

心臓圧負荷に対する心筋ミオシン重鎖遺伝子  
の転写活性ならびにアイソザイムの適応変換

今村伸一郎

心臓圧負荷に対する心筋ミオシン重鎖遺伝子  
の転写活性ならびにアイソザイムの適応変換

今村伸一郎

麻布大学獣医学部獣医学科外科学第一講座

主任教授 高 橋 貢

I . 緒言	1
II . 実験材料ならびに方法	8
1 . 実験動物ならびに手術手技	8
2 . 生化学的検索	10
2 - 1 . MHC mRNAの検索	10
( S 1 ヌクレアーゼ法 )	
2 - 2 . MHC アイソザイムの検索	11
2 - 3 . ミオシンATPase活性の測定	12
2 - 4 . 血清甲状腺ホルモン濃度測定	12
3 . 生理学的検索 ( 血圧測定 )	13
4 . 病理学的検索	13
4 - 1 . 左心室壁厚	13
4 - 2 . 組織学的検索	14
1 ) . 光学顕微鏡による検索	14
2 ) . 電子顕微鏡による検索	14
5 . 統計処理	15

Ⅲ.	実験成績	16
1.	血行動態ならびに病理学的検索	16
2.	MHC mRNAならびにアイソザイムの変化	18
3.	ミオシンATPase活性値の変化	20
4.	血清甲状腺ホルモンレベルの変化	21
Ⅳ.	考察	23
Ⅴ.	結論	29

参考文献

## I. 緒言

絶えず収縮と弛緩を繰り返して血液を駆出している心臓は、その形態も機能も決して一定の状態にとどまることなく、つねに動的な平衡状態を保っている。心筋を構成する主要な構造蛋白であるミオシンの半減期が、同じ横紋筋よりなる骨格筋で150日であるのに対し、6日と非常に短いことから、心筋においてはいかに代謝が活発に行われているかがわかる[17]。個体発生の過程や血行動態の変化に対応して、心筋は肥大を形成しながら心機能を保持するように適応していく。心筋におけるこのような適応現象は、周囲の環境の情報を細胞内の代謝に伝達する生化学的な機序を解明するモデルとしてきわめて興味深いものである。特に圧負荷としての物理的な負荷が、どのような受容器を介し細胞内に伝えられ、心臓の肥大を形成するかについては、循環器病学の分野のみならず、広く一般の医学、生物学の分野においても注目されている課題である。

心臓に負荷が加わると、心臓は肥大を形成して、心重量が増加し、サルコメアあたりの張力を減少させることが示されている[19]。これは、血行力学的負荷に対する

心臓の基本的な適応反応と考えられる。肥大した心筋を細胞レベルで見ると、個々の心筋細胞の大きさが増大している。一方、心肥大の形成時に心筋細胞が分裂してその数が増加するかどうかは問題となるが、心筋は骨格筋と同様に分化が進展しているとともに、収縮の最少単位でかつ堅固な細胞構築である筋原線維が細胞内に密に分布していることから、物理的にも細胞の分裂は困難である。圧負荷時に2核、多核などの細胞が増えることはあっても、細胞分裂が起こり、いわゆる細胞増殖によって肥大を形成する可能性は、現在ではほとんど否定されている。従って、心肥大とは、収縮機序を担っている筋原線維を構成する収縮蛋白の生合成の亢進として捉えることができる。

一般に蛋白の生合成は、遺伝子であるDNAから転写によりRNAが合成され、核内で修飾を受けたのちに細胞質に移行し、リボゾーム上でRNAが翻訳され、アミノ酸が順に組み込まれて行われる。このうち、DNAからの転写、RNA安定性、RNAの翻訳などの過程が亢進すると、その最終産物である蛋白の合成は促進されるわけである。

心筋ミオシン重鎖(myosin heavy chain, MHC)は、筋

原線維の太いフィラメントを構成する収縮蛋白で、収縮の基本となるフィラメントの滑走を行っている。ミオシンの分子構造は頭部と尾部よりなり、尾部は集合してフィラメントを構成し、また頭部は球状を呈し、細いフィラメントを構成するアクチン分子に接している。収縮の機序は、ミオシン頭部がアクチン分子とATPを介して架橋を形成して結合する。そしてミオシン分子は活性化されて頭部の立体構造の変化をきたし、フィラメントを滑走させる。この際にATPは水解され、アクチンとの結合は解離される。そして再びミオシンは次のアクチン分子と結合するようになる。このような反応が連続して発現することによって筋肉は収縮する。従って、ミオシンの分子機能は、ATPを水解してその有する化学エネルギーを放出させ、それを直接収縮という物理的な仕事に変換する収縮機序の中心的な役割を担っており、心筋の収縮力学的な特性を生化学的に調節するとともに、化学エネルギーを物理的エネルギーに変換する効率をも規定するところとなる。絶えず収縮を繰り返して莫大なエネルギーを消費している心筋では、このようなエネルギーの変換効率がその代謝において影響するところが大きい。と

ころが最近、心筋MHCは多形性があり、分子機能の異なるアイソザイムの存在することが示され、心筋の収縮力学的特性やエネルギー代謝との関連で注目されている。

心筋MHCアイソザイムにはV1, V2, V3の3種類が存在し[8], V1-MHCアイソザイム含有量の多い心筋のATPase活性は高く、cross-bridgeの移動速度を促進するために心筋の収縮速度は速くなる。一方、V3-MHCアイソザイム含有量の多い心筋のATPase活性は低く、その収縮速度は遅いことが確認されている[1, 8, 33, 40]。ラットなど小動物の心筋は主としてV1-MHCアイソザイムで構成されているが、圧負荷により心肥大が形成されると、主にV3-MHCアイソザイムが占めるようになり、収縮の効率も改善されることが示された。即ち、V3-MHCアイソザイムは収縮速度を遅くするがエネルギー変換効率がよく、エネルギー消費量の大きい圧負荷に適しているといえる。また、V1-MHCアイソザイムは収縮速度を増加させるが、エネルギー変換効率は低く、容量仕事に適している[9, 29]。このように、肥大心筋において実験的にとらえられた収縮性、特に収縮速度の低下とエネルギー変換効率の改善が、このような心筋MHCアイソザイムのV1からV3

への変化として、生化学的に理解することが可能となった。絶えず収縮を繰り返して莫大なエネルギーを消費している心筋においては、このようなエネルギー効果が代謝に占める意義は大きく、負荷に対する心筋の適応現象の大きな部分を占めている可能性がある。

心筋MHC蛋白としては上記のごとく3種類のアイソザイムの存在が確認されているが、この遺伝子は2種類( $\alpha$ ,  $\beta$ )しか存在しない[24]ことが確認されている。そこで現在のところこの2種類の遺伝子を基に構成される蛋白の性質として、V1は $\alpha\alpha$ 、V3は $\beta\beta$ のホモダイマーであり、V2は $\alpha\beta$ のヘテロダイマーであると考えられている[4]。心臓に血行力学的な負荷が加わると、心筋V1-MHCアイソザイムは減少し、V3-MHCアイソザイムは増加するが、近年に至りこの制御は遺伝子の転写レベルで行われていることが確認されている[11, 14, 23, 26, 27, 39]。

この他にも心筋MHCタイプの変換に関与するものとして、個体発生[20, 22]、甲状腺ホルモン[6, 7, 8, 20, 22, 36, 39]、インシュリン[5]、グルココルチコイド[32]、性ホルモン[30]、成長ホルモン[41]などが知られており、

それぞれ直接あるいは間接的に遺伝子の転写レベルに影響してMHCタイプを変換させている。

このように心筋MHCアイソフォームを変換させる要因は多く知られているが、これらによる遺伝子の制御機構については未だ詳細はわかっていない。但し、甲状腺ホルモンについては比較的よく研究されており、ラットまたはウサギにおいて、大量の甲状腺ホルモンを投与すると、心室筋の $\alpha$ -MHC遺伝子発現が促進され、 $\beta$ -MHC遺伝子発現は抑制されるが、甲状腺機能低下状態においては、 $\alpha$ -MHC遺伝子発現は抑制され、 $\beta$ -MHC遺伝子発現が促進されることがよく知られている [6, 7, 8, 20, 22, 36, 39]。

さらに甲状腺ホルモンは直接遺伝子に作用し、心筋MHCアイソフォームの変換を制御している可能性が示唆されている [15, 18, 25]。

また、心臓圧負荷による心筋MHCアイソフォームの変化については、ホルモン等の内因性因子を介して誘導されているのではなく、心筋細胞に加わる張力が、なんらかの細胞内二次情報伝達系を介して、その細胞におけるMHCアイソフォームの変換を制御している可能性が示唆されている [12]。

心臓に血行力学的な負荷が加わったとき、心筋MHC遺伝子発現ならびにアイソザイムのタイプが変換されるが、この制御機構については、未だに不明な点が多く残されている。制御機構のみならず、このMHCアイソフォームの変換が心肥大形成に対してどのような意義を有しているのかという点については、はっきりとした見解は得られていない。そこで本研究では、まず第一着目点として、心臓圧負荷に対する心筋MHC遺伝子転写活性ならびにアイソザイムの変換動態を、心肥大形成の過程と照らし合わせながら長期間観察し、その意義について検討を加えた。次いで第二着目点として、甲状腺ホルモンとの関係について、この血清濃度の低下が $\beta$ -MHCの誘導と関係があるか否かについて検討した。さらに総合的検討を加えるため、心筋ミオシン重鎖タイプの検索に加え、生化学的検索として、ミオシンATPase活性、血清甲状腺ホルモンレベルの測定を、生理学的検索として、血圧の測定を、また病理学的検索として心筋の壁厚の測定、光学顕微鏡、電子顕微鏡による心筋細胞の検索を行った。

## II. 実験材料ならびに方法

### 1. 実験動物ならびに手術手技

ウィスターイマミチラットの雄, 10週齢(実験開始時の体重は約300gでほぼ一定)を使用した(動物繁殖研究所より搬入)。ペントバルビタール麻酔下(15mg/300g体重, ip)にて開腹し, 右腎動脈直上の腹部大動脈に手術的大動脈縮窄を作成した(Fig. 1)。縮窄の作成にあたっては, 20ゲージ注射針を使用して, この注射針とともに大動脈を絹糸(3-0)にて結紮し, 注射針を抜きさることにより縮窄を作成した。縮窄率については, 実験開始時のラットの体重を均一にしてあることにより, 一定化している。

実験群は, 大動脈縮窄群(CoA, n=75), 大動脈縮窄+甲状腺ホルモン(サイロキシシン)投与群(CoA+Thy, n=41), 偽手術群(Sham, n=75), 無処置群(Normal, n=22), 無処置+甲状腺ホルモン(サイロキシシン)投与群(Normal+Thy, n=23)の5群を用意した。サイロキシシンは毎日1回1頭あたり16 $\mu$ gを皮下投与した。溶液の調製は, L-サイロキシシン(Sigma)16 $\mu$ gを0.001N

NaOHを含んだ生理的食塩水0.4mlに溶解し、これを注射液として使用した。

本手術手技による死亡率はCoA群で18.5%，CoA+Thy群で19.6%，Sham群で12.8%，Normal群およびNormal+Thy群では0%であり、過去の報告[26]における同様の手技による死亡率と比較し、きわめて低いものであった。

手術後は経時的に体重と血圧を測定したのち、安楽死させた（CoA, Sham: 3, 6, 12, 24時間, 3, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 77日；CoA+Thy: 12, 24時間, 3, 7, 10, 21, 42, 77日；Normal: 0, 21, 42, 77日；Normal+Thy: 7, 21, 42, 77日）。安楽死はペントバルビタール麻酔下（15mg/300g体重, ip）にて心臓採血により行った。そしてこの血液は直ちに血清を分離し、-20℃に保存した。安楽死後は直ちに心臓を摘出し、左右心室と心室中隔を切り離し、左右心室自由壁の壁厚を測定した。左右心室および中隔はそれぞれ別個の容器に収納し、直ちに液体窒素中にて凍結させ、-80℃にて保存し、左心室をMHC mRNA, MHC アイソザイム, ミオシンATPase活性の測定に供した。

## 2. 生化学的検索

### 2 - 1. MHC mRNAの検索 (S1ヌクレアーゼ法)

心筋組織をホモジナイズし (溶液組成: 1% SDS, 50 mM Na acetate, 10 mM EDTA, pH 7.4), ホットフェノール法 [37]により細胞質内の総RNAを抽出した。本実験に使用したDNAプローブは, 3'末端がPst I制限酵素切断端になっているpCMHCmini5と命名された $\beta$ タイプMHCのcDNAクローンである (Fig. 2, ハーバード大学 B. Nadal-Ginard博士より寄与された) [24]. このプローブは全長347bpで,  $\beta$ -MHCとホモロジーのある部分が304bpあり, このうち180bpは $\alpha$ -MHCともホモロジーがある。よって $\beta$ -MHC mRNAとは304bpハイブリダイズし,  $\alpha$ -MHC mRNAとは180bpしかハイブリダイズしないことになる。このようなプローブの3'末端に $^{32}$ Pをラベルし, 30 $\mu$ gの総RNAを, 80% フォルムアミド存在下でハイブリダイズさせた (42 $^{\circ}$ C, 18時間)。この時の $\alpha$ および $\beta$ -MHC mRNAのハイブリダイゼーション効率は同一であると考えられる。次にS1ヌクレアーゼにより, ハイブリダイズしなかった一本鎖部分を消化した (25 $^{\circ}$ C, 1時間)。ここで得られた産物を, 8.3M尿素加6%ポリアクリルアミドゲル

