

第4章 結果

4. 1 実験1

遺伝子操作動物であるつくば高血圧マウス（ヒトレニンおよびアンジオテンシノーゲン遺伝子導入マウス）(Fukamizu et al., 1993)のオス（THM）と、対照のコントロール群C57BL/6Jマウス（Clea Japan, Tokyo）のオス（Control）を使用して、20週令時の血圧および血漿中・組織中のエンドセリン（endothelin）濃度とmRNAの発現を測定した。

4. 1. 1 血圧測定

遺伝子操作動物であるつくば高血圧マウスのオス（THM）と、対照のC57BL/6Jマウスのオス（Control）を使用して、20週令時の覚醒時の尾動脈血圧（表1）を測定した。既報告(Fukamizu et al., 1993)と同様に、つくば高血圧マウスの血圧は、対照マウス（C57BL/6J）に対して、約23 mmHgの有意差をもって（ $P < 0.01$ ）高値であった。両群の脈拍数には差を認めなかった。

Avertin（20 mg/kg）の麻酔下に頸動脈血圧を連続測定し、エンドセリン受容体拮抗薬とカルシウム拮抗薬に対する血圧反応を記録した。エンドセリン受容体拮抗薬に、ETA/ETB両受容体拮抗薬であるSB 209670（Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, PA）を3 mg/kg使用し(Ohlstein et al., 1994)、カルシウム拮抗薬にはニカルジピン（nicardipine; Yamanouchi Pharmaceutical Co, Ltd, Tokyo）を2 mg/kg使用した。典型的な血圧反応経過を図示する（図10）。図に示された通り、カルシウム拮抗薬ニカルジピンには通常の予測される降圧反応を示すが、ETA/ETB両受容体拮抗薬であるSB 209670は、つくば高血圧マウスの血圧・心拍数にほとんど影響を与えない。このことから、つくば高血圧マウスの高血圧の維持に、エンド

セリン (endothelin) は、不可欠の役割を果たしているわけではないと考えられた。

4. 1. 2 臓器重量測定

つくば高血圧マウス (THM) と対照マウス (C57BL/6J; Control) の体重および心臓 (右室・左室)、両肺、腎臓 (右) の重量を測定した (表 1)。両肺と腎臓 (data not shown) については両群間で有意差はなく、右室重量も両群間に差はなかった。左室重量は、左室重量のみでも左室重量を体重で補正 (左室重量/体重) しても、有意差をもってつくば高血圧マウスの左室重量が大きく、20週令のつくば高血圧マウスは左室肥大を起こしていることが示された。

4. 1. 3 エンドセリン濃度測定

つくば高血圧マウス (THM) と対照マウス (C57BL/6J; Control) の両群に対して血漿中のエンドセリン 1 (endothelin-1) 濃度 (図 11) および左室のエンドセリン 1 (endothelin-1) 濃度 (図 12) を測定した。血漿中エンドセリン 1 (endothelin-1) 濃度には両群間に差はなく、左室のエンドセリン 1 (endothelin-1) 濃度はつくば高血圧マウス群の方が有意差 ($P < 0.05$) をもって高かった。つくば高血圧マウスにおいては、血漿中レニン活性 (plasma renin activity; PRA) は約 10 倍の活性を示し (Fukamizu et al., 1993)、アンジオテンシン II の組織濃度が心臓で約 5 倍に亢進していることが報告されている (Kai et al., 1998)。このような全身および局所のレニン・アンジオテンシン系 (RAS) の亢進状態において、血漿中エンドセリン 1 (endothelin-1) 濃度に変化はなく、左室エンドセリン 1 (endothelin-1) 濃度は亢進していた。

4. 1. 4 エンドセリンの遺伝子発現

つくば高血圧マウス (THM) と対照マウス (C57BL/6J; Control) 両群の、左室および腎臓におけるエンドセリン 1 (endothelin-1) とエンドセリン 2 (endothelin-2) の前駆体である preproendothelin-1 mRNA と preproendothelin-2 mRNA の発現を reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて測定した。左室のエンドセリン 2 前駆体 (preproendothelin-2) と腎臓のエンドセリン 1 前駆体 (preproendothelin-1) の mRNA の発現量は、両群間に差はなかった (data not shown)。左室のエンドセリン 1 前駆体 (preproendothelin-1) と腎臓のエンドセリン 2 前駆体 (preproendothelin-2) の mRNA の発現は、つくば高血圧マウス群の方が有意差 ($P < 0.05$) をもって高かった (図 13A, B)。左室では、エンドセリン 1 前駆体 (preproendothelin-1) の mRNA の発現が亢進しており、エンドセリン 2 前駆体 (preproendothelin-2) の mRNA の発現は対照と変化ない。反対に腎臓では、エンドセリン 2 前駆体 (preproendothelin-2) の mRNA の発現が亢進しており、エンドセリン 1 前駆体 (preproendothelin-1) の mRNA の発現は対照と変化ない。

