angiotensin II receptor antagonist, cardiac fibrosis, cardiac hypertrophy, hypertension, spontaneously hypertensive rat (SHR)

緒 言

レニン・アンジオテンシン(R-A)系の主要な物質であるアンジオテンシンII(A II)の生理作用は、A II受容体を介して副腎皮質、副腎髄質、交感神経末端、肝、腎、脳、血管、心筋などで発現され、全身の血管平滑筋の収縮、副腎でのアルドステロンの分泌促進、交感神経終末および副腎髄質でのカテコールアミン遊離の亢進、近位尿細管でのNa⁺再吸収の促進、抗利尿ホルモンの分泌刺激作用などを有しており、血圧や水電解質の恒常性維持を司っている。また、A IIは血管平滑筋に作用して血管外マトリックスを増生させたり、心筋細胞に直接作用して心肥大を惹起するなど細胞増殖にも関与していることが知られている。A IIの産生系は、従来から循環R-A系として知られている。すなわち、肝で生成されるアンジオテンシノーゲンに腎由来のレニンが作用してアンジオテンシンIに変換され、これにアンジオテンシン変換酵素(ACE)が作用してA IIが産生される系である。しかし最近、上記の系とは別に、いくつかの臓器内(心臓、血管壁、副腎、脳、下垂体など)でもレニンとA IIが産生されていることが報告されている。これらの系は、組織R-A系と呼ばれ、血圧調節作用以外に細胞増殖作用などにも関与していると考えられている¹⁾。

現在、A II受容体には、type 1(AT-1)とtype 2(AT-2)の2つのサブタイプが存在が明らかにされている²⁻⁶⁾。A IIの主要な生理作用は、主としてAT-1受容体を介していると考えられている。最近、このAT-1受容体に特異的に作用するA II受容体拮抗薬(TCV-116, Dup 753など)が開発された⁷⁻¹¹⁾。A II受容体拮抗薬は、A IIの作用を抑制する以外に、ACE阻害薬のように血漿中でのブラジキニンやプロスタグランジンなどを増量させる作用がないため、A IIの生理作用を特異的に阻害する薬物として期待されている。ACE阻害薬は、降圧作用だけでなく、心肥大抑制や心保護作用も報告されている¹²⁾¹³⁾。しかしACE阻害薬は、前述したように血漿中でのブラジキニンやプロスタグランジンの増量といったA II合成抑制以外の作用を示すため、心肥大抑制や心保護作用の機序が明らかではない。そこで、著者は、高血圧実験動物である自然発症高血圧ラット(SHR)にAT-1受容体の拮抗薬であるTCV-116、ACE阻害薬のエナラプリル、およびR-A系に影響を与えずに降圧作用を示す血管拡張薬のヒドララジンを投与し、これら薬物がSHRの血圧、心肥大、心筋線維症、および心筋細胞膜のA II受容体に及ぼす影響を検討した。

対象と方法

1. 対象

実験動物は、静岡実験動物農業協同組合から購入した自然発症高血圧ラット(SHR)であり、A II受容体拮抗薬(TCV-116)1 mg/kg/日を生後4週齢から投与したA群(20匹)、同様にエナラプリル5 mg/kg/日を投与したE群(20匹)、ヒドララジン10 mg/kg/日を投与したH群(20匹)、および無投与のN群(20匹)の4群に分けた。各群は、いずれも16と24週齢時に10匹ずつ、下記の血圧・体重を測定後、エーテル麻酔下を開腹して腹部大動脈より採血後に屠殺した。なお、飼育には日本クレア(株)のラット用固形飼料(CE-2)を用いた。

2. 方法

(1) 一般検討項目

- 1) 血圧・体重：16と24週齢での屠殺時に測定した。血圧は、tail cuff法によって測定した。
- 2) 心重量：摘出心の重量を測定した。
- 3) 血清A II濃度・血漿レニン活性・血漿アルドステロン濃度：24週齢のSHRについてradioimmunoassay(RIA)法で測定した¹⁴⁻¹⁶⁾。

(2) 心筋の組織形態学的検討

ホルマリン固定後、心室長径の1/2の部位での横断面薄切標本をhematoxylin-eosinおよびMasson trichrome法で染色し、形態学的に観察した。この部位での心筋細胞横径と心筋線維症面積比を、color image processor(SPICCA-II, 日本アビオニクス, 東京)で測定した。

1) 心筋細胞横径：hematoxylin-eosin染色標本を用いて、無作為に2視野を選び、それぞれの視野で200個ずつの細胞について観察し、心筋細胞の核の中心を通る短軸径を心筋細胞横径として計測した。

2) 心筋線維症面積比：Masson trichrome染色標本を用い、SPICCA-IIに心室横断面全体を記録した。心筋細胞と血管を示す赤色の部分と線維症を示す青色の部分について二値化画像処理を実施して青色に染色された部分の面積と全横断面積を計測し、両面積の比、すなわち線維症面積比を求めた。

(3) A II受容体密度の測定

1) 膜分画の抽出：A II受容体密度の測定に先立ち、まず心筋の膜分画をRogg et al.¹⁷⁾の方法で抽出した。つまり、心筋摘出後、氷冷した5 mM Tris-HCl緩衝液[0.25 M 蔗糖, 1 mM MgCl₂, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF), 5 mM EDTA-1 Naを含む, pH 7.4]中で左心室心筋を細切し、Bio Mixer(日本精

機, 東京)を用いて, 30,000 RPM・30秒間のホモゲナイズを2回繰り返した。この懸濁液を400 g, 4°Cで10分間, 遠心分離して沈澱物を除去した後, 上清を105,000 g, 4°Cで40分間, 超遠心分離(model 85 P-73, 日立工機, 東京)した。沈澱物を5 mM Tris-HCl 緩衝液(0.25 M 蔗糖, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA-1 Naを含む, pH 7.4)中に浮遊させてから, 105,000 g, 4°Cで20分間, 超遠心分離した。超遠心分離で得られた沈澱物を50 mM Tris-HCl 緩衝液(10 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA-1 Naを含む, pH 7.4)中に浮遊させて膜分画を得た。すべての手技は0~4°Cで実施した。膜分画の蛋白濃度は, Lowry法¹⁸⁾で測定した。

