

心筋症ハムスターの培養心筋線維芽細胞におけるコラーゲン合成能とそれに及ぼすアンジオテンシン変換酵素阻害薬の影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9159

心筋症ハムスターの培養心筋線維芽細胞における コラーゲン合成能とそれに及ぼすアンジオテンシン 変換酵素阻害薬の影響

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 馬淵 宏教授)
篠原 豪 秀

ヒト特発性心筋症のコラーゲン代謝を明らかにする目的で、ヒト特発性心筋症のモデル動物である心筋症ハムスターの4代継代培養心筋線維芽細胞を³H-プロリンで標識してコラーゲン合成能を量的、質的に検討した。更にアンジオテンシン変換酵素阻害薬カプトプリルを1 μ M添加して、コラーゲン合成能に及ぼすカプトプリルの影響についても検討した。心筋症ハムスターとしてBio14.6, 対照として正常ハムスター(F1b)を用いた。その結果、Bio14.6培養心筋線維芽細胞の総コラーゲン合成量とコラーゲン合成比は13週齢から25週齢にかけて増加し、25週齢のそれは13週齢のBio14.6および25週齢のF1bより有意に大であった。質的には、Bio14.6では13週齢、25週齢ともにF1bと比べてⅢ型、V型合成比率が大きく、13週齢より25週齢にかけてⅠ型が減少し、Ⅲ型、V型コラーゲンが増加した。カプトプリル添加により25週齢のBio14.6の総コラーゲン合成量は有意に減少した。質的には、Ⅰ型が微増し、Ⅲ型が減少してⅠ型/Ⅲ型比は有意に増加した。以上より、Bio14.6培養心筋線維芽細胞におけるコラーゲン代謝異常が認められた。また、カプトプリルがそのコラーゲン代謝を量的にも質的にも改善することが証明され、Bio14.6培養心筋線維芽細胞に対するカプトプリルの組織レニン-アンジオテンシン系を介するコラーゲン代謝は正作用が推定された。

Key words cardiomyopathic syrian hamster, cardiac fibroblast, structural remodeling of the heart, collagen synthesis, angiotensin converting enzyme inhibitor

肥大型心筋症は、病理組織学的には心筋細胞の肥大、錯綜配列とともに心筋間質の線維化の増加が認められる疾患であり、Sugihara¹⁾は肥大型心筋症における心機能障害、特に拡張機能障害には心室壁肥厚とともに心筋間質線維化の増加が関与していることを報告した。一方、Weber²⁾は、圧負荷肥大型心筋における心臓の構造変化と拡張機能の関係を自然発症高血圧ラット(spontaneously hypertensive rat, SHR)を用いて検討し、SHRの心臓において、組織学的には個々の心筋細胞の肥大とともに心筋間質の線維化(心筋細胞壊死を伴わない反応的線維化と心筋細胞壊死を伴う置換的線維化³⁻⁵⁾)等の心筋構造のリモデリングが生じると報告した。彼らは心筋間質線維化の程度と心拍出量との間に負の相関関係を認めており、心機能には間質の変化がより重要な役割をはたしていると考えている。

心筋の全細胞のうち約3分の1が実質細胞の心筋細胞であり、残り3分の2は間質細胞である⁶⁾。間質細胞は大部分が線維芽細胞であり、その他平滑筋細胞、内皮細胞などにより構成されており、この線維芽細胞は細胞外マトリックス蛋白であるコラーゲンおよびフィブロネクチンの産生を担っている。心筋の実質、間質細胞はコラーゲンを主体とした結合組織により結合し、心筋としての構造および機能を維持しており、線維芽細

胞のコラーゲン代謝は心筋の構造および機能に直接的な影響を及ぼしていると考えられる。

以上のことから、肥大型心筋症においては、心筋実質細胞の異常の他に心筋間質細胞である心筋線維芽細胞におけるコラーゲン代謝異常が存在する可能性が推定され、心機能障害に大きく関与していることが推察される。今回著者は、心筋症モデル動物である心筋症ハムスター(Bio14.6)⁷⁾を用いて、その培養心筋線維芽細胞におけるコラーゲン代謝について検討した。実験的肥大型心臓モデルやヒト肥大型心臓のみならず^{8,9)}、心筋症ハムスターにおいてもその病因に組織レニン-アンジオテンシン系が関与している可能性が推定されており¹⁰⁾、アンジオテンシン変換酵素(angiotensin converting enzyme, ACE)阻害薬が心筋線維芽細胞におけるコラーゲン代謝にどのような影響を及ぼすかについても検討した。

対象および方法

1. 心筋症ハムスターの培養心筋線維芽細胞におけるコラーゲン合成能およびACE阻害薬の影響の検討
 1. 実験動物
- 13週齢(104.2g)および25週齢(120.4g)の雄性心筋症ハムス

平成7年7月31日受付, 平成7年9月21日受理

Abbreviations: ABC, avidin-biotinylated peroxidase complex; ACE, angiotensin converting enzyme; CP, collagenous protein; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; FBS, fetal bovine serum; NCP, non-collagenous protein; SHR, spontaneously hypertensive rat

ター Bio14.6⁷⁾ (Bio Breeders, Boston, U.S.A.) を用いた。対照として13週齢 (129.3g) および25週齢 (134.6g) の正常ハムスター Flb (Bio Breeders) を用いた。

