

1週目、4週目に心エコーを行い、左心室のサイズ及び収縮能について計測した。その後屠殺し、心重量を測定、梗塞巣のサイズをTTC染色により定量した。さらに右室重量、肺重量を測定し、心不全の有無について解析した。左室の一部は組織の解析に用い、残りの心筋よりRNAを抽出した。AT1、AT2のRNA量についてRT-PCR法により定量し、コラーゲンの量をノーザンプロット法により定量した。

C. 研究結果

1) 死亡率

心筋梗塞作成後、1カ月での死亡率は、WTマウスが40.9%で、KOマウスが23.5%と、KOマウスにおいて有意に低かった。手術直後の死亡率はWTマウスで18.2%、KOマウス17.6%と有意差はなかったが、1週間までの死亡率がWTマウスで13.6%、KOマウスで5.9%と有意にKOマウスで低く、また1週間から4週間までの死亡率もWTマウスで9.1%であったのに対し、KOマウスでは0%と明らかにWTマウスにおいて死亡する割合が高かった。

2) 心エコーによる解析

梗塞後1週間のエコーでは、両マウスにおいて、前壁中隔の壁は薄くなっており、収縮能の低下も認められた。一方、後壁は反対に代償的な機能の亢進が認められた。心室のサイズに関しては、収縮時及び拡張時とも両マウスにおいて差は認められなかった。梗塞後4週間の心エコーでは、両マウスにおいて中隔壁は菲く化し、輝度の亢進が認められ、収縮機能は低下していた。一方後壁の収縮は良好であり、肥大が認められた。収縮機能に関しては、両マウスにおいて大きな違いは認められなかったが、左心室の径は、WTマウスにおいては、1週間から4週間の経過により、徐々に拡大し、その拡大の傾向はKOマウスと比べ、WTマウスにおいて有意に大きかった。

3) 心重量、肺重量

左心室、右心室ともに梗塞後1週間では両マウスに差はなかったが、4週間では両心室ともWTマウスの方がKOマウスより重かった。また肺重量に関しても、梗塞後1週間では差はなかったが、4週間ではWTマウスの方がKOマウスより有意に重量が増加していた。

4) 心臓のマクロ及びミクロ所見

梗塞巣の大きさ及び危険領域の大きさは両マウスにおいて差を認めなかった。組織所見では、梗塞後1週間では大きな変化は認められなかったが、梗塞後4週間ではWTマウス心臓において、血管周囲ばかりでなく、心筋細胞間にも著明な線維化が認められた。一方、KOマウスでは、その程度は有意に軽く、血管周囲にわずかの線維化を認めるのみであった。

5) 遺伝子発現

まず梗塞におけるレニン-アンジオテンシン系の活性化の有無を調べるために、A II受容体のmRNA量についてRT-PCRにて解析した。非梗塞部において、AT2のmRNA量は両マウスにおいて差がなかったが、AT1はWTマウスにのみ認められ、KOマウスでは、その発現はほとんど認められなかった。梗塞後、AT2のmRNA量は1週間後、4週間後とも両マウスにおいて増減が認められなかった。一方、AT1のmRNA量は、KOマウスにおいては、ほとんど認められなかったが、WTマウスにおいては、時間の経過に従って増加した。

次に線維化の増加の機序を知るために、コラーゲンのmRNA量についてノーザンプロット法により定量した。両マウスの非梗塞部においてコラーゲンのタイプIIIの増加を認めたが、その程度はWTマウスにおいて顕著であった。

D. 考察

1) 死亡率

梗塞後1週間まで及び1週間から4週間まで

で、ともにWTマウスにおいてKOマウスより死亡率が高かった。このことは後に述べるような機序により、AT1が心筋梗塞後の予後を大きく左右することを示している。また臨床的にACEIが心筋梗塞後の左室リモデリングを抑制し、有意に生命予後を改善することが示されているが、その機序として2つの可能性が考えられていた。1つはA IIの産生低下によるものであり、他の1つがブラジキニンの産生亢進によるものであった。今回のAT1a KOマウスの結果は、A IIの作用の低下が左室リモデリングの抑制に効いていることを示唆している。

2) 心エコーの結果

左室のサイズに関して、梗塞後1週間では両マウスに差が認められなかったが、4週間においてWTマウスの左室径がKOマウスより有意に拡大を示した。このことは逆に梗塞後の左室の拡大というリモデリングに、AT1を介するA IIのシグナルが必須の役割を果たしていることを示している。心筋の収縮機能、壁厚においては両マウスで大きな差を認めなかったことより、これらの現象にA IIのシグナルは関係ないことが示唆された。圧負荷による心肥大同様、心筋梗塞後の梗塞領域の反対側におこる肥大に関しても、A IIの重要性が示唆されていたが、今回の結果は少なくともA IIが必須ではないことを示している。我々は以前、このKOマウスを用いて、圧負荷を作成し、心肥大の有無について検討した。横行大動脈を縮窄した急性圧負荷時においても、また腹部大動脈を縮窄した慢性圧負荷時においても、心肥大はWTマウス、KOマウスともに同じ程度に誘導された。その機序についてin vitroの培養系で解析したところ、KOマウスの心筋細胞では、メカニカルストレスにより肥大時反応が惹起されるものの、WTマウスの心筋細胞とは細胞内のシグナル伝達機序が異なることがわかった。つまりKOマウスの心筋細胞では、メカニカルストレスによりチロシン