[2]により泳動分離した。泳動が終了したのち、ゲルを乾燥し、X線フィルムに感光させた。以上のプロトコールの概略をFig. 3に、また、電気泳動像の1例をFig. 4に示した。X線フィルムに感光された $\alpha$ および $\beta$ -MHC mRNAの含有率は、レーザーデンシトメーター(Ultroscaan XL, Pharmacia LKB)によりその光学密度を読み取り、ガウシアン曲線より面積を算出し、それぞれの比率を計算した。

## 2 - 2. MHC アイソザイムの検索

MHC mRNAの検索に使用したサンプルの一部をホモジナイズし(溶液組成: 0.1M KCl, 1mM NaHCO<sub>3</sub>), 4℃にてHasselbach-Schneider溶液(組成: 0.6M KCl, 0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.4) [38]によりミオシン蛋白を抽出した。アイソザイムの分離は、Hohら[8]の報告に基づき、20mMピロリン酸加3.7%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(ディスク泳動, Gel Electrophoresis Apparatus GE-2/4, Pharmacia LKB)により行った。この電気泳動像の1例をFig. 5に示した。分離された各アイソザイムの含有率は、mRNAの検索と同

様、レーザーデンストメーターにより、分離された各バンドの光学密度を読み取り、ガウシアン曲線より各比率を計算した。なおV2アイソザイムについては $\alpha$ および $\beta$ のヘテロダイマーと考え、 $1/2 V2$ をV1およびV3に加え、V1:V3として計算した。

### 2 - 3. ミオシンATPase活性の測定

本実験では $Ca^{2+}$ および $(K^+)EDTA$ 依存性ミオシンATPase活性の測定を行った。mRNAおよびアイソザイムの検索に用いた心筋サンプルの一部を使用し、 $4^{\circ}C$ にてGuba-Straub溶液( $0.3M KCl$ ,  $0.15M H_3PO_4$ ,  $5mM ATP$ ,  $5mM MgCl_2$ ,  $pH6.5$ ) [38]によりミオシンを抽出し、この濃度をローリー法 [21]により測定した。 $Ca^{2+}$ および $(K^+)EDTA$ 依存性ATPase活性測定は、Nakanishiら [28]の報告に基づいて行った。なお $(K^+)-EDTA$ 依存性ATPase活性は、測定系の安定性を確認するために測定した。

### 2 - 4. 血清甲状腺ホルモン濃度測定

血清は採血後直ちに分離し、測定時まで $-20^{\circ}C$ にて保存した。本実験ではラジオイムノアッセイキット

(Clinical Assays, Baxter Healthcare) を使用し、サイロキシン (T4) およびトリヨードサイロニン (T3) の測定を行った。

### 3. 生理学的検索 (血圧測定)

ラットを安楽死させる前に、全例について左心室、大動脈、肺動脈、右心室、右心房の血圧測定を行った。ヘパリン加生理食塩水を満たした内径 0.28 mm または 0.31 mm のカテーテルを、右内頸動脈より左心系に、右外頸静脈より右心系に挿入し、physiological pressure transducer (PI0EZ Transducer, Statham-Gould Instruments) によりそれぞれの血圧測定を行った。

## 4. 病理学的検索

### 4 - 1. 左心室壁厚

左心室自由壁 outflow portion [10] の厚さをノギスにて測定した。壁厚または壁重量の測定に関しては、病理学的見地からどちらがより真の値として測定できるかという見解は出ていない。そこで著者は、実際両者について測定し、よい相関が得られていることを確認した上で、

本実験では壁厚のみを測定した。壁厚の実測値は体重により影響を受けているので、体重補正を行った値について検討した。

#### 4 - 2. 組織学的検索

##### 1). 光学顕微鏡による検索

左室自由壁の一部を10% フォルマリンにて固定、パラフィン包埋し、厚さ4 $\mu$ mの切片標本を作成した。この標本をヘマトキシリン-エオジン染色し、心筋細胞の横断面で核が存在する部位での横径を、接眼用マイクロメーターを用いて計測した。この時、心筋細胞の分岐部は測定から除外した。細胞横径の平均値は細胞100個を測定して算出した[31]。

##### 2). 電子顕微鏡による検索

光学顕微鏡による検索に用いた心筋サンプルの一部について、透過型電子顕微鏡により、浮腫など細胞肥大とは別個の異常所見が見られるか否かについて検討した。

## 5. 統計処理

結果は一部を除き、平均値 ± SD (標準偏差) にて表記した。3群以上の平均値の差の検定は、ANOVA (分散分析法) と Newman-Keul's range test により行った。2群間の平均値の差の検定は unpaired Student's t-test により行った。相対比率データについては正規分布に近似するため、arcsine 変換 [42] を行ったのち、上記検定を行った。有意差判定は  $p < 0.05$  をもって有意差ありと判断した。

### Ⅲ. 実験成績

#### 1. 血行動態ならびに病理学的検索

CoA 群, CoA+Thy 群および Sham 群の左心室最大収縮期圧 (LVSP), 平均肺動脈圧 (mean PAP), 右心室拡張末期圧 (RVEDP) を Table 1 に示した. CoA 群および CoA+Thy 群における LVSP は, Sham 群と比較し, 術後 3 日目には統計学上有意に高値を示すようになった. しかし mean PAP および RVEDP の値は, Sham 群と比較しても有意な変化は認められなかった. また左心室拡張末期圧, 右心室最大収縮期圧, 右心房圧についても, 各群の間に有意差は認められなかった.

Table 2 は CoA 群, CoA+Thy 群および Sham 群の体重補正をかけた左心室壁厚 ( $[LVTh(outf)/BW] \times 100$ ) と, CoA 群および Sham 群の心筋細胞横径を示している. CoA 群における  $[LVTh(outf)/BW] \times 100$  値は, 7 日目までは Sham 群で見られるのと同様, 若干減少する傾向にあった. これは心臓壁の成長率より体重の増加率が上回っていることを示し, 正常ラットの成長過程で認められる現象である. しかしその後, CoA 群の値は Sham 群と比較し,

有意に上昇することが確認された。CoA+Thy 群の  $[\text{LVTh}(\text{outf})/\text{BW}] \times 100$  値は Sham 群と比較し、既に 12 時間目から有意に高値を示していることが確認された。これは甲状腺ホルモンによる心筋細胞の肥大が短時間の内に誘導されていることを示している。

心筋細胞横径については CoA 群は Sham 群と比較し、7 日目より有意に高値を示すようになることが確認された。CoA 群および Sham 群の 12 時間目および 3 週間目の光学顕微鏡像の 1 例を Fig. 6-1, 2 に示した。CoA 群 3 週間目の像は明かに肥大の像を呈している。

電子顕微鏡による心筋細胞の観察によると、細胞間あるいは細胞形質内に浮腫は認められず、またその他の異常所見も確認されなかった。即ち心筋細胞横径の増加は純粹に心筋細胞の肥大に起因していることが確認された。

以上の結果より、本実験に使用したラットモデルは、大動脈縮窄により左心室に確実に圧負荷がかかっているが、心不全には陥っていないモデルであることが確認された。さらに本実験モデルは、圧負荷をかけてから 1 ないし 2 週間で心肥大が形成されるモデルであることが確認された。

## 2. MHC mRNAならびにアイソザイムの変化

Fig. 7は $\beta$ -MHC mRNA相対量( $\alpha$ と $\beta$ の合計を100%とする)ならびにV3-MHCアイソザイム相対量(V1とV3の合計を100%とする)の変化を示したグラフである。CoA群の $\beta$ -MHC mRNAの割合はSham群と比較し、1日目より35日目まで有意に高値を示した。蛋白レベルでも7日目より35日目まで有意に高値を示した。

CoA群の $\beta$ -MHC mRNAとV3-MHCアイソザイムの変化を比較すると、14日目までは"lag time"が存在することが確認され、この間は遺伝子の転写のほうが同時点の蛋白誘導と比較し、常に先行していることが確認された(Fig. 8)。

MHC mRNAならびにアイソザイムの変換は、14日目ないし21日目頃には収束しているように見え( $\beta$ -MHC mRNA:  $38.6 \pm 6.6\%$ ; V3-MHC アイソザイム:  $34.4 \pm 7.6\%$ ) (Fig. 7), この後は両者ともプラトーな値に達した( $\beta$ -MHC mRNA:  $34.0 \sim 40.8\%$ ; V3-MHCアイソザイム:  $31.1 \sim 37.0\%$ )。

また、56日目以後は、CoA群およびSham群の値はほぼ一致した。この現象は、各時点におけるCoA群の平均値とSham群の平均値の差をプロットしたグラフで見ると、よ

り明確に確認できる (Fig. 9).

CoA+Thy 群の  $\beta$ -MHC mRNA 値は CoA 群と比較してみると, 1, 3, 7, 10, 21 日目において有意に低く, また V3-MHC アイソザイム値においては 7, 10, 21 日目において有意に低かった (Fig. 7). さらに CoA+Thy 群の両者の変化は全期間を通して Sham 群のそれとほぼ一致しており, 有意差は全く認められなかった.

Normal 群の  $\beta$ -MHC mRNA および V3-MHC アイソザイムの値は Sham の値と比較し若干低値を示したが, 有意差は認められなかった (Fig. 7). Normal 群と Sham 群の間にみられた若干の差は, 開腹手術による生体侵襲の有無に起因しているものと考えられる. 従って, 圧負荷による心筋 MHC の変化を論ずるためには, CoA 群と Sham 群の比較によらなければならないことが判った.

Normal+Thy 群の  $\beta$ -MHC mRNA ならびに V3-MHC アイソザイムの値は, Sham 群と比較し全期間を通じて低値を示しており, 77 日目の値 ( $\beta$ -MHC mRNA:  $14.5 \pm 3.6\%$ ; V3-MHC アイソザイム:  $13.3 \pm 6.8\%$ ) を Normal 群の 0 日目の値と比較しても有意差がみられなかった (Fig. 7). これは甲状腺ホルモン (サイロキシン) による  $\alpha$ -MHC 遺伝

子発現の促進,  $\beta$ -MHC遺伝子発現の抑制に起因している。

77日目の各群の値を比較してみると, 興味あることに, Normal+thy群以外の群の値がほぼ一致していることが確認された ( $\beta$ -MHC mRNA:約35%; V3-MHCアイソザイム:約36%) (Fig. 7)。

### 3. ミオシンATPase活性値の変化

Fig. 10 はミオシンATPase活性値の変化を示したグラフである。Ca<sup>2+</sup>依存性ATPase活性値の変化は, MHCアイソザイムタイプの組成を反映しており, V1-MHC含有率が高いとCa<sup>2+</sup>依存性ATPase活性値は高くなり, 逆にV3-MHC含有率が高くなるとCa<sup>2+</sup>依存性ATPase活性値は低くなることがよく知られている[8]。本実験結果においてもこのことがよく反映されており, CoA群においてCa<sup>2+</sup>依存性ATPase活性値は,  $\beta$ -MHC mRNA および V3-MHC アイソザイムの誘導がみられる14ないし21日目まで急速に低下することが確認された。その後はやはりMHCの変化と同様に, ほぼプラトーの値を維持した。CoA+Thy群の値は徐々に低下する傾向がみられ, これもMHCの変化とよく一致していた。(K<sup>+</sup>)-EDTA依存性ATPase活性値は全期間

通じて変化はなく、本測定系の安定性が示唆された。

#### 4. 血清甲状腺ホルモンレベルの変化

Fig. 11 は血清中の T4 ならびに T3 濃度の変化を示したグラフである。T4 および T3 レベルとも CoA 群と Sham 群の間には有意差は認められず、全期間を通じてほぼ同じ値を示した。T4 レベルは両群とも術後 1 日目までに急速に低下し (CoA:  $1.63 \pm 0.67 \mu\text{g/dl}$ ; Sham:  $1.57 \pm 0.61 \mu\text{g/dl}$ ,  $p < 0.05$  vs. Normal 群 0 日目), 3 日目までこの低値が継続された。しかし 7 日目より両群ともほぼ正常レベルに復帰し、それ以後は Normal 群とほぼ同様の値を示した。これに対し、T3 レベルは術後 56 日目まで Normal 群と比較し、有意に低値を示し、この値は、全期間を通じてほぼ一定であった。血清甲状腺ホルモンレベルは、種々の生体に対する侵襲により影響されることが報告されており [13], CoA 群と Sham 群でみられたこれらの変化は、手術的侵襲に起因していると判断した。

次に甲状腺ホルモン (サイロキシン) の大量投与 ( $16 \mu\text{g/頭/日}$ ) が、 $\beta$ -MHC 遺伝子発現に対する圧負荷の影響を抑制することができるかについて検討した。この投

与量については予備実験を行い、これ以上投与量を増やしても、血清甲状腺ホルモン濃度（T4およびT3）はほとんど変化しなくなる量に定めてある。結果は過去の報告[11, 14, 22, 23, 26]と一致し、大量の甲状腺ホルモンは本実験における圧負荷には十分拮抗することが確認された。

#### IV. 考察

心臓負荷によるMHCアイソフォームタイプの変換は、遺伝子の転写レベルにおいて制御されていることが報告されてきたが[11, 14, 23, 26, 27, 39], 本実験においても、14日目までは $\beta$ -MHC mRNA相対量とV3-MHCアイソザイム相対量に差が認められ、 $\beta$ -MHC mRNA合成がV3-MHCアイソザイム誘導より常に先行していることが確認され(Fig. 7), 圧負荷によるMHCアイソフォームタイプの変換は、転写レベルで制御されていることが確認された。また、 $\beta$ -MHC遺伝子の転写は、3時間経過した時点で既に確認されるようになり、蛋白レベルでも1日目より確認可能となった(Fig. 9)。

甲状腺ホルモンは骨格筋MHC遺伝子発現を制御すると同時に、心筋MHC遺伝子発現をも制御している大きな要因の一つである[16]。ラットまたはウサギにおいて、大量の甲状腺ホルモンを投与すると、心室筋の $\alpha$ -MHC遺伝子発現が促進され、 $\beta$ -MHC遺伝子発現は抑制されるが、甲状腺機能低下状態においては、 $\alpha$ -MHC遺伝子発現は抑制され、 $\beta$ -MHC遺伝子発現が促進されることがよく知ら

れている [6, 7, 8, 20, 22, 36, 39]. 最近, いくつかの甲状腺ホルモン反応性遺伝子の検索が進められ, 甲状腺ホルモンは直接遺伝子に作用して, MHCアイソフォームの変換を制御している可能性が示唆されている [15, 18, 25]. また胎仔期には  $\beta$ -MHC遺伝子発現が有意にみられるが, 出生にともない甲状腺ホルモンが大量に放出され, これにより  $\alpha$ -MHC遺伝子発現が有意に高まることも示されている [3, 20].