2) A II受容体密度の測定: A II受容体密度は, Chiu et al.²⁰⁾の方法で測定した。すなわち, protease inhibitorとしてaprotinin 10 μg/ml, pepstatin A 10 μg/ml, およびleupepsin 10 μg/mlを前述の操作で得られた膜分画に放射性リガンドを投与する5分前に加えた。ついで, リガンドに用いた¹²⁵I- [Sar¹, Ile⁸] A IIを膜分画に加えた後, 25°Cで60分間反応させた。60分の反応後, Whatman GF/B glass fiber filter(Whatman International Ltd. Maidstone, UK)とCell Harvester(Brandel Co., Gaithersburg, USA)を用いて受容体結合と非結合に分離した。つぎに, フィルターを氷冷の5 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)で4回洗浄した。フィルターの放射活性は, γ-カウンターで測定した。一方, 非特異的結合は, 10 μMのA IIの存在下で測定した。受容体密度(Bmax)と解離定数(Kd)は, Scatchard分析で求めた。

(4) AT-1 mRNA の発現

AT-1 mRNA の発現は, 下記の方法で心筋細胞から総RNAを精製してcDNAを合成後, Polymerase chain reaction(PCR)で検討した。

1) 心筋細胞中の総RNAの精製: 心筋細胞中の総RNAは, guanidinium thiocyanate phenol chloroform法¹⁹⁾によって精製した。

2) cDNAの合成: cDNAは, 上記の方法で精製された心筋細胞中の総RNAから, cDNA合成キットreverse transcriptase RAV 2(Amersham, Buckinghamshire, UK)を使用して作成した。

3) Polymerase chain reaction(PCR): 上記の方法で合成されたcDNAをGene Amp PCR Reagent Kit(Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA)を使用したPCR法で増幅した。PCR反応液の組成は, 1 μlのcDNA, 10 mM Tris-HCl 緩衝液(50 mM KC1, 1.5 mM MgCl₂, 0.001%ゲラチンを含む, pH 8.3), 10 μM dNTPs(Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA), 2.5単位のthermas

aquatics DNA polymerase(Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA)および0.2 MのAT-1受容体に対するoligonucleotide primers(バイオロジカ, 名古屋)である。oligonucleotide primerの塩基配列は, antisense primerとして5'-GGGAGCGTCAATTCGAGAC-3', sense primerとして5'-ACCCTCTACAGCATCATCTTTGTGGTGGGA-3'を使用した。PCRは, 熱変性に94°C, 30秒, アニーリングに65°C, 45秒, DNA鎖伸長反応に72°C, 45秒の条件で施行した。primerの作成およびPCRは, Iwai et al.²⁰⁾の方法で実施した。16サイクルでβアクチンのprimerを加え, 合計45サイクルのPCRを施行した。増幅されたDNAを, 2% NuSieve アガロース・ゲル(FMC Bioproducts, Rockland, USA)を用いた電気泳動で検出した。AT-1受容体 mRNAの発現量は, AT-1受容体とβアクチンの各バンドの密度をデンストメーターを用いて比較した。

3. 推計学的処理

本文中の測定値は, 平均値±標準偏差(S. D.)で示した。群間比較は, 対応のないStudent's *t*検定で検定した。なお, 有意水準は, 危険率が5%以下とした。

成 績

(1) 一般検討項目

1) 血圧: 8週齢ではA群が112.2±10.3 mmHg, E群が112.0±8.1, H群が105.5±9.2, N群が142.8±4.8, 16週齢ではA群が98.4±6.8, E群が99.8±11.3, H群が104.4±5.8, N群が149.2±4.7, 24週齢ではA群が118.0±4.8, E群が112±11.7, H群が101±4.6, N群が157±4.3であり, 8, 16, および24週齢での各週齢とも降圧薬を投与したA, E, およびH群の3群間では差がないが, N群に比してA, E, およびH群で有意に低値を示した($p < 0.01$)(Fig. 1, left).

2) 心重量/体重比: 16週齢ではA群が0.337±0.027%, E群が0.332±0.032, H群が0.362±0.039, N群が0.374±0.019, 24週齢ではA群が0.352±0.034, E群が0.332±0.037, H群が0.364±0.046, N群が0.379±0.034であり, 16と24週齢でN群に比してAおよびE群で有意に低値を示した(16週齢のA群 vs N群, E群 vs N群, 24週齢のA群 vs N群; $p < 0.05$, 24週齢のN群 vs E群; $p < 0.01$)(Fig. 1, right).

3) 血清A II濃度・血漿レニン活性・血漿アルドステロン濃度: 24週齢の血清A II濃度は, A群が1348.8±370.2 pg/ml, E群が444.4±97.8, H群が493.8±162.8, N群が594±160.1であり, A群が他の3群に比して有意に高値を示した($p < 0.01$)(Fig. 2, left). 24週

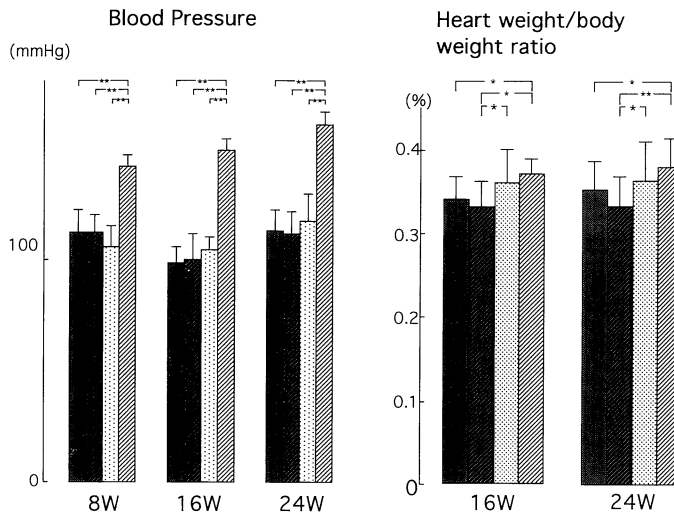


Fig. 1. Left panel showing systolic blood pressure of each group of SHR at 8, 16 and 24 weeks of age. Right panel showing heart weight/body weight ratio at 8, 16 and 24 weeks of age.

