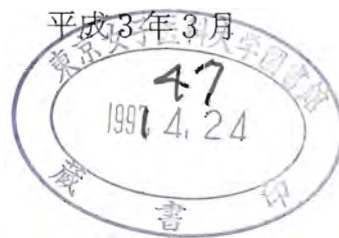


心筋ミオシン アイソザイムに対する
交感神経の影響について
(63570414)

平成2年度科学研究費補助金 一般研究C 研究成果報告書



研究代表者 木 全 心 一

(東京女子医科大学日本心臓血圧研究所 教授)

はじめに

本研究は、広沢弘七郎先生、細田瑛一先生の御指導の下で行なわれた。

myosin isozyme の monoclonal 抗体の提供は、東京大学医学部の矢崎義雄先生、土持英嗣先生の御好意により、また筋小胞体のCa⁺⁺ ATPase の mRNA は永井良三先生、小室一成先生の御好意のよるものである。

また、開心術時の乳頭筋の採取は、本学の小柳仁先生、橋本明政先生の御好意ある御協力のたまものである。

実験には初見卷子氏、甫仮妙子氏の献身的な協力によってなされた。

本研究をまとめるにあたり深甚なる感謝の意を表したい。

研究者一同

1) 研究組織

代表研究者

木全心一 東京女子医科大学 日本心臓血圧研究所
教授

研究分担者

川名正敏	同上	助手
平 敦子	同上	助手
石塚尚子	同上	助手

2) 研究費

昭和63年度	1,700千円
平成元年度	300千円
平成2年度	300千円

3) 研究発表

- 1) Tsuchimochi H, Kuro-o M, Takaku F, Yoshida K, Kawana M, Kimata S, Yazaki Y : Expression of myosin isozymes during the developmental stage and their redistribution induced by pressure overload. Jap.Circul.J. 50:1044~1052,1986.
- 2) 川名正敏、木全心一、高橋早苗、土持英嗣、矢崎義雄：肥大心および心不全にみられるヒト心筋ミオシンの変化 Therap. Res, 7:45~51.1987.
- 3) 木全心一、川名正敏、平敦子、石塚尚子、矢崎義雄、土持英嗣、小柳仁、橋本明政、広沢弘七郎：心筋肥大の悪化と改善 呼吸と循環 35:723~733,1987.
- 4) 石塚尚子：正常心および病的心におけるヒト心筋ミオシンアイソザイムの分布——モノクロナール抗体を用いた免疫組織学的研究 東京女子医大誌 57:1557~1566,1987.
- 5) Kawana M, Kimata S, Taira A, Isizuka N, Hirosawa K:

Distribution of cardiac myosin isozyme in normal and pressure overload human ventricular myocardium. The 8th International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society. Osaka, 1987.

- 6) 川名正敏、木全心一、細田瑛一：心肥大に伴う心筋収縮蛋白の変化とこれに対する交感神経活性の影響シンポジウム「心肥大の病態と対策」第53回日本循環器学会総会(名古屋) 1989.
- 7) 木全心一、慢性心不全の治療 パネルディスカッション「心不全の治療：up to date」第38回日本心臓病学会総会(広島) 1990.

1. 目的

心臓には自律神経が分布しており、心臓の機能を調節している。例えば、交感神経は心拍数を速くしたり、心室の収縮性を増強したりする。

この交感神経の心臓に対する作用の評価は、時代と共に変わって来ている¹⁾。以前は、生体の緊急時に、心臓が対応出来る状態にすることが高く評価された。心拍数の増加、心室の収縮性の増強であり、この作用の研究は生理学的手法で解明された。しかし、現代はこの代償機転の効果は緊急時には有効であるが、長期的に続いた時は、心臓にとって望ましくなく、有害だとの考えが強くなって来た。特に問題となるのは、心不全の場合である。心不全の重症度が重くなるほど、血中の norepinephrine 値が上昇している。これは、皮膚、骨格筋などへの末梢動脈を収縮させ、血圧を維持していると同時に、重要臓器へ重点的に血液を配分している。また、心臓の収縮性を強め心拍出量を維持している。しかし、この作用は、心臓に対しては後負荷を上げ、弱った心室が血液を駆出するのに負荷となり、また心室への刺激も加わって心筋酸素消費量が増し、これらの作用の結果として心筋障害が進むと考えられている。このことが心不全患者の予後を悪くしているのではないかとの危惧がもたれている。また、これら交感神経による刺激によって、 β_1 受容体は down regulation を生じて来る。このことにより心臓の収縮に対する反応性を悪くしている。このように、現在では、交感神経の代償機転が overshoot していることが問題となって来ている。

これらの問題について、新しい目で評価するためには、交感神経の心臓への作用を生化学的に検討する必要がある。エネルギー代謝系への作用についての研究はかなりなされている。本研究では心不全で交感神経の役割、意義を明らかにすることに焦点をあてた。この目的のためには、収縮機構への作用を検討するが必要と考えた。中でも、収縮蛋白の主体である myosin と、筋小胞体の Ca^{++} ATPase に注目した。これら心筋の収縮機構が交感神経の作用でどう変わるかをウサギを用いて検討した。実験方法としては、心臓への交感神経の除神経と、交感神経の刺激の代用として、isoproterenol の皮下注をすることで行なった。

心臓への交感神経への影響を最小限とするには、交感神経を切断するのが良い。古くから多くの方法が試みられて来た。心臓の周辺で交感神経を切断する方法は、不完全であるだけでなく、すぐに元に戻るため今回の研究には適さない。また、強力な化学物質を心臓の周囲に塗布、化学的に交感神経を障害する方法も用いられて来たが、心筋を生化学的検討をするのには、多くの因子が入って来て望ましくない。そこで今回は、ウサギの上、中、下の星状神経節を全て摘出する方法を用いた²⁾。

一方、交感神経の持続的興奮状態を作ることは困難であった。そこで、薬物を注入する方法で代用することにした。交感神経の終末より分泌されるのは norepinephrine なので、これの注入も考えた。しかし、norepinephrine には血圧を上昇する作用が強い。後負荷増大による心肥大時に生じる myosin isozyme の変換は、以前の研究で明らかになっており、その影響を除く必要がある^{4~6)}。そこで、今回は isoproterenol の皮下注で行な

うことにした。isoproterenol は、 $\beta_1\beta_2$ 受容体の刺激で、心拍数、心拍出量を増加するが、 β_2 受容体の刺激で血管は拡張し、血圧上昇作用はあまり強くないからである。