本実験では, 圧負荷により誘導される  $\beta$ -MHC遺伝子発現が, 血清甲状腺ホルモンレベルの低下により誘導されているのか否かを確認するため, 血清中の T4 および T3 濃度の測定を行った. Fig. 11 に示されたごとく, CoA 群 および Sham 群における T4 および T3 レベルはほぼ同値を示しながら推移している. しかしながら, CoA 群における  $\beta$ -MHC mRNA ならびに V3-MHC アイソザイムの値は, Sham 群と比較し有意に上昇していた (Fig. 7). また, この Sham 群の値はほぼ Normal 群と一致していた. これらの結果は, 圧負荷による  $\beta$ -MHC 遺伝子発現の誘導は, 血清甲状腺ホルモンレベルの低下に依存しているのではないことを示唆しており, 圧負荷による MHC アイソフォーム変

換機構は、甲状腺ホルモンによる変換機構とは異なった機構によって制御されている可能性を示唆するものである。

本実験ではさらに、CoA群でみられた $\beta$ -MHC遺伝子発現の誘導は、大量のサイロキシンを投与することにより抑制されることが確認された。しかしながら、CoA+Thy群はNormal+Thy群と同様、血清甲状腺ホルモンレベルは高値に維持された（Fig. 11）にも関わらず、 $\beta$ -MHC mRNAならびにV3-MHCアイソザイムの割合は、Normal+Thy群のように低値が維持されず、時間とともに徐々にその割合が増加して行き、Sham群またはNormal群とほぼ同様の推移を示した（Fig. 7）。このことは、CoA+Thy群において、サイロキシンによる $\alpha$ -MHC遺伝子発現の誘導効果と、圧負荷による $\beta$ -MHC遺伝子発現の誘導効果がほぼ等しかったために、結果として $\beta$ -MHC mRNAならびにV3-MHCアイソザイムの割合が、Sham群あるいはNormal群とほぼ一致したものと推察される。換言すれば、本実験における圧負荷の程度よりさらに大きな圧負荷が加わった場合は、 $\beta$ -MHC遺伝子発現の割合はさらに大きくなる可能性があるものと考えられる。

CoA 群において、術後35日目までは $\beta$ -MHC mRNAあるいはV3-MHCアイソザイムの割合がSham群と比較し、有意に高値を示している (Fig. 7)。これは換言すると、術後35日目まではSham群と比較し、CoA群の心筋のATPase活性は低く (Fig. 10)、従って筋収縮速度も遅いといえる。筋収縮速度を知る新しい指標として、近年提示された  $f_{m.i.}$  (frequency of minimum stiffness) という指標があり、これは筋収縮速度を直接反映するといわれている [34]。本研究とは別の実験において、大動脈縮窄ラット心筋のV1-MHCアイソザイムの変化と  $f_{m.i.}$  の変化の相関関係を調べたところ、きわめてよい相関が得られた ( $r=0.82$ ) [35]。この結果からも、本実験におけるCoA群の術後35日目までは、やはり筋収縮速度が低下している時期といえる。

一方、CoA群の術後56日目以降では、 $\beta$ -MHC mRNA ならびにV3-MHCアイソザイムの割合は、Sham群の値とほぼ一致していることが確認された (Fig. 7)。これは換言すると、術後56日目以降はSham群と比較し、CoA群の心筋のATPase活性および筋収縮速度はほぼ正常化したと見なすことができる。これは圧負荷に対する心筋の生化学

的適応反応が、もはや必要でなくなったことを意味するものである。即ち、細胞横径の変化または  $[LVTh(outf)/BW] \times 100$  値の変化 (Table 2) より判断した場合、この時期には既に心肥大の形成が完了し、心臓が圧負荷に対して、物理学的に完全に適応できる状況になっているためである。Fig. 12 は Fig. 9 に細胞横径の変化率をプロットしたグラフであるが、細胞横径の増加、即ち、心肥大の形成が完了する 21 日目頃より、MHC アイソフォームの変化率が低下してきており、心臓が圧負荷に対して物理学的に適応できる状況になったとき、心筋の生化学的適応反応は収束していくことが確認された。

これらの成績から、圧負荷に対する心臓の適応現象を心筋細胞レベルでみたとき、第一のプロセスとして MHC アイソフォームタイプの変換（”質的”変化）が起こり、収縮線維自体の収縮効率の改善を図りつつ、負荷に対する心臓の対応としての肥大が形成されるまでの間、心臓にかかる負荷を軽減するように適応する。続いて第二のプロセスとして心肥大（”量的”変化）が起こり、収縮線維の物理的収縮効果の増大をもたらす、物理的に負荷に適応できるようになると、MHC アイソフォームタイプ

の変換は収束することが判明した。

以上のことより、心肥大形成過程におけるMHCアイソフォームタイプの変換の意義としては、心負荷に対する心臓の適応現象の第一段階を担う重要な要素であり、肥大心はエネルギー代謝を行ううえで、形態的のみならず形質的にも適応をしようることが明かとなった。

## V. 結論

心筋ミオシン重鎖(MHC)遺伝子の転写ならびにアイソザイムは、成長過程(加齢)、心臓負荷、ホルモンなどにより $\alpha$ (V1)タイプから $\beta$ (V3)タイプへ、または $\beta$ (V3)タイプから $\alpha$ (V1)タイプへと変換される。本研究では、心肥大形成過程におけるMHCアイソフォームタイプの変換の意義について検討するため、左室圧負荷(CoA群)に対する心筋MHC mRNAならびにアイソザイムの変化を対照群(Sham群)と比較観察するとともに、この変換に大きな影響を及ぼす甲状腺ホルモンとの関係についても検討を行った。

その結果、

1. CoA群の血清甲状腺ホルモンレベルはSham群とほぼ一致していたにも関わらず、CoA群では $\beta$ -MHC mRNAならびにV3-MHCアイソザイムの割合が、Sham群と比較し、有意に上昇した。
2. CoA+Thy群の $\beta$ -MHC mRNAならびにV3-MHCアイソザイムの割合はCoA群と比較し、有意に低値を示しており、大量のサイロキシンは圧負荷による $\beta$ -MHC遺伝子発現の誘導を抑制することが確認された。

3. 術後56日目以降, CoA群とSham群の $\beta$ -MHC mRNAならびにV3-MHCアイソザイムの値はほぼ一致し, この時期には, 病理学的データより心肥大も完成していることが確認された.

以上の結果は次のことを示唆するものである.

1. 圧負荷による心筋MHCアイソフォームの変換は, 血清甲状腺ホルモンレベルの低下により誘導されるのではなく, この変換制御機構と甲状腺ホルモンによる制御機構とは異なるものである.

2. 圧負荷に対する心臓の適応反応は二段階からなっており, 第一のプロセスはMHCアイソフォームの変換により収縮線維自体の収縮効率の改善を図る. 続く第二のプロセスが心肥大形成であり, 収縮線維の物理的収縮効果の増大をもたらすものである.

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇切なるご指導とご校閲を賜りました麻布大学獣医学部外科学第一教室、高橋貢教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究を遂行するにあたり直接ご指導をいただきました、東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所循環器小児科、松岡瑠美子博士、中西敏雄講師、高尾篤良名誉教授、東京女子医科大学第二病理学教室西川俊郎助教授に拝謝致します。また、多大なるご協力をいただきました東京女子医科大学附属日本心臓血圧研究所研究部平塚江里子技師、アリゾナ州立大学木村美佐氏に感謝致します。

参 考 文 献

- 1 . Barany, M. 1967. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. J. Gen. Physiol. 50: 197-218.
- 2 . Berk, A.J. and Sharp, P.A. 1977. Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease digested hybrids. Cell 12: 721-732.
- 3 . Chizzonite, R.A. and Zak, R. 1984. Regulation of myosin isoenzyme composition in fetal and neonatal rat ventricle by endogeneous thyroid hormones. J. Biol. Chem. 259: 12626-12632.
- 4 . Dechesne, C.A., Bouvagnet, P., Walzthony, D. and Leger, J.J. 1987. Visualization of cardiac ventricular myosin heavy chain homodimers and heterodimers by monoclonal antibody epitope

- mapping. J. Cell Biol. 105: 3031-3037.
- 5 . Dillman, W. 1980. Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin of rats. Diabetes 29: 579-582.
- 6 . Everett, A.W., Shinha, A.M., Umeda, P.K., Jakovcic, S., Rabinowitz, M. and Zak, R. 1984. Regulation of myosin synthesis by thyroid hormone: Relative change in  $\alpha$  - and  $\beta$  -myosin heavy chain mRNA levels in rabbit heart. Biochemistry 23: 1596-1599.
- 7 . Gustafson, T.A., Markham, B.E. and Morkin, E. 1985. Analysis of the thyroid hormone effects on myosin heavy chain gene expression in cardiac and soleus muscles using novel dot-blot mRNA assay. Biochem. Biophys. Res. Commun. 130: 1161-1167.

- 8 . Hoh, J.F.Y., McGrath, P.A. and Hale, H.T.  
1978. Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin. Effect of hypophysectomy and thyroxine replacement. J. Mol. Cell Cardiol. 10. 1053-1076.
- 9 . Holubarsch, Ch., Goulette, R.P., Litten, R.Z., Martin, B.J., Mulieri, L.A. and Alpert, N.R. 1985. The economy of isometric force development, myosin isoenzyme pattern and myofibrillar ATPase activity in normal and hypothyroid rat myocardium. Circ. Res. 56: 78-86.
10. Hudson, R.E.B. 1965. Cardiovascular Pathology. Vol. 1, pp.34-40. Arnold, London.
11. Imamura, S., Matsuoka, R., Hiratsuka, E., Kimura, M., Nakanishi, T., Nishikawa, T., Furutani, Y. and Takao, A. 1991. Adaptational changes of MHC gene expression and isozyme

- transition in cardiac overloading. Am. J. Physiol. 260: H73-H79.
12. Imamura, S., Matsuoka, R., Hiratsuka, E., Kimura, M., Nishikawa, T. and Takao, A. 1990. Local response to cardiac overload on myosin heavy chain gene expression and isozyme transition. Circ. Res. 66: 1067-1073.
13. Ingbar, S.H. 1986. The Thyroid. pp.287-406. Lippincott, Philadelphia.
14. Izumo, S., Lompre, A.M., Matsuoka, R., Koren, G., Schwartz, K., Nadal-Ginard, B. and Mahdavi, V. 1987. Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. J. Clin. Invest. 79: 970-977.

15. Izumo, S. and Mahdavi, V. 1988. Thyroid hormone receptor  $\alpha$  isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. Nature 334: 539-542.
16. Izumo, S., Nadal-Ginard, B. and Mahdavi, V. 1986. All members of the myosin heavy chain multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. Science 231: 597-600.
17. Kimata, S. and Morkin, E. 1971. Comparison of myosin synthesis in heart and red and white skeletal muscles. Am. J. Physiol. 221: 1706-1713.
18. Koren, G., Nadal-Ginard, B. and Mahdavi, V. 1987. Multiple cis-acting sequences regulate expression of the  $\alpha$  - and  $\beta$  -MHC genes.

19. Laks, M.M., Morady, F., Garner, D. and Swan, H.J.C. 1974. Temporal changes in canine right ventricular volume, mass, cell size, and sarcomere length after banding the pulmonary artery. Cardiovasc. Res. 8: 106-111.
20. Lompre, A.M., Nadal-Ginard, B. and Mahdavi, V. 1984. Expression of the cardiac ventricular  $\alpha$  - and  $\beta$  -myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. J. Biol. Chem. 259: 6437-6446.
21. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurements in the Folin phenol reagents. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

22. Mahdavi, V., Izumo, S. and Nadal-Ginard, B.  
1987. Developmental and hormonal regulation of sarcomeric myosin heavy chain gene family. Circ. Res. 60: 804-814.
23. Mahdavi, V., Matsuoka, R. and Nadal-Ginard, B.  
1985. Molecular characterization and expression of the cardiac  $\alpha$  - and  $\beta$  -myosin heavy chain gene. pp. 2-9. In : Cardiac Morphogenesis (Ferrans, V.J., Rosenquist, G., and Weinstein, C. eds.) Elsevier, Amsterdam.
24. Mahdavi, V., Periasamy, M. and Nadal-Ginard, B.  
1982. Molecular characterization of two myosin heavy chain genes expressed in the adult heart. Nature 297: 659-665.
25. Markham B.E., Bahl, J.J., Gustafson, T.A. and Morkin, E. 1987. Interaction of a protein factor within a thyroid hormone-sensitive

region of rat  $\alpha$ -myosin heavy chain gene.