2. 細胞培養

ハムスターをエーテルにて麻酔後、胸部正中切開にて心臓を無菌的に摘出した。クリーンベンチ内で、心房、大血管を切除し、心室筋のみを1mm立方以下の大きさに細切し、エキスプラント (explant) を作成した。このエキスプラントを25cm²培養フラスコ (Corning, Oneonta, U.S.A.) に散布し、37℃, 5% CO₂, 95% 空気の条件下で培養した。培地として10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, Grand Island, U.S.A.), カナマイシン (100μg/ml) (明治, 神奈川), アンフォテリシンB (5μg/ml) (大日本, 大阪) を加えたダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) を用い、3日毎に培地を新鮮なものに交換した。エキスプラントより細胞が遊出増殖し、細胞密度がコンフルエント (confluent) に達した時に、2% EDTA-0.25% トリプシンを用いて細胞を継代し更に培養した。実験には4代継代細胞を用いた。

3. 免疫組織化学染色

一部の継代細胞を用い免疫組織化学染色を行い、心筋線維芽細胞であることの確認および細胞集団の純度の検定を行った。以下に染色方法を詳述する。免疫染色はアビジン・ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotinylated peroxidase complex, ABC) 法にて行った。スライドガラス上の細胞集団をアセトンにて固定後、パラフィン包埋した。脱パラフィン化した細胞分画を過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼのブロックを行った後、非特異的反応を阻害するためマウス正常血清を室温にて10分間反応させた。一次抗体として抗第Ⅷ因子関連抗原, 抗デスミン, 抗ビメンチンの3種の抗体 (ダコジャパン, 京都) を用い、室温にて30分間反応させた。二次抗体としてビオチン化マウス抗ウサギ IgG 抗体を室温にて30分間反応させた。次に ABC を室温にて30分間反応させた。発色は3,3'-ジアミノベンチジン溶液を用いた。核染色はヘマトキシリンにて行った。

4. コラーゲン合成能の解析

細胞を、10% FBS 添加 DMEM 1ml 加えた 35mm 径プラスチックシャーレに1×10⁵個接種した。以後、3日毎に培地を新鮮なものに交換した。10日目に新鮮な培地に50μCi/mlのL-[2,3-³H] プロリン (Amersham, Amersham, England), 0.1mMのアスコルビン酸ナトリウムおよび0.5mMのベータ・アミノプロピオニトリルマル酸を培養液に加えた。24時間標識後、培地とともに細胞を回収し超音波処理し、一部は定量分析、残りを型別分析の試料とした。

1) コラーゲンの定量分析

試料を5分間煮沸し、種々の酵素を不活化した。分析は Peterkofsky ら¹¹⁾ のコラゲナーゼ消化法を用いた。試料は、0.05M 酢酸に対して十分な透析を行った後、凍結乾燥した。凍結乾燥した試料を0.04N 水酸化ナトリウム水溶液に再溶解させ、次いで Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) で中和した後、コラゲナーゼ (*Clostridium histolyticum* コラゲナーゼ, Form III) (Advance Biofactures Corporation, Lynbrook, U.S.A.) で37℃, 2時間消化を行った。消化後試料に10%トリクロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) と0.5%タンニン酸を加え、1000×gで5分間の遠心により沈殿した高分子量画分 (非コ

ラーゲン性蛋白) (non-collagenous protein, NCP) を上清中の低分子量画分 (collagenous protein, CP) と分離した。各々の画分を液体シンチレーター ACS-II (Amersham) に溶解し、シンチレーションカウンター LSC-700 (アロカ, 東京) で放射活性を測定した。次いで、細胞1個あたりの NCP と CP の放射活性を算出した後、総蛋白合成活性の比を Peterkofsky ら¹¹⁾ の式、 $[CP/(CP+5.4 \times NCP)] \times 100(\%)$ にて算出した。測定は各々2枚ずつのシャーレに対して行い平均値と標準偏差を算出した。

2) コラーゲンの定性分析

試料に中性プロテアーゼインヒビター (0.25M EDTA2Na, 10mM フェニルメタンсульフォニルフルオリド, 0.1M Nエチルマレイミド) を加えた後、コラーゲンの型別分析を行った。

分析は Hata ら¹²⁾ の方法に従って行った。分析用試料に硫酸アンモニウム (176mg/ml) を加えて硫酸沈殿画分を得た。この画分を0.5M酢酸に再び溶解させ、最終濃度100μg/mlのペプシン (Sigma, St. Louis, U.S.A.) で4℃, 6時間消化した。試料全容量の1/10量の2M Tris-HCl 緩衝液を加えた後、5N水酸化ナトリウム溶液でペプシンを不活化し、凍結乾燥して電気泳動用試料とした。

電気泳動は Weber ら¹³⁾ の SDS-PAGE を用いた。アクリルアミドの濃度は濃縮用ゲルは3% (pH6.8), 分離用ゲルは5% (pH8.8) に調節した。

泳動終了後、スラブ・ゲルを1.1Mサリチル酸ナトリウムに1時間浸した後乾燥し、フルオログラフィー¹⁴⁾¹⁵⁾を行った。X線フィルム XAR-5 (Eastman Kodak Company, Rochester, U.S.A.) を-80℃, 5日ないし10日、乾燥ゲルに露光した後、現像した。感光したフィルム上の各コラーゲンに相当するバンドの濃度をデントメーター PDS15 (サクラ, 東京) を用いて、500nmの波長の吸光度を測定し、記録紙に記録した。I型コラーゲンはα₁(I)およびα₂(I)のバンドを、III型コラーゲンは還元前のγ位置のα(III)を、IV型コラーゲンは還元前のバンドを、またV型コラーゲンについてはα₁(V)のバンドを計測した。