また、このデータをもとに、ヒトの心不全例の心臓でmyosin isozyme がどの様になり、それを変えている要因は何であるのかについても検討を加えた。

2. 対象と方法

1) ウサギの心筋に対する除神経および isoproterenol 投与の影響の検討

日本家兎34羽を以下の4群に分けて実験を行なった。除神経 (n=12)、偽手術群 (n=10)、isoproterenol 投与群 (n=7)、圧負荷群 (n=5) の4群である。

a) 交感神経の心臓への除神経²⁾

ウサギの上、中、下の星状神経節を全て摘出した。以前、イヌで行なった実験では、両側同時に摘出しても多くは生存していたが、ウサギでは死亡するので、一側を摘出した後、一週間後に他側も摘出した。左室への分布は、左の交感神経の方が強いこともあって³⁾、原則としては左側を先に摘出した。

b) 偽手術

星状神経節を摘出するのと同じ術式を両側の頸部に加えた。

c) isoproterenol の皮下注

isoproterenol 1 mg/kg/day の皮下注射を3週間行なった。

d) 圧負荷群

腹部大動脈の腎動脈分岐上部に銀製のクランプを用いて縮窄を形成し、左室へ圧負荷を加えた。

2) 心不全例の心筋 myosin isozyme 変換の検討

後述するように心内膜側では α myosin が少なく、圧負荷などの影響を検討するのに適していない。このため、圧負荷の影響の検討には僧帽弁置換時に採られた乳頭筋を用いた。

基礎心疾患は、僧帽弁狭窄 (n=6)、僧帽弁閉鎖不全 (n=9)、大動脈閉鎖不全 (n=1)、大動脈弁狭窄閉鎖不全 (n=9)、連合弁膜症 (n=5) である。

また、心不全死亡例についても検討を加えた。剖検時に心筋標本を採取し得た18例である。基礎心疾患は、急性心筋梗塞7例、弁膜症8例、拡張型心筋症3例である。この他、心不全以外で死亡した12例を対象群として用いた。

3) 心筋内 norepinephrine 含量の測定

心筋50mgに1% HClO₂ 1ml、0.2Mアスコルビン酸20μl、3,4-DHBAを加えてホモジナイズし、1時間氷中に放置。3×10⁴g 20分間冷却遠心。高速液体クロマトグラフィ、(TOSO EC-8000) に装着したカラム(TOSO ODS 80TM 25cm) に上清を入れ、35°Cに保温して、溶液(水1lに0.005Mクエン酸、50μMEDTA、500μMトリエチルアミン、325μM sodium octyl sulfate、4.5%アセトニトリル4mlを加え、4M NaOHでPH 3.5とした溶液) で流速1.0 ml/min で展開分離して、測定する。

4) 心筋 myosin isozyme の分離同定法

myosin は、心筋の収縮蛋白の代表的なものの一つである。myosin には、α myosin と β myosin という二つの isozyme があることが知られている。α myosin は、ATPase 活性が高く、速く収縮するが、エネルギー効率が悪い。これに対して、β myosin は、ATPase 活性が低く、収縮速度は遅いが、エネルギー効率高い⁴⁻⁶⁾。この二つの isozyme を分離測定するのに、二つの方法がある。

i) 組織免疫学的検討⁴⁾

ヒトの心室と牛の心房より myosin を抽出した。myosin 軽鎖を除去した。ついで、両重鎖で免疫されたマウスの脾細胞と骨髓腫の細胞系列 (P3U1) と重合した細胞より α myosin 重鎖、 β myosin 重鎖に特異的な hybridoma colony の溶液の中で、myosin の抗体活性を ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法でスクリーニングした。

この方法で作成した monoclonal antibody うち、図 1 に示したとおり、CMA 19 は α myosin、HMC 14、48、50 は β myosin に選択的に吸着した。

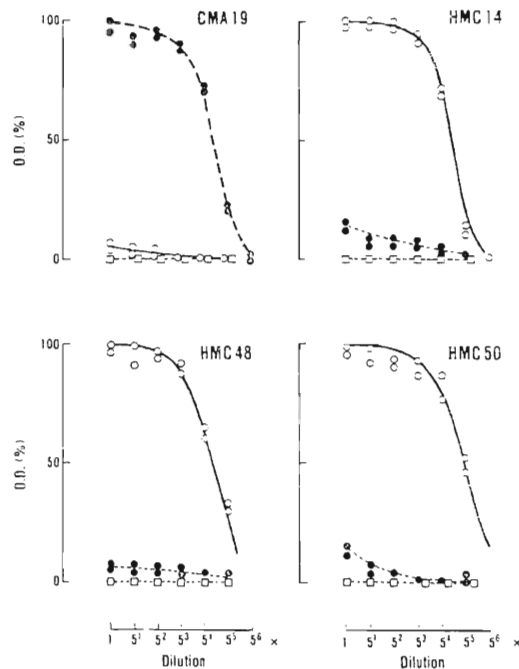


図 1. monoclonal 抗体の選択性の検討⁴⁾

CMA 19 はウシの心房筋 myosin 重鎖(●)と選択的に吸着し、HMC 14、48、50 はヒトの心室筋 myosin 重鎖(○)と選択的に反応した。ヒトの心室筋の myosin 軽鎖(□)とはいずれも反応しなかった。

心筋標本を $4 \mu\text{m}$ の薄さの切片にしガラス・スライド上で30分間空気中で乾燥し、その後使用まで -20°C で保存した。染色時は、切片を上述の抗体と 37°C , 40~60分間 incubate し、ついで fluorescein isothiocyanate (FITC) でラベルされた羊の抗マウス IgG で処理した。図6に示したように strongly positive (++) は1点、 positive (+) は0.5点、 pseudonegative (±) と completely negative (—) を0点とし、1000個の心筋細胞で数えて評価とした。

ii) ピロリン酸ゲル電気泳動

凍結した心筋を機械的に粉とした後、 $100\text{mM Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、 5mM EGTA 、 $2\text{mM 2-mercaptoethanol}$ 、 0.2mM dicholorvos , pH 8.8 (1:50 wt/vol) の溶解内でホモジナイズして myosin を抽出。ピロリン酸ゲル電気泳動は、 84V (14V/cm , constant voltage)、 2°C , 16.5時間で行なった。溶解中には $20\text{mM Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, PH 8.8、10% glycerol、 2mM cysteine を含んでいる。泳動後、ゲルを0.025% Coomassie brilliant blue R-250, 25% isopropanol, 10% acetic acid で一晩で染色した後、10% acetic acide で脱色した。gel は laser beam densitometer でスキャンニングした。