このことから、エンドセリン (endothelin) の発現の調節が、各組織において異なっている可能性が示唆された。

4. 2 実験 2

遺伝子操作動物であるつくば高血圧マウス (THM) と対照のコントロール群の C57BL/6J マウスのオス (Control) を使用して、エンドセリン受容体拮抗薬が、つくば高血圧マウスの高血圧と臓器障害に対してどのような効果をもたらすかを検討した。つくば高血圧マウスを、エンドセリン受容体拮抗薬 SB 209670 を投与された群 (THM+SB) と生理食塩水を投与された群 (THM+saline) とに分け、対照群

(Control) にも生理食塩水を投与した。投与は各マウスの 5 週令から 16 週令まで 12 週間行った。

4. 2. 1 血圧測定

12 週間の全期間を通じて、つくば高血圧マウスの両群 (THM+saline, THM+SB) の血圧は、コントロール群 (Control) に対して有意に高値であった (図 14)。つくば高血圧マウスの両群間の血圧には、全期間を通じて有意差はなく、エンドセリン受容体拮抗薬 SB 209670 の効果は、つくば高血圧マウスの血圧に関しては認められなかった。つくば高血圧マウスの血圧は、5 週から 12 週にかけてマウスの成長とともに上昇する傾向があり、高血圧の進展がうかがわれた。エンドセリン受容体拮抗薬 SB 209670 の効果は、降圧効果だけでなく高血圧の進展を抑さえる効果に関しても認められなかった。以上の結果から、エンドセリン (endothelin) は、つくば高血圧マウスの高血圧の進展に関して大きな役割を果たしていないことが示唆された。

4. 2. 2 臓器重量測定

12 週間の飼育後 (17 週令) にて、つくば高血圧マウス (THM) と対照マウス (C57BL/6J; Control) の体重および心臓 (右室・左室)、両肺、腎臓の重量を測定した。実験前の各群の体重に差は認められなかったが (Control, 17.8 ± 0.25 g; THM-saline, 16.8 ± 2.50 g; THM-SB, 16.5 ± 2.68 g)、12 週間の飼育中、コントロール群の成長が他の 2 群よりも良好であったため、最終的にはコントロール群の体重が有意差をもって大きくなったが、つくば高血圧マウスの両群 (THM+saline, THM+SB) の体重には有意差を認めなかった (Control, 31.0 ± 0.83 g; THM-saline, 27.8 ± 1.99 g; THM-SB, 26.4 ± 3.69 g)。

臓器重量は、両肺、右室、腎臓には、体重補正を行うと3群間に有意差はなかった (data not shown)。左室重量については体重補正後、コントロール群 (Control) に対してつくば高血圧マウス両群 (THM-saline, THM-SB) が有意差 ($P < 0.01$) をもって大きく、つくば高血圧マウス両群間では、生理食塩水を投与された群 (THM+saline) の方が、エンドセリン受容体拮抗薬SB 209670を投与された群 (THM+SB) よりも、有意差 ($P < 0.01$) をもって大きかった (図 15)。この結果から、エンドセリン受容体拮抗薬SB 209670は、つくば高血圧マウスの心肥大の進展を抑制したことが示された。

4. 2. 3 エンドセリンとその他の遺伝子発現

つくば高血圧マウス2群 (THM-saline, THM-SB) と対照群 (C57BL/6J; Control) 3群における、左室および腎臓におけるエンドセリン1 (endothelin-1) とエンドセリン2 (endothelin-2) の前駆体であるpreproendothelin-1 mRNAとpreproendothelin-2 mRNAの発現をreverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて測定した。実験1の場合と同様に、つくば高血圧マウス2群 (THM-saline, THM-SB) の左室のエンドセリン1前駆体 (preproendothelin-1) と腎臓のエンドセリン2前駆体 (preproendothelin-2) のmRNAの発現が、対照群 (C57BL/6J; Control) と比較して有意 ($P < 0.05$) に高かった。また、つくば高血圧マウス両群間には、左室のエンドセリン1前駆体 (preproendothelin-1) と腎臓のエンドセリン2前駆体 (preproendothelin-2) のmRNAの発現について、いずれも差はなかった (図 16A, B)。このことから、エンドセリン受容体拮抗薬SB 209670は、左室のエンドセリン1前駆体 (preproendothelin-1) と腎臓のエンドセリン2前駆体 (preproendothelin-2) の発現に影響を与えないことが示された。

つくば高血圧マウス2群 (THM-saline, THM-SB) と対照群 (C57BL/6J; Control) 3群の左室における、心房性ナトリウム利尿ペプチド (atrial natriuretic

peptide; ANP)、 α および β ミオシン重鎖 (α -, β -myosin heavy chain; α -, β -MHC) の mRNA の発現も、reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて測定した。 α ミオシン重鎖 (α -MHC) の mRNA の発現は、3 群間に差を認めなかったが (data not shown)、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) と β ミオシン重鎖 (β -MHC) の mRNA の発現は、つくば高血圧マウス 2 群 (THM-saline, THM-SB) の mRNA の発現が、対照群 (C57BL/6J; Control) と比較して有意 ($P < 0.05$) に高かった。つくば高血圧マウス両群間を比較すると、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) と β ミオシン重鎖 (β -MHC) の mRNA の発現のいずれも、生理食塩水を投与された群 (THM+saline) が、エンドセリン受容体拮抗薬 SB 209670 を投与された群 (THM+SB) よりも、有意 ($P < 0.01$) に大きかった (図 17, 図 18)。