A ; All receptor antagonist (TCV-116), E ; enalapril, H ; hydralazine, N ; no treatment. Value are mean±SD, *P<0.05, **P<0.01

A ■ E ▨ H ▩ N ▪

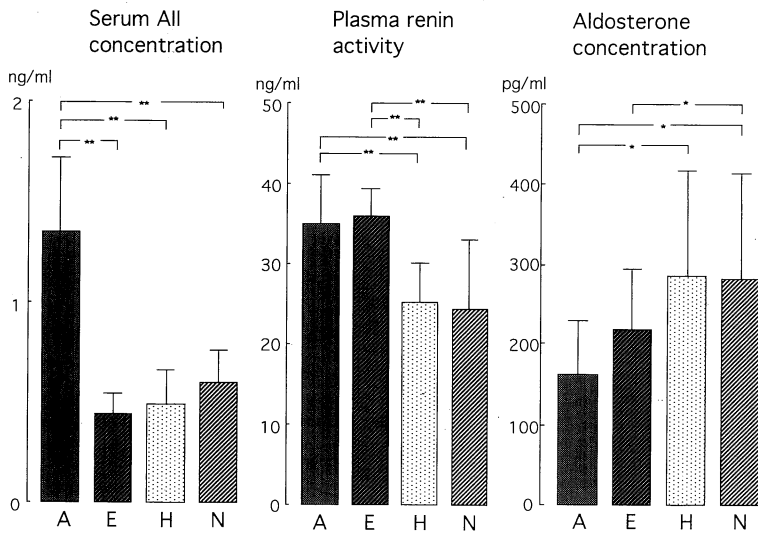


Fig. 2. Left panel : Serum angiotensin II concentration in each group at 24 weeks of age.

Middle panel : Plasma renin activity in each group at 24 weeks of age.

Right panel : Aldosterone concentration in each group at 24 weeks of age.

A ; All receptor antagonist (TCV-116), E ; enalapril, H ; hydralazine, N ; no treatment.

Value are mean±SD, *P<0.05, **P<0.01

A ■ E ▨ H ▩ N ▪

齢の血漿レニン活性は、A群が 34.84 ± 6.13 ng/ml, E群が 35.92 ± 3.35 , H群が 25.29 ± 4.86 , N群が 24.92 ± 8.71 であり、NとH群に比してAとE群で有意に高値を示した($p < 0.01$)(Fig. 2, middle). 24週齢の血漿アルドステロン濃度は、A群が 163.3 ± 66.4 pg/ml, E群が 218.3 ± 77.6 , H群が 284.9 ± 133.2 , N群が 283.1 ± 129.9 であり、HおよびN群に比してA群で有意に低値($p < 0.05$), N群に比してE群で有意に低値を示した($p < 0.05$)(Fig. 2, right).

(2) 心筋の組織形態学的検討

Fig. 3に24週齢の各群でのMasson trichrome染色組織所見を示す。心筋細胞は各群で肥大しているが、その程度がNおよびH群に比してAおよびE群で軽度にとどまっていた。また、血管周囲に認められる線維症も、その程度がNおよびH群に比してAおよびE群で軽度にとどまっていた。

1) 心筋細胞横径：16週齢ではA群が 13.54 ± 0.78

μm , E群が 13.07 ± 0.39 , H群が 18.72 ± 1.27 , N群が 21.18 ± 0.72 , 24週齢ではA群が 17.13 ± 0.84 , E群が 17.15 ± 0.42 , H群が 23.15 ± 0.86 , N群が 24.21 ± 1.23 であり、16および24週齢での心筋細胞横径はHおよびN群に比してAおよびE群で有意に低値を示した($p < 0.01$)(Fig. 4, left).

2) 心筋線維症面積比：16週齢ではA群が 0.71 ± 0.11 %, E群が 0.71 ± 0.15 , H群が 1.05 ± 0.21 , N群が 1.07 ± 0.16 , 24週齢ではA群が 3.46 ± 0.30 , E群が 3.37 ± 0.59 , H群が 5.29 ± 0.47 , N群が 6.58 ± 1.00 であり、16, 24週齢での心筋線維症面積比はHおよびN群に比してAおよびE群で有意に低値を示した(16週齢のA群 vs H群, E群 vs H群; $p < 0.05$, 16週齢のA群 vs N群, E群 vs N群, 24週齢のA群 vs H群, A群 vs N群, E群 vs H群, E群 vs N群; $p < 0.01$)(Fig. 4, right).

(3) A II受容体密度・親和性

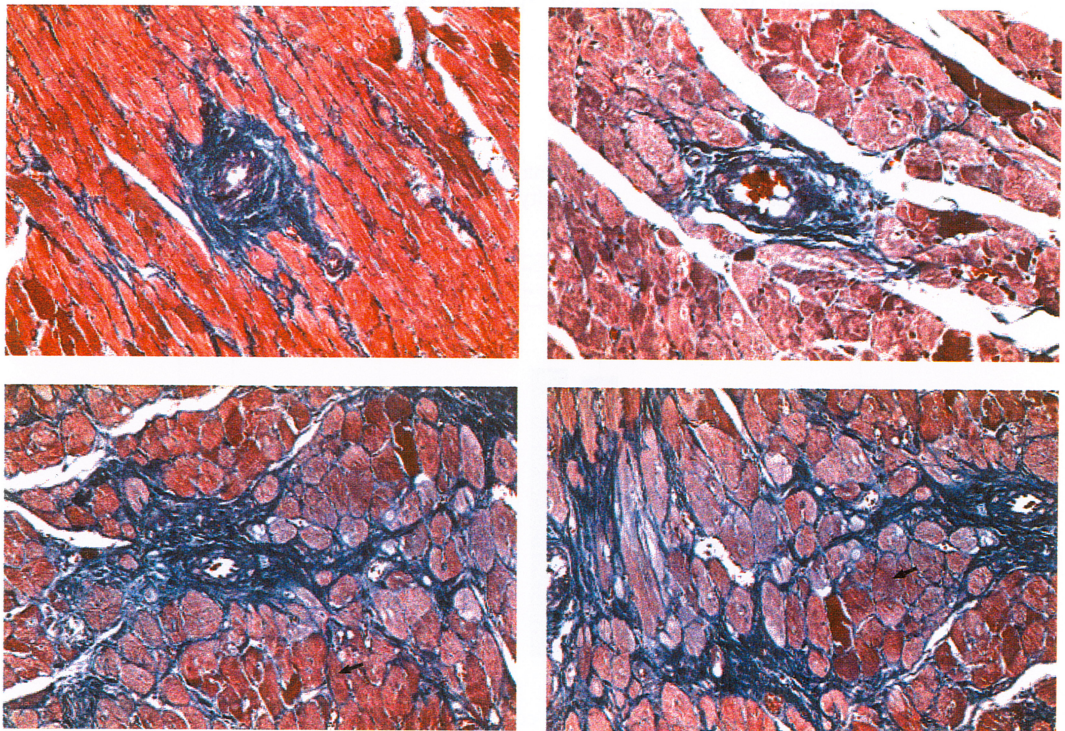


Fig. 3. Light micrographs of cardiomyocyte in SHR at 24 weeks of age.
 Panel A : Treatment of angiotensin II receptor antagonist (A group).
 Panel B : Treatment of ACE inhibitor (E group).
 Panel C : Treatment of hydralazine (H group).
 Panel D : No treatment (N group). (Masson trichrome staining $\times 200$)
 $\frac{A}{C} \Big| \frac{B}{D} \rightarrow$: hypertrophied myocardial cell

