



Title	肥大型心筋症における肥大促進因子に関する研究：組織レニン-アンジオテンシン系および細胞成長因子TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor $\beta$ 1) の心肥大への関与について
Author(s)	坂田, 芳人
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第3105号
Issue Date	1992-06-30
DOI	10.11501/3089270
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/51163">http://hdl.handle.net/2115/51163</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	000000251702.pdf



[Instructions for use](#)

①  
肥大型心筋症における肥大促進因子に関する  
研究

— 組織レニン—アンギオテンシン系および  
細胞成長因子 TGF $\beta$  1 (Transforming Growth  
Factor  $\beta$  1) の心肥大への関与について —

坂田 芳人 ※

Tissue Factors Contributing to Cardiac Hypertrophy in Cardiomyopathic  
Hamsters (BI014.6)

-Involvement of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1  
and Tissue Renin-Angiotensin System in the  
Progression of Cardiac Hypertrophy-

Yoshihito Sakata

Department of Cardiovascular Medicine,  
Hokkaido University School of Medicine, Sapporo 060 JAPAN

The present study was performed to determine whether transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF  $\beta 1$ ) and tissue renin-angiotensin (R-A) system are involved in hypertrophic cardiomyopathy. Cardiomyopathic Syrian hamsters (Bio 14.6) aged 4 and 20 weeks were used as a model of hypertrophic cardiomyopathy and compared with age-matched F1  $\beta$  Syrian hamsters. Total RNA was extracted from the left ventricle, and the m-RNA expressions of TGF  $\beta 1$  and angiotensinogen(ATN) were examined by Northern blotting or Ribonuclease Protection Assay (RPA). The activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) was assayed by the modified method of Tess, using crude membrane fraction prepared from left ventricle. The effect of angiotensin II (AII) on phosphatidylinositol(PI) metabolism was evaluated by the PI- or PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)- specific phospholipase C (PLC), which releases inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) and diacylglycerol(DAG) in cardiac myocytes. The m-RNA expressions of TGF  $\beta 1$  and ATN were detected in each group of Syrian hamsters (BI014.6 and F1  $\beta$ ). TGF  $\beta 1$  m-RNA expression was markedly increased in BI014.6 compared with F1  $\beta$  at the age of 4 weeks, and was more intensified at the age of 20 weeks, while no significant difference was demonstrated in the ATN m-RNA expression. ACE activity in the left ventricle was enhanced in 20 week-old BI014.6 compared with age-matched F1  $\beta$ . The activities of PI- and PIP<sub>2</sub>-specific PLC were enhanced in 20 week-old BI014.6 in response to AII stimulation. DAG and IP<sub>3</sub>, which are second messengers and activate protein kinase C, were significantly released from the cardiac myocytes of 20 week-old BI014.6.

These results suggest that the increase in expression of TGF  $\beta 1$  gene in the left ventricle may induce cardiac hypertrophy in BI014.6, and that the exaggerated response of phosphatidylinositol metabolism to AII and the increased activity of ACE in cardiac tissue R-A system may lead to the development of cardiac hypertrophy.

Key words: hypertrophic cardiomyopathy, BI014.6, transforming growth factor- $\beta$ 1, tissue renin-angiotensin system.

## 英文抄録和訳

本研究の目的は、肥大型心筋症における心肥大に、形質転換細胞成長因子 $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ )並びに心筋組織レニン-アンジオテンシン系が関与する可能性を検討することである。実験対象動物として、肥大型心筋症モデルハムスターであるBI014.6 (4、20週齢)を用い、対照群として同週齢の正常心筋ハムスターPI $\beta$ と比較した。

左室心筋を摘出後、全RNAを抽出して、TGF $\beta 1$ とアンジオテンシノーゲン(ATN)のm-RNAの発現について、各々、Northern blottingとRibonuclease Protection Assay (RPA)を用いて検討した。心筋アンジオテンシン変換酵素(ACE)活性は、左心室粗細胞膜分画を調製後、Tessらの方法に従って検討した。また、アンジオテンシンII (AII)刺激による心筋細胞のイノシトールリン脂質(PI)代謝への影響を、イノシトール1,4,5-三リン酸(IP $_3$ )とジアシ

ルグリセロール (DAG) の産生を測定して、ホスファチジルイノシトール (PI-) 特異的ホスホリパーゼ C (PLC) 活性の変化を測定することにより検討した。

TGF $\beta$  1 と ATN の m-RNA は、 BIO14.6, FI $\beta$  各群、各週齢で発現していることが確認された。

TGF $\beta$  1 m-RNA の発現は、 BIO14.6 で FI $\beta$  に比較し各週齢とも有意に高く、更に BIO 群の中では、20週齢における発現量が4週齢に比して高かった。ATN の発現には群間、週齢間で有意差が見られなかった。心筋 ACE 活性は20週齢において、 BIO 群で FI $\beta$  群に較べて有意に高値であった。また、A II 刺激に対する心筋細胞の IP<sub>3</sub>, DAG 産生、さらに PI-, PIP<sub>2</sub>-specific PLC の活性は、20週齢において BIO 群で FI $\beta$  群に較べて有意に亢進していた。

以上の結果から、肥大型心筋症ハムスターにおける心肥大に、TGF $\beta$  1 が発症に関与し、また A II 刺激に対する PI-metabolism の亢進、並びに、心筋組織 R-A 系の変化が、肥大の進展

に 関 与 し て い る も の と 考 え ら れ た。



## I : 緒言

特発性心筋症は、原因不明の心筋疾患であり、その病態像によって、肥大型心筋症、拡張型心筋症の二つに大別される。心筋症の発症要因の検討に、ヒトでは、心筋生検により少量の試料が得られるほかに直接検討できる手段が乏しく、その解明が困難である。そのため、近年モデル動物を用いて、心筋症の発症機序についての検討が行われるようになってきた。心筋症ハムスター (BIO 14.6) は、常染色体劣性遺伝の形式をとり、進行性に心肥大が生じ、肥大型心筋症のモデル動物と考えられている<sup>1)</sup>。BIO 14.6を用いて心筋肥大に関する検討が行われるようになり、我々は $\beta$ 受容体-GTP結合タンパク質、および、 $\alpha$ 受容体-ホスファチジルイノシトール系の細胞質情報伝達系の異常が心筋肥大の発症、進展に関与しているとの結果を得ている<sup>2)-4)</sup>。

一方、近年、心筋組織にレニン、アンジオ

テンシノーゲン (ATN), アンジオテンシン変換酵素 (ACE)、アンジオテンシン II (AII) レセプターなどレニン-アンジオテンシン (R-A) 系の存在が報告され<sup>5)-8)</sup>、循環血中のレニン-アンジオテンシン系とは独立して、局所機能の調節に関わっていることが示唆されている。AII は、心臓において、陽性変力作用、陽性変時作用を有するが、心筋細胞の肥大にも関与する可能性が示されている。平滑筋細胞では AII 受容体刺激が、PI 代謝を介して protein kinase C (PKC) を活性化、核内の癌遺伝子を発現し、細胞増殖を生ずるものと考えられているが<sup>12)-14)</sup>、心筋における検討はなされていない。

一方、細胞成長因子の一種である TGF $\beta$  1 (Transforming Growth Factor- $\beta$  1) は、線維芽細胞から細胞外基質蛋白質の産生を促すことが知られ、間質線維化に関与すると推測されているが、その詳細に関しては不明な点が少なくない<sup>15)-19)</sup>。特に心筋肥大に関する

TGF $\beta$  1の検討は他になされていない。

本研究では、肥大型心筋症を心筋細胞の肥大と間質の線維増生に分けて考えて、これらに心筋組織内因性R-A系、および細胞成長因子TGF $\beta$  1が関与するかを検討した。

## II : 材料と方法

1) 実験動物 ; 肥大発症前期として4週齢の、心肥大期として20週齢の雄性心筋症ハムスター-BI014.6 (Bio Breeders, Inc., Fitchburg, Mass. U.S.A.)を用いた。同週齢のシリアンハムスター (FI $\beta$ ) を対照として用い比較検討を行った。(n=5)

### 2) 病理組織標本の作成

摘出した左室心筋をアルコールで脱水した後、キシレンで脱アルコールを行い、パラフィンを浸透させて包埋ブロックを作成した。3 $\mu$ m

の切片に切断して光顕像を観察した。

### 3) 心室筋 m-RNA の抽出

ハムスターをエーテル麻酔下で心臓を摘出後、左心室を切離した。左心室は液体窒素で迅速に凍結し、擦鉢にて細かく砕いて粉末状にした後、Chomczynski<sup>20)</sup>等の変法により RNAzol (Cinna/Biotex Laboratories International, Inc., Friendswood Texas) を 0.2 ml/g tissue wet weight の割合で混ぜ、ガラス製のホモジナイザーにてすりつぶし、1/10 量の Chloroform・isoamylalcohol (24:1) を混ぜ 15 分間氷冷した。次に 4℃ 下 15 分間 1,2000g で遠沈し、上清に等量の Isopropylalcohol を加え -20℃ で 45 分間冷却、その後 4℃ にて 15 分間 1,2000g で遠心し、沈渣を 75% ethanol で洗浄することにより全 RNA を抽出した。続いてラテックス粒子の表面に Oligo(dT)<sub>30</sub> の 5' 末端領域を共有結合により固定した oligotex-dT30 粒子を用いて、全 RNA に対して polyA selection を