J. Biol. Chem. 262: 12856-12862.

26. Matsuoka, R., Nadal-Ginard, B. and Mahdavi, V.  
1984.  $\alpha$ - and  $\beta$ -myosin heavy chain gene  
expression in response to systolic overload  
hypertrophy. Circulation 70 (Suppl. II): 196.
27. Nagai, R., Pritzl, N., Low, R.B., Stirewalt, W.  
S., Zak, R., Alpert, N.R. and Litten, R.Z.  
1987. Myosin isozyme synthesis and mRNA levels  
in pressure-overloaded rabbit hearts. Circ.  
Res. 60: 692-699.
28. Nakanishi, T., Nagae, M. and Takao, A. 1986.  
Developmental changes in contractile protein.  
Adenosine 5'-triphosphatase in the rabbit  
heart. Circ. Res. 58: 890-895.

29. Pagani, E.D. and Julian, F.J. 1984. Rabbit papillary muscle myosin isozymes and the velocity of muscle shortening. Circ. Res. 54: 586-594.
30. Schaible, T.F., Malhotra, A. Ciambrone, G. and Scheuer, J. 1984. The effect of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats. Circ. Res. 54:38-49.
31. Sekiguchi, M., Hiroe, M. and Morimoto, S. 1979. On the standardization of histopathological diagnosis and semiquantitative assessment of the endomyocardium obtained by endomyocardial biopsy. Bull. Heart Inst. Jpn. 55-85.

32. Sheer, D. and Morkin, E. 1984. Myosin isozyme expression in rat ventricle: Effects of thyroid hormone analogs, catecholamines, glucocorticoids and high carbohydrate diet. J. Pharmacol. Exp. Ther. 229: 872-879.
33. Sheuer, J. and Bahn, A.K. 1979. Cardiac contractile proteins: adenosine triphosphatase activity and physiological function. Circ. Res. 45: 1-12.
34. Shibata, T., Hunter, W.C. and Sagawa, K. 1987. Dynamic stiffness of barium-contracted cardiac muscles with different speed of contraction. Circ. Res. 60: 770-779.
35. Shibata, T., Imamura, S., Matsuoka, R. and Takao, A. 1990. Effect of pressure overload on crossbridge cycling rate of cardiac muscles. Jpn. Circ. J. 54: 902-903.

36. Shinha, A.M., Umeda, P.K., Kavinsky, C.J.,  
Rajamanickam, C., Hsu, H.J., Jakovcic, S. and  
Rabinowitz, M. 1982. Molecular cloning of mRNA  
sequences for cardiac  $\alpha$  - and  $\beta$  form myosin  
heavy chains: Expression in ventricles of  
normal, hypothyroid, and thyrotoxic rabbits.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 5847-5851.
37. Soeiro, R., Birnboim, H. and Darnell, H.  
1966. Rapidly labeled Hela cell nuclear RNA:  
H. Base composition and cellular location of  
a heterogeneous RNA fraction. J. Mol. Biol.  
19: 362-373.
38. Takano-Ohmuro, H., Obinata, T., Masaki, T.  
and Mikawa, T. 1982. Changes in myosin iso-  
zymes during development of chicken breast  
muscle. J. Biochem. 91: 1305-1311.

39. Umeda, P.K., Darling, D.S., Kennedy J.M.,  
Jacovcic, S. and Zak, R. 1987. Control of  
myosin heavy chain expression in cardiac  
hypertrophy. Am. J. Cardiol. 59: 49A-55A.
40. Yazaki, Y. and Raben, M.S. 1974. Cardiac  
myosin adenosine triphosphatase of rat and  
mouse. Distinctive enzymatic properties com-  
pared with rabbit and dog cardiac myosin.  
Circ. Res. 35: 15-23.
41. Whalen, R.G., Toutan, M., Butler-Browne, G.S.  
and Watkins, S.C. 1985. Hereditary pituitary-  
dwarfism in mice affects skeletal and cardiac  
myosin isozyme transitions differently.  
J. Cell Biol. 101: 603-609.
42. Zar, J.H. 1984. Biostatistical Analysis, 2nd  
ed., pp.239-241. Prentice-Hall, Englewood  
Cliffs.

Table 1. 血行力学的測定値

	LVSP (mmHg)			mean PAP (mmHg)			RVEDP (mmHg)		
	CoA	CoA+Thy	Sham	CoA	CoA+Thy	Sham	CoA	CoA+Thy	Sham
12 hrs	171.9±22.7	168.0±14.6	152.6±23.4	17.8±1.7	18.0±1.6	17.3±2.9	1.9±0.5	1.0±0.0	1.8±0.8
24 hrs	166.7±21.8	177.2±12.7	155.6±23.7	16.8±2.6	18.3±1.0	19.4±1.1	2.0±1.6	0.8±0.3	3.6±0.9
3 days	174.0±10.5*	175.4±12.1*	149.6±19.1	17.7±1.5	18.6±2.8	17.5±1.7	1.8±0.8	1.7±0.6	1.3±0.6
7 days	175.0±8.8*	170.0±9.4*	146.3±13.5	17.8±1.5	18.8±5.3	19.2±5.0	2.1±0.3	1.3±1.0	1.6±1.3
14 days	176.4±15.6*	-	145.8±19.1	16.0±2.2	-	16.0±1.4	1.4±0.5	-	1.2±0.5
21 days	171.2±10.5*	161.6±14.1*	131.5±9.6	16.7±2.5	19.0±2.5	16.4±2.7	1.1±0.2	2.0±1.6	1.4±0.9
42 days	177.2±16.2*	178.3±19.1*	141.3±17.8	16.0±2.0	19.3±1.9	17.3±1.6	0.8±1.1	1.0±1.4	1.0±1.0
77 days	174.8±15.5*	170.5±11.6*	138.8±13.0	15.0±3.0	14.4±4.3	18.8±2.5	1.0±1.6	2.3±3.3	2.6±0.6

LVSP: 左室最大収縮期圧, mean PAP: 平均肺動脈圧, RVEDP: 右室拡張末期圧

CoA: 大動脈縮窄群, CoA+Thy: 大動脈縮窄+甲状腺ホルモン投与群, Sham: 偽手術群

\*p<0.05 vs Sham.

Table 2. 左心室壁厚および細胞横径

		[LVTh(outf)/BW] x 100			Myocyte Diameter( $\mu$ m)		
		CoA	CoA+Thy	Sham	CoA	Sham	
12 hrs		0.65 $\pm$ 0.05	0.68 $\pm$ 0.04*	0.60 $\pm$ 0.02	14.1 $\pm$ 0.9	13.8 $\pm$ 0.5	
24 hrs		0.61 $\pm$ 0.01	0.72 $\pm$ 0.04*	0.58 $\pm$ 0.03	14.1 $\pm$ 0.2	13.6 $\pm$ 0.5	
7 days		0.56 $\pm$ 0.02	0.77 $\pm$ 0.14*	0.56 $\pm$ 0.03	16.4 $\pm$ 1.0*	13.8 $\pm$ 0.8	
14 days		0.65 $\pm$ 0.11*	-	0.50 $\pm$ 0.03	-	-	
21 days		0.78 $\pm$ 0.12*	0.70 $\pm$ 0.14*	0.46 $\pm$ 0.03	18.4 $\pm$ 0.6*	14.6 $\pm$ 1.2	
42 days		0.61 $\pm$ 0.10*	0.72 $\pm$ 0.13*	0.40 $\pm$ 0.05	-	-	
77 days		0.60 $\pm$ 0.09*	0.66 $\pm$ 0.15*	0.35 $\pm$ 0.01	19.8 $\pm$ 0.9*	16.2 $\pm$ 0.9	

[LVTh(outf)/BW] x 100: [left ventricular free wall (outflow portion) thickness/body weight]x100.

CoA: 大動脈縮窄群, CoA+Thy: 大動脈縮窄+甲状腺ホルモン投与群, Sham: 偽手術群

\*p<0.05 vs Sham.

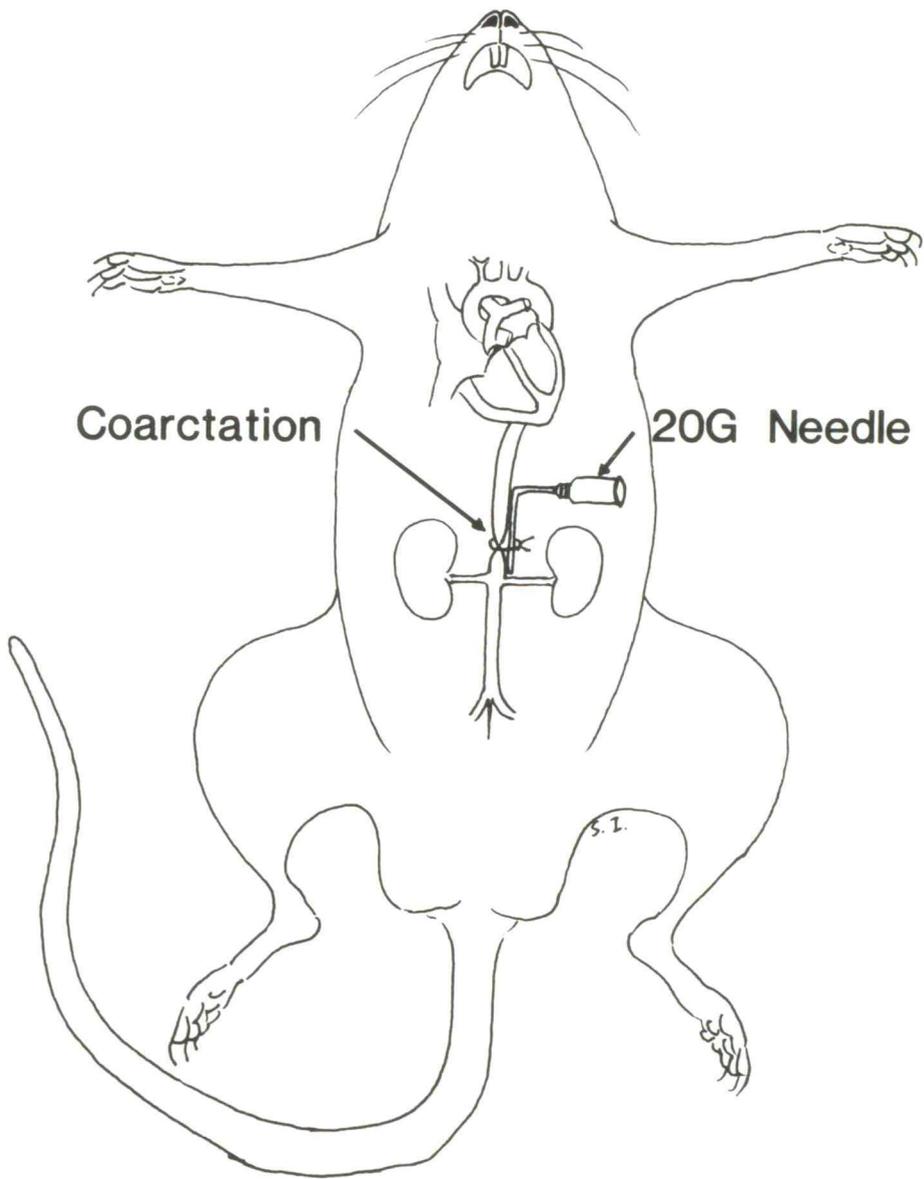


Fig. 1 大動脈縮窄モデルの作成法

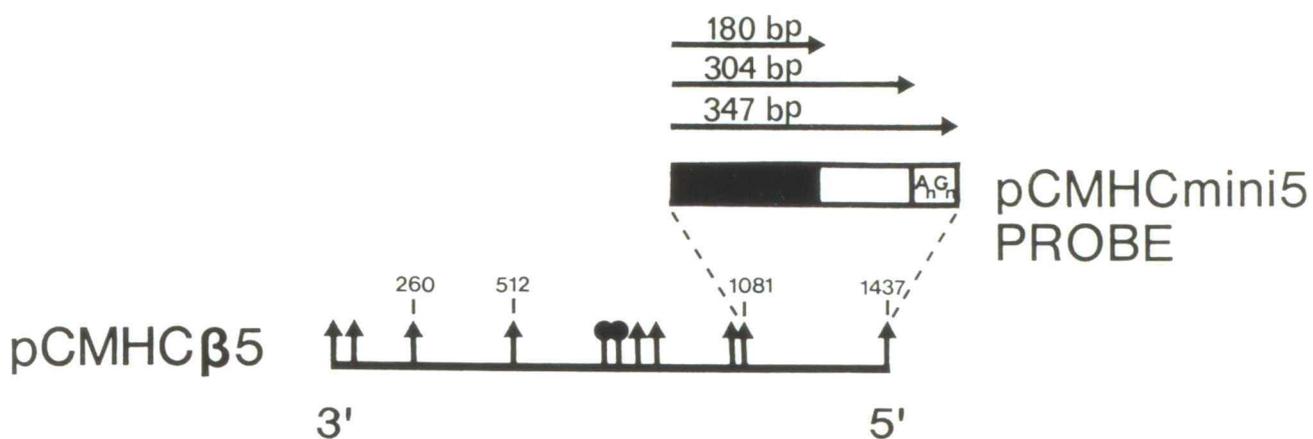


Fig. 2 S1ヌクレアーゼ法で使用したDNAプローブ  
 全長 347bp, β特異的塩基配列部分が180bpで  
 αとホモロジーのある塩基配列部分を加えると  
 304bpになる.