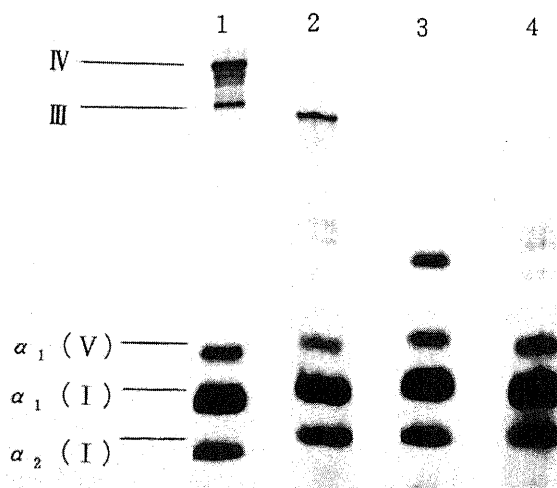


Fig. 1. SDS-PAGE (fluorogram) of ³H-proline labeled collagenous protein synthesized by cultured cardiac fibroblasts. Lanes 1 and 2, non-reduction; lanes 3 and 4, reduction by DTT; lanes 1 and 3, Bio 14.6 (25 weeks); lanes 2 and 4, captropil supplemented Bio 14.6 (25 weeks); α₁(I) and α₂(I), type I collagen; III, type III collagen; IV, type IV collagen; α₁(V), type V collagen.

(図1)．各バンドに相当する吸光波形を記録紙から切り抜き、各型別の重量を測定することにより、各型別コラーゲンの割合を算出した。

3) コラーゲン合成能に及ぼすカプトプリル(三共, 東京)の影響の検討

血清には, ACE が豊富に存在しており¹⁶⁾, 血清中の ACE の影響を排除するために, カプトプリル添加前に無血清培地に交換した. ヒトにおいて臨床的にカプトプリルを常用量投与した際の最高血中濃度は 5-10 μ M である¹⁷⁾ こと, およびカプトプリルの直接の細胞毒性をさけるために今回培地に添加するカプトプリルの濃度として治療域と考えられる 1 μ M を採用した.

25週齢の Bio14.6 培養心筋線維芽細胞を 35mm 径プラスチックシャーレに接種後, 9 日目に新鮮な無血清培地に交換し, そこに 1 μ M のカプトプリルを加えた. 24時間後, L-[2,3-³H] プロリン, アスコルビン酸ナトリウムおよびベータ・アミノプロピオニトリルフマル酸を加え, 試料を作成した. 前述の方法にてコラーゲンの定量および定性分析を行った.

II. 統計学的検定法

得られた成績はすべて平均値±標準偏差で示した. 各群間の平均値の差の検定は, 1元配置分散分析後, Scheffe の多重比較を用いて行い, 危険率 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した.

成 績

I. 免疫組織化学染色

ほとんど全ての細胞の核周囲の細胞質にビメンチン活性が認められ(図2)たが, デスミン, 第VIII因子関連抗原は陰性であった. 実験に用いた細胞がほとんど全て心筋線維芽細胞であることが確認された.

II. Bio14.6 培養心筋線維芽細胞のコラーゲン合成能

1. コラーゲン合成量

培養心筋線維芽細胞1個あたりの総コラーゲン合成量は, 13週齢では, Bio14.6 と F1b で差はなかった (Bio14.6, 4.8 \pm 0.4; F1b, 6.5 \pm 0.9cpm/細胞). 25週齢では Bio14.6, F1b とともに13週齢に比較して増加したが (Bio14.6, 12.4 \pm 1.6; F1b, 8.7 \pm 0.9cpm/細胞), その増加度は F1b より Bio14.6 で大きく, 13週齢の Bio14.6 および25週齢の F1b より有意に大であった.

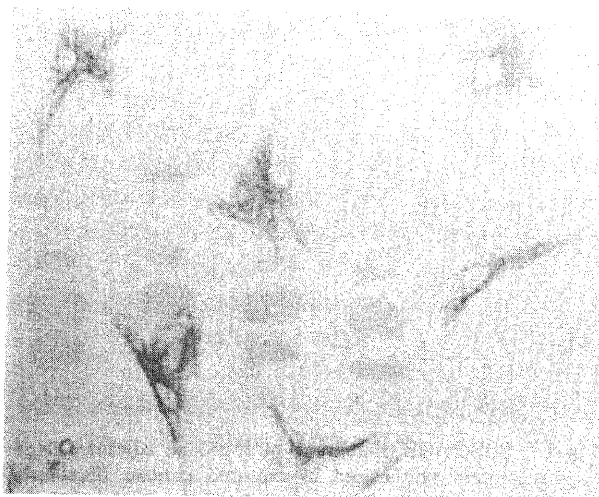


Fig. 2. Photomicrograph of cultured fibroblasts from cardiomyopathic hamsters by immunocytochemical staining for vimentin. Almost all cells are positively stained with anti-vimentin antibody ($\times 200$).