1 度行った。上記操作により、全 RNA に対して 5% の回収率で m-RNA を精製した。

#### 4) 心室筋アンジオテンシノーゲン (ATN)

##### m-RNA 発現の解析

ATN-RNA プローブの作成のために、ラット ATN cDNA (大久保博晶先生、京都大学医学部免疫研究施設より供与)<sup>21)</sup> を、2 種類の制限酵素 AccI、BamHI で切断して、アガロースゲル電気泳動により 712bp の断片を分離、精製した。得られた断片をプラスミド pSPT19 のマルチプルクローニングサイトに挿入し鑄型を作成し、ATP, GTP, UTP,  $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP の存在下で SP6RNA ポリメラーゼ (Amersham; RPN.2006) を作用させ RNA プローブを作成した (RPA II Kit: Ambion を使用)。Ribonuclease Protection Assay (RPA) 法は、左心室から得た全 RNA 30  $\mu\text{g}$  と RNA プローブ ( $1.2 \times 10^5$  CPM) を混合し、Hybridization Buffer (80% Formamide, 40mM PIPES, 400mM NaOAc, 1mM EDTA) 中で、43°C、約 20 時

間 Hybridizationさせた。その後、反応液に、RNase A,並びに RNase T1を加え 37°Cにて 30分間消化し、一本鎖 RNA を分解した。さらに、反応液に、SDS存在下で Proteinase K を加え、RNase を失活させ、泳動用サンプルを調整した。8M尿素を含む 5%ポリアクリルアミドゲルを用いて、TBE溶液を泳動用 bufferとして、電気泳動を行った。電気泳動後のゲルは、X線フィルムに露光した後、現像定着を行った。

#### 5) TGF $\beta$ 1 m-RNA発現の解析

左心室より得た polyA<sup>+</sup> RNA 5 $\mu$ g をホルムアルデヒド法で変性し、1.5%のアガロースゲル電気泳動を行った後、ナイロンメンブラン (HybondN<sup>+</sup>; Amersham) にブロッティングを行い、50mMの水酸化ナトリウム溶液に10分間浸し、アルカリ固定した。メンブランをハイブリダイゼーション溶液 (組成; 50% deionized formamide, 0.47 $\times$  Denhardt's solution, 4.7 $\times$  SSPE, 0.1% SDS, 10% dextran sulfate) 中で、

42℃で6時間プレハイブリダイゼーションした。DNAプローブの作成は、ヒトTGFβ1 cDNA (1.6 kb) (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTIONから入手)を鋳型として klenow fragment を用いたランダムプライマー伸長法に従って、 $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (370 mCi/ $\mu\text{l}$ ; Amersham) によりアイソトープラベルを行った<sup>22)</sup>。反応後、未反応のデオキシヌクレオチドを、Sephadex G50 スピンカラムにより除去して、DNAプローブを精製した。DNAプローブとサケ変性DNAを各々、2 ng/ml、50 ng/ml、ハイブリダイゼーション溶液中に混合して、42℃で12時間、ハイブリダイゼーションした。メンブランを、1×SSC、0.1% SDS溶液にて、室温で15分間2回洗浄し、更に0.1×SSC、0.1% SDS溶液中で、55℃15分間で2回洗浄した。リンス終了後のメンブランは、-70℃12時間、X線フィルム(コダックXAR70D)に露光した。また、Internal ControlとしてアクチンcDNAプローブを同様にマルチプライム法により作成して用いた。

#### 6) 左心室筋細胞膜分画の調整

体重測定後、ジエチルエーテル麻酔下に断頭し、直ちに心臓を摘出、4℃の生理食塩水で血液を洗浄、左心室を分離、細切した。3倍容の50mM HEPES buffer中でPolytron型ホモジナイザー30秒間、最高速度にて5回、さらにPotter型ホモジナイザーにて3回ホモジナイズし、得られたホモジネートを3000g、30分間遠心し、さらにその上清を105,000g、90分間超遠心し、得られた沈渣を粗細胞膜分画として用いた。

#### 7) ACE活性の測定

ACEは、表在性蛋白質として、細胞膜表面に存在するdipeptidylpeptidaseであることが知られているために、左心室細胞膜分画におけるACE活性は、Tess等<sup>2,3)</sup>の方法を改変して行った。すなわち、 $[^3\text{H}]\text{Bz-Gly-Gly-Gly}$  (200mCi/mmol, NEN)を基質とし、HEPES-NaOH buffer,



0.3M, pH8.0中で総量150 $\mu$ lの反応液を37 $^{\circ}$ C、30分間培養し、0.1N HCl 1mlを加え反応を停止させ、酢酸エチル 1mlにて抽出し、生成した $[^3\text{H}]$  Hippuric Acidの放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。ACEの至適pHは、8.0であった。ACEの比活性は $10^{-7}$  MのACE阻害薬captoprilをコントロールチューブに添加し測定した。また、粗細胞膜分画中のタンパク質は、ウシ血清アルブミンを対照として、Lowry法<sup>24)</sup>により定量した。

#### 8) 心筋細胞の調整

心筋細胞の単離は、Glickらの方法<sup>25)</sup>に従って行い、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>-95%air下で10%ウシ胎児血清加Ham F-10溶液中で培養された。細胞は、1 mMのCaCl<sub>2</sub>を含む1 mlのphosphate Buffer中で35mmディッシュに、 $3 \times 10^5$ /dishの密度に播布した。

#### 9) 培養心筋細胞におけるイノシトールリン

### 脂質代謝の検討

培養心筋細胞 ( $1 \times 10^5$ ) の培養液にあらかじめ myo- $[\text{}^3\text{H}]$ inositol ( $5 \mu\text{Ci}$ ) を加え、24時間ラベリングの後、phosphate buffer で細胞を洗浄し、AII  $10^{-6}\text{M}$  存在下で  $37^\circ\text{C}$  5分間培養した後、chloroform/methanol (2:1, vol/vol) を加え反応を停止させリン脂質を抽出した<sup>26)</sup>。Chloroform層を回収し、真空下で乾固後、沈渣を少量の chloroform/methanol (2:1, vol/vol) に再溶解しシリカゲル薄層プレートに添加した。薄層クロマトグラフィは chloroform/methanol/acetate/water (50:30:8:4, vol/vol) を溶媒として展開し、phosphatidylinositol (PI) を分離した後、放射能活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、Phospholipase C (PLC) で水解されていない PI の比率を求めた。これにより PLC の相対的な活性が求められた。しかし上記の方法では、PI と、Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) を分離するのが不可能であるため、Inositol 1,4,5

-triphosphate( $IP_3$ )の産生量を測定することにより、 $PIP_2$ -PLC活性を得た。上記リン脂質抽出試料の水層部分をDowex AG 1X8カラム(100-200 mesh; Bio-Rad laboratories, Richmond California, U.S.A.)を用いて分離し、Inositol 1-phosphate( $IP_1$ ), Inositol 1,4-bisphosphate( $IP_2$ ),  $IP_3$ の分画を分離し、それぞれの放射能活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。<sup>4)</sup>  $IP_3$ の遊離の測定は、 $IP_3$ -binding system(myo-inositol-1,4,5-triphosphate assay system, Amersham, U.K.)による測定法も併せて行い、Dowex AG 1X8カラムによって溶出した [ $^3H$ ]  $IP_3$ の特異性を確認した。Diacylglycerol(DAG)の測定は、次のように行った。培養心筋細胞をあらかじめ [ $^3H$ ]arachidonic acid( $1\mu Ci$ )で24時間ラベリングして、phosphate bufferで洗浄し、AII  $10^{-6}M$ 存在下で $37^\circ C$  5分間培養を行った後、chloroform/methanol(2:1, vol/vol)を加え反応を停止させた。Chloroform層のリン脂質、

脂肪酸を上記と同様に処置した後、薄層クロマトグラフィにて isopropylether/acetate (96:4, vol/vol) を溶媒として 30 分間展開後、propyl-ether/diethylether/arachidonic acid (90:9:1) でさらに 30 分間二次展開し、DAG 分画を分離して放射能活性を測定した<sup>29)</sup>。

#### 10) 統計学的処理

対応のない二群間の平均値の差の検定には Student's unpaired t-test,  $\chi^2$  検定を行った。

### III : 成績

#### I : 病理組織学的所見

##### 1. 心重量並びに心重量/体重比の変化

FI $\beta$  と BI014.6 を比較すると、4 週齢においては、心重量、心重量/体重比に有意差は認められなかった。一方、20 週齢においては、FI $\beta$

と比較して B1014.6 で、心重量、心重量 / 体重比の有意な増加を認めた (Table 1)。

## 2. 組織学的検討

20週齢の B10 14.6 の心臓横断面および組織像を Figure 1, 2 に示す。この時期では、左心室壁厚の増大が明らかに認められ、細胞浸潤を伴わない細胞破壊が進展し、心筋線維が消失し、いわゆる "spotty myolysis" の組織像を呈していた。また、線維組織の増生は石灰化を伴ない、変性を免れた心筋細胞は肥大を呈していた。

## II : 心筋細胞における A II と細胞膜機能

### ① 培養心筋細胞における PLC 活性

予備実験において、PLC 活性は A II の濃度依存性に活性が亢進し、37℃において A II  $10^{-6}$  M 存在下で、5分間の培養で活性の最高値を示した。