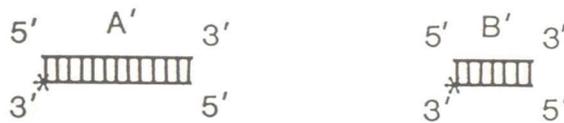
bp: base pair, ▲: Pst I, ●: Bal I

3' END LABEL  
 ss cDNA PROBE 3' \* ————— 5'

HYBRIDIZATION TO RNA IN EXCESS OF DNA  
 (80% FORMAMIDE, 42°C, 18 hrs)



S1 NUCLEASE DIGESTION  
 RNA-DNA RESISTANT HYBRIDS



↓  
 ETHANOL PRECIPITATION

↓  
 UREA-ADDED 6% POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS  
 (350V, 13 hrs)

↓  
 GEL DRY (80°C, 4 hrs)

↓  
 EXPOSURE TO X-RAY FILM (-80°C)

Fig. 3 S1ヌクレアーゼ法のプロトコール

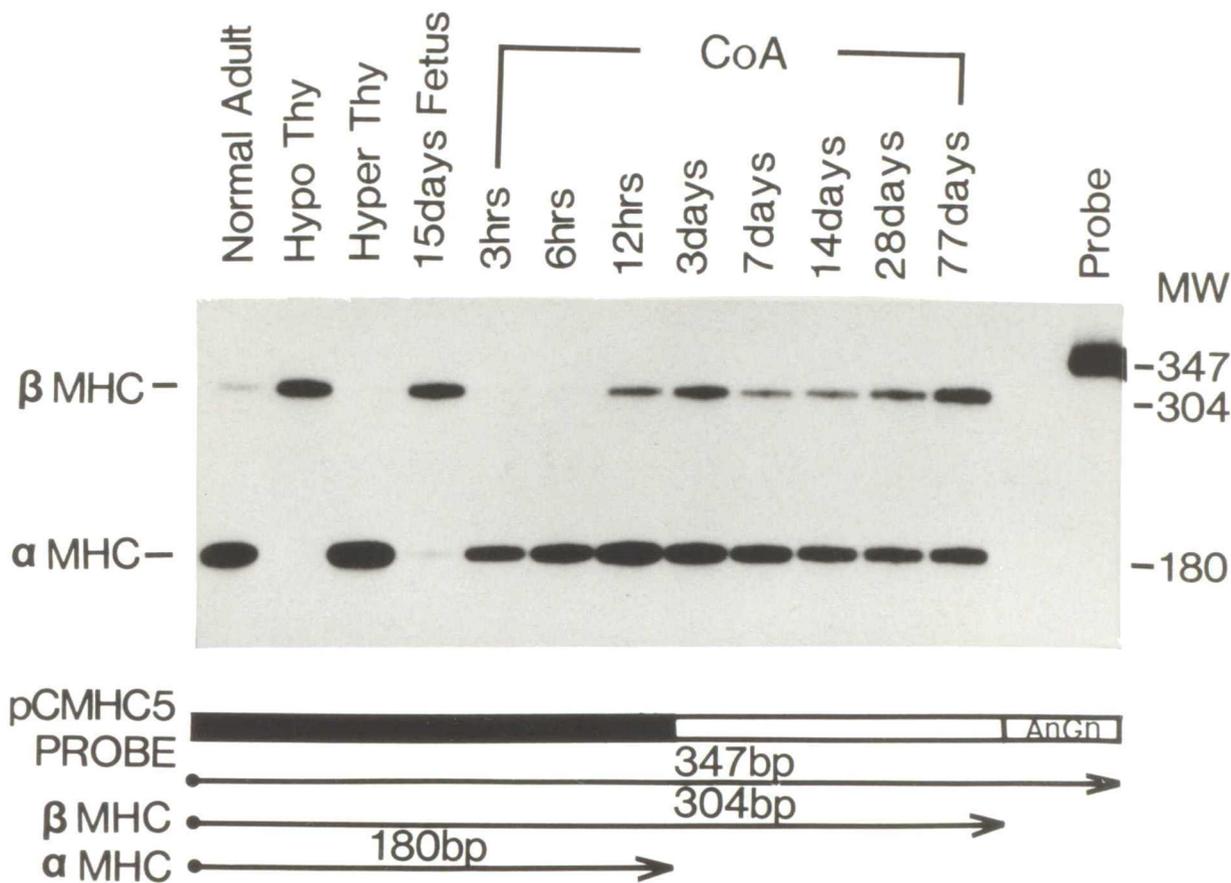


Fig. 4 S1ヌクレアーゼ法により検出されたMHC mRNA

の電気泳動像の1例

Hypo Thy: 甲状腺機能低下

Hyper Thy: 甲状腺機能亢進

CoA: 大動脈縮窄群

bp: base pair

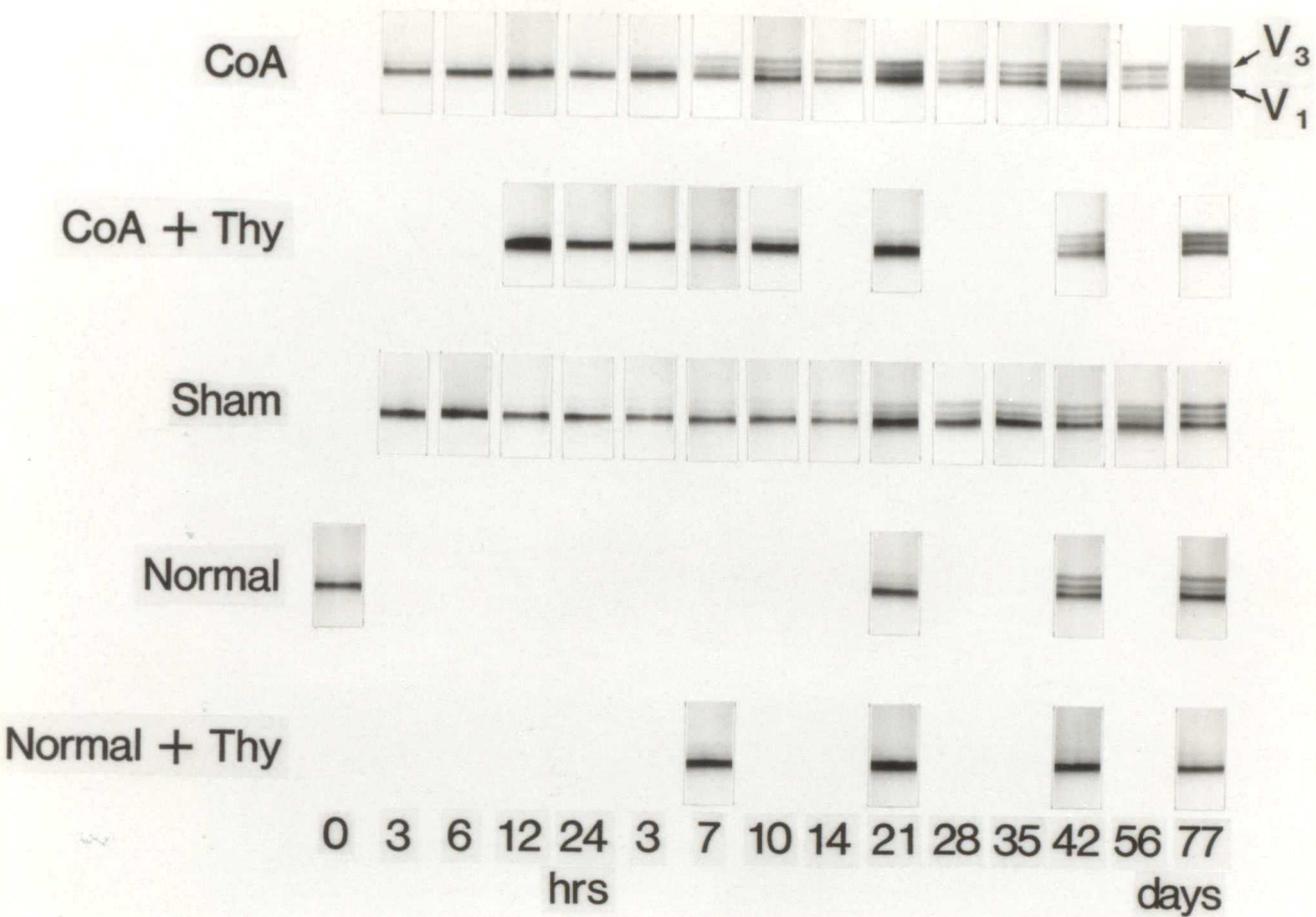


Fig. 5 ピロリン酸加アクリルアミドゲル電気泳動法により検出されたMHCアイソザイムの1例

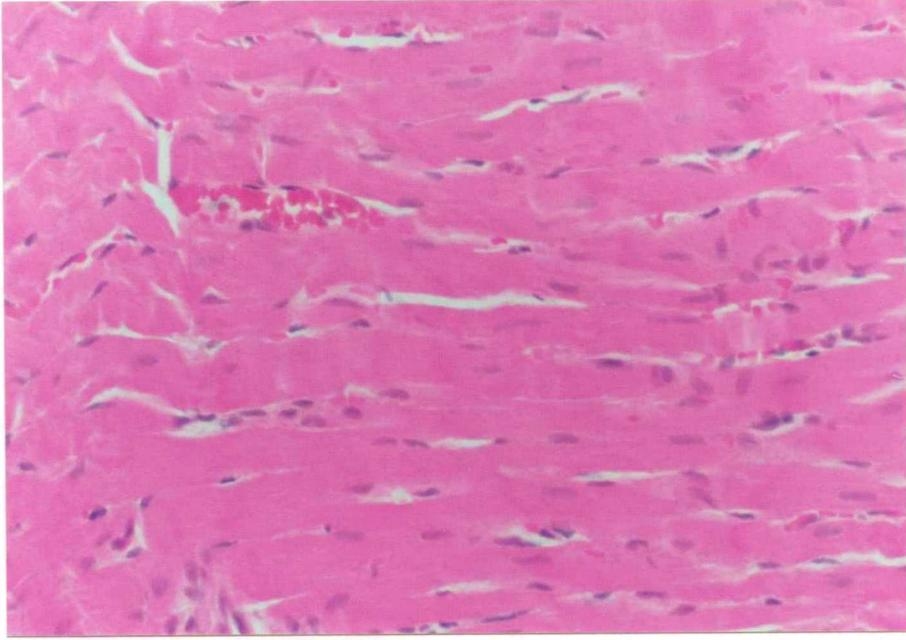
CoA: 大動脈縮窄群

CoA+Thy: 大動脈縮窄+甲状腺ホルモン投与群

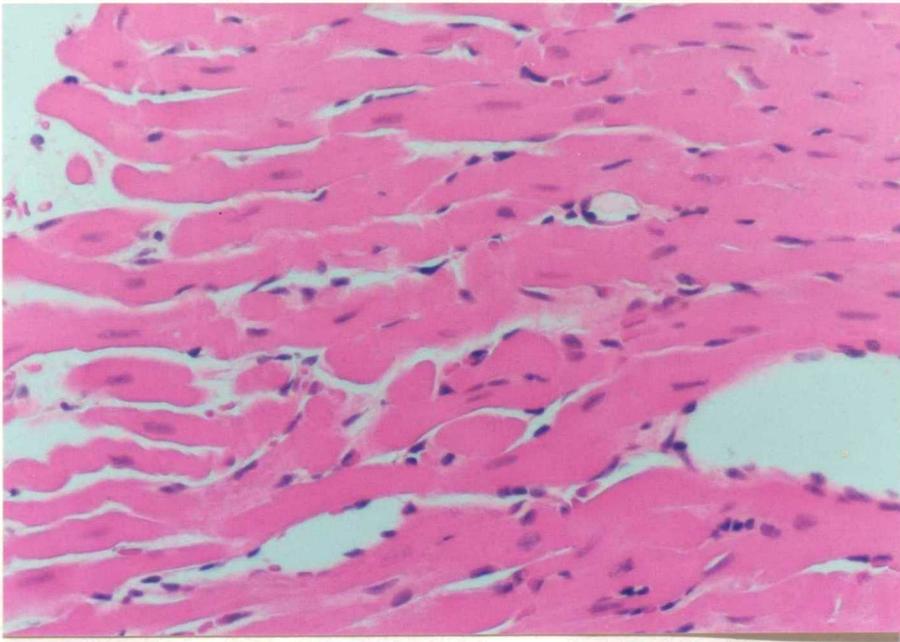
Sham: 偽手術群

Nor: 未処置群

Nor+Thy: 未処置+甲状腺ホルモン投与群



大動脈縮窄群

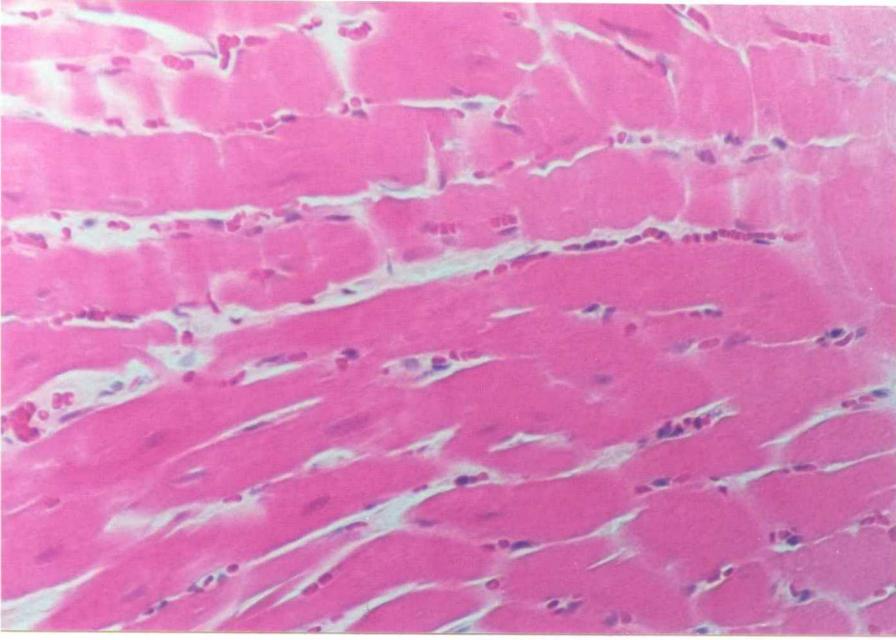


偽手術群

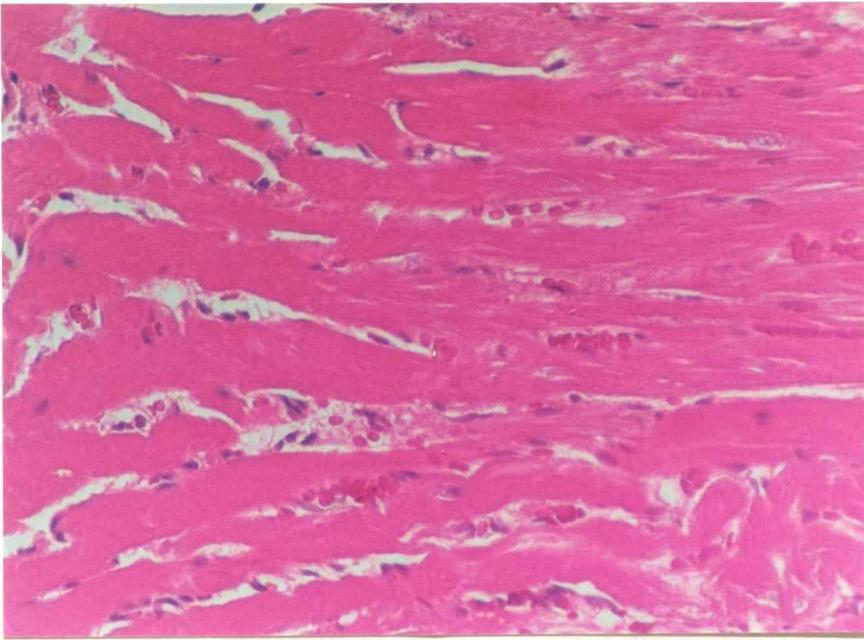
Fig. 6-1 心筋細胞の光学顕微鏡像の1例

術後12時間目

(100倍, H-E染色)



大動脈縮窄群



偽手術群

Fig. 6-2 心筋細胞の光学顕微鏡像の1例

術後3週間目

(100倍, H-E染色)