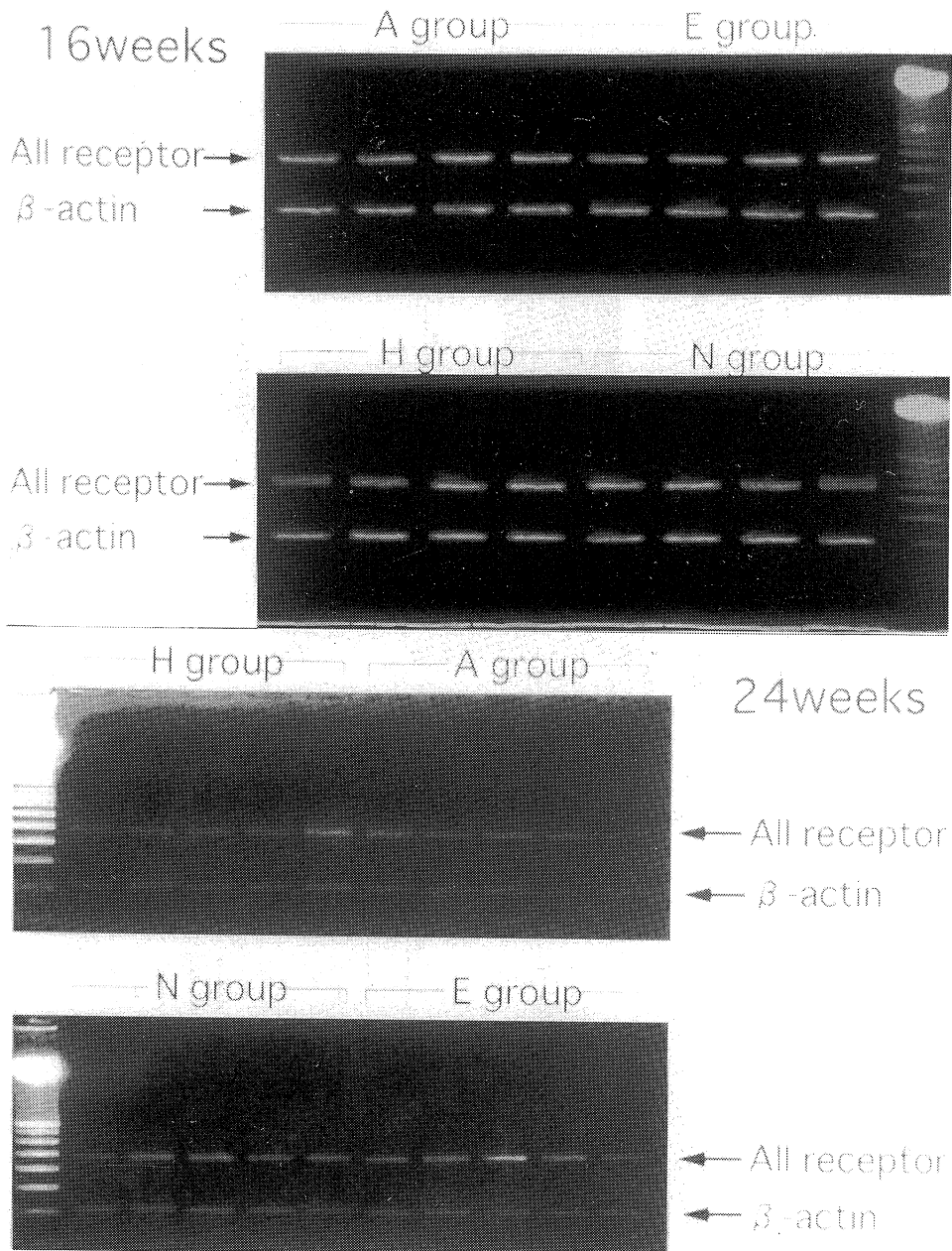


Fig. 6. Panel A : Expression of AT-1 mRNA in myocardium at 16 weeks of age.
Panel B : Expression of AT-1 mRNA in myocardium at 24 weeks of age.

A
B

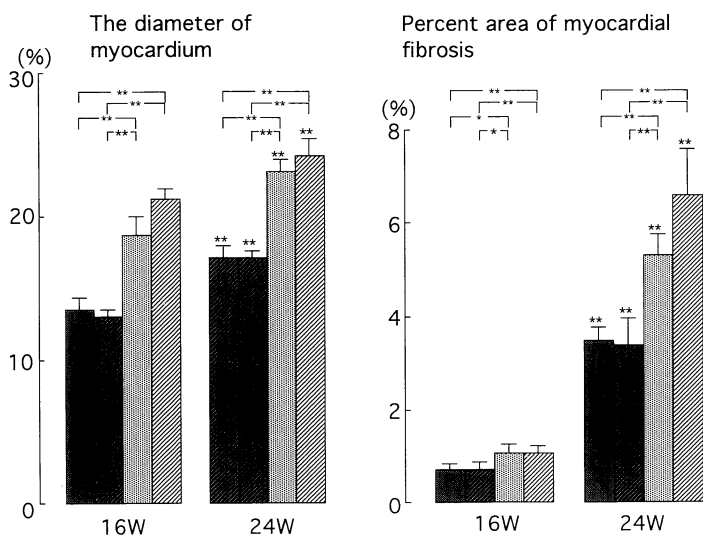


Fig. 4. Left panel : Cardiac myocyte diameter in each group at 16 and 24 weeks of age.
Right panel : Percent area of myocardial fibrosis in each group at 16 and 24 weeks of age.
A ; All receptor antagonist (TCV-116), E ; enalapril, H ; hydralazine, N ; no treatment.
Value are mean±SD, *P<0.05, **P<0.01
A ■ E ▨ H ▩ N ▪