A II  $10^{-6}$  M 添加時に PI の減少によって測定し

た PLC 活性 (Figure 3, left panel) は、4 週齢では両群間に差を認めなかったが、20 週齢では、BIO 14.6 において有意に亢進していた。同様に DAG 遊離は、4 週齢では両群間に差は認められなかったが、20 週齢では、BIO 14.6 において有意に遊離が増加していた (Figure 3, right panel)。IP<sub>3</sub> を産生する PIP<sub>2</sub>-PLC 活性を測定したところ、 $10^{-6}$  M 存在下にて、培養心筋細胞における IP<sub>3</sub> の遊離は、4 週齢では差は認めないが、20 週齢の BIO 14.6 において遊離が増大していた (Figure 4)。

② ACE 活性の検討：

Figure 5 に示す様に、BIO 14.6 と FIβ を比較すると、4 週齢では両群間で差は認めなかった。20 週齢ではいずれの群においても 4 週齢に比し活性が亢進していたが、FIβ に比し、BIO 14.6 で有意に高値であった。

③ アンジオテンシン合成基質の検討：

A II は ACE により Angiotensin I (A I) より変換される。また A I は ATN を基質として、レニンより合成される。本研究では A II 合成基質である ATN 量について、その m-RNA の発現量を測定した。

Yeast RNA と ATN-RNA probe を hybridize させて、RNase I で消化したサンプルをレーン 1 に、未消化のサンプルをレーン 2 に泳動した。その結果、レーン 2 では、ATN-RNA probe の位置を示す濃いバンド (Figure 6、矢印) が確認された。FI $\beta$ , BI014.6 それぞれ 30  $\mu$ g の total RNA を試料として用い、全レーンで ATN-RNA probe のバンドが認めることができた。すなわち、FI $\beta$  と BI014.6 の各群で、ATN m-RNA の発現が確認されたが、週齢および群間で有意差は見られなかった。

III : 細胞間質と細胞増殖因子の関連について

: TGF $\beta$  1 m-RNAの発現

Internal controlとしてのActinの発現は、各レーンで同量であり、試料であるpolyadenylated RNAが各レーンに均等に泳動されていることが確認された (Figure 7, lower panel)。FI $\beta$ では、全週齢 (4、20週齢) において、2.4 kbの位置に微弱なTGF $\beta$  1 m-RNAの発現を確認した。4週齢と20週齢の間に発現の差は認められなかった。BIO 14.6では、発症前期である4週齢、並びに肥大型である20週齢いずれの週齢においても、FI $\beta$ と比較してTGF $\beta$  1 m-RNAの発現の増大を認めた。(Figure 7, upper panel)。デンストメトリーによってその発現量を比較したところ、4週齢のBIO 14.6では対照群の約4倍、20週齢のBIO 14.6では対照群の約13倍の発現を示し、また、20週齢のBIO 14.6では、4週齢のBIO 14.6に比し約2倍の発現を示していた (Table 2)。



#### IV : 考 察

本研究では心筋肥大発症要因を心筋実質細胞の肥大と間質線維の増殖の二つに分け、それに関与する因子について検討した。すなわち肥大型心筋症モデル動物 BIO 14.6 を用い、培養心筋細胞におけるアンジオテンシン II に対する細胞内イノシトールリン脂質代謝の変化、左心室心筋におけるアンジオテンシノーゲン m-RNA の発現、ACE 活性、さらに、TGF $\beta$  1 m-RNA の発現を分析し、組織レニン-アンジオテンシン系および細胞成長因子 TGF $\beta$  1 の心肥大発症への関与を検討した。

$\alpha$  受容体刺激が心筋細胞肥大を引き起こすとの Simpson らの知見以来、心肥大の発症に細胞膜情報伝達系が関与するとの報告がなされている<sup>30), 31)</sup>。心筋症ハムスター BIO 14.6 においても、 $\beta$  受容体数が減少し、 $\alpha_1$  受容体数が増加し、ノルエピネフリン刺激に対応して、イノシトールリン脂質代謝系が亢進し、心筋

内への  $Ca^{2+}$  過負荷を惹起し、その発症、進展に  
関与するのではないかと考えられている<sup>4)</sup>、  
32) - 35)。また PKC あるいは  $Ca^{2+}$  は、*c-myc* な  
どの癌遺伝子の発現を制御すると報告されて  
いることから<sup>36) 37)</sup>、イノシトールリン脂質  
代謝は心肥大発症に関与すると考えられる。  
一方、アンジオテンシン II は、PKC を介して  
細胞内  $Ca^{2+}$  動態を調節することが示唆されて  
いる<sup>13)</sup>。近年、心臓において、アンジオテン  
シンレセプターなど R-A 系の各要素の存在が知  
られ、組織 R-A 系として、オートクライン、パ  
ラクラインに作用するものと考えられる。  
本研究の結果、AII は、20 週齢の BIO 14.6 よ  
りえられた培養心筋細胞において、DAG の遊離  
を増大させた。さらに、 $PIP_2$ -PLC を活性化し、  
 $IP_3$  の遊離を増大させた。このことは、AII  
が、イノシトールリン脂質代謝を亢進させ、  
セカンドメッセンジャーである  $IP_3$ 、DAG を介し  
て<sup>38)</sup> 情報伝達することを示すとともに、20 週  
齢の BIO 14.6 では、PKC を介した蛋白質合成

が亢進する可能性を示した。また、R-A系の基質であるATNがm-RNAレベルで発現していることから、Syrian hamsterの心臓においても、組織R-A系が存在することが明らかになった。さらに、ACE活性が20週齢のBIO 14.6において亢進していたことより、心筋組織R-A系は活性化されている可能性がある。本研究の結果、イノシトールリン脂質代謝および組織R-A系の亢進状態は心肥大期である20週齢で認められ、心肥大の発症よりむしろ進展、経過に影響を与えていると考えられた。

近年、動脈壁平滑筋細胞においてAIIは、TGF $\beta$ 1やプロトオンコジーンのc-fos, c-mycを介して、動脈平滑筋細胞の肥大や間質の線維化を誘導することが報告されている<sup>13)39)</sup>。また我々の研究では、培養心筋由来線維芽細胞において、AII刺激がコラーゲン合成を促進する知見を得ている<sup>40)</sup>。心臓においても、心筋細胞のみならず、間質細胞に作用し、コラーゲン合成能、蛋白質合成能を亢進させ、

肥大型心筋症における心肥大の発症に関与する可能性が示唆された。

一方、Spornらのグループは、 $TGF\beta 1$ が心筋細胞、血管内皮細胞および平滑筋細胞に存在していることを確認している。彼らは、その分布から、 $TGF\beta 1$ が間質線維の増生のみならず、心筋収縮蛋白質の産生のコントロールや心筋細胞の分化を抑制する因子である可能性を推測している<sup>41)</sup>。従って、 $TGF\beta 1$ の産生異常が心筋蛋白質の質的異常、量的異常を招いて心筋肥大を生じる可能性が考えられる。本研究では、 $TGF\beta 1$ の産生が心肥大発症前から増加しているため、肥大型心筋症の発症要因である可能性が示された。さらに、BI014.6においては心肥大が発症する20週齢において発症前期である4週齢よりも $TGF\beta 1$ の発現が亢進していたことより、心肥大、間質線維化の進展にも関与していることが示唆された。また、心筋における $TGF\beta 1$ と組織R-A系との相互関係についても今後検討が必要であると考えられ

た。

#### V : 結語

肥大型心筋症モデルハムスター (BIO14.6) を用いて、肥大型心筋症の心肥大における心筋局所 R-A系と TGF $\beta$  1との関連を検討し、以下の結果を得た。

- 1) 20週齢の BIO 14.6から得た培養心筋細胞では、AII刺激に対応して DAGおよび IP<sub>3</sub>の遊離が増大しており、PLC活性の亢進が示唆された。
- 2) シリアンハムスターの左室心筋において、ATNの mRNAの発現を確認した。BIO14.6と FI $\beta$ の各群間で発現の程度に差はみられなかった。また、週齢に対応して発現の変化は見られなかった。
- 3) BIO 14.6の心筋細胞膜分画の ACE活性は、4週齢では対照群と差を認めないが、20週齢では亢進していた。
- 4) BIO14.6の心筋では、FI $\beta$ と比較して、4週齢より TGF $\beta$  1 m-RNA発現の増大を認め、さ

らに、20週齢では4週齢に比較して発現が亢進していた。

以上の結果より、肥大型心筋症モデルハムスターにおいて、組織R-A系が存在し、AIIはイノシトールリン脂質代謝を介して心肥大に関与する可能性が示された。また、R-A系のみならず、ハムスター心筋にTGF $\beta$ 1がm-RNAレベルで発現していることを初めて証明した。その発現量の変化から、心筋症発症への関与が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御校閲、御指導を賜った北海道大学医学部循環器内科北畠 顕教授に厚く謝意を表します。また本研究につき御指導、御助言をいただきました北海道大学安田 寿一名誉教授、並びに、直接、研究、実験を指導して戴いた北海道大学医学部循環器内科、川口 秀明助手、岡本 洋博士、工藤 敏行先生、また、第一生化学教室、西信三教授、酒井 正春助教授、梨本 正之助手、第二生化学教室、石橋 輝雄教授、第二病理学教室、長嶋 和郎教授をはじめとする諸先生方に深謝致します。