5) 筋小胞体 Ca^{++} ATPase の活性の測定と mRNA の分離測定法

a) Northern blot 分析

RNAを温めたフェノールで左室から抽出した。RNA 10 mg を1% agorose gel を用いて電気泳動し、nylon 膜の袋に移した。nylon 膜を紫外線で2分間照射し、hybridization の前段階を作った。これを心筋の筋小胞体の Ca^{++} ATPase (小

室 (1989) によって作製) でコードされ、 ^{32}P でラベルされた cDNA プロブを用いて 42°C で hybridization した。Ca⁺⁺ ATPase の発現の相対量はデンシトメーターのスキンで求め、コントロールにはマウスの α -actin の DNA を用いた。

3. 成績

1) 正常心臓の myosin の代謝と isozyme の分布

a) myosin の分離

心筋 myosin の特徴を知る目的で、骨格筋 myosin との対比を行なうことにした。心筋と、骨格筋の赤筋と白筋より Katz¹²⁾ の方法で myosin を抽出した。次に diethylaminoethyl-cellulose (DEAE-cellulose) chromatography で分離したところ、図 2 に示したように、心筋、骨格筋より純粋な myosin が抽出できた⁷⁾。

DEAE cellulose chromatography を用いての抽出条件も、図 2 に見るようにはほぼ同じである。また、単位重量 (g wet wt) あたりの myosin の抽出量は、心筋 9.1 ± 0.7 mg/g、赤筋 10.4 ± 0.7 mg/g、白筋 9.2 ± 0.8 mg/g とほぼ同じであった。高電位電気泳動法を用いての myosin 内に含まれる lysine の含有量も、心筋 81.8 ± 1.7 moles/ 10^5 g、赤筋 84.6 ± 2.8 moles/ 10^5 g、白筋 83.3 ± 3.3 moles/ 10^5 g と同じであった。この他、色々の検討を行なったが三者間に大きな差を認めなかった⁷⁾。

b) myosin の turnover (交換)

次に³H-lysine をウサギに注入後、1~45日間の全蛋白と myosin の turnover を検討した。全蛋白も基本的に同じ傾向なので、図 3 には myosin の turnover のみを示す。図 3 で得られたデータをもとに各 myosin の生物学的半減期を検討したところ、心筋は7.6日と極めて短いのに、赤筋は148日、白筋は165日と長いことがわかった。このデータより、心筋の myosin は骨格筋に比べて極めて速い turnover をしているといえる⁷⁾。

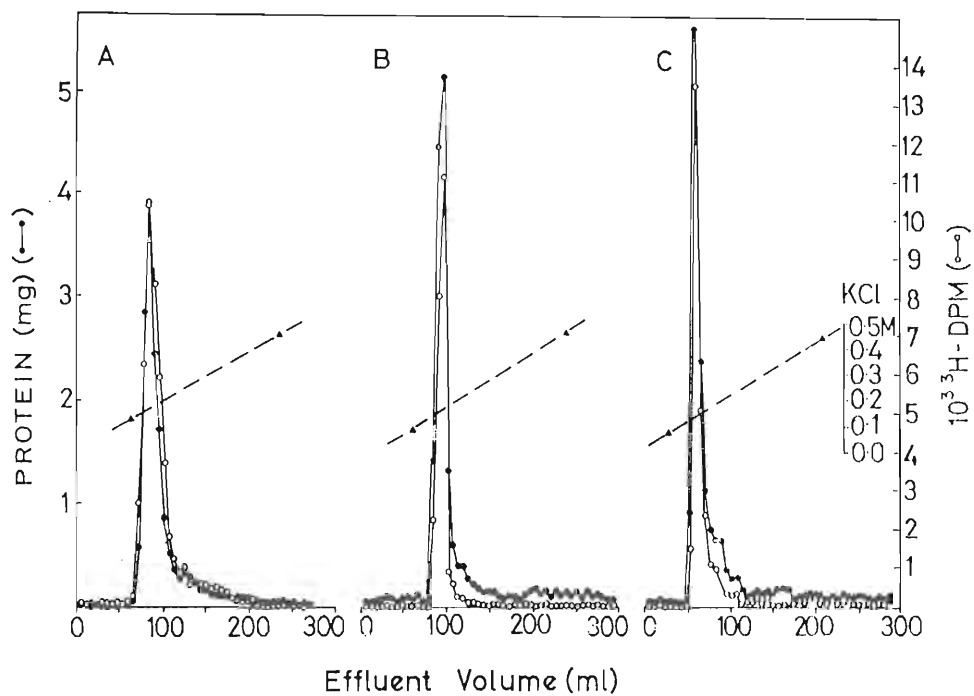


図2. DEAE cellulose カラムを用いての心筋 (A)、骨格筋の赤筋 (B)、白筋 (C) の分離抽出⁷⁾

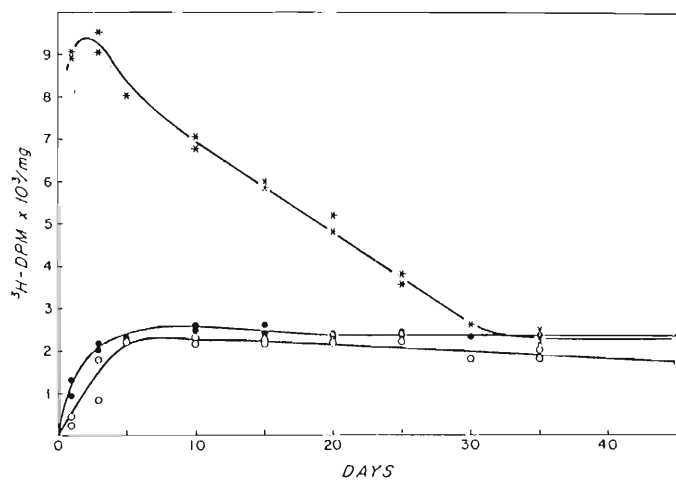


図3. 心筋 (※)、骨格筋の赤筋 (●)、白筋 (○) の³H lysine の注入後の myosin の specific radioactivity の変化⁷⁾

c) myosin isozyme の分布

myosin には α myosin と β myosin があり、各々の特徴については方法の所で説明した。心房には α myosin が多く、心室には β myosin が多く含まれている。