その増加度は F1b より Bio14.6 で大きく, 13週齢の Bio14.6 および25週齢の F1b より有意に大であった. 全蛋白合成量に対するコラーゲン性蛋白合成比に関しても同様で, 13週齢では, Bio14.6 と F1b で差はなかった (Bio14.6, 3.9 \pm 0.4; F1b, 3.8 \pm 0.4%). 25週齢では Bio14.6, F1b とともに13週齢に比較して増加したが (Bio14.6, 11.0 \pm 0.9; F1b, 4.8 \pm 0.4%), その増加度は F1b より Bio14.6 で大きく, 13週齢の Bio14.6 および25週齢の F1b より有意に大であった.

2. 型別コラーゲン合成比率

13週齢, 25週齢ともに F1b と比べて Bio14.6 でⅢ型, V型コラーゲン合成比率が大きかった. また, Bio14.6 では13週齢より25週齢にかけてⅠ型が減少し (81.2% \rightarrow 71.3%), Ⅲ型

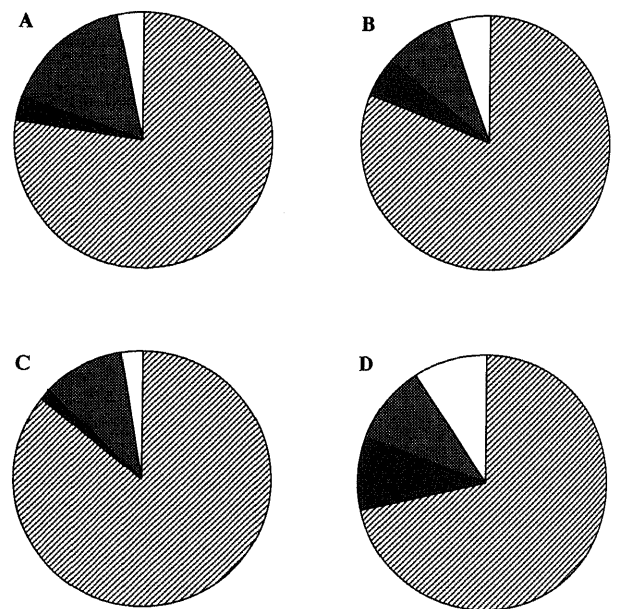


Fig. 3. Relative proportions of collagen types I, III, IV and V synthesized by cultured cardiac fibroblasts from F1b and Bio 14.6. \square , type I collagen; \blacksquare , type III collagen; \boxtimes , type IV collagen; \square , type V collagen; A, F1b (13 weeks); B, Bio 14.6 (13 weeks); C, F1b (25 weeks); D, Bio 14.6 (25 weeks).

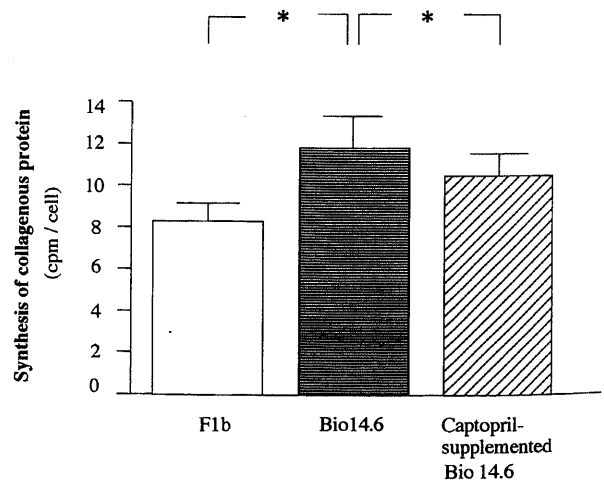


Fig. 4. Effects of captopril on the synthesis of collagenous protein of cultured cardiac fibroblasts from Bio 14.6 (25 weeks). *, $p < 0.05$.

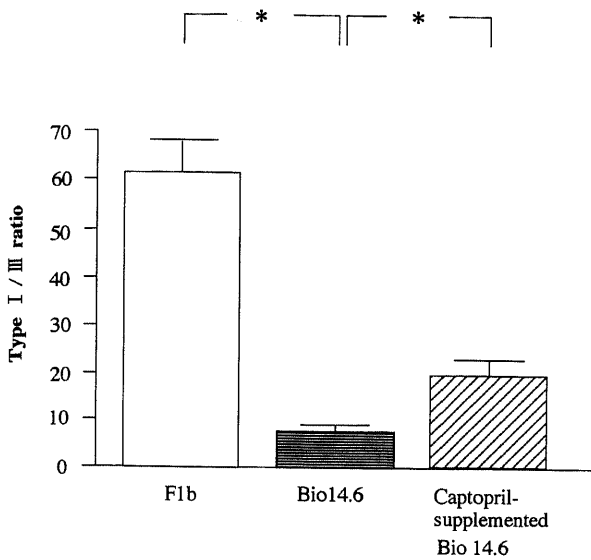


Fig. 5. Effects of captopril on the type I/III ratio synthesized by cultured cardiac fibroblasts from Bio 14.6 (25 weeks). *, $p < 0.05$.