文 献

- 1) Homburger, F., Baker, J. R., Nixon, C. W., Whitney, R.: Primary, generalized poly-myopathy and cardiac necrosis in an inbred line of Syrian hamsters. Med. Exp. 6: 339, 1962.
- 2) Murakami, T., Katada, T., Yasuda, H.,: Reduction in the Activity of the Stimulatory Guanine Nucleotide-binding Protein in the Myocardium of Spontaneously Hypertensive Rats. J. Mol. Cell. Cardiol. 19: 199, 1987.
- 3) Kawaguchi, H., Iizuka, K., Takahashi, H., Yasuda, H.: Inositol Triphosphate Kinase Activity in Hypertrophied Rat Heart. Biochim. Med. and Met. Biol. 44: 42, 1990.
- 4) Kawaguchi, H., Shoki, M., Sano, H., Kudo, T., Sawa, H., Okamoto, H., Sakata, Y.,



- Yasuda, H.: Phospholipid Metabolism in Cardiomyopathic Hamster Heart Cells. *Circ. Res.* 69: 1015, 1991.
- 5) Baker, K.M., Chernin, M.I., Wixon, S.K., Aceto J.F.: Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am. J. Physiol.* 28: H324, 1990.
- 6) Dzau, V.J., Re, R.N.: Evidence for the existence of renin in the heart. *Circulation* 75 (suppl 1): I-134, 1987.
- 7) Baker, K.M., Campanile, C.P., Trachte, G.J., Peach, M.J.: Identification and Characterization of the Rabbit Angiotensin II Myocardial Receptor. *Circ. Res.* 54: 286, 1984.
- 8) Murphy, T.J., Alexander, R.W., Griendling, K.K., Runge, M.S., Bernstein, K.E.: Isolation of cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature*

. 351: 233, 1991.

- 9) Schelling, P., Fisher, H., Ganten, D.:  
Angiotensin and cell growth: a link  
to cardiovascular hypertrophy? J. Hy-  
pertension. 9: 3, 1991.
- 10) Dzau, VJ.: Cardiac Renin-Angiotensin  
System. Am. J. Med. 84(suppl3A): 22,  
1988.
- 11) Geisterfer, AAT., Peach, MJ., Owens, GK.  
: Angiotensin II induces hypertrophy,  
not hyperplasia, of cultured rat aor-  
tic smooth muscle cells. Circ. Res. 62  
:749, 1988.
- 12) Alexander, RW., Brock, TA., Gimbrone, MA  
. , Rittenhouse, SE.: Angiotensin incre-  
ases inositol triphosphate and calci-  
um in vascular smooth muscle. Hyper-  
tension. 7: 447, 1985.
- 13) Kawahara, Y., Sunako, M., Tsuda, T., Fu-  
kuzaki, H., Fukumoto, Y., Takai, Y.:

Angiotensin II induced expression of the c-fos gene through kinase C activation and calcium ion mobilization in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150 : 52, 1988.

14) Lindpaintner, K., Ganten, D.: The Cardiac Renin-Angiotensin System : An Appraisal of Present Experimental and Clinical Evidence. *Circ. Res.* 68:905, 1991.

15) Sporn, M., Robert, A.: Transforming Growth factor  $\beta$  : Multiple actions and potential clinical applications. *J. A. M. A.* 262: 938, 1989.

16) Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M., Sporn, M.: Transforming growth factor-beta in human platelets. *J. Biol. Chem.* 258: 7155, 1983.

17) Roberts, A., Sporn, M., Assoian, R., Smi-

th, J., Roche, N., Wakefield, L., Heine, U., Liotta, L., Falanga, V., Kegl, J., Fauci, A.: Transforming growth factor type  $\beta$ : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:4167, 1986.

- 18) Sporn, M., Roberts, A.: Peptide growth factors are multifunctional. Nature. 332: 217, 1988.
- 19) Schneider, M.D., Parker, T.G.: Cardiac Myocytes as Targets for the Action of Peptide Growth Factors. Circulation. 81:1443, 1990.
- 20) Chomczynski, P., Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162: 156, 1987.

- 21) Ohkubo H., Nakayama K., Tanaka T.,  
Nakanishi S.: Tissue distribution of  
rat angiotensinogen m-RNA and struc-  
tural analysis of its heterogeneity.  
J. Biol. Chem. 261: 319, 1986.
- 22) Kasid, A., Bell, G.I., Director, EP.:  
Effects of Transforming growth factor  
-  $\beta$  1 on human lymphokineact-activated  
killer cell precursors. J. Immun. 141:  
690, 1988.
- 23) Stewart, T.A., Weare, J.A., Erdos, E.G.:  
Human Piptidyl Dipeptidase (Converti-  
ng Enzyme, Kininase II). Methods In  
Enzymology. 80: 450, 1981.
- 24) Peterson, G.L.: Review of the Folin phe-  
nol protein quantitation method of  
Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall.  
Anal. Biochem. 100: 201, 1979.
- 25) Glick, M.R., Burns, A.H., Reddy WJ.: Dis-  
persion and isolation of beating ce-

- lls from adult rat heart. Anal Biochem. 61:32, 1974.
- 26) Irvine, RF., Letcher, AJ., Heslop, JP., Berridge, MJ.: The inositol tris/tetrakisphosphate pathway - demonstration of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 3-kinase activity in animal tissues. Nature. 320: 631, 1986.
- 27) Downes, CP., Hawkins, PT., Irvine, RF.: Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and not phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate is the probable precursor of inositol 1,3,4-trisphosphate in agonist-stimulated parotid gland. Biochem. J. 238:501, 1986.
- 28) Podzuweit, T., Granz, M., Muller, A., Schaper, W.: Inositol(1,4,5)-triphosphate levels in ischemic and reperfused pig myocardium (abstract). J. Mol. Cell. Cardiol. 21: S34, 1989.
- 29) Kawaguchi, H., Yasuda, H.: Effect of

various plasminogen activators on prostacyclin synthesis in cultured vascular cells. Circ.Res.63:1029,1988

30) Simpson, P., McGrath, A., Savion, S.: Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. Circ.Res. 51: 787, 1982.

31) Simpson, P.: Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an  $\alpha_1$ -adrenergic receptor and induction of beating through an  $\alpha_1$ - and  $\beta_1$ -adrenergic receptor interaction. Circ.Res.56:884, 1985.

32) Gwathmey, JK., Copelas, L., Mackinnon, R., Schoen, FJ., Feldman, MD., Drossman, W., Morgan, JP.: Abnormal intracellular calcium handling in myocardium

- from patients with end-stage heart failure. *Circ.Res.*61: 70, 1987.
- 33) Whitmer, J.T., Kumar, P., Solaro, R.J.: Calcium transport properties of cardiac sarcoplasmic reticulum from cardiomyopathic Syrian hamsters (BI053.58, 14.6): Evidence for a quantitative defect in dilated myopathic hearts not evident in hypertrophic hearts. *Circ.Res.*62:81, 1988.
- 34) Bond, M., Jaraki, A.R., Disch, C.H., Healy, B.P.: Subcellular Calcium Content in Cardiomyopathic Hamster Hearts In Vivo: An Electron Probe Study. *Circ.Res.*64: 1001, 1989.
- 35) Morgan, H.E., Baker, K.M.: Cardiac Hypertrophy: Mechanical, Neural, and Endocrine Dependence. *Circulation.*83: 13, 1991.
- 36) Izumo, S., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V.



- : Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:339, 1988.
- 37) Stralsen, N.F., Simpson, P.C., Bishopric N.: Cardiac myocyte hypertrophy is associated with c-myc protooncogene expression. Proc. Acad. Sci. USA. 83:8348, 1986.
- 38) Berridge, M.J.: Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. Biochem. J. 220:345, 1984.
- 39) Naftilan, A.J., Pratt, R.E., Dzau, V.J.: Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expression by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. J. Clin. Invest. 83:1419, 1989.
- 40) Sano, H., Okada, H., Kawaguchi, H., Yasuda, H.: Increased angiotensin II -

stimulated collagen synthesis in  
cultured cardiac fibrosis from  
spontaneously hypertensive rats.

Circulation 84(4):II-48, 1991.

- 41) Casscells, W., Bazoberry, F., Speir, E.,  
Thompson, N., Flanders, K., Kondaiiah, P.,  
Ferrans, VJ., Epstein, SE., Sporn, M.:  
Transforming Growth Factor- $\beta$  1 in No-  
rmal Heart and in Myocardial Infarct-  
ion. Annals.N.Y.Acad.Sci.593:148, 1990

Figure1 (a,b)

Macroscopic view of cross-sectional plane of the left ventricle from FI $\beta$  (1-a) and BI014.6(1-b) hamsters, showing marked left ventricular wall thickening with calcification (small arrow) and extensive fibrosis (large arrow). H-E stain  $\times 15$

Figure2 (a,b)

Histology of the section from FI $\beta$  (2-a) and BI014.6 (2-b) hamsters, showing disarray (small arrow) of the hypertrophied myocardial cells and, progression of fibrosis (large arrow), which are characteristic findings in the BI014.6 specimen. H-E stain  $\times 400$

Table1

HW/BW is significantly increased in 20 week old BI014.6 hamster compared with the age-matched FI $\beta$  hamster, demonstrating the development of left ventricular hypertrophy.