心室には僅かしか含まれていない α myosin も、更に細かく見ると心室の部位によって発現する量も異なる。図4に示したように、心室壁の心外膜側に多く、心内膜側で少なくなる。心室中隔では心内膜側で少なく、中央に行くにつれて多くなる^{10,11)}。心筋生検で得られる心筋は心内膜側のものである。このため、色々の刺激の影響で myosin isozyme がどのように変化するかを見る時、用いた心筋の部位が問題となる。特に、 α myosin が量が減少するか否かを見る時に、心内膜側で α myosin が少ないことが問題で、このため心筋生検標本では差を出しにくいことになる。

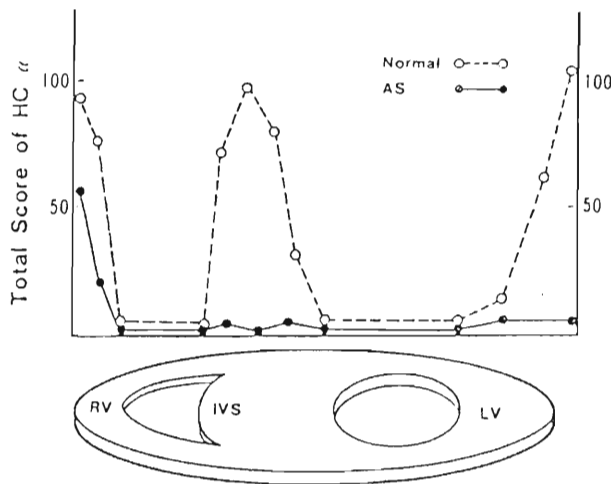


図4. 心室の α myosin の分布、正常心 (○---○)、大動脈弁狭窄 (●—●) での α myosin の分布の比較¹¹⁾

2) 圧負荷時の myosin の代謝と isozyme の変換

a) myosin の turnover

心臓の myosin の turnover が骨格筋に比べて極めて速いことは前述した。そこで、外からの刺激に対応してどの位すばやく対応出来るのかを検討した。この検討には圧負荷を用いることにした。心室は後負荷としての平均動脈圧の上昇に対して、壁肥厚で対応し、壁応力を正常化しようとする。同じ後負荷のままでも、壁肥厚により応力が低下することが重要な対応である。後負荷の増大に伴い求心性肥大を生じることは良く知られている。この求心性肥大がどの位の速さで出来、その時収縮蛋白の myosin の増加があるかが問題である。収縮蛋白の増加のない単なる壁肥厚では望ましくない。

ウサギの上行大動脈に銀のクランプをかけ縮窄を作り、左室収縮期圧を 97 ± 4 mmHg より 125 ± 6 mmHg まで上昇させた。この縮窄により、心重量は 3.91 ± 0.19 g より2日で 4.11 ± 0.19 g、12日で 4.99 ± 0.12 g と上昇した。このように、心肥大は急速に生じることがわかる。一方、偽手術では、心重量は2日で 3.67 ± 0.18 g と低下したあと徐々に戻り、12日には 3.85 ± 0.19 g となる⁸⁾。

この間の myosin の合成を、myosin に対する³H-lysine の取り込みで見ると図5に示したように、縮窄7日前後にピークを持って変化する。圧負荷の増大に対して左室は急速に myosin の生合成を増大し、心肥大を生じ、応力が低下するように反応しているのが認められる⁸⁾。この間の myosin の分解には変化を認められない⁹⁾。

b) ヒト心室筋の myosin isozyme の圧負荷による変換

myosin の生合成が圧負荷の増大に対して増加することは明らかになったが、isozyme がどう変わるかが問題となる。心房で、圧の上昇につれて α myosin が減少することは土持によって示されている¹³⁾。

心房は、 α myosin が多く、その減少を示すことは容易である。しかし、心室には α myosin は少なく、前述のとおり心内膜側に少ないので、心筋生検の材料を用いての検討は困難と考えた。このため、僧帽弁置換の時に弁と一緒に採られる乳頭筋を用いて検討することにした。この仕事の結果は図 6, 7 に示したとおりで、心室筋内の α myosin は本来少ないのに、左室収縮期圧が上昇するにつれて更に減少し、150 mmHg を越す付近からほとんど認められなくなる事が明らかとなった^{4~6)}。