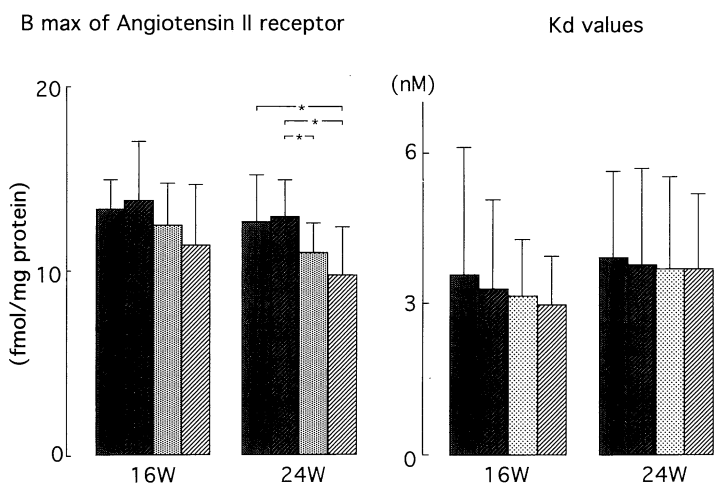


Fig. 5. Left panel : Angiotensin II receptor density (Bmax) in each group at 16 and 24 weeks of age.
Right panel : Kd value in each group at 16 and 24 weeks of age.
A ; All receptor antagonist (TCV-116), E ; enalapril, H ; hydralazine, N ; no treatment.
Value are mean±SD, *P<0.05.
A ■ E ▨ H ▩ N ▪

1)心筋A II受容体密度：16週齢ではA群が 13.29 ± 1.60 fmol/mg protein, E群が 13.74 ± 3.24 , H群が 12.44 ± 2.30 , N群が 11.35 ± 3.25 , 24週齢ではA群が 12.59 ± 2.61 , E群が 12.89 ± 2.01 , H群が 10.93 ± 1.65 , N群が 9.74 ± 2.62 であり, 16週齢では各群間に差がなかったが, 24週齢ではN群に比してAとE群で有意に高値を示した($p < 0.05$) (Fig. 4, left).

2)心筋A II受容体親和性：16週齢ではA群が 3.56 ± 2.55 nM, E群が 4.52 ± 1.40 , H群が 4.42 ± 1.39 , N群が 4.65 ± 1.12 , 24週齢ではA群が 3.90 ± 1.71 , E群が 3.78 ± 1.88 , H群が 3.68 ± 1.85 , N群が 3.68 ± 1.48 であり, 16と24の両週齢で各群間に差がなかった (Fig. 5, right).

(4) AT-1 mRNA の発現

心筋AT-1受容体のmRNAの発現をFig. 6に示す。AT-1受容体は479 bp, β アクチンは259 bpに位置している。これらのバンドのデンスitomーターによる計測では, AT-1 mRNAの発現は, 16週齢では各群間に差を示さなかったが, 24週齢ではA群がH群に比してE群がHとN群に比して高い傾向を示した。

考 察

本研究は, A II受容体拮抗薬のSHRに対する薬理作用を検討したものであり, 以下に同薬物の薬理作用を列記し, その機序について考察する。

1. A II受容体拮抗薬の降圧作用

ACE阻害薬は, A II産生抑制以外に血漿中のブラジキニンやプロスタグランジンの増量作用があり, R-A系だけを阻害しているわけでない。したがってR-A系だけを抑制するA II受容体拮抗薬の開発が望まれていた。Furukawa et al.²¹⁾²²⁾は, 非ペプチド性のイミダゾール酢酸化合物にA II受容体拮抗作用があることを明らかにした。これを契機に, 経口可能なA II受容体拮抗薬の開発が進められ, 現在ではDup 753, TCV-116などのAT-1受容体に特異的な受容体拮抗薬が開発されている。高血圧モデルのみならず, ヒトに対する臨床試験でも, A II受容体拮抗薬は良好な降圧効果を示すが, 副作用が認められないという報告が多数を占めるようになった⁷⁻¹¹⁾。

本研究でも, 自然発症高血圧ラット(SHR)でのTCV-116による降圧効果は, 臨床で応用されているACE阻害薬のエナプリルと同等であった。つまり, A II受容体拮抗薬は, 降圧薬としてきわめて有用と考えられた。

2. R-A系に対するA II受容体拮抗薬の効果

A IIの産生系は, 従来から循環R-A系として知られている。本検討では, SHRでの循環血液中の血清A II濃

度, 血漿レニン活性, および血漿アルドステロン濃度を測定した。A II受容体拮抗薬を投与した群は血清A II濃度および血漿レニン活性の増加を示したが, この増加はA II受容体を阻害したためにフィードバック機構が作働したことによるものと考えられる。

また近年では, 組織R-A系の存在が明らかにされており, それによる各臓器での細胞増殖など局所機能の調節が注目されるようになってきた¹⁾。つまり, 循環R-A系と組織R-A系は, 必ずしも平行して変動するとは限らず, 組織におけるR-A系の亢進・低下などを循環R-A系の検討から評価することはできないと考えられる。本研究も, 循環R-A系の変動を検討したにすぎないため, SHRの心筋組織R-A系に対するA II受容体拮抗薬の効果を必ずしも正確には評価していない可能性が残されている。

3. A II受容体拮抗薬による心肥大の退縮

心臓になんらかの負荷が加わった場合, 個々の心筋細胞は収縮力を保つために代償的に心肥大を形成する。しかし, 心筋細胞は, 高度に分化した細胞であるために, 分裂能を有さない。したがって心肥大は, 心筋細胞の分裂によるものではなく, 収縮蛋白合成の亢進および筋原線維数の増加によって形成される。その成因には, 物理的的刺激以外に, カテコラミン, A IIなどの液性因子が考えられている。

(1) 物理的負荷による心肥大

物理的的刺激による心肥大については, 抽出した心筋細胞の核に静水圧をかけた場合に心筋細胞核内のRNAポリメラーゼ活性が亢進したとの報告²³⁾, ニワトリ胎仔骨格筋細胞を培養させたシリコン膜を伸展させた場合に骨格筋細胞での蛋白合成が増強したとの報告²⁴⁾, ネコの心筋培養細胞をシリコン膜上で伸展させた場合に心筋細胞核内の総RNAと蛋白の生合成が亢進したとの報告²⁵⁾, シリコン製培養皿上の培養心筋細胞に伸展刺激を加えた場合に核内前癌遺伝子c-fosのmRNA発現が増強した報告²⁶⁾などがみられる。以上のように, 機械的伸展刺激は, 心筋細胞での蛋白合成を直接亢進させると考えられる。