Figure3

Effects of angiotensin II stimulation on phospholipase C activity and sn-1,2-diacylglycerol(DG) production in BI014.6 and FI $\beta$  hamsters with the age of 4week and 20week, determined as described in Materials and Methods. \*  $p < 0.05$  compared with age-matched FI $\beta$  hamsters.

#### Figure4

Effects of angiotensin II stimulation on inositol monophosphate (IP1; left panel) and on inositol 1,4,5-triphosphate (IP3; right panel) production in BI014.6 and FI $\beta$  hamsters with the age of 4week and 20week, determined as described in Materials and Methods.

#### Figure5

Activity of angiotensin converting enzyme in BI014.6 and FI $\beta$  hamsters with the age of 4week and 20week, determined as described in Materials and Methods. \*  $p < 0.05$  compared with age-matched FI $\beta$  hamsters.

#### Figure6

##### Identification of angiotensinogen (ATN) m-RNA

Polyacrylamide gel electrophoresis of sample-RNA hybridized with  $\alpha^{32}\text{P}$  labeled ATN-RNA probe. Shown is an autoradiograph of native gel and each lane contains 30  $\mu\text{g}$  of total RNA hybridized with ATN-RNA probe, which was treated with RNase-I digestion following hybridizing reaction. lane 1: Yeast RNA hybridized with ATN-RNA probe was digested completely with RNase-I. lane 2: Yeast RNA hybridized with ATN-RNA probe was treated with no RNase-I digestion, showing the the size of ATN-RNA probe. Each sample RNA was extracted from the ventricle of lane 3: 4 week old FI $\beta$ , lane 4: 20 week old FI $\beta$ , lane 5: 4 week old BI014.6, lane 6: 20 week old BI014.6 hamsters. The expression of ATN-RNA probe

was detected in each lane, demonstrating the production of ATN-mRNA in the left ventricle of FI $\beta$  and BI014.6 hamsters.

#### Figure7

#### Northern analysis of TGF $\beta$ 1 m-RNA

The expression of TGF $\beta$ 1 m-RNA was demonstrated by the band at 2.4kb, probed with  $\alpha$ -<sup>32</sup>P labeled human TGF $\beta$ -cDNA. Actin-mRNA expression was also evaluated in each lane. Densitometric values are described in Table2. The intensity of expression increased markedly in 4 and 20 week-old BI014.6 hamsters compared with the age-matched FI $\beta$  hamsters, which was more intensified in 20 week old than 4week old BI014.6 hamsters.

#### Table2

The intensity of expression in Northern blotting was evaluated by the densitometry.

### Characteristics of normal and myopathic hamsters

Group	N	Body Weight (g)	Heart Weight (mg)	HW/BW (mg/g)
4W. FI $\beta$	5	44.0 $\pm$ 2.4	290.8 $\pm$ 69.8	5.7 $\pm$ 1.5
4W, BIO14.6	5	43.2 $\pm$ 3.6	230.0 $\pm$ 21.3	5.3 $\pm$ 4.6
20W. FI $\beta$	5	133.6 $\pm$ 4.9	471.8 $\pm$ 42.0	3.5 $\pm$ 0.4
20W. BIO14.6	5	104.4 $\pm$ 10.5*	501.8 $\pm$ 45.6	4.8 $\pm$ 0.6*

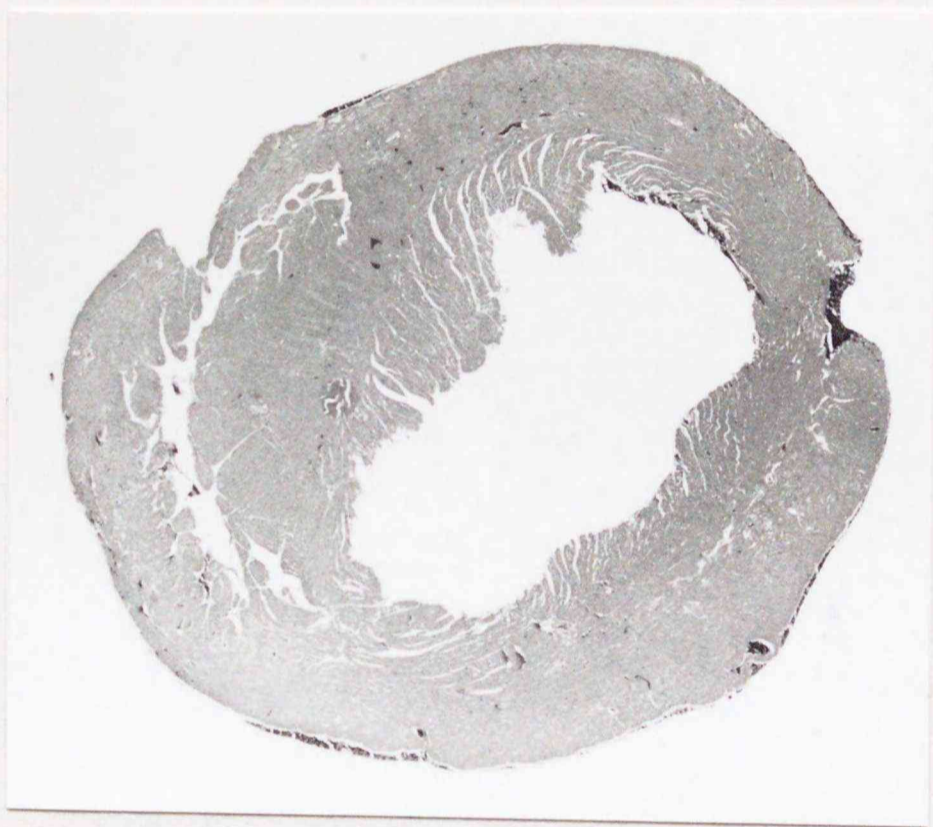
Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

HW/BW is heart weight to body weight ratio.

\*P < 0.05 compared with age-matched control hamsters.