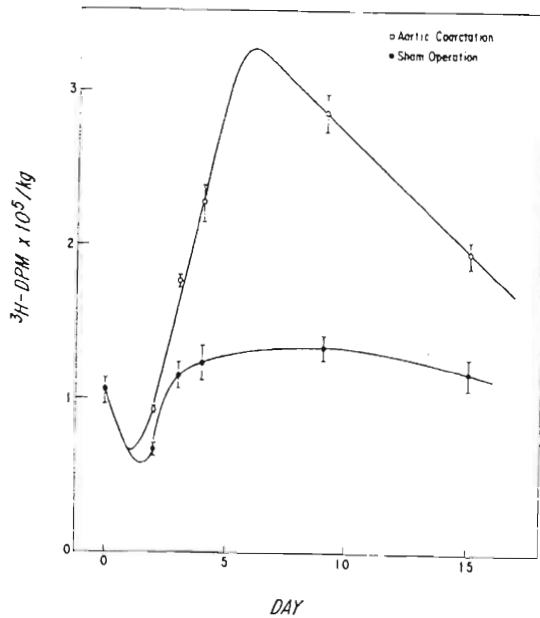


図 5. 大動脈狭窄 (○)、偽手術 (●) の左室 myosin への ^3H lysine の取り込み⁸⁾

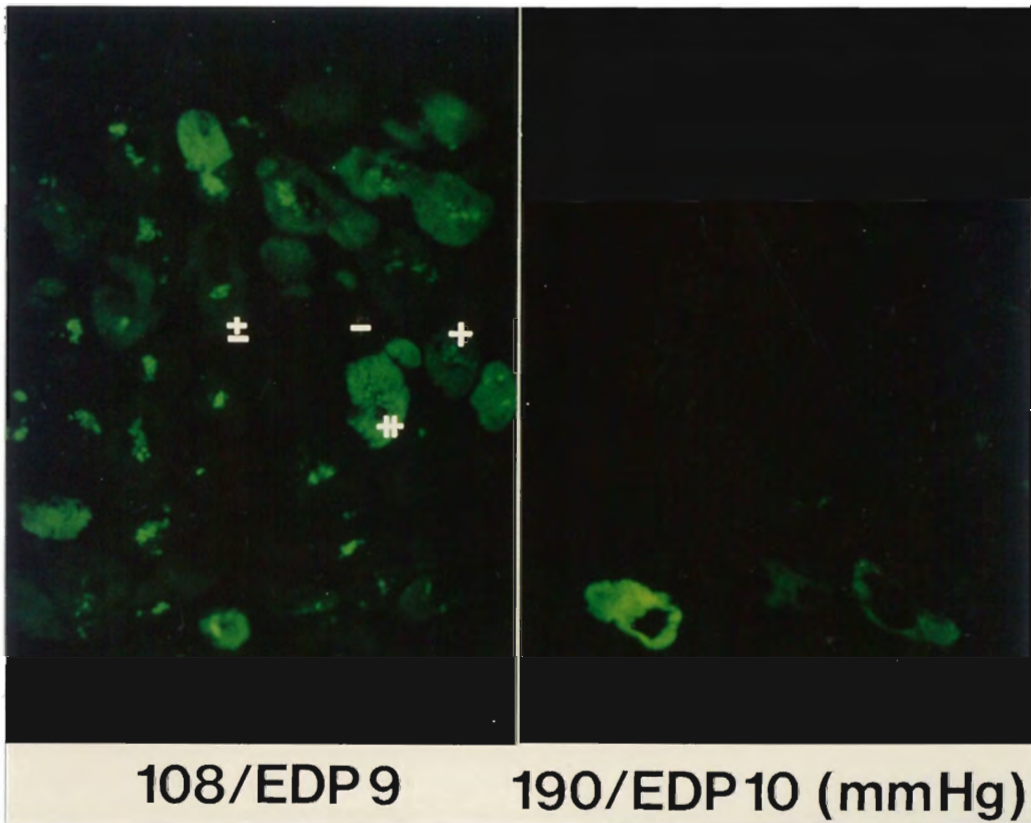


図 6. 正常の心内圧の左室での α myosin の発現は少ないが (左)、左室内圧が上昇すると更に少なくなる (右)

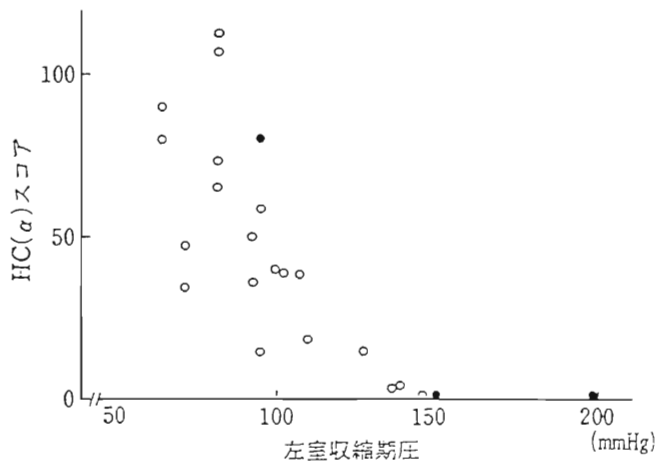


図 7. 左室収縮期圧と左室心筋細胞の α myosin の発現の関係⁴⁾

心臓は圧負荷に対して、壁肥厚により応力を正常化するのみでなく、僅かしかない α myosin までも、エネルギー効率の高い β myosin に変換して対応しているのが認められる。

3) Thyroxine による myosin isozyme の変換

thyroxine は、mitochondria の電子伝達系をはじめ、代謝機能に多大な影響を及ぼすことが知られている^{14~16)}。また、動物では thyroxine は β myosin を α myosin に変換する最も強力なホルモンであることも、多くの研究で明らかにされている¹⁷⁾。

ヒトでも同じ交換を生じるのかを、甲状腺機能亢進から心不全となった5例の症例の心筋生検の標本で検討した。その結果、甲状腺機能亢進の時期には、 α myosin がほとんどの心筋細胞に発現しているが、治療により甲状腺機能が正常化するにつれて α myosin を発現している細胞が減少し、正常化するのが認められた。

thyroxine による影響が強いことが認められたので、前述の圧負荷の実験、後述の交感神経の実験でも血中 thyroxine 濃度を測定しているが、いずれも有意の変化を認められず、以下の変化は thyroxine を介しての作用ではないと考えられる。

4) 交感神経切断による myosin isozyme の変換と筋小胞体の Ca^{++} ATPase の変化^{18,19)}

a) 心筋内 norepinephrine 含量の変化

図8は、イヌで両側の上、中、下星状神経節を全て摘除した時の心筋内 norepinephrine 含量の変化を示したものである。除神経により、心筋内 norepinephrine は急速に低下し、10H以降は $0.1 \mu\text{g/g}$ となり、その後あまり上昇して来ない。