心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) と β ミオシン重鎖 (β -MHC) は、いずれも心臓に負荷 (圧負荷・容量負荷) がかかる際に発現が増加することが知られており (Appel, 1994; Izumo et al., 1988)、また発現量が肥大の程度と相関することから、肥大の程度を示す分子マーカーとしての性格を持っている (Appel, 1992; Schwartz et al., 1992)。このことを、今回の結果に当てはめると、エンドセリン受容体拮抗薬 SB 209670 は、つくば高血圧マウスの心臓への負荷を軽減し、つくば高血圧マウスに発症する心肥大の状態を改善したことが示唆された。

4. 2. 4 組織学的検討

1) 左室

左室は乳頭筋断面の組織標本を作成し、肉眼および顕微鏡下に、断面の形態、筋線維の肥大、線維化の程度を観察した。典型例を図 19 に示す。肉眼所見では、対照群 (Control) の左室と比較して、つくば高血圧マウスの生理食塩水を投与された群 (THM+saline) の左室は、心筋部分が増加しているにもかかわらず内腔の

拡大は認められず、求心性の肥大を示している。また、エンドセリン受容体拮抗薬SB 209670を投与された群（THM+SB）の左室は、断面が円形に近く求心性の肥大が認められるものの程度は、つくば高血圧マウスの生理食塩水を投与された群（THM+saline）の左室に比べて軽度であり、肉眼所見からもエンドセリン受容体拮抗薬SB 209670がつくば高血圧マウスの心肥大を抑制したと考えられた。

左室心筋の強拡大像の観察において、対照群（Control）と比較して、つくば高血圧マウスの生理食塩水を投与された群（THM+saline）は、筋線維の直径が約2倍程度に増大している。これに対して、エンドセリン受容体拮抗薬SB 209670を投与された群（THM+SB）は、対照群（Control）と比較すると、筋線維の直径が約1.5倍程度に増大しているものの、つくば高血圧マウスの生理食塩水を投与された群（THM+saline）と比較すると、筋線維の直径の増大は明らかに軽度で、エンドセリン受容体拮抗薬SB 209670がつくば高血圧マウスの筋線維の肥大を抑制したと考えられた。

顕微鏡下に心筋の線維化部分を綿密に検索したが、3群ともに心筋の線維化や心筋配列の乱れ、石灰化などは認められなかった。

2) 腎臓

つくば高血圧マウスの生理食塩水を投与された群（THM+saline）は、糸球体の拡大と進行性の糸球体病変を認め、糸球体メサンジウム細胞の増殖とメサンジウム基質の産生によるメサンジウム領域の拡大を認めた。さらに尿細管にはPAS染色性の物質を認めた。エンドセリン受容体拮抗薬SB 209670を投与された群（THM+SB）では、つくば高血圧マウスの生理食塩水を投与された群（THM+saline）と比較すると、腎病変の改善が認められた（図 20）。

糸球体の硬化の程度を指標化したglomerular sclerosis index（GSI）で、3群の糸球体硬化の程度を評価した（図 21）(Raij et al., 1984)。つくば高血圧マウスの生理食塩水を投与された群（THM+saline）は、対照群（Control）に対して、glomerular

sclerosis indexが有意に高く、つくば高血圧マウスの腎臓に糸球体硬化が認められた。エンドセリン受容体拮抗薬SB 209670を投与された群（THM+SB）のglomerular sclerosis indexは、対照群（Control）より有意に高いものの、つくば高血圧マウスの生理食塩水を投与された群（THM+saline）に対して有意に低く、エンドセリン受容体拮抗薬SB 209670の投与による糸球体硬化の改善が認められた。

3) 腎血管

つくば高血圧マウスの腎臓の細動脈には、動脈硬化性（中膜硬化）の変化が認められた。対照群（Control）と比較して、つくば高血圧マウスの生理食塩水を投与された群（THM+saline）では、中膜の肥厚と基底膜構造の破壊が認められた。エンドセリン受容体拮抗薬SB 209670を投与された群（THM+SB）では、生理食塩水を投与された群（THM+saline）と比較して、中膜の肥厚と基底膜構造の破壊の程度が軽度であった（図 22）。

生理食塩水を投与された群（THM+saline）において、血管周囲に、炎症細胞の集積が認められた（図 23 ）。この炎症細胞の集積は、対照群（Control）とエンドセリン受容体拮抗薬SB 209670を投与された群（THM+SB）には認められず、つくば高血圧マウスの腎臓の細動脈周囲には、何らかの炎症反応が起こっていることが考えられ、この炎症反応をエンドセリン受容体拮抗薬SB 209670が押さえることが示唆された。