Table 1

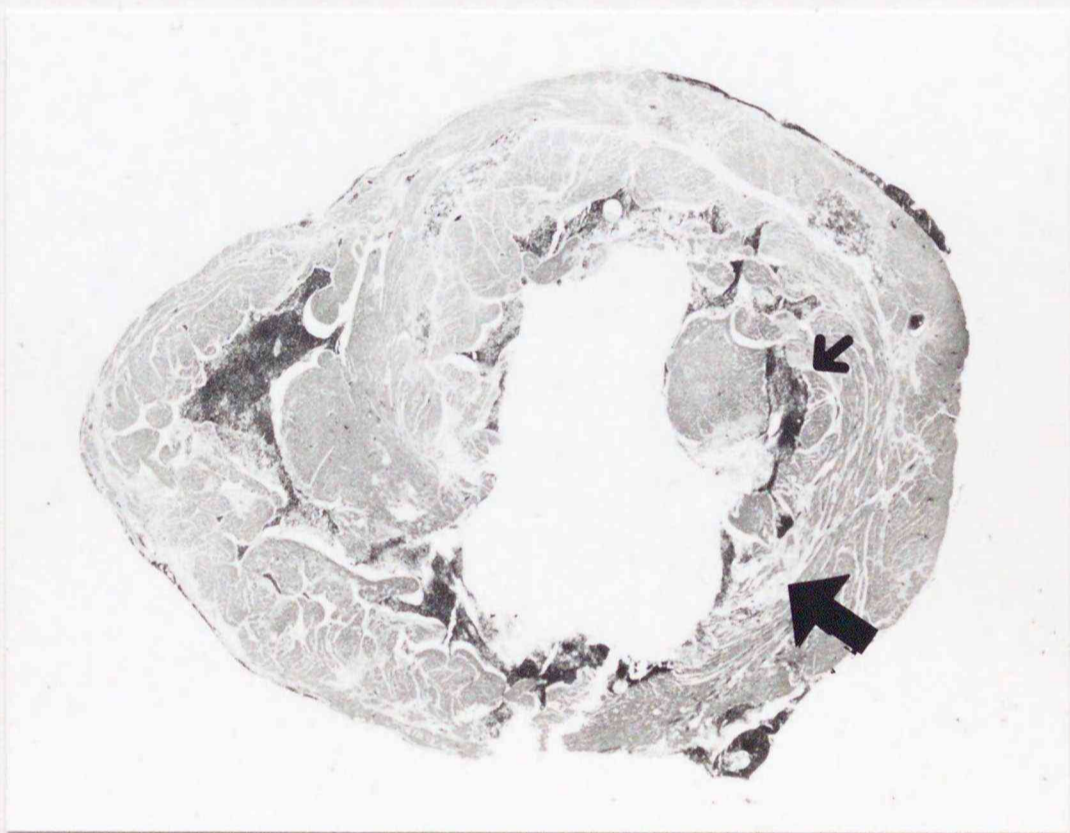
坂田 芳人



1-a

坂田芳人

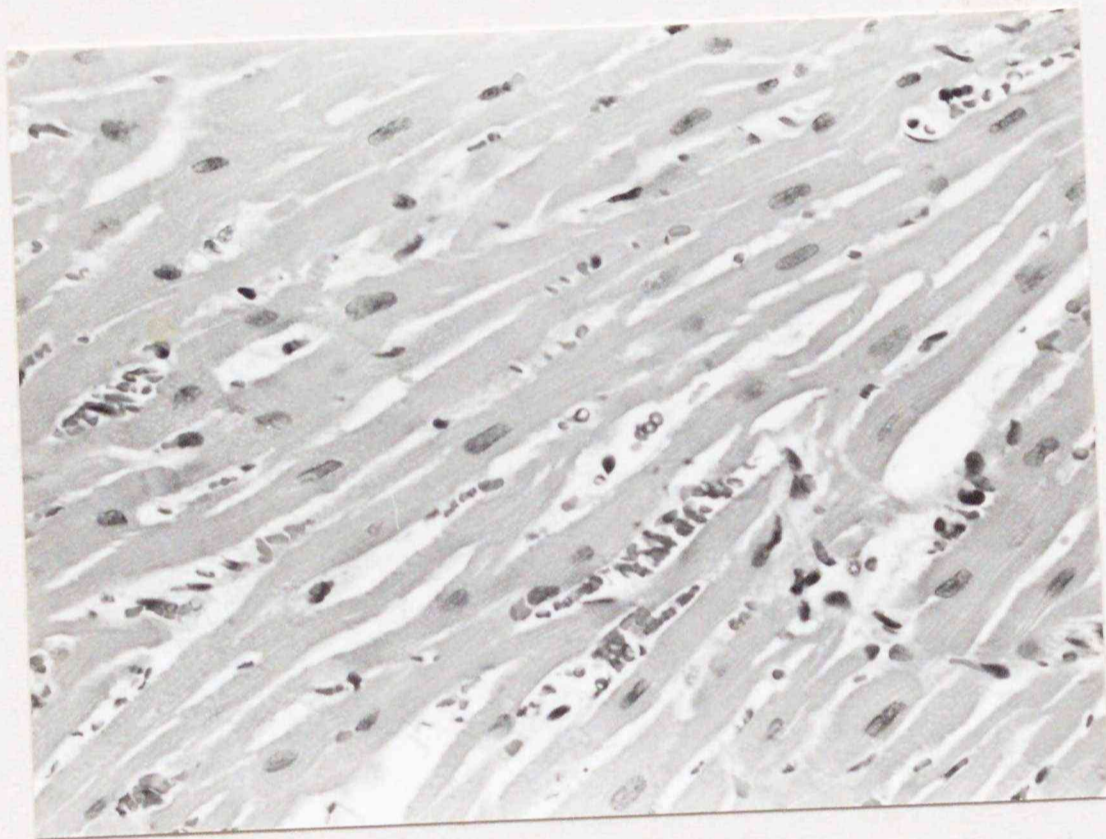
5025



1-b

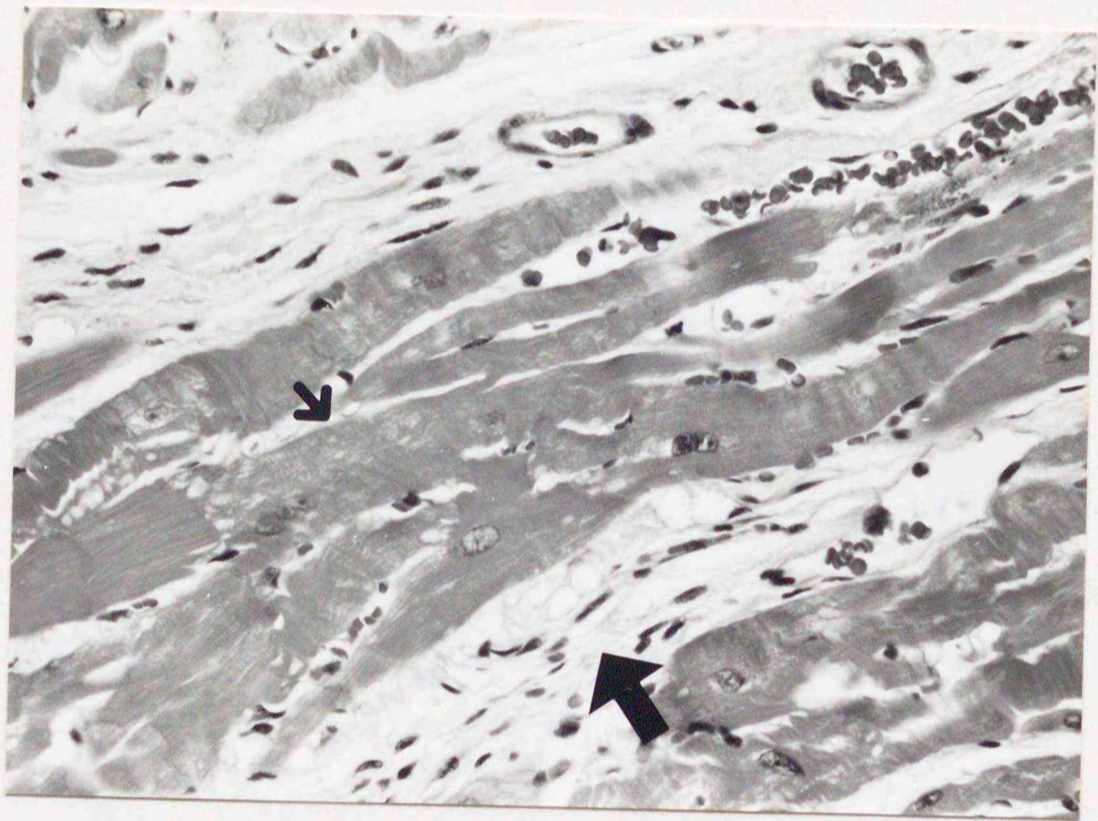
坂田 芳人





2-a

坂田 晋人



2-b

坂田 芳人

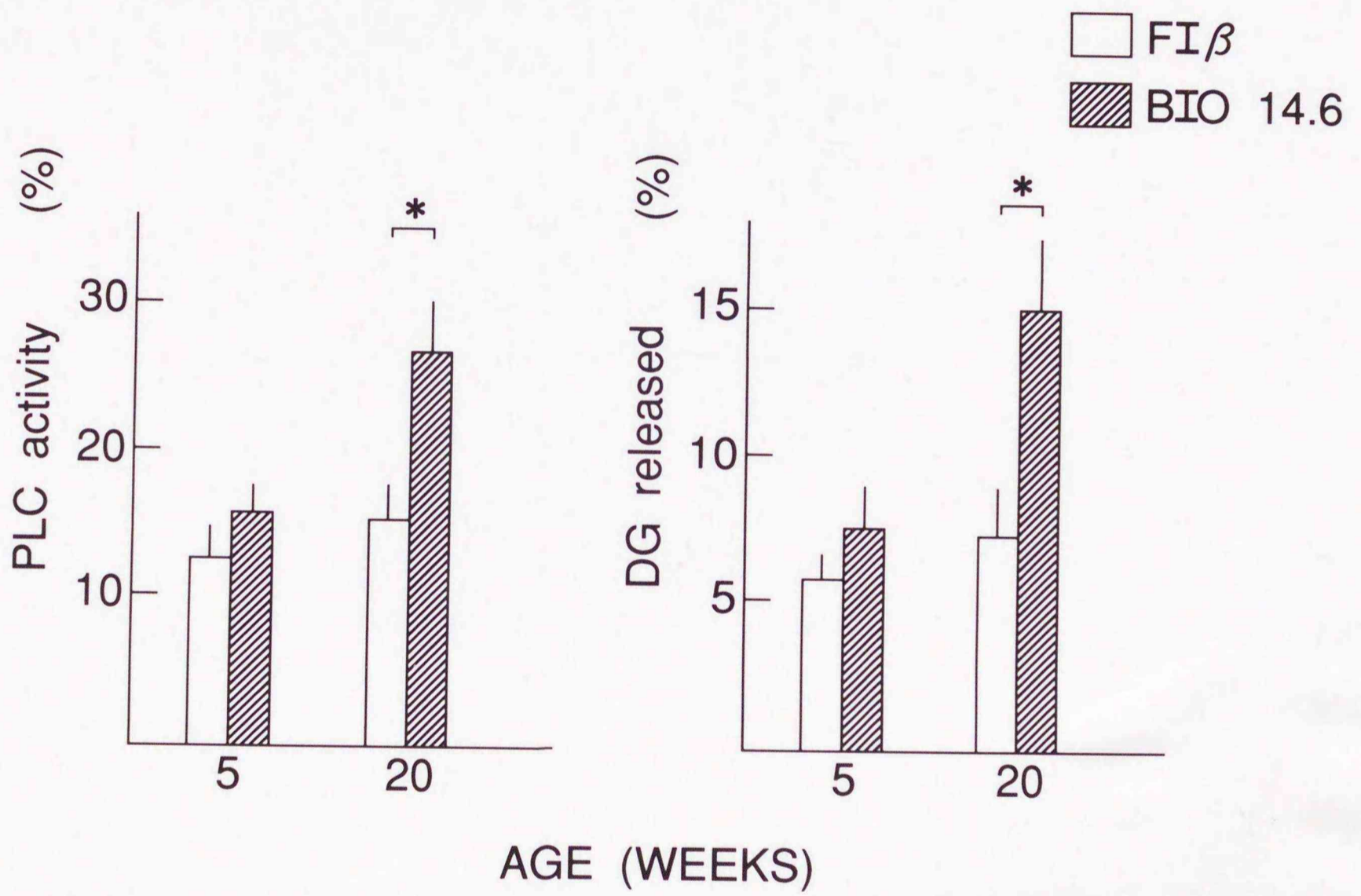