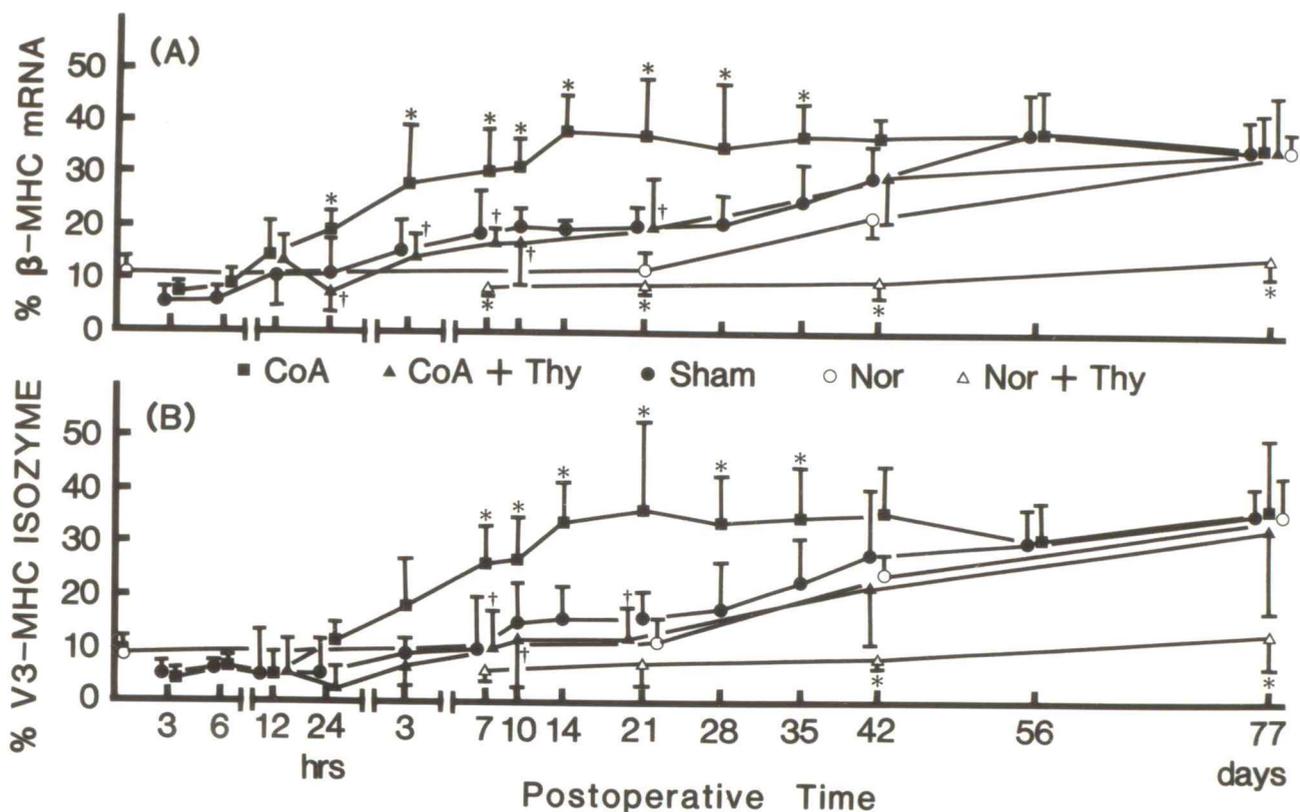


Fig. 7 心筋ミオシン重鎖 mRNAならびにアイソザイムの経時的変化

(A):  $\beta$ -MHC mRNA 相対量の変化

(B): V3-MHCアイソザイム相対量の変化

■ : 大動脈縮窄群,

▲ : 大動脈縮窄 + 甲状腺ホルモン投与群,

● : 偽手術群, ○ : 無処置群,

△ : 無処置 + 甲状腺ホルモン投与群

\* :  $p < 0.05$  vs. Sham, † :  $p < 0.05$  vs. CoA

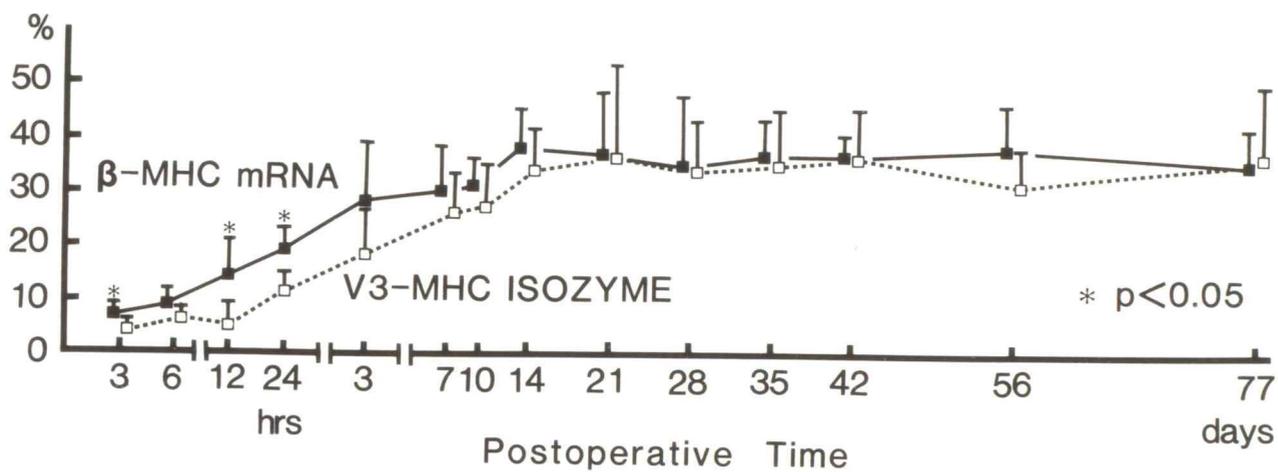


Fig. 8 大動脈縮窄群における $\beta$ -MHC mRNA相対量とV3-MHCアイソザイム相対量の経時的変化の比較

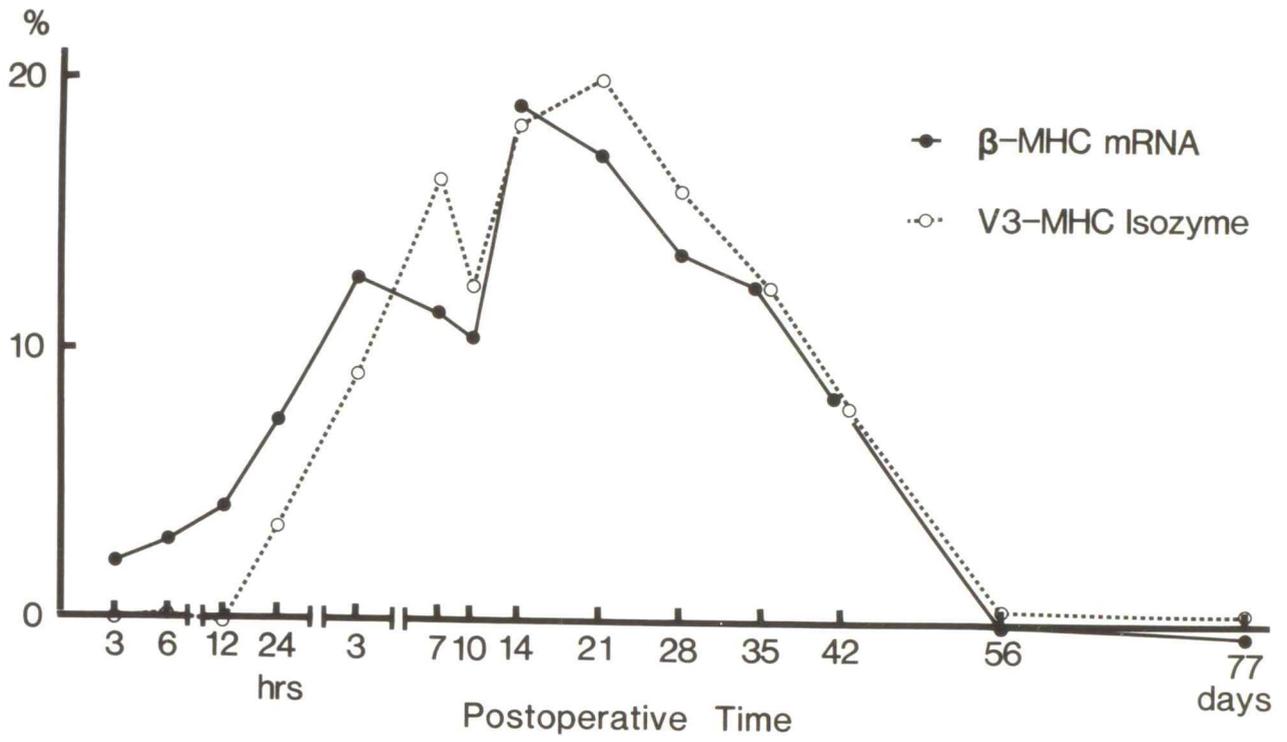


Fig. 9 大動脈縮窄群と偽手術群の $\beta$ -MHC mRNAなら  
びにV3-MHCアイソザイムの平均値の差の経時  
的変化

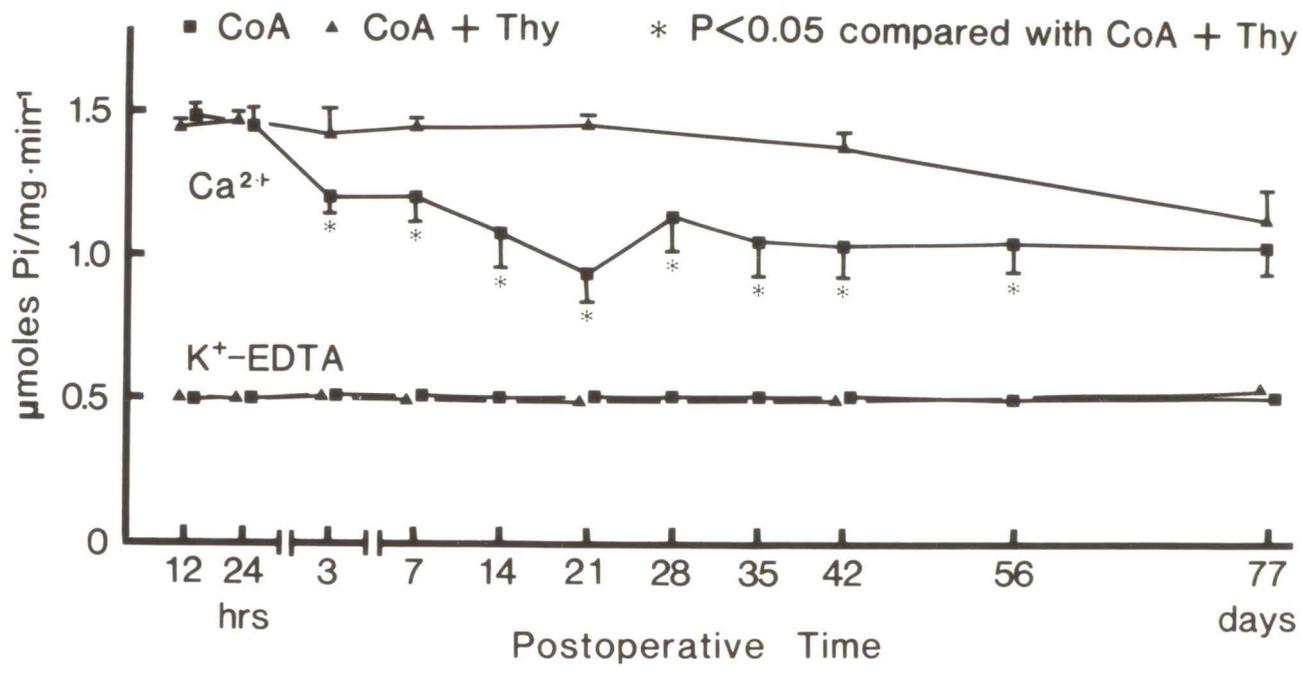


Fig. 10 ミオシンATPase活性値の変化

Ca<sup>2+</sup> : Ca<sup>2+</sup>依存性ATPase

■ K<sup>+</sup>-EDTA : (K<sup>+</sup>)EDTA依存性ATPase

■ : 大動脈縮窄群

▲ : 大動脈縮窄 + 甲状腺ホルモン投与群

\* : p < 0.05 vs. CoA + Thy

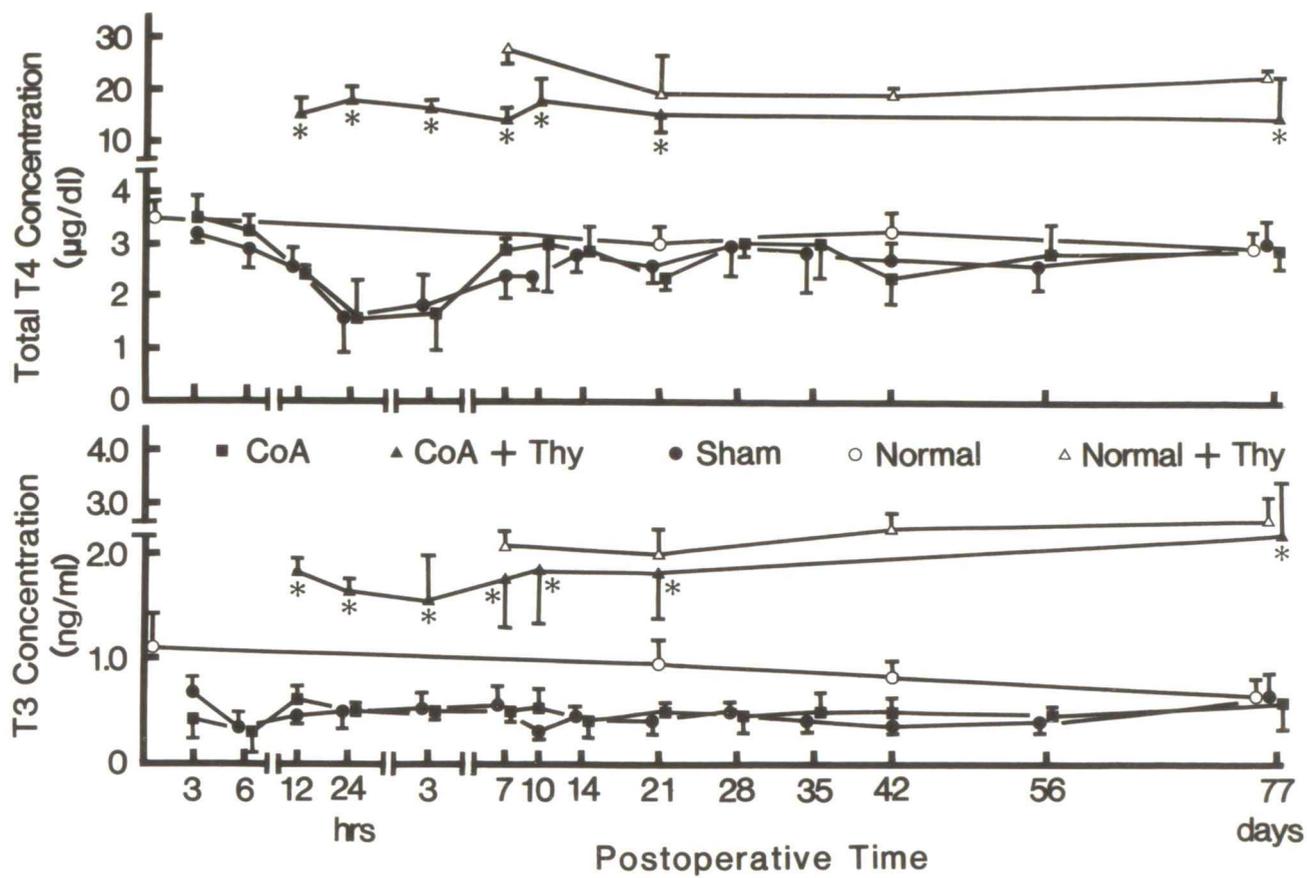


Fig. 11 血清甲状腺ホルモンレベルの変化

上段：サイロキシン (T4)

下段：トリヨードサイロニン (T3)

■：大動脈縮窄群，

▲：大動脈縮窄 + 甲状腺ホルモン投与群，

●：偽手術群，○：無処置群，

△：無処置 + 甲状腺ホルモン投与群

\*：p < 0.05 vs. CoA, Sham

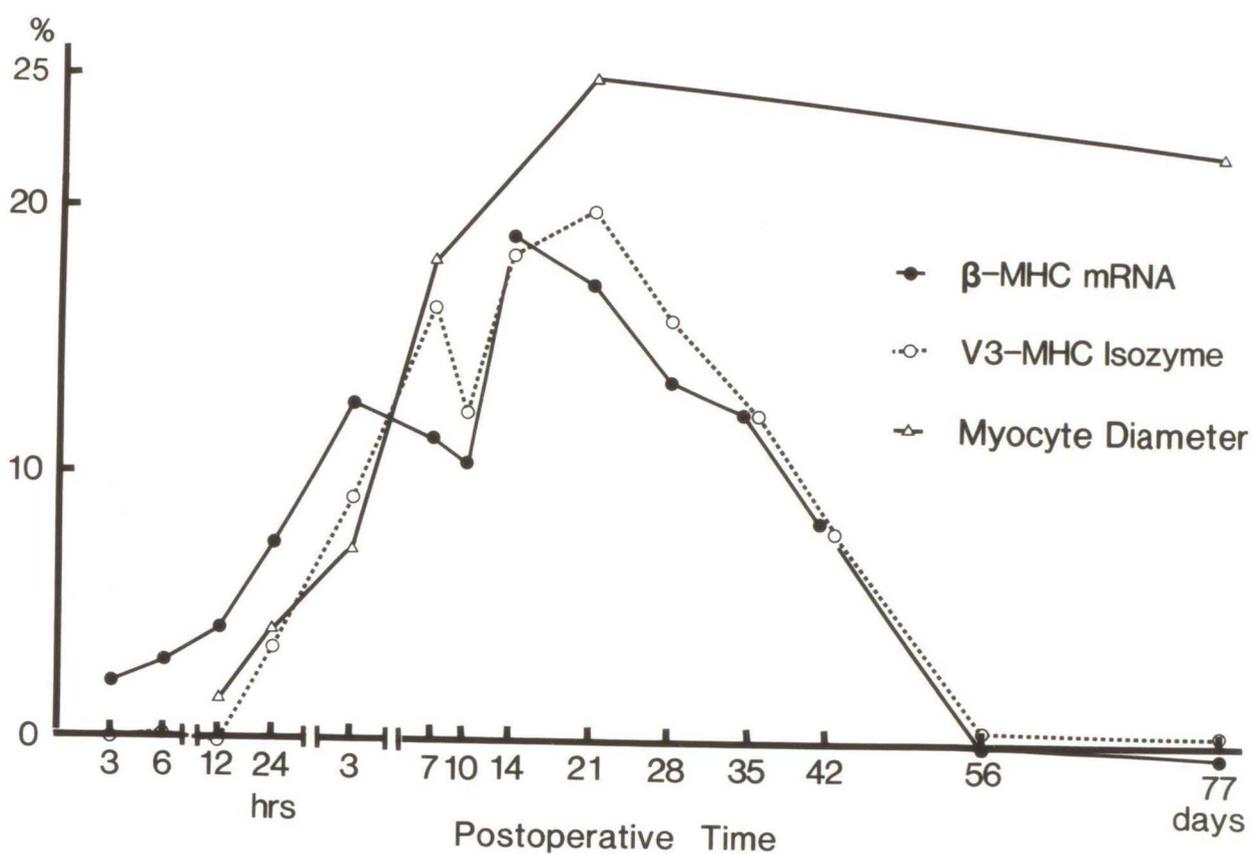


Fig. 12 大動脈縮窄群と偽手術群の $\beta$ -MHC mRNAならびにV3-MHCアイソザイムの平均値の差の経時的変化と大動脈縮窄群における心筋細胞横径変化率

Adaptational Changes of Myosin Heavy Chain Gene Expression  
and Isozyme Transition in Cardiac Overloading

Shin-ichiro Imamura

Department of Veterinary Surgery  
School of Veterinary Medicine  
Azabu University

## INTRODUCTION

Hypertrophy is clearly the basic adaptative response of the heart to hemodynamic overload, and an increase in myocardial mass has been shown to be associated with a decrease in wall tension per sarcomere. In the early search for biochemical correlates of cardiac hypertrophy, the relation between decreased mechanical performance and decreased myosin ATPase activity was confirmed in various animal models of hemodynamic overload and by a direct relationship between the rate of  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated myosin ATPase activity and the maximum velocity of muscle shortening. The changes in myosin ATPase activity were later found to be due to the three different myosin isozymes (V1, V2 and V3), which are thought to be correlated with two myosin heavy chains ( $\alpha$ -MHC and  $\beta$ -MHC); V1 is the  $\alpha\alpha$  homodimer and has the highest ATPase activity, V3 is the  $\beta\beta$  homodimer with the lowest ATPase activity, while V2 is the  $\alpha\beta$  heterodimer. Recently, it has been shown that V1- to V3-MHC isoform transition is induced by hemodynamic overload, and this process is mainly regulated by pretranslational mechanisms. Also, previous studies have demonstrated that the induction of the  $\beta$ -MHC caused by hemodynamic overload can be overcome at pretranslational levels by higher doses of the thyroid hormone. However, several questions still remain, including whether the shift toward the  $\beta$ -MHC during pressure overload is induced by a decrease in serum thyroid hormone levels, and how the shift of the MHC is related to the development of cardiac hypertrophy process.