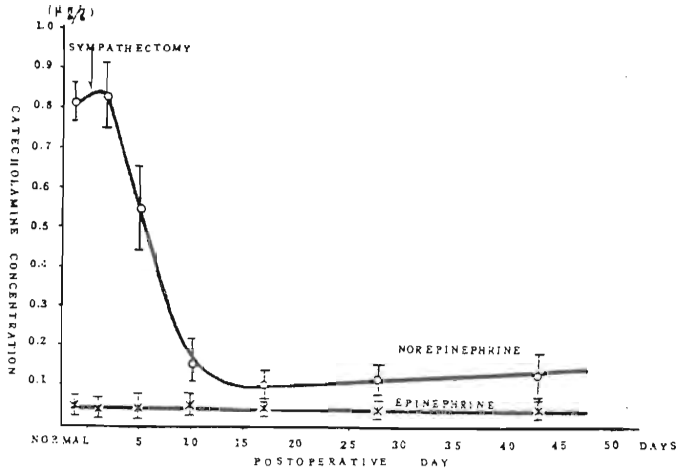


図8. イヌの両側星状神経節を全摘出した後の心筋 catecholamine 含量の変動²⁾

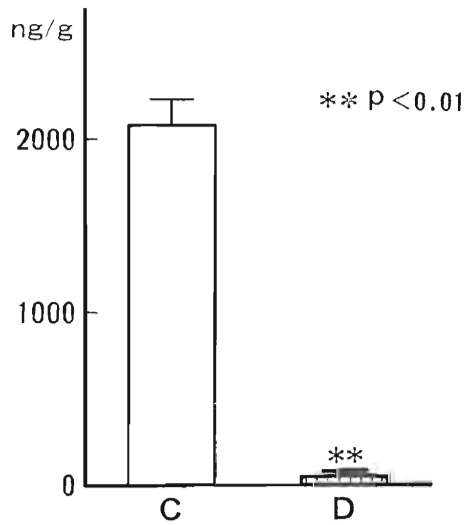


図9. ウサギの交感神経の除神経した(D)と偽手術(C)したのちの左室壁 norepinephrine 含量の変化

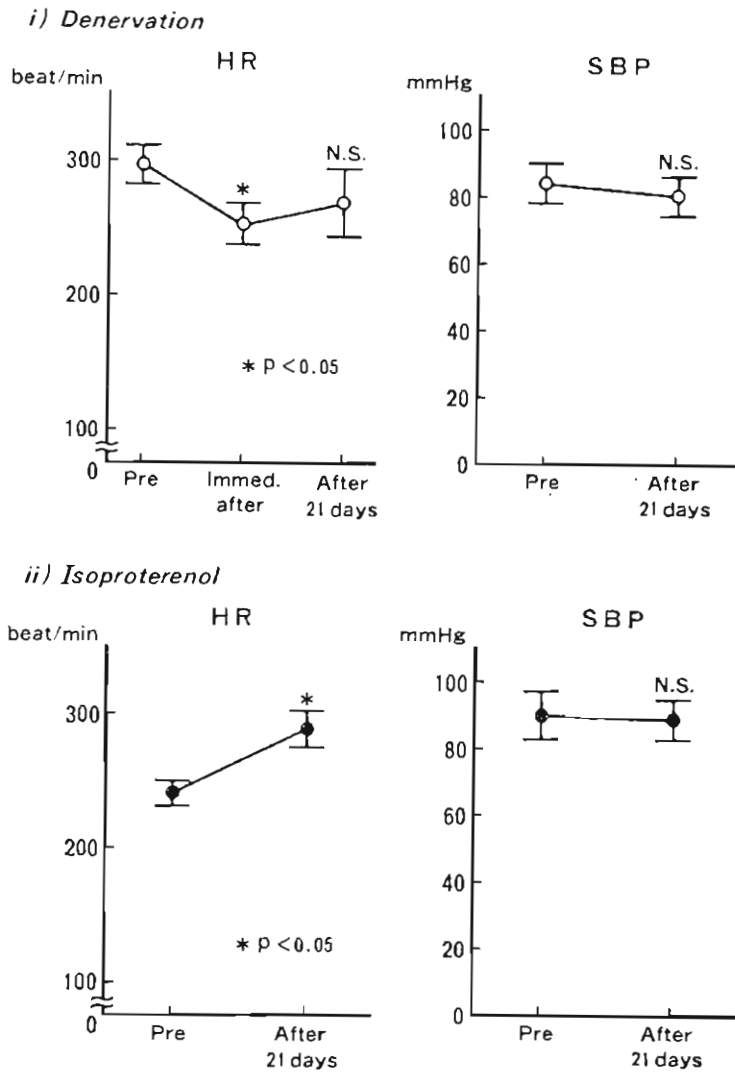


図 10. 除神経、isoproterenol 皮下注後の心拍数(HR)、血圧(SBP)の変動

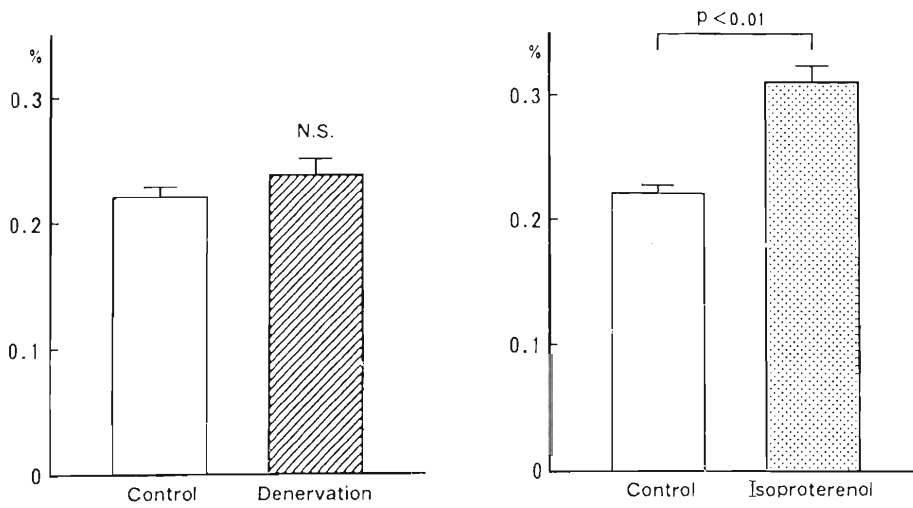


図 1 1. 除神経、isoproterenol 皮下注後の心重量/体重比 (%)

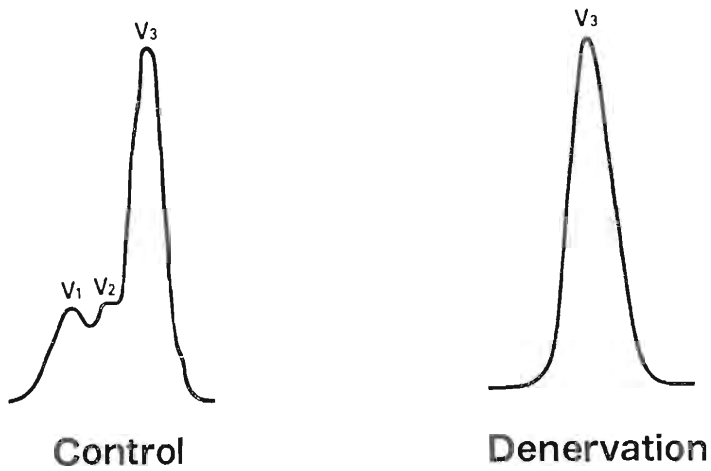


図 1 2. 除神経後の myosin isozyme の変換の一例

この方法でほぼ完全に除神経されており、時間を追って交感神経が更生されていないのがわかる。

同様の方法をウサギで行なった。方法で述べたとおり、一側の星状神経節摘出後、一週間目に他側の摘除を行なった。12羽でのまとめを図9に示した。除神経で左室の心筋内 norepinephrine が著減しているのがわかる。