キナーゼの系路が活性化され、肥大時反応が惹起された。梗塞心の非梗塞部における心肥大も、メカニカルストレスにより誘導されると考えられることより、同様の細胞内メカニズムが働いている可能性があると考えられる。また梗塞後1週間では、両マウスの心臓の大きさ及び収縮能に違いが認められなかったことより、梗塞後早期のリモデリングにはAT1を介するA IIのシグナルはあまり関係がないと思われた。一方、梗塞後4週間では、WTマウスとKOマウスとでは、違いが明白であり、この間のリモデリングには、A IIが必須であることが示唆された。つまり、梗塞後の左室リモデリング形成には、その時期によって異なる機序が働いている可能性がある。早期はA II/AT1非依存性であり、後期はA II/AT1依存性である。

3) 心重量・肺重量

梗塞後、WTマウスの左室重量がKOマウスに比べ有意に大きかった。これは、心エコーの所見と合わせ、WTマウスにおいてより強く左室リモデリングがおこった結果と考えられる。右室重量及び肺重量の増加は、一般に心不全の一つの示標と考えられるが、WTマウスにおいて梗塞後4週間で有意に増加しており、WTマウスに心不全が生じていることを示唆している。また実際WTマウスでは梗塞後、KOマウスと比べ有意に動きが少ないことが観察されており、著明な胸水や心のう水は認められなかったものの、WTマウスにおいて左心不全のために、肺うっ血が生じているものと考えられた。

4) 心臓のマクロ、ミクロ所見

梗塞領域及び危険領域のサイズに関しては、両マウスにおいて差が認められなかった。このことは、AT1は、梗塞量の決定には関与していないことを示していると思われる。

組織所見において、WTマウスの心臓に線維化の領域が有意に多かった。このことは、AT1が梗塞後の線維化において重要な役割を果たし

ていることを示していると考えられる。圧負荷により心肥大が形成されるが、その肥大心には線維化も認められる。この肥大心や梗塞心における線維化の誘導にもA IIが重要であることが報告されていたが、今回のKOマウスを使った結果は、心臓の線維化におけるA II/AT1の重要性を明確に示している。一般に線維化には、TGF β が重要であることが指摘されているが、A IIとTGF β とがどのような関係にあるのか、今後の課題である。

5) 遺伝子発現

WTマウスの非梗塞部において、AT1mRNA量の増加が認められた。この結果は従来の主にラットを用いた実験及びヒトでの結果と一致しており、梗塞後の左室リモデリング時に、レニン-アンジオテンシン系が活性化されていることを示唆していると考えられる。一方AT2の遺伝子発現量に関しては、両マウスにおいて差がないことより、今回認められた両マウスにおける差異は、AT2によるものではないと考えられた。

コラーゲン遺伝子の発現であるが、両マウス心臓において梗塞後増加を認めたが、特にWTマウスで顕著であり、組織所見の結果と一致した。このことは、A II/AT1がコラーゲン遺伝子発現の活性化に必須の役割を果たしていることを示している。

E. 結論

AT1aKOマウスではWTマウスに比べ、心筋梗塞後の左室リモデリングの程度が軽く、死亡率も低かった。このことより、AT1を介するA IIによるシグナルは、心筋梗塞後の左室リモデリングに必須の役割を果たしていることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

① Harada K, Komuro I, Hayashi D,

Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y. Angiotensin II Type 1a Receptor Is Involved in the Occurrence of Reperfusion Arrhythmias. *Circulation*, 97 : 315-317, 1998.

② Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Kudoh S, Aikawa R, Zhu W, Shiojima I, Hiroi Y, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Cell Type-Specific Angiotensin II-Evoked Signal Transduction Pathways : Critical Role of Gbg Subunit, Src Family and Ras in Cardiac Fibroblasts. *Circ Res*, 82 : 337-345, 1998.

③ Harada K, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Kijima K, Matsubara H, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y. Acute Pressure Overload Could Induce Hypertrophic Responses in the Heart of Angiotensin II Type 1a Knockout Mice. *Circ Res*, 82 : 779-785, 1998.

④ Harada K, Komuro I, Shiojima I, Hayashi D, Kudoh S, Mizuno T, Kijima K, Matsubara H, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y. Pressure Overload Induces Cardiac Hypertrophy in Angiotensin II Type 1A Receptor Knockout Mice. *Circulation*, 97 : 1952-1959, 1998.

⑤ Kudoh S, Komuro I, Hiroi Y, Zou Y, Harada K, Sugaya T, Takekoshi N, Murakami K, Kadowaki T, Yazaki Y. Mechanical Stretch Induces Hypertrophic Responses in Cardiac Myocytes of Angiotensin II Type 1a Receptor Knockout Mice. *J Biol Chem*, 273 : 24037-24043, 1998.

⑥ Harada K, Komuro I, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y. Vascular

Injury Causes Neointimal Formation
in Angiotensin II Type 1a Receptor
Knockout Mice. Circ Res, (in press)

2. 学会発表

- ① Harada K, Hayashi D, Sugaya T, Murakami K, Komuro I. Improved Survival and Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Angiotensin II Type 1a Receptor Knockout Mice. Circulation, 98 : I-552, 1998.
- ② Kudoh S, Komuro I, Hiroi Y, Sugaya T, Murakami K, Takekoshi N, Yazaki Y. Mechanical Stretch Activates Tyrosine Kinase Pathways in Cardiac Myocytes of Angiotensin II Type 1a Receptor Knockout Mice. Circulation, 98 : I-624, 1998.

G. 知的所有権の取得状況

なし