(4.8%→9.1%) および V 型コラーゲン (5.1%→9.5%) が増加した。一方, F1b では Bio14.6 とは逆に I 型が増加し (77.2%→85.5%), III 型コラーゲンが減少 (3.0%→1.3%) した (図 3)。その結果, I 型/III 型比は, 13 週齢より 25 週齢にかけて F1b では増加する ($25.7 \pm 1.8 \rightarrow 65.7 \pm 3.2$, $p < 0.05$) のに対して, Bio14.6 では逆に減少した ($16.8 \pm 1.1 \rightarrow 7.5 \pm 0.8$, $p < 0.05$)。

Ⅲ. Bio14.6 培養心筋線維芽細胞のコラーゲン合成能に及ぼすカプトプリルの影響

1. コラーゲン合成量に及ぼすカプトプリルの影響

カプトプリル添加により 25 週齢の Bio14.6 培養心筋線維芽細胞 1 個あたりの総コラーゲン合成量は有意に減少した ($12.4 \pm 1.6 \text{cpm/細胞} \rightarrow 10.9 \pm 1.1 \text{cpm/細胞}$, $p < 0.05$) (図 4)。

2. 型別コラーゲン合成比率に及ぼすカプトプリルの影響

カプトプリル添加により 25 週齢の Bio14.6 培養心筋線維芽細胞において, I 型が微増し (71.3%→78.6%), III 型コラーゲンがほぼ半減した (9.1%→4.8%)。その結果, I 型/III 型比は有意に増加した ($7.5 \pm 0.8 \rightarrow 16.4 \pm 1.3$, $p < 0.05$) (図 5)。

考 察

肥大型心筋症は, 病理組織学的には心筋細胞の肥大, 錯綜配列と間質の線維化を特徴とし, 病期の進行とともに線維化の増加および心機能の低下が認められる疾患であり, この線維化の大部分はコラーゲン線維で占められている¹⁾。故に, 肥大型心筋症においては心筋細胞の異常の他に心筋線維芽細胞におけるコラーゲン代謝異常が存在する可能性が推察されるが, ヒトではこれらの点を十分に明らかにすることはできない。

一方, 心筋症ハムスター Bio14.6 に関して Bajusz⁷⁾ は, 常染色体性劣性遺伝性格をもち, 健常ハムスターとの交配によってもメンデル遺伝則に従って F3 世代では 100% 発症することや, 病像も慢性進行性心不全で 90% 以上が死亡することなど, ヒト特発性心筋症に類似していると報告している。また, 肥大型, 拡張期は心電図および血行動態に関してヒト特発性心筋症 (肥大型, 拡張型) と同質の臨床像を呈している¹⁸⁾。病理組織学

的变化に関してはいくつかの報告があるが, Jasmin ら¹⁹⁾ は, 壊死期 (30-100 日齢), 線維化期 (100-160 日齢), 肥大・拡張期 (160-200 日齢), 持続的拡張 (心不全) 期 (200-300 日齢) と分類しており, 心筋細胞の退行変性, ミトコンドリアの変化, 筋原線維の変性, 間質線維化, 心肥大の 5 主要病変は, ヒト心筋症での Breithardt らの記載²⁰⁾ と一致するところである。

心筋症モデル動物に関してはいくつか知られている²¹⁾ が, 著者は特にその病態がヒト特発性心筋症に酷似している心筋症ハムスター Bio14.6 を用いて, その培養心筋線維芽細胞におけるコラーゲン代謝を検討した。その結果, Bio14.6 培養心筋線維芽細胞 1 個あたりの総コラーゲン合成量は 13 週齢から 25 週齢にかけて約 3 倍に著増し, 25 週齢になると F1b より有意に大であった。一方, 型別コラーゲン合成比率に関しては, 13 週齢, 25 週齢ともに F1b と比べて III 型, V 型コラーゲン合成比率が大きく, 各々 13 週齢から 25 週齢にかけて更に増加した。Araki ら²²⁾ は, 生体内の実験において, 25 週齢の Bio14.6 の心筋コラーゲン量は同週齢の F1b より有意に大きく, 5 週齢から 25 週齢にかけて III 型コラーゲン合成比率が大きくなることを示したが, 血行動態の影響等を完全に否定しきれなかった。そこで今回著者は培養心筋線維芽細胞を用いて検討を行ったが, 著者の試験管内の実験結果は彼らの実験結果に符号するものであり, Bio14.6 培養心筋線維芽細胞自身のコラーゲン代謝異常が存在することが示された。

近年分子生物学的手法によりレニン, アンジオテンジノーゲン, ACE の遺伝子が心筋細胞や血管内皮細胞に発現していることが示され^{23,24)}, 組織レニン-アンジオテンジノ系の意義が大きく注目されてきている。種々の実験的肥大型心臓モデルやヒト肥大型心臓において組織レニン-アンジオテンジノ系が心臓に関与している可能性が示唆されており²⁵⁾, アンジオテンジノ II は心筋線維芽細胞のコラーゲン合成を促進させ心筋間質の線維化に関与しているのではないかと推定されている²⁶⁻²⁹⁾。Hirakata ら¹⁰⁾ が 300 日齢の心筋症ハムスター Bio14.6 の左室においてアンジオテンジノ II に対する受容体の親和性が正常ハムスターに比し 35% 高いと報告している様に, 心筋症ハムスターにおいてもその病因に組織レニン-アンジオテンジノ系が関与している可能性が推定されている。そこで, 今回我々は, ACE 阻害薬であるカプトプリルが Bio14.6 培養心筋線維芽細胞のコラーゲン代謝にどのような影響を及ぼすかを検討した。その結果, 臨床的に治療域濃度と考えられる $1 \mu\text{M}$ のカプトプリル添加により III 型コラーゲン合成量が有意に減少した。生体内の実験では, Araki ら²²⁾ は 5 週齢の心筋症ハムスター Bio14.6 にカプトプリルを 20mg/kg/day , 20 週間経口投与し, 心筋 III 型コラーゲンの増加が抑制されたと報告しており, 今回の我々の試験管内の実験結果は彼らの実験結果に符号するものである。一方, Kuzuo ら³⁰⁾ は, 20 週齢の SHR にカプトプリルを 100mg/kg/day , 12 週間経口投与し, 心筋肥厚は抑制されるがコラーゲンの型および量は不変であったと報告している。今回の我々の実験結果との相違は, 液性因子の関与の他に, 動物の種類, 週齢, カプトプリルの投与量, 投与期間等の関与が考えられる。