同じくウサギで左および右の星状神経を摘出後^{1 2 3}I-MIBGの取り込みを見た。右星状神経節摘出後は右室と心室中隔、左室中隔の一部に取り込みが低下した。一方、左星状神経節の摘出で、左室の後壁と前壁の一部に取り込みの低下が認められた。これは、生化学的に norepinephrine 含量の低下から、心臓の交感神経の分布を検討した時の結果とほぼ同じであった³⁾。

b) 血圧と心拍数

図10上段に示すとおり、除神経直後は心拍数が軽度に低下している。しかし、2週後には血圧、心拍数には有意の変化を認めなかった。従って、除神経時には、血圧の変化による影響はないと考えられる。

c) 心重量

体重に対する心重量比を図11左に示した。図に示したとおり、心重量には変化は認められなかった。

d) myosin isozyme

除神経時の myosin isozyme の変換の一例を図12に示す。磷酸化ゲル濾過法を用いての検討である。左図は正常例であるが、 V_3 (β myosin の homodimer) が多いが、 V_1 (α myosin の homodimer) も明らかに認められる。ところが、除神経す

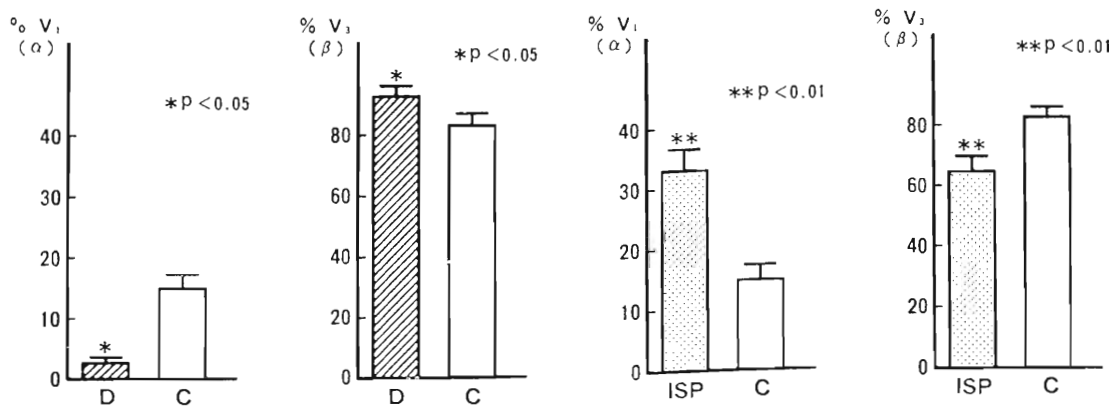


図 1 3. 偽手術(C)に対する除神経(D)、isoproterenol 皮下注の myosin isozyme の変換

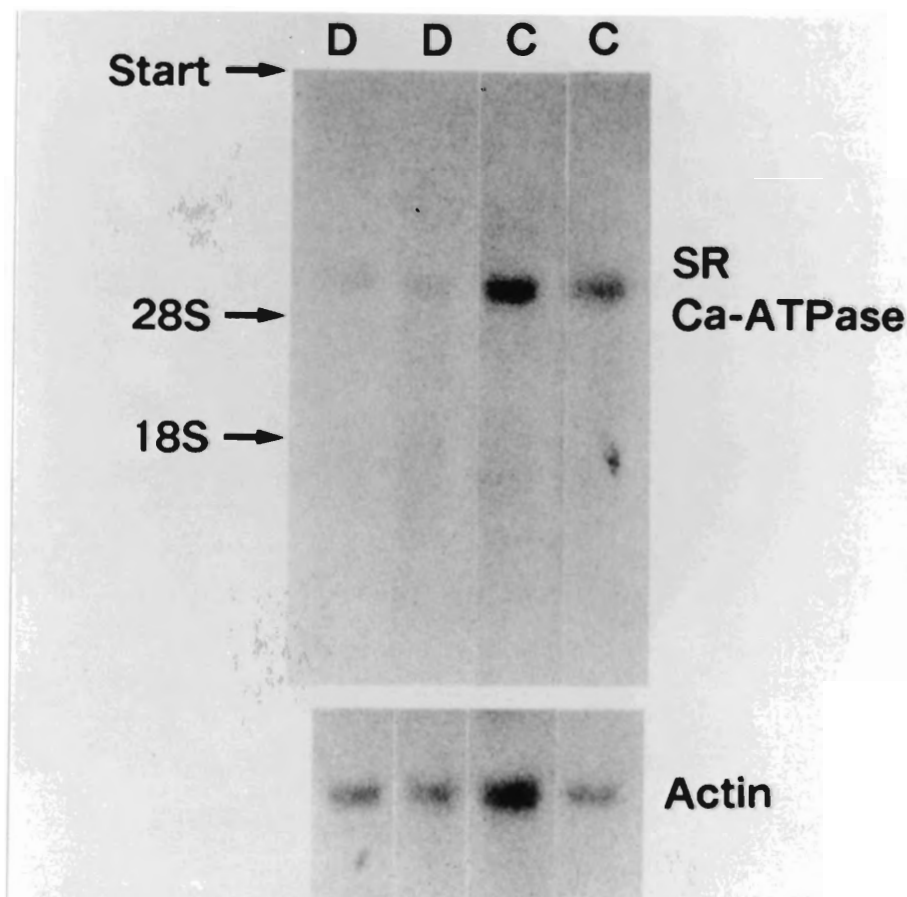


図 1 4. 除神経後の筋症胞体の Ca²⁺ATPase の mRNA レベルでの変化
D: 徐神経 C: 正常

ると右図に示したように、 V_1 、 V_2 (α myosin と β myosin の homodimer) も明らかに認められる。ところが、除神経すると右図に示したように、 V_1 、 V_2 (α myosin と β myosin の homodimer) が完全に消失しているのが認められる。これは、大動脈縮窄の圧負荷の時と同じ変化である。

図 1 3 は、1 2 羽の平均値である。左の 2 つの図に見るように心室では V_1 が著明に減少し、 V_3 が増加しているのが認められる。血圧には変化ないにもかかわらず、圧負荷と同一の変化を示している。

e) 筋小胞体の Ca^{++} ATPase

心筋の収縮には、収縮蛋白のみでなく、筋小胞からの Ca^{++} の出入の量が関係する。そこで、筋小胞体の Ca^{++} ATPase の活性を測定したところ低下していた。

