

氏名(本籍)	山根 剛(鳥取県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第98号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	イヌの右室心筋リモデリングに対するアンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACE I)ならびにアンジオテンシン II 受容体拮抗薬(ARB)の影響
論文審査委員	(主査) 若尾 義人 (副査) 赤堀 文昭 山田 隆紹 代田 欣二

## 論文内容の要旨

### 【背景】

心疾患により心臓に対し持続的な負荷が加わることによって、心筋細胞肥大ならびに細胞外マトリックスの増大などの心筋リモデリングと呼ばれる変化が生じる。心筋リモデリングは負荷に対する適応として生じるが、過度に進行すれば心臓の拡張障害を招来するなど、心臓に対して悪影響を及ぼす。このことから、心筋リモデリングを抑制することは心疾患治療において必要不可欠な要素とされている。

アンジオテンシン II (ANG II) は心筋細胞肥大ならびに細胞外マトリックスの増大作用を有しており、心筋リモデリングに関与していることが知られている。アンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACE I)はアンジオテンシン変換酵素(ACE)からのANG II産生を阻害し、ラットやマウスの心筋リモデリングを抑制することが報告されている。しかしながら、ヒトやイヌにおいてはACE以外にchymaseからもANG IIが産生されることから、ACE Iではラットと同等の心筋リモデリング抑制効果を期待することは出来ないと考えられている。一方、近年開発されたアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)は、ANG IIの生理作用を受容体レベルにおいて遮断することから、chymaseによるANG II産生経路を有する動物に対しても、心筋リモデリング抑制効果が期待されている。

動物種により心筋リモデリングに関与している心筋内ANG II産生酵素ならびに薬物による心筋リモデリング抑制効果には相違が認められる。しかしながら、イヌの心筋リモデリングに対する心筋内ANG II産生酵素の関与ならびに心筋リモデリング抑制に効果的な薬物は明確にされていない。さらに、イヌにおいては右心系の心疾患が多く認められるが、右室心筋リモデリングに関する報告はない。

そこで本研究では、イヌの右室肥大モデルを作製し、心筋内ANG II産生酵素活性の測定、ならびにACE I、ARBの投与を行い、経時的な心筋リモデリングにおける心筋内ANG II産生酵素活性の関与

ならびに心筋リモデリング抑制効果について検討した。

## 実験1. 右室肥大に伴う右室心筋内 ANG II 産生酵素活性の変化

### 【目的】

心筋内 ANG II 産生酵素である ACE および chymase 活性は動物種あるいは臓器により異なること、ならびに心疾患の病期により変化することが報告されている。しかしながら、イヌの心臓における心肥大進行と心筋内 ANG II 産生酵素活性の経時的変化については明確にされていない。そこで本実験ではイヌの右室肥大モデルを作製し、肥大に伴う ACE ならびに chymase 活性の変化を観察し、心筋リモデリングと心筋内 ANG II 産生酵素活性との関連について検討を行った。

### 【実験材料ならびに方法】

実験には身体検査において健康と認められたビーグル犬24頭を使用した。供試犬は Sham 群、15日群、60日群ならびに180日群の4群に分類した（各群6頭）。Sham 群を除く3群は、主肺動脈を60%狭窄することで右室肥大モデルを作製し、15日、60日ならびに180日の経過観察を行った。

実験開始から終了まで定期的に心エコー検査を行い、右室壁厚の計測を行った。また、実験終了後、心臓を摘出し心筋内 ANG II 産生酵素活性の測定に用いた。ACE 活性は、心筋ホモジネートにおける Hip-His-Leu (HHL) による馬尿酸生成量を、HPLC にて測定することにより求めた。ACE 活性は、37℃にて HHL より馬尿酸 1  $\mu\text{mol}$  が生成される酵素活性を1ユニット (1U) とした。また、chymase 活性は、ANG I から ANG II への変換量を、HPLC にて測定することにより求めた。chymase 活性は、心臓湿重量 1g あたりの1分間で生成された ANG II (nmol) で表した。

### 【結果】

右室壁厚は、15日から60日にかけて有意な増大が観察されたが、60日と比較して、180日では有意な増大は認められなかった。右室心筋中の ACE 活性は、15日で上昇し、60日後には Sham 群レベルまで低下していた。しかし、180日には再び有意な上昇が認められた。また、chymase 活性は、60日までは変化が観察されなかったが、180日において有意な上昇が認められた。

