

氏名（本籍）	金森寛充（岐阜県）
学位の種類	博士（再生医科学）
学位授与番号	甲第 708 号
学位授与日付	平成 19 年 3 月 25 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Inhibition of Fas-associated apoptosis in granulation tissue cells accompanies attenuation of postinfarction left ventricular remodeling by olmesartan
審査委員	(主査) 助教授 湊 口 信 也 (副査) 教授 竹 村 博 文 教授 小 澤 修

### 論文内容の要旨

心筋梗塞は急性期死亡のみならず、慢性期にも左心室のリモデリングを引き起こし、左室の拡大・心機能の低下をもたらす心不全の原因となる。アンジオテンシンⅡタイプ1受容体拮抗薬（ARBs）は心筋梗塞後心不全を改善すると報告されているが、その機序は非心筋梗塞領域の線維化抑制や心筋肥大の抑制以外については不明である。特に心筋梗塞領域の動態については未だ明らかにされていない。本研究では、選択的ARBsとしてolmesartanを用い、以上の観点からマウス心筋梗塞において *in vivo*, *in vitro* で検討した。

#### 【対象と方法】

92匹の10週齢のC57BL/6J雄マウスを全身麻酔下、左肋間開胸直視下にて左冠動脈結紮し、心筋梗塞を作製した。3日後に生存した76匹のマウスを亜急性期心筋梗塞モデルとしてolmesartan (10mg/kg/day)投与治療群、降圧治療コントロールとしてhydralazine (15mg/kg/day)投与群、生食投与無治療群の3群に振り分け、これとは別に非心筋梗塞群を加え、合計4群について検討した。心筋梗塞後慢性期として梗塞4週後に屠殺し、生存率、心臓カテーテル検査・心エコーによる血行動態、組織学的検索の比較検討を行った。また亜急性期として、梗塞10日後にも屠殺し心臓の組織学的検討と発現蛋白の検討を行った。なお薬剤投与方法は、梗塞3日後より浸透圧ミニポンプを直接皮下に埋め込み持続投与とした。さらに *in vitro* の実験系として、梗塞10日後の梗塞巣より筋線維芽細胞を培養しFasとActinomycin Dを加えアポトーシスを誘導し、これに対するolmesartanの効果を検討した。

#### 【結果】

心筋梗塞後4週の時点で、生存率についてolmesartan治療群(94%)は、無治療群(54%)と比較し有意に改善を認めたが、hydralazine治療群(73%)で有意な改善を認めなかった。またolmesartan治療群は左室収縮能、拡張能など心機能の改善を認めた。心体重比は、olmesartan治療群で縮小し心肥大を抑制した。梗塞面積は群間で有意差を認めなかったが、olmesartan治療群では有意な梗塞壁厚の増大と梗塞壁長の短縮を認めた。olmesartan治療群では、梗塞領域・非梗塞領域ともに線維化は抑制され心筋細胞の肥大抑制を認めた。梗塞領域において非心筋細胞の密度の増加に加え、 $\alpha$ -smooth muscle actin陽性筋線維芽細胞と血管の増加を認めた。そこで、梗塞領域の肉芽組織細胞の動態を梗塞亜急性期である梗塞10日後で検討したところ、olmesartan治療群の梗塞領域において、アポトーシスを示すTUNEL陽性細胞の減少、増殖を示すKi67陽性細胞の増加、酸化ストレスを示す8-OHdG陽性細胞の減少が有意に認められた。梗塞10日後のwestern blotting法によるアポトーシス関連の発現

蛋白分子については、olmesartan 治療群において Fas, Daxx, Bax, ProCaspase-3, Active Caspase-3 の抑制を認めた。

これは、Fas 誘導性アポトーシス経路のうち alternative pathway の抑制を示しており、さらにこの経路に重要な影響を与えるとされる MAP-kinase について注目したところ、同群では JNK のリン酸化の抑制を認めた。In vitro の系において、培養した筋線維芽細胞に Fas と Actinomycin D を加えアポトーシスを誘導したところ olmesartan を加えることによりアポトーシス抑制効果を認めた。この効果は濃度依存性であり、同様に JNK のリン酸化抑制と Active Caspase-3 の発現抑制を認めた。他の ARB (Losartan) や ACE 阻害薬 (Captopril)、さらに抗酸化剤である superoxide dismutase, catalase, deferoxamin も濃度依存性にアポトーシスを抑制した。

### 【考察】

本研究では、心筋梗塞亜急性期より olmesartan を投与することで、慢性期の左室リモデリングの抑制と左室心機能や生存率の改善がみられた。この機序として、亜急性期心筋梗塞巣での肉芽組織細胞のアポトーシス抑制により梗塞巣の細胞を温存し、慢性期心筋梗塞領域の壁厚を保つことで、壁ストレスを減少させ心不全や左室リモデリングを抑制したと考えられた。このアポトーシス抑制の分子機構は、梗塞（肉芽）組織において Fas, Daxx, Bax, Caspase-3 の発現抑制並びに JNK, c-Jun の不活化が認められたため、Fas 誘導性アポトーシス経路のうち alternative pathway の抑制と考えられた。また、in vitro において他の ARB や ACE 阻害薬、抗酸化剤においても筋線維芽細胞の Fas 誘導性アポトーシスが抑制されたことから、alternative pathway について olmesartan のアンギオテンシン II タイプ 1 受容体阻害を介した抗酸化作用の関与が示唆された。

### 【結論】

olmesartan は、心筋梗塞亜急性期の肉芽組織細胞の Fas 関連アポトーシスを抑制することにより、慢性期壁厚を保ち心筋梗塞後心不全を抑制した。すなわち、olmesartan は、心筋梗塞発症後急性期を逃した亜急性期以後の投与でも、慢性期心不全の予防が期待できることを示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 金森寛充は、マウス心筋梗塞モデルを用いて、アンギオテンシン II 受容体拮抗薬のオルメサルタンが心筋梗塞後心不全抑制作用を有し、その機序のひとつが亜急性期肉芽組織細胞に対する抗アポトーシス作用であることを明らかにした。さらに Fas/Fas ligand 系とレニン・アンギオテンシン系には関連があることを初めて指摘した。

以上より本研究は、循環器病学ならびに細胞生物学の進歩に少なからず寄与するものと考えられる。

---

### 【主論文公表誌】

Inhibition of Fas-associated apoptosis in granulation tissue cells accompanies attenuation of postinfarction left ventricular remodeling by olmesartan

American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 292,2184-2194 (2007).