To answer these questions, I examined the interaction between

the effects of aortic coarctation and serum thyroid hormone levels on  $\alpha$ - and  $\beta$ -MHC gene expression at the messenger RNA (mRNA) level and on MHC isozyme transitions in rats, compared with a sufficient number of sham-operated animals, from 3 hours to 77 days following surgery. To elucidate the processes involved in the development of cardiac hypertrophy, biochemical (myosin ATPase activity, serum thyroid hormone levels), physiological (blood pressure) and pathological (heart wall thickness, light and electron microscopic histology) studies were performed.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Surgical Procedures

Ten-week-old male Wistar Imamichi rats, weighing approximately 300g at the time of operation, were used. Surgical coarctation of the aorta was made at the abdominal artery, just above the renal artery, by knotting a thread around the artery with a 20-gauge needle, under pentobarbital anesthesia (15.0mg/300g body weight, administered intraperitoneally). For these studies, a coarctation group (CoA, n=75), a coarctation group with daily injection of thyroid hormone (T4) (CoA+Thy, n=41) and, as controls, a sham-operated group (Sham, n=75), a non-operated group (Nor, n=22) and a non-operated group with daily injection of thyroid hormone (T4) (Nor+Thy, n=23), were prepared. The mortality rate of this procedure was about 18.5% in the CoA group, 19.6% in the CoA+Thy group, 12.8% in the Sham group and 0% in the Nor and Nor+Thy groups. In the CoA+Thy and Nor+Thy groups, 16  $\mu$ g/head of L-thyroxine (Sigma), which was dissolved in 0.4ml

of 0.9% NaCl containing 0.001N NaOH, was injected daily, subcutaneously. At successive times following surgery (CoA and Sham: 3, 6, 12 and 24 hours, and 3, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 56 and 77 days; CoA+Thy: 12 and 24 hours, and 3, 7, 10, 21, 42 and 77 days; Nor: 0, 21, 42 and 77 days; Nor+Thy: 7, 21, 42 and 77 days), five or six animals were weighed and their blood pressure measured. Blood samples were then taken, and the animals were killed. The heart was rapidly excised, the left and right ventricles were separated, and the free wall thickness was measured. The ventricles were immediately frozen in liquid nitrogen, stored at -80 °C and subjected to MHC mRNA, MHC isozyme and myosin ATPase activity analyses. For each of these studies, parts of the same left ventricle were used.