### 【小括】

右室心筋内 ACE 活性が15日時点で増大したのに対し、chymase 活性は60日時点まで変化は認められなかった。右室肥大の初期には右室心筋内 ACE による ANG II 産生が関与していることが示唆された。また、右心肥大の進展が緩やかになった180日時点において、ACE ならびに chymase 活性が有意に上昇していることから、長期的な右室肥大の進展には両 ANG II 産生酵素が関与している可能性が示唆された。

## 実験2. ACE I ならびに ARB の右室心筋リモデリング抑制に対する検討

### 【目的】

第1実験において、右室肥大初期には ACE 活性が上昇していることが明らかとなった。ACE I は

ACEからのANG II産生を阻害するため、右室心筋リモデリングの進展を抑制することが期待される。また、ARBは受容体に作用するためANG II産生経路に関係なく、右室心筋リモデリング抑制効果が期待される。第2実験では両薬物の右室心筋リモデリング抑制効果を明確にする目的で、以下の実験を行った。

#### 【実験材料ならびに方法】

第1実験のSham群、60日群に加え、新に12頭のビーグル犬に対して右室肥大を作製し、実験に使用した。60日群をPS群とし、ACE I（マレイン酸エナラプリル：0.5mg/kg SID）の投与を行った群をACE I群、ARB [カンデサルタン（Can）：1.0mg/kg SID]の投与を行った群をARB群に分類した（各群6頭）。ACE IならびにARBは、モデル作製翌日から実験終了日（60日間）まで連日投与した。

実験1と同様に右室壁厚ならびに心筋内ANG II産生酵素活性の測定を行った。また、実験終了後、心筋組織切片を作製し、心筋細胞径ならびに心筋の線維組織面積を、コンピューター画像解析により計測した。

#### 【結果】

ARB群の右室壁厚、心筋細胞径ならびに線維組織面積の増大は、PS群ならびにACE I群と比較して有意に抑制された。一方、ACE I群の右室壁厚、心筋細胞径ならびに線維組織面積は、PS群と比較して差は認められなかった。ACE I群の心筋内chymase活性は、PS群と比較して有意な上昇が認められた。

#### 【小括】

ACE I投与によりchymase活性の上昇が認められた。このことから、ACE活性が阻害されることにより、chymaseを介したANG II産生系が活性化することが示唆された。ACE I群に右室心筋リモデリングの抑制が認められなかったことは、chymaseによるANG II産生が亢進することに起因すると考えられた。ARBでは右室心筋リモデリング抑制効果が認められた。ARBはANG IIを受容体レベルにおいて抑制する薬物であることから、ACEならびにchymaseからのANG II産生経路を有するイヌにおいては、右室心筋リモデリング抑制に有効的であると考えられた。

### 実験3. ARB投与量による右室心筋リモデリング抑制効果の検討

#### 【目的】

ARBに心筋リモデリング抑制効果が認められたが、投与量を増すことにより更なる心筋リモデリング抑制効果が得られる可能性がある。そこで本実験では、ARB投与量の相違に起因する心筋リモデリング抑制効果の差異について検討を行った。

#### 【実験材料ならびに方法】

第2実験において実験に供したPS群をControl群、ARB群をARB-1群（Can: 1mg/kg投与群）、新に用いたビーグル犬6頭をARB-10群（Can: 10mg/kg投与群）として実験に用いた。ARB-10群に対しても、第1実験と同様の方法を用いて右室肥大モデルの作製を行った。心筋リモデリング抑制効果の判

定には第2実験と同様の指標を用いた。

### 【結果】

ARB-1群とARB-10群との右室壁厚の経時的変化には、有意な変化は認められなかった。また、心筋細胞径ならびに線維組織面積に関しても、両群間に有意な変化は認められなかった。

### 【小括】

ARB-1群ならびにARB-10群の右室壁厚、心筋細胞径ならびに線維組織面積は同程度の増大抑制が認められた。このことから、イヌの右室心筋リモデリングに対しては、1mg/kgならびに10mg/kgのカンデサルタンにより同程度の抑制効果が得られることが確認された。

### 【考察】

右室肥大の初期にはACE、長期的にはACEならびにchymase活性が上昇していることから、初期の右室肥大にはACE、長期の右室肥大には両ANG II産生酵素活性により産生されたANG IIが関与していると考えられた。また、エナラプリルによりACE活性を抑制した場合、chymase活性の上昇が生じるため、エナラプリルでは右室心筋リモデリングの進展を抑制することは不可能であると考えられた。