一方, 高血圧症では, 心筋細胞は, 後負荷の増大のために過伸展状態となっている。機械的伸展刺激のみが心肥大の原因であれば, 降圧を十分企れば, 心肥大も抑制されると考えられる。しかし, 本研究では, 血管拡張薬であるヒドララジンを投与したSHRでは, 十分に降圧されたにもかかわらず, 心肥大は抑制されなかった。つまり, 今回の成績は, 心肥大の原因が機械的伸展刺激だけでなく, その他の因子も関与していることを示唆している。

(2) カテコラミンによる心肥大

血圧を上昇させない程度の微量ノルエピネフリンをイヌに静注しても心肥大が発症したという報告²⁷⁾、運動によって発症した肥大心には心筋内ノルエピネフリン含量が増加していたという報告²⁸⁾、ラット培養心筋細胞へのノルエピネフリン投与によって心筋細胞へのアミノ酸の取り込みが増大したという報告²⁹⁾などがあり、カテコラミンは心肥大の成因の一つと考えられてきた。

本研究でも SHR の心肥大の進展にカテコラミンも関与している可能性があるが、血中や心筋組織中のカテコラミン濃度を測定していなかったために SHR の心肥大の進展に対するカテコラミンの影響は不明である。また、A II がカテコラミンの分泌に促進的に働くため、R-A 系の阻害薬である ACE 阻害薬あるいは A II 受容体拮抗薬を投与した SHR は、薬物無投与およびヒドララジン投与の SHR に比して血中および心筋組織中のカテコラミン濃度が低下しているのではないかと推測される。今後は、血中や心筋組織中のカテコラミン濃度についても検討していく必要があると考えられる。

(3) A II による心肥大

A II は、交感神経末端や副腎髄質からのカテコラミン分泌を促進させる作用がある。A II は、このカテコラミン分泌促進作用によって心肥大の成因に二次的に寄与しているのではないかと考えられる。しかし、心筋細胞膜にも A II 受容体が存在するため、A II は心筋細胞に直接的に作用して心肥大に関与しているとも考えられる。R-A 系と心肥大との関係については、多数の報告がみられる¹²⁾¹³⁾³⁰⁻³³⁾。Baker et al.³⁰⁾は、A II を培養心筋細胞に直接投与することで心筋細胞中の RNA 含量の増加や蛋白合成の亢進が認められたと報告しており、心筋細胞への A II の直接刺激で心肥大が進展することを示唆した。Sen et al.¹²⁾は、SHR での心肥大が血管拡張薬などによる血圧の正常化だけでは進展を阻止しえないが、ACE 阻害薬で心肥大の進展が抑制されたことを報告している。本研究でも、SHR に血管拡張薬であるヒドララジンを投与した群は、十分な血圧降下が得られたにもかかわらず、心肥大の抑制を示さなかった。しかし、R-A 系を阻害する薬物の ACE 阻害薬あるいは A II 受容体拮抗薬の投与群は、ヒドララジン投与群に比して有意に心肥大抑制効果が認められた。つまり、血圧下降という機械的な伸展を除去するだけでは、SHR での心肥大を十分に抑制できないことになる。一方、R-A 系を阻害する薬物の投与で SHR での心肥大が抑制されたことから、SHR の心肥大の進展には R-A 系が関与しているのではないかと推測される。また、本研究では、A II の作用を直接阻害す

る A II 受容体拮抗薬の効果を検討したことになるので、R-A 系のなかでも特に A II が SHR の心肥大の進展に関与していると推測された。

また今回の検討では、心肥大の抑制の程度は、A II 受容体拮抗薬を投与した群と ACE 阻害薬を投与した群の両群間で差がなかった。しかし、最近の報告では、組織における A II の産生は、ヒトやイヌの心臓や動脈では ACE を介する系だけでなく、ACE を介さないで A II を産生するキマーゼによる系の存在することも明らかにされている³⁴⁾³⁵⁾。したがって、ヒトでは、これらの ACE を介さずに産生される A II が存在するために、A II による心肥大の抑制は ACE 阻害薬単独では不十分と考えられる。一方、A II 受容体拮抗薬は、A II の作用を特異的に阻害するために ACE を介さずに A II が産生されるような場合に、ACE 阻害薬に比して有効性を発揮する可能性があると考えられる。本研究で A II 受容体拮抗薬を投与した群と ACE 阻害薬を投与した群の間に心肥大抑制効果に差が認められなかった理由は、動物種の相違に基づくのではないかと考えられる。

4. A II 受容体拮抗薬による心筋線維症の抑制

A II は、TGF- β とともに最も強力なコラーゲン合成促進因子である³⁶⁾。A II は心筋細胞の肥大を促進させるばかりでなく、間質細胞に働いてコラーゲンの産生を促進させて間質の線維化を進展させるとの報告がある³⁷⁾。Kojima et al.³⁸⁾の報告によると、機械的刺激を培養心筋細胞に加える実験でも、心筋細胞の肥大の形成および間質の線維化が A II 受容体拮抗薬の投与によって抑制されたという。本研究でも、SHR に ACE 阻害薬あるいは A II 受容体拮抗薬を投与した群は、無投与あるいはヒドララジン投与群に比して心肥大の抑制が認められたばかりでなく、間質の線維化も著しく抑制された。つまり、R-A 系、特に A II は心肥大の進展に関与しているばかりでなく、心筋線維症の進展にも関与しているのではないかと推測される。

5. A II 受容体密度と A II 受容体 mRNA に及ぼす A II 受容体拮抗薬の影響

A II の作用は、細胞膜上にある受容体を介して発現される。この A II 受容体は、標的臓器である心臓、血管、腎臓、副腎、腸、肝臓、下垂体、中枢神経、子宮などに存在している。最近、新しい A II 受容体拮抗薬を放射性リガンドに用いた検討から、A II 受容体のサブタイプの存在が明らかにされた²⁻⁶⁾。ロサルタン、TCV-116 などが選択的に結合する受容体は AT-1 と名付けられた。Sasaki et al.³⁹⁾はブタ副腎皮質培養細胞の遺伝子ライブラリー、Murphy et al.⁴⁰⁾はラット大動脈平滑筋細胞の遺

伝子ライブラリー, Takayanagi et al.⁴¹⁾はヒト肝臓のcDNAの遺伝子ライブラリーから, AT-1のcDNAクローニングに成功した. 今までに知られているA IIの作用を発現するのがこのAT-1である. 一方, PD 123177, PD 123319 およびCGP 42112 Aなどが選択的に結合する受容体はAT-2と名付けられた⁴⁰⁾. AT-2のmRNAは, 胎生組織, 子宮, 脳などで発現していることから, 組織の分化あるいは増殖へ関与しているものと推測されているが⁴²⁾, 生理的機能は未だ不明である.