コラーゲンは結合組織マトリックスの主要成分で, 心臓には現在まで 6 種類, すなわち, I, III, IV, V, VI, VIII 型コラーゲンが存在することがわかっている³¹⁾。そのうち, 心筋間質の線維性コラーゲンである I, III 型コラーゲンは量的には大部分を占め, 正常な状態では I 型コラーゲンは心臓全体のコラーゲ

ンの85%,そしてⅢ型が11%を占めている³⁰。Ⅰ型コラーゲンは主に太い線維を形成し、引張力を有しているのに対し、Ⅲ型コラーゲンは細い線維を形成して弾性を有し、心筋の微細構造維持、伸展性維持などに関与している³¹⁻³⁵。Weber³¹は、実験的圧負荷作成ラットの心肥大期において、心筋に対するコラーゲン容量分画(正常:3-5%)が有意に増加し、8-12%に達すると心筋の収縮期および拡張期の硬さは正常より増大し、20%以上になると収縮期の心筋の硬さは減少すると報告している。また彼らはコラーゲンの質的变化と心機能の関係についても検討を行い、Ⅲ型コラーゲンが増加して総コラーゲンの20%を占める様になると心筋の収縮期の硬さは正常であるが拡張期の硬さが減少すると報告している³⁶。Mukherjeeら³⁷は、SHRにおいて心機能が保たれている代償期にはⅠ型コラーゲンが優位であるが、心機能が低下した非代償期にはⅢ型コラーゲンが優位になると報告しており、一方ヒト特発性心筋症の剖検例においても、おそらくⅢ型コラーゲンであると思われる多量の細いコラーゲン線維が確認されている³。

このように心筋間質コラーゲンの量的、質的变化は、心臓の構造および機能に重大な影響をおよぼしていると考えられる。特に、Ⅲ型コラーゲンはⅠ型コラーゲンに比し、線維が細く張力も弱いと断裂しやすいとされており^{38,39}、Ⅲ型優位の心筋では、その構造を維持できずに内腔が拡張し、壁が非薄化するとともに心機能が低下すると推察される。今回の我々の実験ではカプトプリルによりBio14.6培養心筋線維芽細胞のコラーゲン代謝は質的にも量的にも是正され、ひいては心機能の改善につながる可能性があると考えられた。また、その作用機序としては、組織レニン-アンジオテンシン系を介してのものが推定された。

結 論

ヒト特発性心筋症のモデル動物である心筋症ハムスターBio14.6のコラーゲン代謝を明らかにする目的で、4代継代培養心筋線維芽細胞を³H-プロリンで標識してコラーゲン合成能を量的(Peterkofskyらのコラゲナーゼ消化法)、質的(Hataらの方法)に検討した。更にACE阻害薬カプトプリルを1 μ M添加して、コラーゲン合成能に及ぼすカプトプリルの影響についても検討し、以下の結論を得た。

1. 25週齢のBio14.6培養心筋線維芽細胞1個あたりの総コラーゲン合成量および全蛋白合成量に対するコラーゲン性蛋白合成比は、F1bと同様、13週齢より増加したが、その増加度はF1bより大きく、13週齢のBio14.6および25週齢のF1bより有意に大であった。カプトプリル添加により25週齢のBio14.6培養心筋線維芽細胞1個あたりの総コラーゲン合成量は有意に減少した。

2. Bio14.6培養心筋線維芽細胞においては13週齢、25週齢ともにF1bに比べてⅢ型、Ⅴ型コラーゲン合成比率が大であった。13週齢より25週齢にかけてⅠ型が減少してⅢ型が増加し、Ⅰ型/Ⅲ型比が減少するのに対して、F1bではBio14.6とは逆にⅠ型が増加し、Ⅲ型が減少してⅠ型/Ⅲ型比は増加した。カプトプリル添加により、25週齢のBio14.6培養心筋線維芽細胞においてⅢ型コラーゲン合成比率の増加が抑制され、Ⅰ型/Ⅲ型比が正常化する傾向が認められた。

以上の結果から、カプトプリルが心筋症ハムスターのコラーゲン代謝を量的にも質的にも改善する可能性のあることが示唆

された。その作用機序としては、組織レニン-アンジオテンシン系を介する機序が推定された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師金沢大学第二内科馬淵 宏教授に深甚の謝意を表します。また終始御指導、御教示を頂きました金沢大学第二内科清水賢巳講師に深く感謝し、本研究の遂行に際し、多大な御協力を頂きました金沢大学第二内科第四研究室の各位に感謝致します。さらに、コラーゲンの解析に関して御指導を賜りました金沢大学医学部第一病理学教室(現大阪医科大学第二病理学教室)の岡田仁克講師に深く感謝いたします。