### Biochemical Studies

#### MHC mRNA analysis (S1 nuclease analysis)

Total cytoplasmic RNA was extracted from the myocardium, using the hot phenol procedure. The DNA probe used in this study was the 3' end PstI fragment of pCMHC mini5 ( $\beta$ -type MHC cDNA clone). The probe was hybridized in DNA excess to 30  $\mu$ g total RNA in 80% formamide for 18 hours at 42 °C. S1 nuclease digestion was done for 1 hour at 25 °C and the digestion products were separated by 6% polyacrylamide 8.3M urea-sequencing gel. The proportions of  $\alpha$  - and  $\beta$ -MHC mRNA were quantitated by measurement of the X-ray film density exposed from the gel, using a laser densitometer (Ultrosan XL, Pharmacia LKB). The proportion of each band was calculated by the area of the resolved Gaussian curves.

### MHC isozyme analysis

Myosin was extracted from the myocardium of part of the same sample using MHC mRNA analysis at 4 °C with Hasselbach-Schneider solution (final concentration: 0.6M KCl, 0.1M potassium phosphate, 10mM sodium pyrophosphate, and 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.4), and isoforms were separated by 3.7% polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of 20mM sodium pyrophosphate. The density of each band (V1, V2 and V3) was quantitated with a laser densitometer. The proportions of V1, V2 and V3 were calculated by the resolved Gaussian curves and a half value of V2 density was added to those of V1 and V3.

### Myosin ATPase activity

Both Ca<sup>2+</sup>- and (K<sup>+</sup>)EDTA-stimulated myosin ATPase activities were determined. The myosin was extracted from the sample using MHC mRNA and isozyme analyses at 4 °C with Guba-Straub solution and the myosin concentration was measured by Lowry's method. The Ca<sup>2+</sup>- and (K<sup>+</sup>)EDTA-stimulated ATPase activities were calculated as described previously.

### Levels of thyroid hormones in serum

The serum was separated immediately after blood sampling, and stored at -20 °C. Serum concentrations of total thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) were measured by radioimmunoassay (Clinical Assays, Baxter Healthcare Corporation).

## Physiological Studies

### Blood pressure

The blood pressure was monitored before the animals were sacrificed. Heparinized saline-filled catheters (I.D. 0.28mm catheter for artery, I.D. 0.31mm flexible catheter for vein) were inserted into the right carotid artery or the right jugular vein, and the pressure was measured by a physiological pressure transducer (P10EZ Transducer, Statham-Gould Instruments).

## Pathological Studies

### Left ventricular free wall thickness

The left ventricular free-wall thickness (outflow portion (outf)) was measured, after the left and right ventricles were separated, and normalized to the body weight to express the value.

### Histology

Heart specimens taken from the left ventricular free wall were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and 4  $\mu\text{m}$ -thick sections were cut and stained with hematoxylin-eosin for the morphological studies. The diameter of myocardial cells was measured on a longitudinal section across the nucleus of the cells by a micrometer in the microscope. The mean value of the cell diameter was calculated from 100 cells for each heart, as described previously. The same ventricular samples were studied using electron microscopy.

## Statistical Analysis

The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical comparisons among more than three groups were carried out using analysis of variance and Newman-Keul's test for multiple sample comparisons. Unpaired Student's t-test was also used for comparisons between two groups. The relative data ( $\beta$ -MHC mRNA and V3-MHC isozyme) were evaluated after transformation to normal distribution of values using the arcsine transformation. The probability was considered to be significant if the p value was less than 0.05.

## RESULTS

### Hemodynamic and Histological Studies

Significant increases in the LVPSP in the CoA and CoA+Thy groups were observed compared with the Sham group from the 3rd day following surgery. The mean PA and RVEDP in the CoA and CoA+Thy groups did not change significantly, compared with the Sham group. The increases in left ventricular end-diastolic pressure and right atrial pressure in the CoA and CoA+Thy were also not significant, compared with the Sham group. The left ventricular free-wall thickness (LVTh(outf)/body weight) in the CoA group showed a slight decrease, as seen in the Sham group until the 7th day, but thereafter, a significant increase was observed, compared with the Sham group. In the CoA+Thy group, the LVTh(outf)/body weight was significantly higher than in the Sham group, at all timing points. Significant differences in the myocyte diameter were observed from the 7th day following

surgery. As electron micrographs revealed no edema in the interstitium or cytoplasm at all timing points, this increase in myocyte diameter was the result of hypertrophy. From these results, I confirmed that heart failure did not exist but the left ventricle was overloaded in these coarctation models. Moreover, from the data of LVTh(outf)/body weight and myocyte diameter, it was confirmed that hypertrophy induced by pressure overload was recognizable from 1 or 2 weeks following coarctation.

#### Changes in MHC Isoforms at both mRNA and Protein Levels

The rise in the  $\beta$ -MHC mRNA level in the CoA group was statistically significant compared with the Sham group, from 1 to 35 days following surgery. At the protein level, a significant increase in the CoA group was observed from 7 to 35 days following surgery. Although there were no significant differences between the CoA and Sham groups, the rise in the  $\beta$ -MHC mRNA level was observed from 3 hours and that in the V3-MHC isozyme started at 24 hours following surgery. In the CoA group, a lag time between the appearances of  $\beta$ -MHC mRNA and V3-MHC isozyme was seen until 14 days following surgery; the increase in the  $\beta$ -MHC mRNA occurred earlier than in the V3-MHC isozyme. The switch from  $\alpha$ (V1)- to  $\beta$ (V3)-MHC seemed to be completed at around 14 days following coarctation ( $\beta$ -MHC mRNA:  $38.6 \pm 6.6\%$ ; V3-MHC isozyme:  $34.4 \pm 7.6\%$ ), and thereafter, the mean values of  $\beta$ (V3)-MHC reached a plateau ( $\beta$ -MHC mRNA:  $34.0 - 40.8\%$ ; V3-MHC isozyme:  $31.1 - 37.0\%$ ). From 56 days following surgery, the mean levels of  $\beta$ (V3)-

MHC in the CoA and Sham groups were the same.

In the CoA+Thy and CoA groups, there were significant differences ( $p < 0.05$ ) in the  $\beta$ -MHC mRNA at 1, 3, 7, 10 and 21 days following surgery, and in the V3-MHC isozyme at 7, 10 and 21 days following surgery. The proportion of  $\beta$ (V3)-MHC in the CoA+Thy group showed nearly the same level as in the Sham group at all timing points ( $p = \text{NS}$ , CoA+Thy vs. Sham). Also in the Nor and Sham groups, there were no significant differences in the  $\beta$ (V3)-MHC at all timing points. In the Nor+Thy group, the proportion of  $\beta$ (V3)-MHC stayed at quite a low level throughout all timing points ( $\beta$ -MHC mRNA:  $14.5 \pm 3.6\%$ ; V3-MHC isozyme:  $13.3 \pm 6.8\%$  at the 77th post-operative day,  $p = \text{NS}$  compared with the Nor group at day 0). Furthermore, the mean proportion of  $\beta$ (V3)-MHC at the 77th day, interestingly, reached a similar level in all groups ( $\beta$ -MHC mRNA: approximately 35%; V3-MHC isozyme: approximately 36%) except for the Nor+Thy group.

#### Changes in Myosin ATPase Activity during Pressure Overload

A similar correlation was observed between the fluctuations in the levels of MHC isoforms and  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated myosin ATPase activity. In the CoA group, the MHC mRNA, MHC isozyme and  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated ATPase activity changed rapidly up to 14 or 21 days following surgery and these parameters reached nearly the same level, and thereafter, these values were maintained. ( $\text{K}^+$ )EDTA-stimulated myosin ATPase activity in both the CoA and CoA+Thy groups showed no changes at all timing points.

Whether the Shift Toward the  $\beta$ -MHC during Pressure Overload  
Is Induced by a Decrease in Serum Thyroid Hormone Levels?

Thyroid hormone is a potent regulator of the cardiac as well as the skeletal muscle MHC gene family. In the ventricle, hyperthyroidism induces the  $\alpha$ -MHC gene expression and deinduces the  $\beta$ . Indeed, the developmental transitions of the ventricular myosins have been shown to coincide with the postnatal surge of thyroid hormone.

I measured circulating total T4 and T3 levels to examine whether the induction of the  $\beta$ -MHC during coarctation may possibly be associated with a decrease in serum thyroid hormone levels. The T4 and T3 levels were almost the same in the CoA and Sham groups. In both groups, total T4 levels were decreased during 24 hours (CoA:  $1.63 \pm 0.67$   $\mu\text{g/dl}$ ; Sham:  $1.57 \pm 0.61$   $\mu\text{g/dl}$ ,  $p < 0.05$  compared with the Nor group at day 0) and these levels were maintained until 3 days following surgery, but from the 7th day, they returned approximately to the normal level. Especially, T3 levels continued to be significantly lower in the CoA and Sham groups, compared with the Nor group, except at 77 days following surgery. At the 77th day, there were almost no differences among the CoA, Sham and Nor groups. This phenomenon might have been due to the surgical stress itself, as a decrease in serum thyroid hormone levels in a variety of stressful conditions has been well documented. However, this transient decline of total T4 and long-term decline of T3 in thyroid hormone levels would not account for the switch from  $\alpha$ - to  $\beta$ -MHC observed in the CoA group, since there were almost no differences in serum thyroid hormone levels

between the CoA and Sham groups.

I next explored whether a high dose of thyroid hormone could prevent the effect of pressure overload on MHC gene expression. When L-thyroxine (16 $\mu$ g/head/day) was administered in the CoA+Thy group following coarctation, the proportions of  $\beta$ -MHC mRNA and protein decreased slightly the day after surgery, but thereafter, the proportions of  $\beta$ -MHC mRNA and protein increased gradually and showed similar levels to those in the Sham group. However, serum thyroid hormone levels were quite high in the CoA+Thy group (T4: 14.35 - 18.62  $\mu$ g/dl; T3: 1.60 - 2.45ng/ml), as observed in the Nor+Thy group (T4: 19.34 - 28.30  $\mu$ g/dl; T3: 2.16 - 2.93 ng/ml), and were low in the Sham group (T4: 1.57 - 3.27  $\mu$ g/dl; T3: 0.36 - 0.59ng/ml).

## DISCUSSION

It has been shown that MHC isoform transition induced by pressure overload is mainly regulated by pretranslational mechanisms. In this study, I confirmed this fact and also showed that the change at the gene level had already begun at 3 hours after coarctation.

The interplay of pressure overload and serum thyroid hormone levels on MHC isoform transitions was studied. The data presented here showed that the serum total T4 and T3 levels in the CoA and Sham groups were nearly the same at all timing points. In the CoA group, however, a significant accumulation of the  $\beta$ -MHC mRNA and corresponding protein was observed compared with the Sham group, in which the MHC isoform transitions were almost the same as in

the Nor group. This result demonstrates that the shift toward the  $\beta$ -MHC during pressure overload observed in the CoA group is not induced by a decrease in serum thyroid hormone levels, and that the mechanisms of MHC transition regulated by pressure overload are different from those caused by thyroid hormone which affect the gene directly.

I also confirmed that a high dose of thyroid hormone (T4) could prevent the effect of pressure overload on the MHC gene expression seen in the CoA group. In the CoA+Thy group, however, in spite of serum thyroid hormone levels being kept high as in the Nor+Thy group, the  $\beta$ -MHC gene expression was not maintained at a low level as in the Nor+Thy group; the proportion of  $\beta$ -MHC increased gradually, as in the Sham group. Moreover, at 77 days following surgery, the relative amount of the  $\beta$ -MHC reached a similar level in all groups, except for the Nor+Thy group. These results indicate that the accumulation of the  $\alpha$ -MHC mRNA due to the effect of thyroid hormone might have equalled the accumulation of  $\beta$ -MHC mRNA due to that of pressure overload in this study.

In the CoA group, during 35 days following surgery, a significant accumulation of  $\beta(V3)$ -MHC was observed compared with the Sham group. In other words, there was a lower state of ATPase activity and muscle contraction speed compared with the Sham group. In that study, we examined the correlation between cardiac MHC isozymes and frequency of minimum stiffness ( $f_{\min}$ ) which are expected to reflect directly the contractile rates of the interaction between myofibrillar proteins, using rats with coarctation

of the aorta. The results showed a linear correlation between V1-MHC isozyme and  $f_{\min}$  ( $r=0.82$ ). On the other hand, after the 56th day, the relative levels of  $\beta(V3)$ -MHC were the same as those in the Sham group, which means that the ATPase activity and muscle contraction speed were the same as in the Sham group. In this stage, the biochemical adaptation to the hemodynamic overload was no longer necessary, because the hypertrophy of the heart had been accomplished, judging from cell diameter and LVTh(outf)/body weight, and the hemodynamic state had stabilized. These findings demonstrate that the "qualitative" response (MHC changes) to pressure overload begins first, and later the "quantitative" response (hypertrophy) can be seen. I consider that at the myocardial level, the adaptational mechanisms consists of two processes; at first, the MHC changes lead to an improved efficiency at the fiber level, and then the hypertrophy itself, by simply multiplying the contractile units, is a secondary adaptational process.