本研究では, A II受容体拮抗薬がA II受容体密度およびAT-1 mRNAの発現にどのように影響するかを検討した. 無治療のSHRでのA II受容体密度は, 週齢を重ねるとともに低下した. この成績は, SHRではR-A系が亢進している可能性があり, 心筋組織中でA IIの過剰な産生がみられることを示唆している. この過剰に産生されたA IIがA II受容体を持続的に刺激することにより, その結果として受容体密度が減少したのではないかと推測される. 一方, A II受容体拮抗薬あるいはACE阻害薬を投与した24週齢のSHRは, 無投与およびヒドララジン投与のSHRに比して受容体密度が有意に高かった. また, AT-1 mRNAの発現についても, 同様の傾向が認められた. 以上のように, A II受容体拮抗薬ではA IIの受容体に対する拮抗作用により, またACE阻害薬はA IIの産生を抑制する作用により, A II受容体へのA IIの刺激を減少させたと考えられる. このA II受容体へのA IIの刺激の減少が, 受容体密度あるいは受容体mRNAの発現の低下を抑制したのではないかと考えられる. つまり, A II受容体密度およびAT-1受容体mRNAの発現は, A II受容体へのA IIの刺激により調節されている可能性が推測される.

結 語

A II受容体拮抗薬が自然発症高血圧ラット(SHR)の血圧, 心肥大, 心筋線維症, および心筋細胞膜のA II受容体に及ぼす影響を検討した.

1) A II受容体拮抗薬(TCV-116)は, ACE阻害薬(エナラプリル)およびヒドララジンと同等に, 自然発症高血圧ラット(SHR)の血圧を低下させた.

2) SHRの心筋細胞横径と心筋線維症面積比は, ヒドララジン投与群および無投与群に比してTCV-116投与群およびエナラプリル投与群で有意に低値を示した.

3) A II受容体密度およびAT-1受容体mRNAの発現は, ヒドララジン投与群および無投与群に比してTCV-116投与群およびエナラプリル投与群で有意に増加していた.

以上, A II受容体拮抗薬は, 良好な降圧効果を有するだけでなく, 心肥大および心筋線維症に対する抑制効果も有しており, 心肥大を伴う高血圧症の降圧薬としてきわめて有用な薬物と考えられる.

謝 辞

稿を終わるにあたり, ご指導, ご校閲いただきました第1内科学講座土肥和紘教授に深甚の謝意を表しますとともに, ご校閲, ご助言をいただきました第2病理学講座日浅義雄教授ならびに薬理学講座中嶋敏勝教授に感謝致します. さらに直接ご指導いただきました橋本俊雄講師に感謝致します. また, 終始ご協力いただきました第1内科学教室心臓グループの諸兄に感謝いたします.

本論文の要旨は第58回日本循環器学会総会(平成6年, 東京)および第92回日本内科学会講演会(平成7年, 名古屋)において発表した.

文 献

- 1) Dzau, V. J. : Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77 [Suppl 1] : I 4-I 13, 1988.
- 2) Chiu, A. T., Herblin, W. F., McCall, D. E., Ardecky, R. J., Carini, D. J., Duncia, J. V., Pease, L. J., Wong, P. C., Wexler, R. R., Johnso, A. L. and Timmermans, P. B. M. W. M. : Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165 : 196-203, 1989.
- 3) Whitebread, S., Mele, M., Kamber, B. and de Gasparo, M. : Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163 : 284-291, 1989.
- 4) Timmermans, P. B. M. W. M., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Wong, P. C. and Smith, R. D. : Angiotensin II receptor subtypes. *Am. J. Hypertens.* 5 : 406-410, 1992.
- 5) Iwai, N. and Inagami, T. : Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS* 298 : 257-260, 1992.
- 6) Sechi, L. A., Grady, E. F., Griffin, C. A., Kalinyak, J. E. and Schambelan, M. : Distribution of angiotensin II receptor subtypes in rat and human kidney. *Am. J. Physiol.* 262 : F 236-F