なお、本論文の要旨は、日本循環器学会第95回東海・第80回北陸合同地方会、第59回日本循環器学会学術集会、第10回北陸心筋代謝研究会において発表した。

文 献

- 1) Sugihara, N., Shimizu, M., Suematsu, T., Horita, Y., Shimizu, K., Ohsato, K., Shibayama, S., Nakao, T., Kitamura, M. & Takeda, R.: Early diastolic dysfunction of the left ventricle affected by hypertrophy and abnormal histopathology in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Cardiol.*, 20, 71-81 (1990).
- 2) Brilla, C. G., Janicki, J. S. & Weber, K. T.: Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension: Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ. Res.*, 69, 107-115 (1991).
- 3) Weber, K. T.: Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 13, 1637-1652 (1989).
- 4) Eghbali, M. & Weber, K. T.: Collagen and the myocardium: Fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression. *Mol. Cell. Biochem.*, 96, 1-14 (1990).
- 5) Weber, K. T., Pick, R., Jalil, J. E., Janicki, J. S. & Carroll, E. P.: Patterns of myocardial fibrosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 21 (suppl V), 121-131 (1989).
- 6) Zak, R.: Cell proliferation during cardiac growth. *Am. J. Cardiol.*, 31, 211-219 (1973).
- 7) Bajusz, E.: Hereditary cardiomyopathy: A new disease model. *Am. Heart. J.*, 77, 686-696 (1969).
- 8) Nakashima, Y., Fouad, F. M. & Tarazi, R. C.: Regression of left ventricular hypertrophy from systemic hypertension by enalapril. *Am. J. Cardiol.*, 53, 1044-1049 (1984).
- 9) Tarazi, R. C. & Fouad, F. M.: Reversal of cardiac hypertrophy in humans. *Hypertension*, 6 (suppl III), 140-146 (1984).
- 10) Hirakata, H., Fouad-Tarazi, F. M., Bumpus, F. M., Khosla, M., Healy, B., Husain, A., Urata, H. & Kumagai, H.: Angiotensins and the failing heart. Enhanced positive inotropic response to angiotensin I in cardiomyopathic hamster heart in the presence of captopril. *Circ. Res.*, 66, 891-899 (1990).
- 11) Peterkofsky, B., Chojkier, M. & Bateman, J.: Determination of collagen synthesis in tissue and cell culture

- systems. *In* H. Furthmeyr (ed.), *Immunochemistry of the Extracellular Matrix*, Vol. II. Applications, 1st ed., p19-47, CRC Press, Florida, 1982.
- 12) Hata, R., Ninomiya, Y., Nagai, Y. & Tsukada, Y.: Biosynthesis of interstitial types of collagen by albumin-producing rat liver parenchymal cell (hepatocyte) clones in culture. *Biochemistry*, **19**, 169-176 (1980).
- 13) Weber, K. & Osborn, M.: Proteins and sodium dodecyl sulfate: Molecular weight determination on polyacrylamide gels and procedures. *In* H. Neurath, R. L. Hill & C. L. Boeder (eds.), *The Proteins*, Vol. I, 3rd ed., p179-223, Academic Press, New York, 1975.
- 14) Lasky, R. A. & Mills, A. D.: Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.*, **56**, 335-341 (1975).
- 15) Chamberlain, J. P.: Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. *Anal. Biochem.*, **98**, 132-135 (1979).
- 16) Bagby, S. P. & Holden, W. E.: An in vitro system for study of effects of angiotensin II on cultured endothelial cells. *Cardiovasc. Res.*, **23**, 279-285 (1989).
- 17) Kostis, J. B., Raia, J. J., Defelice, E. A., Barone, J. A. & Deeter, R. G.: Comparative clinical pharmacology of ACE inhibitors. *In* J. B. Kostis & E. A. Defelice (eds.), *Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors*, 1st ed., p19-54, Alan R. Liss, New York, 1987.
- 18) Abelmann, W. H., Wagner, R. L. & Bajusz, E.: Serial hemodynamic observations in hereditary cardiomyopathy of the Syrian hamster. *In* E. Bajusz & G. Rona (eds.), *Cardiomyopathies*, Vol. II, 1st ed., p509, University Park Press, Baltimore, 1973.
- 19) Jasmin, G. & Bajusz, E.: Myocardial lesions in strain 129 dystrophic mice. *Nature*, **193**, 181-182 (1962).
- 20) Breithardt, G., Kuhn, H. & Knieriem, H. J.: Prognostic significance of endomyocardial biopsy in patients with congestive cardiomyopathy. *In* M. Kaltenbach, F. Loogen & E. G. J. Olsen (eds.), *Cardiomyopathy and Myocardial Biopsy*, 1st ed., p258, Springer-Verlag, Berlin, 1978.
- 21) Van Fleet, J. F. & Ferrans, V. J.: Myocardial diseases of animals. *Am. J. Pathol.*, **124**, 98-178 (1986).
- 22) Araki, T., Shimizu, M., Sugihara, N., Yoshio, H., Ino, H. & Takeda, R.: Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on myocardial collagen metabolism in cardiomyopathic hamsters. *In* M. Nagano, N. Takeda & S. Naranjan (eds.), *The Cardiomyopathic Heart*, 1st ed., p137-143, Dhalla. Raven Press, New York, 1994.
- 23) Dostal, D. E. & Baker, K. M.: Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart: Mediation by the AT₁ receptor. *Am. J. Hypertens.*, **5**, 276-280 (1992).
- 24) Lilly, L. S., Pratt, R. E., Alexander, R. W., Larson, D. M., Ellison, K. E., Gimbrone, M. A. & Dzau, V. J.: Renin expression by vascular endothelial cells in culture. *Circ. res.*, **57**, 312-318 (1985).
- 25) Campbell-Boswell, M. & Robertson, A. L.: Effects of angiotensin II and vasopressin on human smooth muscle cells in vitro. *Exp. Mol. Pathol.*, **35**, 265-276 (1981).
- 26) Schelling, P., Ganten, D., Speck, G. & Fischer, H.: Effects of angiotensin II and angiotensin II antagonist saralasin on cell growth and renin in 3T3 and SV3T3 cells. *J. Cell. Physiol.*, **98**, 503-514 (1979).
- 27) Kato, H., Suzuki, H., Tajima, S., Ogata, Y., Tominaga, T., Sato, A. & Saruta, T.: Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens.*, **9**, 17-22 (1991).
- 28) Weber, K. T. & Brilla, C. G.: Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*, **83**, 1849-1865 (1991).
- 29) Crawford, D. C., Chobanian, A. V. & Brecher, P.: Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ. Res.*, **74**, 727-739 (1994).
- 30) Kuzuo, H., Honda, M., Ishinaga, Y., Morioka, S., Tanaka, K., Kuramochi, T., Mansoor, A. M., Yamori, Y. & Moriyama, K.: Angiotensin converting enzyme inhibitor, captopril, inhibits cardiac hypertrophy without changing collagen types and concentration in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **20**, 253-260 (1993).
- 31) Yoshikane, H., Honda, M., Goto, Y., Morioka, S., Ooshima, A. & Moriyama, K.: Collagen in dilated cardiomyopathy: Scanning electron microscopic and immunohistochemical observations. *Jpn. Circ. J.*, **56**, 899-910 (1992).
- 32) Weber, K. T., Janicki, J. S., Shroff, S. G., Pick, R., Chen, R. M. & Bashey, R. I.: Collagen remodeling of the pressure overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ. Res.*, **67**, 757-765 (1988).
- 33) Parry, D. A. D. & Craig, A. S.: Collagen fibrils during development and maturation and their contribution to the mechanical attributes of connective tissue. *In* M. E. Nimni (ed.), *Collagen*, Vol. II, 1st ed., p1-23, CRC Press, Boca Raton, 1988.
- 34) Burton, A. C.: Relation of structure to function of the tissues of the wall of vessels. *Physiol. Rev.*, **34**, 619-642 (1954).
- 35) Montes, G. S. & Junqueira, L. C. U.: Biology of collagen. *Rev. Can. Biol. Exp.*, **41**, 143-156 (1982).
- 36) Weber, K. T., Jalil, J. E., Janicki, J. S. & Pick, R.: Myocardial collagen remodeling in pressure overload hypertrophy: A case for interstitial heart disease. *Am. J. Hypertens.*, **2**, 931-940 (1989).
- 37) Mukherjee, D. & Sen, S.: Collagen phenotypes during development and regression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.*, **67**, 1474-1480 (1990).
- 38) Fleischmajer, R., Timpl, R., Tuderman, L., Raisher, L., Wiestner, M., Perlish, J. S. & Graves, P. N.: Ultrastructural identification of extension aminopeptides of