Figure 3

坂田 芳人

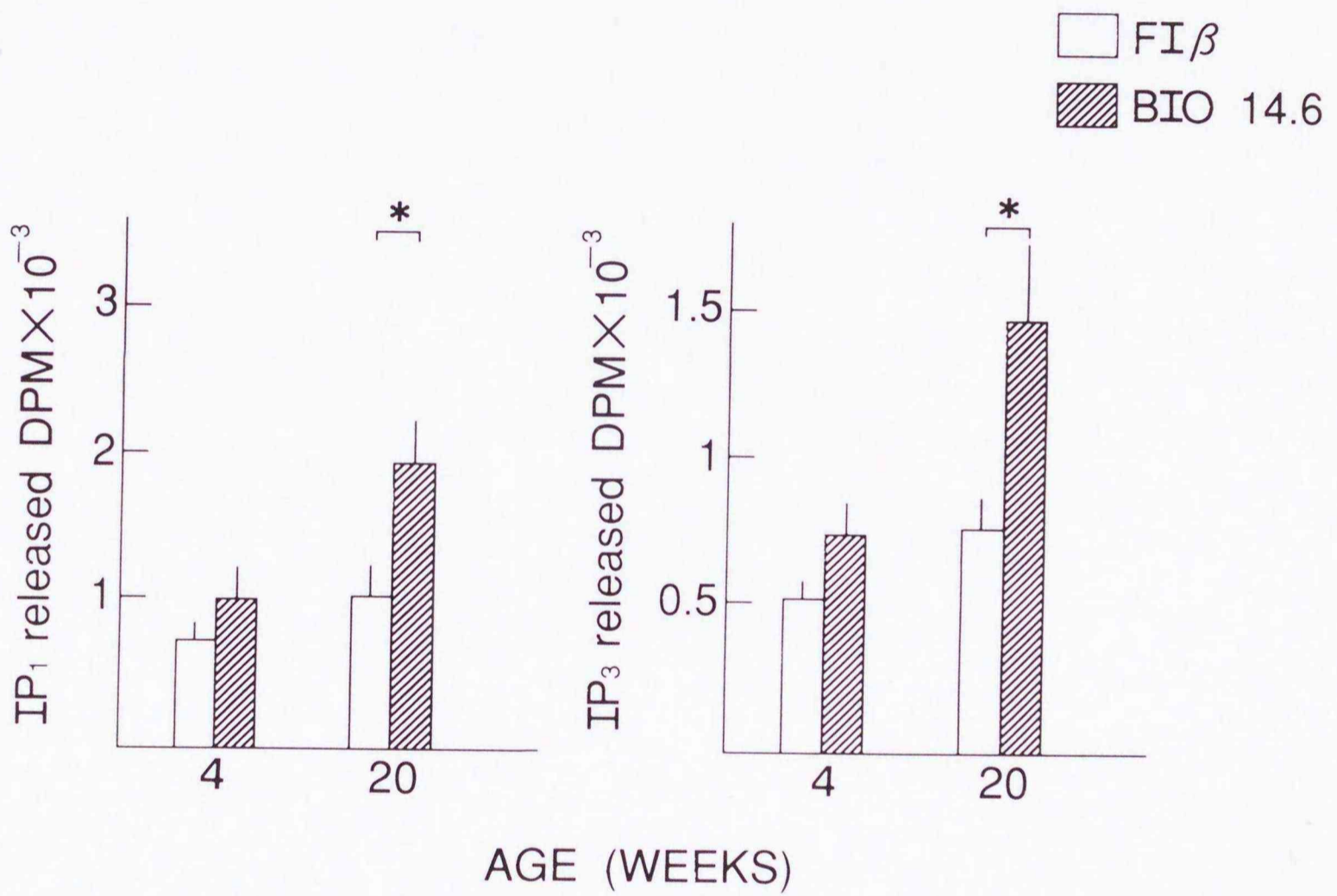


Figure 4

坂田 晋人

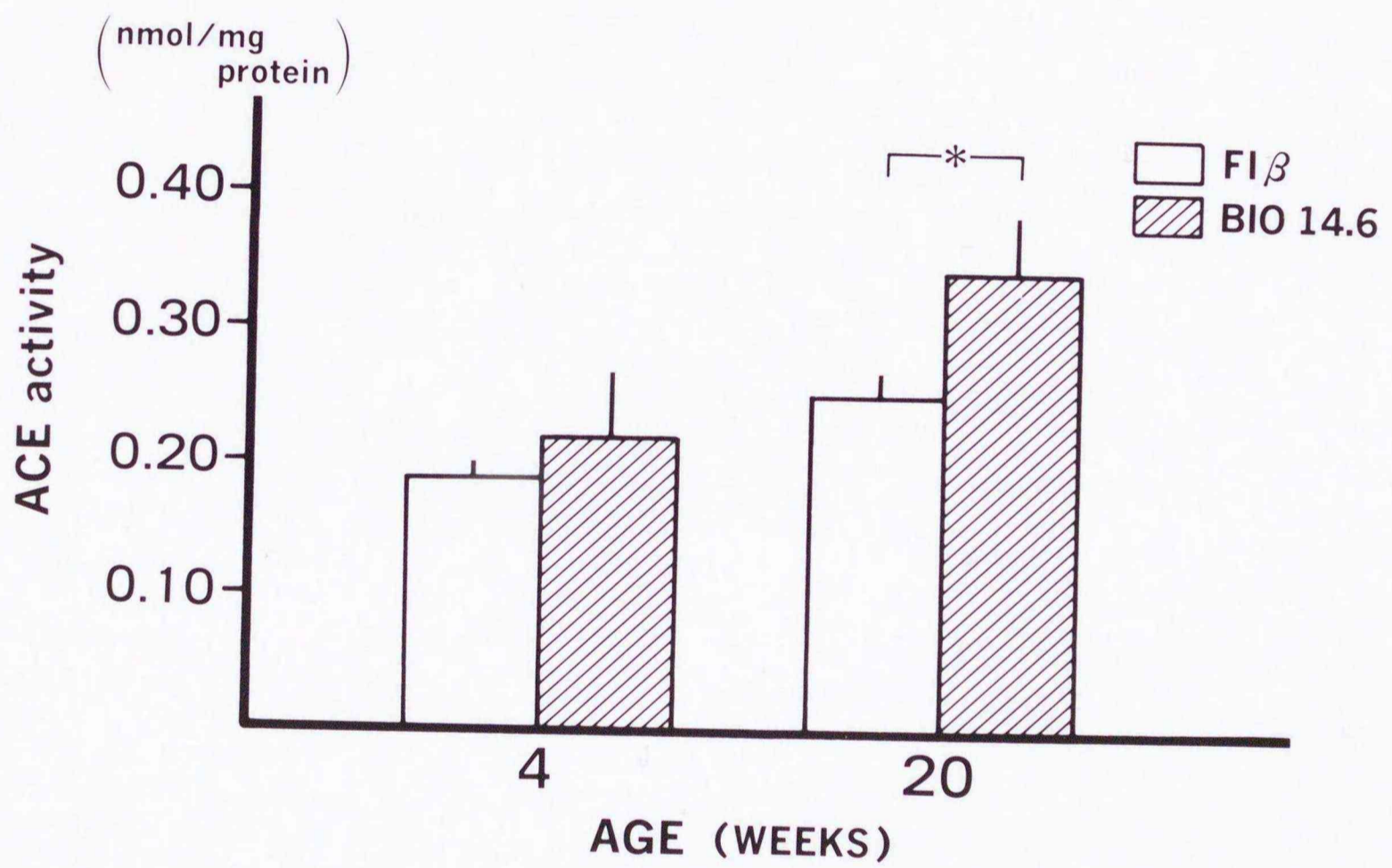


Figure 5

坂田 芳人

# Ribonuclease Protection Assay

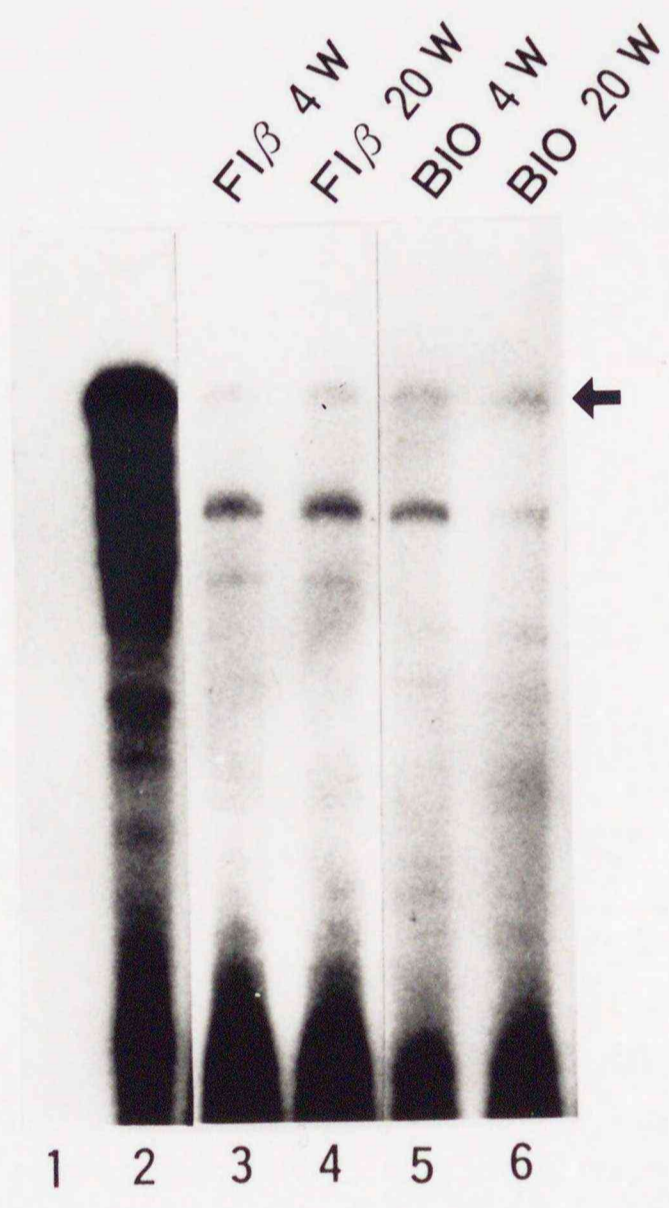


Figure 6.