- 240, 1992.
- 7) **Bovee, K. C., Wong, P. C., Timmermans, P. B. M. W. M. and Thoolen, M. J. M. C.** : Effects of the nonpeptide angiotensin II receptor antagonist DuP 753 on blood pressure and renal functions in spontaneously hypertensive PH dogs. *Am. J. Hypertens.* **4** : 327 S-333 S, 1991.
 - 8) **Kawano, Y., Yoshida, K., Yoshimi, H., Ashida, T., Kuramochi, M. and Omae, T.** : Central and peripheral effects of DuP 753, an angiotensin II receptor antagonist, on blood pressure in hypertensive and normotensive rats. *Therap. Res.* **13** : 151-155, 1992.
 - 9) **Mizuno, K., Niimura, S., Tani, M., Haga, H., Gomibuchi, T., Sanada, H. and Fukuchi, S.** : Antihypertensive and hormonal activity of MK 954 in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **215** : 305-308, 1992.
 - 10) **Oddie, C. J., Dille, R. J. and Bobik, A.** : Long-term angiotensin II antagonism in spontaneously hypertensive rats : effects of blood pressure and cardiovascular amplifiers. *Clin. Exp. Pharmacol. Physio.* **19** : 392-395, 1992.
 - 11) **Ogihara, T., Higashimori, K., Masuo, K. and Mikami, H.** : Pilot study of a new angiotensin II receptor antagonist, TCV-116 : effects of a single oral dose on blood pressure in patients with essential hypertension. *Clin. Therap.* **15** : 684-691, 1993.
 - 12) **Sen, S., Tarazi, R. C. and Bumpus, F. M.** : Effect of converting enzyme inhibitor(SQ 14,225) on myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **2** : 169-176, 1980.
 - 13) **Sen, S., Tarazi, R. C. and Bumpus, F. M.** : Cardiac hypertrophy and antihypertensive therapy. *Cardiovasc. Res.* **11** : 427-433, 1977.
 - 14) **Robertson, G. L., Mahr, E. A., Athar, S. and Sinha, T.** : Development and clinical application of a new method for the radioimmunoassay of arginine vasopressin in human plasma. *J. Clin. Invest.* **52** : 2340-2352, 1973.
 - 15) 荻原俊男, 西 啓子, 圓山アンナ, 中 透, 中丸光昭, 宮井 潔, 熊原雄一, 岩永圭市 : ガンマー・コート [¹²⁵I] PRA Kit の基礎的検討ならびに臨床応用. *ホルモンと臨床* **28** : 63-69, 1980.
 - 16) 高橋堅治, 畑川清美, 野村こずえ, 石田信二, 大滝正通 : スパック-S アルドステロンキットの基礎的検討. *医学と薬学* **22** : 155-160, 1989.
 - 17) **Rogg, H., Schmid, A. and de Gasparo, M.** : Identification and characterization of angiotensin II receptor subtypes in rabbit ventricular myocardium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173** : 416-422, 1990.
 - 18) **Lowly, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-275, 1951.
 - 19) **Chomczynski, P. and Sacchi, N.** : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162** : 156-159, 1987.
 - 20) **Iwai, N., Yamano, Y., Chaki, S., Konishi, F., Bardhan, S., Tibbetts, C., Sasaki, K., Hasegawa, M., Matsuda, Y. and Inagami, T.** : Rat angiotensin II receptor : cDNA sequence and regulation of the gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177** : 299-304, 1991.
 - 21) **Furukawa, Y., Kishimoto, S. and Nishikawa, K.** : Hypotensive imidazole derivatives. US Patent 4, 340, 598 issued to Takeda Chemical Industries, Osaka, Japan, 1982.
 - 22) **Furukawa, Y., Kishimoto, S. and Nishikawa, K.** : Hypotensive imidazole-5-acetic derivatives. US Patent 4, 355, 040 issued to Takeda Chemical Industries, Osaka, Japan, 1982.
 - 23) **Schreiber, S. S., Oratz, M., Rothschild, M. A. and Reff, F.** : Effect of hydrostatic pressure on isolated cardiac nuclei : stimulation of RNA polymerase II activity. *Cardiovasc. Res.* **12** : 265-268, 1978.
 - 24) **Vandenburgh, H. and Kaufman, S.** : In vitro model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Science* **203** : 265-268, 1979.
 - 25) **Mann, D. L., Kent, R. L. and Cooper, G.** : Load regulation of the properties of adult feline cardiocyte : growth induction by cellular deformation. *Circ. Res.* **64** : 1079-1090, 1989.
 - 26) **Komuro, I., Katoh, Y., Kaida, T., Shibasaki, Y., Kurabayashi, M., Hoh, E., Takaku, F. and Yazaki, Y.** : Mechanical loading stimulates cell

- hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **266** : 1265-1268, 1991.
- 27) **Laks, M. M., Morady, F. and Swan, H. J. C.** : Myocardial hypertrophy produced by chronic infusion of subhypertensive doses of norepinephrine in the dog. *Chest* **64** : 75-78, 1973.
- 28) **Ostman, I., Sjostrand, N. O. and Swedin, G.** : Cardiac noradrenalin turnover and urinary catecholamine excretion in trained and untrained rats during rest and exercise. *Acta Physiol. Scand.* **86** : 299-308, 1972.
- 29) **Starksen, N. F., Simpson, P. C., Bishopric, N., Coughlin, S. R., Lee, W. M. F., Escobedo, J. A. and Williams, L. T.** : Cardiac myocyte hypertrophy is associated with c-myc protooncogene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 8348-8350, 1986.
- 30) **Baker, K. M. and Aceto, J. F.** : Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am. J. Physiol.* **259** : H 610-H 618, 1990.
- 31) **Schunkert, H., Dzau, V. J., Tang, S. S., Hirsh, A. T., Apstein, C. S. and Lorell, B. H.** : Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy : effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J. Clin. Invest.* **86** : 1913-1920, 1990.
- 32) **Sadoshima, J., Xu, Y., Slayter, H. S. and Izumo, S.** : Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocyte in vitro. *Cell* **75** : 977-984, 1993.
- 33) **Baker, K. M., Chernin, M. I., Wixson, S. K. Aceto, J. F.** : Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am. J. Physiol.* **259** : H 324-332, 1990.
- 34) **Urata, H., Kinoshita, A., Misono, K. S., Bumpus, F. M. and Husain, A.** : Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J. Biol. Chem.* **265** : 22348-22357, 1990.
- 35) **Urata, H., Kinoshita, A., Perez, D. M., Misono, K. S., Bumpus, F. M., Graham, R. M. and Husain, A.** : Cloning of the gene and cDNA for human heart chymase. *J. Biol. Chem.* **266** : 17173-17179, 1991.
- 36) **Weber, K. T., Anversa, P., Armstrong, P. W., Brilla, C. G., Burnett, J. C., Cruickshank, J. M., Devereux, R. B., Giles, T. D., Korsgaard, N., Leier, C. V., Mendelsohn, F. A. O., Motz, W. H., Mulvany, M. J. and Strauer, B. E.** : Remodeling and repair of the cardiovascular system. *J. Am. Coll. Cardiol.* **20** : 3-16, 1992.
- 37) **佐野 均, 庄木美香子, 岡田 斉, 川口秀明, 安田寿一, 山田 尚, 久保木芳徳** : アンジオテンシンIIによる心臓由来線維芽細胞のコラーゲン合成促進作用. 厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班 平成元年度研究報告集 p50-52, 1990.
- 38) **Kojima, M., Shiojima, I., Yamazaki, T., Komuro, I., Yunzeng, Z., Ying, W., Mizuno, T., Ueki, K., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R. and Yazaki, Y.** : Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vitro. *Circulation* **89** : 2204-2211, 1994.
- 39) **Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J. J., Hasegawa, M., Matsuda, Y. and Inagami, T.** : Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* **351** : 230-232, 1991.
- 40) **Murphy, T. J., Alexander, R. W., Griendling, K. K., Runge, M. S. and Bernstein, K. E.** : Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **351** : 233-236, 1991.
- 41) **Takayanagi, R., Ohnaka, K., Sakai, Y., Nakao, R., Yanase, T., Haji, M., Inagami, T., Furuta, H., Gou, D., Nakamuta, M. and Nawata, H.** : Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183** : 910-916, 1992.
- 42) **Janiak, P., Pillon, A., Prost, J. F. and Vilaine, J. P.** : Role of angiotensin subtype 2 receptor in neointima formation after vascular injury. *Hypertension* **20** : 737-745, 1992.