type I and III collagens in human skin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 78, 7360-7364 (1981).
39) Miller, E. J.: Biochemical characteristics and biologi-

cal significance of the genetically-distinct collagens. Mol. Cell. Biochem., 130, 165-192 (1975).

Effect of an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor on Collagen Synthesis of Cultured Cardiac Fibroblasts from Cardiomyopathic Hamsters Takehide Shinohara, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., 104, 556—562 (1995)

Key words cardiomyopathic syrian hamster, cardiac fibroblast, structural remodeling of the heart, collagen synthesis, angiotensin converting enzyme inhibitor

Abstract

To clarify the myocardial collagen metabolism in human idiopathic cardiomyopathy, the synthetic activity of collagenous protein was determined by measuring ^3H -proline uptake, and the collagen type was subsequently analyzed by SDS-PAGE in cultured cardiac fibroblasts from cardiomyopathic hamsters which are animal models of human idiopathic cardiomyopathy. Also studied were the effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor, captopril[®], on collagen synthesis. Cardiac fibroblasts of Bio14.6 cardiomyopathic hamsters and normal F1b hamsters were cultured and used in the 4th passage. At 25 weeks of age, Bio14.6 hamsters had significantly higher synthetic activity of collagenous protein and rate of collagen/total protein synthesis compared with those at 13 weeks of age. Twenty-five-week-old Bio14.6 hamsters had significantly higher synthetic activity of collagenous protein and rate of collagen synthesis compared with 13-week-old Bio14.6 hamsters or 25-week-old F1b hamsters. Qualitatively, both at 13 weeks of age and at 25 weeks of age, Bio14.6 hamsters showed an increase in the proportion of type III and type V collagens as compared with F1b hamsters. At 25 weeks of age, the proportion of type III and V collagens had increased and the proportion of type I collagen had decreased in Bio14.6 hamsters as compared with 13-week-old hamsters. Captopril (1 μM) caused a significant decrease in synthetic activity of collagenous protein in 25-week-old Bio14.6 hamsters. Qualitatively, the proportion of type I collagen had slightly increased and that of type III collagen had decreased to about a half. The type I/III ratio, therefore, had significantly increased. These findings suggest that captopril improves myocardial collagen metabolism in the cardiomyopathic hamster not only quantitatively but also qualitatively, and that the mechanism of this improvement may be related to the cardiac renin angiotensin system.