# Northern blot analysis

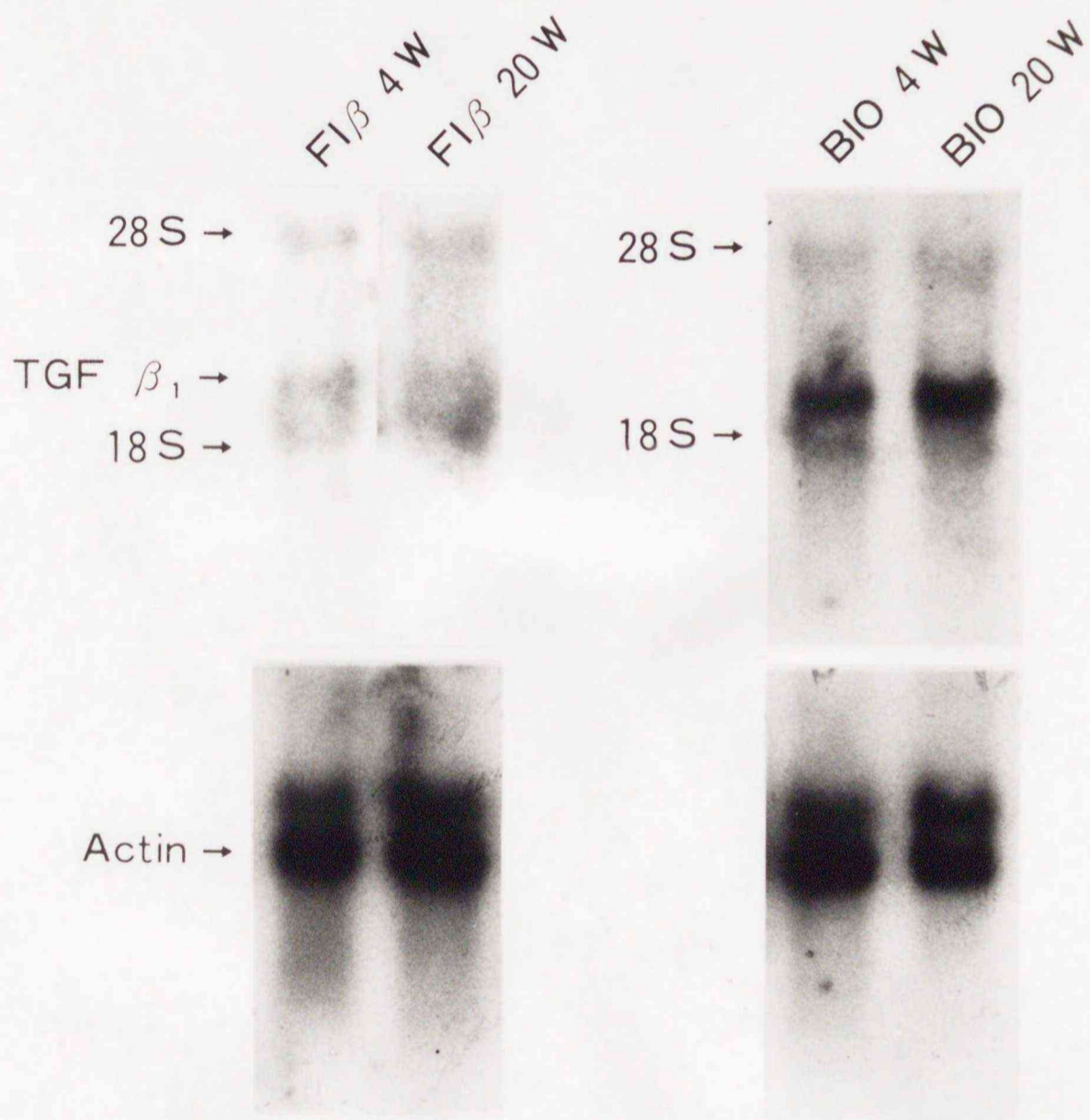


Figure 7

坂田 芳人

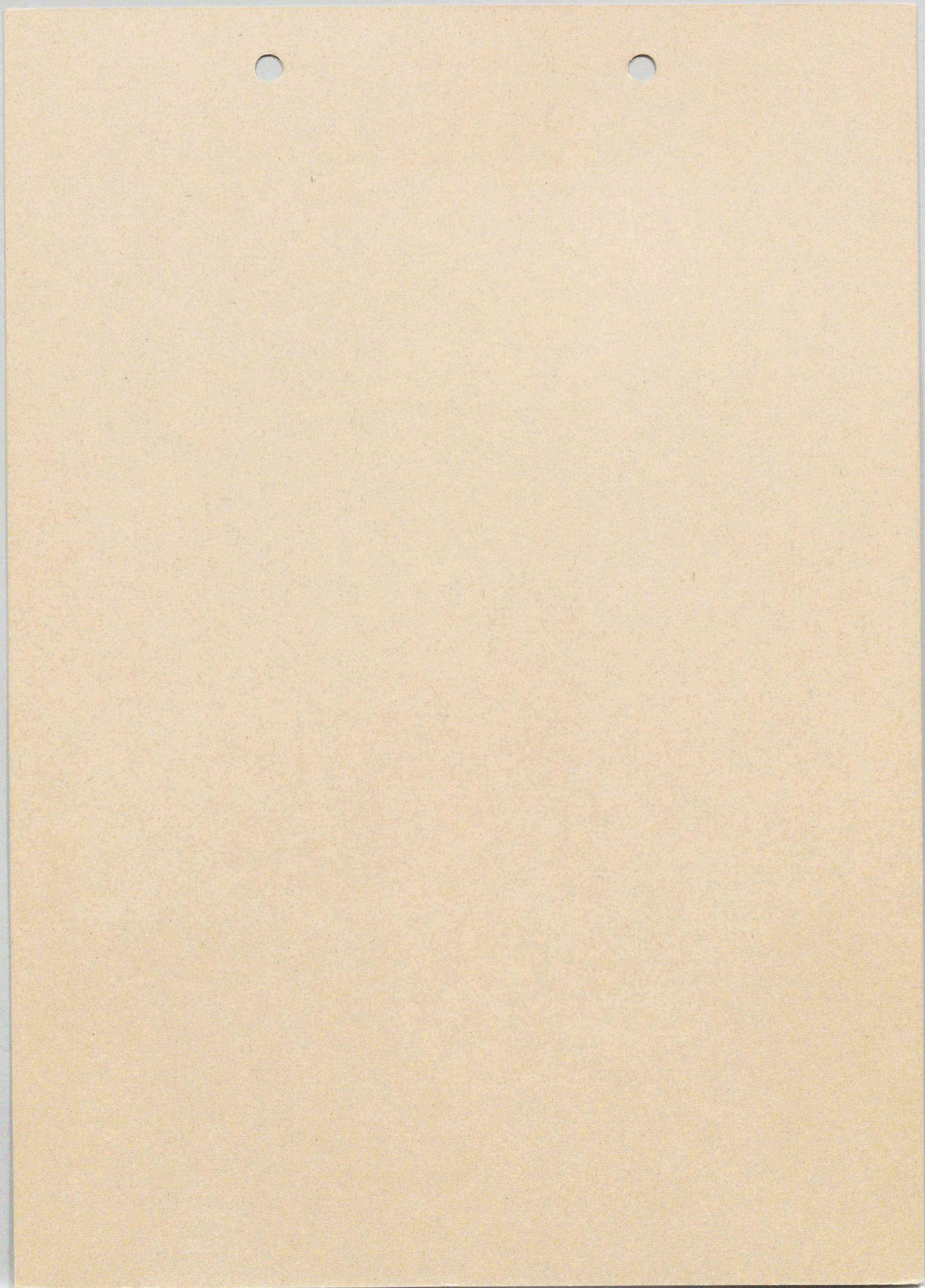
Intensity of the expression detected by densitometer

	Actin (A)	TGF $\beta$ 1 (T)	T / A ( $\times 10$ )
4W. F1 $\beta$	$7.4 \times 10^4$	$7.2 \times 10^3$	0.97
4W. BIO 14.6	$12.8 \times 10^4$	$54.0 \times 10^3$	4.21
20W. F1 $\beta$	$11.3 \times 10^4$	$7.0 \times 10^3$	0.63
20W. BIO 14.6	$8.6 \times 10^4$	$70.0 \times 10^3$	8.14

Table 2

坂田 芳人





inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