カンデサルタンはエナラプリルと比較して、chymaseから産生されたANG IIに対しても、受容体レベルにおいてその生理作用を遮断できることから、イヌの右室心筋リモデリング抑制に対して有効的な薬物であると考えられた。

### 【結語】

イヌの右室肥大モデルを用いて、ACE IならびにARBの右室心筋リモデリングの機序およびその抑制効果を検討した結果、以下のような知見が得られた。

1. 右室肥大初期には右室心筋内ACE活性のみが上昇していることから、右室肥大初期には心筋内ACEにより産生されたANG IIが関与していることが示唆された。また、180日時点では右室心筋内ACEならびにchymase活性の上昇が認められていることから、長期にわたる右室負荷時には、両ANG II産生酵素により産生されたANG IIが右室心筋リモデリングに関与すると考えられた。
2. ACE I投与により右室心筋内chymase活性の上昇が認められていることから、ACEからのANG II産生が抑制された場合には、chymaseによるANG II産生が亢進し、右室心筋リモデリングを進展させると考えられた。
3. カンデサルタンには右室壁厚増大、心筋細胞肥大ならびに線維組織の増殖を抑制する作用が認められたが、エナラプリルにはその効果は観察されなかった。このことから、イヌの右室心筋リモデリング抑制に対してカンデサルタンは有効的な薬物であることが確認された。

4. イヌの右室心筋リモデリングに対しては、1mg/kgのカンデサルタンにより抑制効果が得られることが確認された。

## 論文審査の結果の要旨

心室に対する長期的な前および後負荷の増加は、心筋肥大などの心筋リモデリングと呼ばれる変化を生じさせる。これらの変化は、初期には心室負荷に対する代償機転として働くが、長期的には逆に心室に対して抑制的に作用する。従って、心疾患の長期治療では心筋リモデリングを出来る限り抑制することができる薬剤を選択することが必要とされる。

心筋リモデリングに強く関係するアンジオテンシンⅡ (ANG Ⅱ) は、アンジオテンシンⅠ (ANG Ⅰ) からアンジオテンシン変換酵素 (ACE) を介して生産されるが、最近の研究では、各組織中のChymaseを介しても産生されることが証明されている。このことは、ACEⅠのみではANGⅡへの変換を完全に抑制できないことを示していると同時に、心不全における心筋リモデリングの抑制も困難であることを示唆している。さらに、ACEとChymaseのANGⅡ産生割合に関しても、動物種差があると報告されており、ヒトで得られた成績が必ずしもイヌに該挿出来ない。したがって、心肥大および心筋マトリックスの増大を抑制するためには、ANGⅡの生理作用を確実に抑制する薬剤の開発が必要とされる。

アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) は、ANGⅡの作用を受容体レベルで抑制することから、ChymaseによるANGⅡ産生に対してもその作用を強く抑制する薬剤であるとされている。しかしながら、イヌの心筋リモデリングに対する心筋内ANGⅡ産生酵素の関与ならびにARBの心筋リモデリング抑制に関する検討はなされておらず、特に、右心系の障害が多い獣医臨床分野において必要とされる、右室心筋リモデリングとACEⅠおよびARBとの関係を検討した報告はない。

以上の背景から著者は、イヌの右室肥大モデルを作製し、右室心筋内ANGⅡ産生酵素活性の測定ならびにACEⅠおよびARBの投与を行い、経時的な心筋リモデリングにおける右室心筋内ANGⅡ産生酵素活性の関与ならびに右室心筋リモデリング抑制効果を、以下の第1～第3実験によって検討した。

### 第1実験 右室肥大に伴う右室心筋内ANGⅡ産生酵素活性の変化

この実験の目的は、右室肥大に伴って心筋内ANGⅡ産生活性酵素がどのように変動するかを検討したものである。すなわち、著者は心筋内ANGⅡ産生酵素に動物種差があること、および心疾患の病期によって差があることから、まず、右室肥大の進行に伴う心筋内ANGⅡ産生酵素であるACEおよびChymaseの動態を、右室肥大作製後15日、60日および180日の時点で観察した。右室肥大は、肺動脈の60%バンディングによって作製した。その結果、右室壁厚は15日以降Sham群と比較して有意に増大したが、60日群および180日群間では有意な増大は認めなかった。この間の右室心筋中のACE活性は15日で上昇し、60日の時点ではSham群のレベルまで低下したが、180日で再び上昇する事を確認した。一方Chymase活性は60日の時点までは大きく変化しなかったが、180日の時点で有意に上昇す

ることを確認した。

以上の成績から著者は、右室肥大の初期においてはACEによるANG II産生が大きく関与し、長期的な右室肥大に関してはACEとChymaseの両酵素の活性によるANG II産生が右室肥大に大きく関与していることを強く示唆した。

## 第2実験 ACE IならびにARBの右室心筋リモデリング抑制する検討

第1実験の成績から、右室肥大の初期においてはACE活性が、長期的な右室肥大に関してはACEとChymaseの両活性がANG II産生に大きく関与していることが強く示唆されたことから、第2実験で著者は、アンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACE I）およびアンジオテンシンII受容体拮抗薬（ARB）を60日間連続投与して、右室心筋リモデリングが抑制されるか否かを検討した。その結果、ACE I（エナラプリル）を投与した群では、右室壁厚、心筋細胞径および線維組織面積はPSのみ作製群と比較して差は認められず、ACE I投与では右室心筋リモデリングは抑制されないことを確認した。一方、ARB（カンデサルタン）投与群では、上記の壁厚、細胞径および組織面積は、PSのみ作製群およびACE I投与群と比較して有意に抑制されることを確認した。また、ACE I投与によってACE活性は抑制されたが、逆にChymase活性が上昇することも同時に確認した。

以上の成績から著者は、ACE Iの投与では右室心筋リモデリングの抑制は不可能であることを確認したと同時に、その理由として、ACE活性が阻害されることによって、Chymaseを介したANG II産生が活性化されることを示唆した。したがって、イヌの右室心筋リモデリングの抑制には、受容体レベルでANG II産生を抑制するARBの投与が極めて有効であることを提起した。

## 第3実験 ARB投与量による右室心筋リモデリング抑制効果の検討

第2実験の成績から、著者は、ARB投与が右室心筋リモデリング抑制に大きく貢献することを確認したが、一方では、投与量の増量によって心筋リモデリングをさらに強く抑制出来る可能性も考えられた。そこで著者は、第3実験として、ARB投与量の相違による右室心筋リモデリング抑制効果の差異について実験を行った。ARBの投与量は、これまでと同量の1mg/kg投与群と、新たに10mg/kg投与群を設定した。その結果、60日間の両群間の右室壁厚、心筋細胞径および組織面積に有意な変化が認められなかったことから、著者は、これらの用量間では右室心筋リモデリング抑制効果に差異がないことを確認した。

以上、これまでに得られた第1～第3実験の成績から著者は、

- 1) 右室肥大初期では右室筋内ACE活性のみが上昇し、長期の右室肥大ではACEおよびChymaseの両酵素活性が上昇することを確認した。
- 2) 1)の成績から、右室肥大初期では主にACEにより産生されたANG IIが関与し、また、長期的な右室肥大では、ACEおよびChymaseにより産生されたANG IIが右室心筋リモデリングに関与することを強く示唆した。

- 3) ACE I 投与により右室心筋内 Chymase 活性が上昇することを確認した。
- 4) 3) の成績から、ACE からの ANG II 産生が抑制された場合には、Chymase による ANG II 産生が亢進し、右室心筋リモデリングを進展されることを示唆した。
- 5) ARB (カンデサルタン) の投与によって右室壁厚の増大、心筋細胞の肥大および心筋線維組織の増殖は抑制されたが、ACE I (エナラプリル) の投与ではこれらの抑制効果を確認出来なかったことから、イヌの右室心筋リモデリングの抑制には ARB の投与が有効であることを確認した。
- 6) イヌの右室心筋リモデリングの抑制には、1mg/kg の ARB の投与が有効であることを確認した。

このように今回、獣医臨床で重要な位置を占める右心系に焦点を当てて実施された上記の研究成果は、右心肥大モデルを使用して実施されたとはいえ、これまで知られていなかった右心系における心筋リモデリングと ANG II 産生酵素との関係の一端を解明したものとして高く評価できる。さらに、これらの研究成果は、右心系あるいは左心系に関わらず、ANG II 産生酵素に関する基礎薬理的な観点からも重要な情報を提供するものと思われると同時に、将来、実際の獣医臨床における右心系障害の治療法の進展に大きく関与するものと期待され、本研究が博士（獣医学）の学位に値する業績であると判定した。