更に Ca^{++} ATPase が mRNA のレベルでどの様に発現しているかを見たのが図 1 4、1 5 である。除神経によって明らかに低下している。永井が、ラットの大動脈縮窄で圧負荷をかけた時に、筋小胞体の Ca^{++} ATPase が低下することを発表している²⁰⁾。これは、圧負荷と除神経という全く異なった操作で、 α myosin が低下し、しかも筋小胞体の Ca^{++} ATPase の mRNA が低下するという同じ現象を生じさせたことになる。

5) isoproterenol 皮下注による myosin isozyme の変化

交感神経の刺激という状態は作りにくく、目的の所で述べた理由で isoproterenol の皮下注射をすることによって生じる変化を検討した。2 0 羽について実験を行ない、注射 3 日後、7 日後、2 1 日後に検討を加えた。

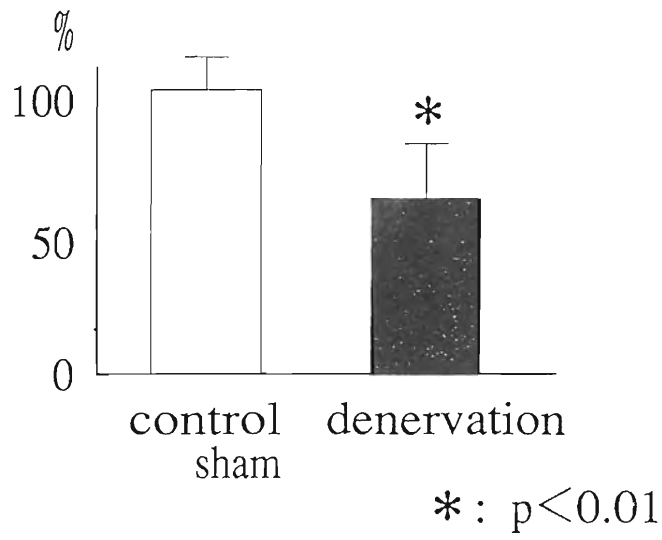


図 1 5 . 除神経後の筋症胞体の Ca⁺⁺ATPase の mRNA レベルでの変化

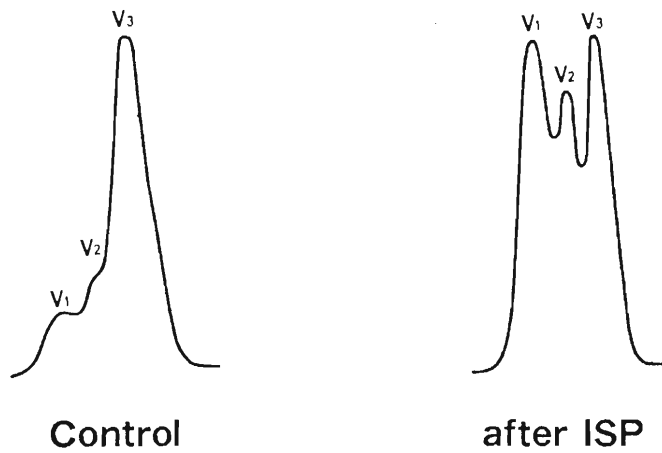


図 1 6 . isoproterenol 皮下注による myosin isozyme の変換

a) 心筋内 norepinephrine 含量

norepinephrine 注射群は、心筋内 norepinephrine 含量が幾分少ない傾向を認めたが有意な変化ではなかった。

b) 血圧と心拍数

図 10 の下段に示したように、2 週間注射し続けたあと、心拍数は有意に多かったが、血圧には変化は認められなかった。従って、この実験においても圧負荷の影響はないと考えられる。

c) 心重量

図 11 の右図に示したように、isoproterenol の皮下注によって心重量/体重比は有意に増加した。この心重量の増加はすでに 3 日で有意にみられ、7 日目でプラトーに達する。

d) myosin isozyme

isoproterenol による myosin isozyme の変化の実例を図 16 にしめした。右の正常比で、 V_1V_2 が明らかに上昇し、 α myosin の増加が生じているのがわかる。

図 17 は 3 日目、7 日目の変化であるが正常(C)に比べ V_1V_2 が日を追って増加していくのがわかる。

圧負荷時にも isoproterenol の効果が出るかを見た。圧負荷のみの時は、 V_1V_2 が認められない。これに isoproterenol の皮下注を続けると V_1V_2 が出現して来る。圧負荷による α myosin の低下作用に抗して、isoproterenol は α myosin を発現するのが認められた。

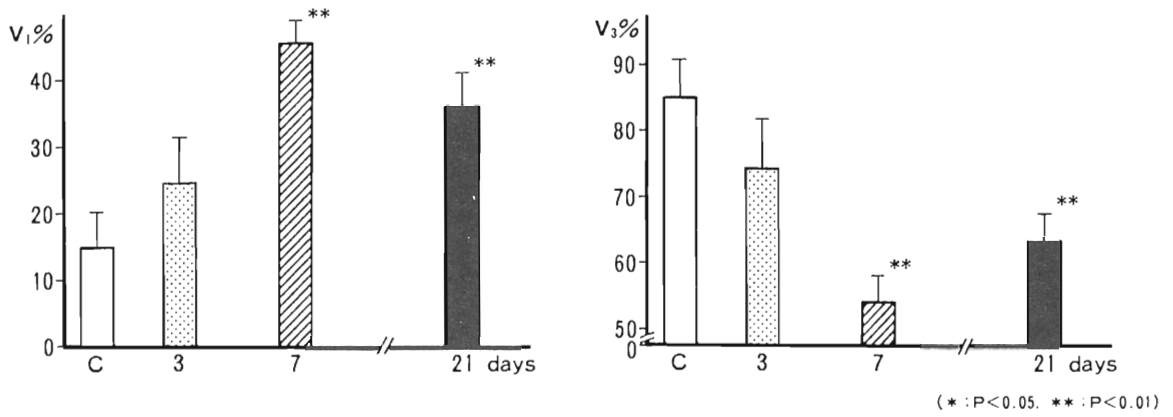


図 1 7. isoproterenol 皮下注による正常(C)よりの myosin isozyme の経時的変化

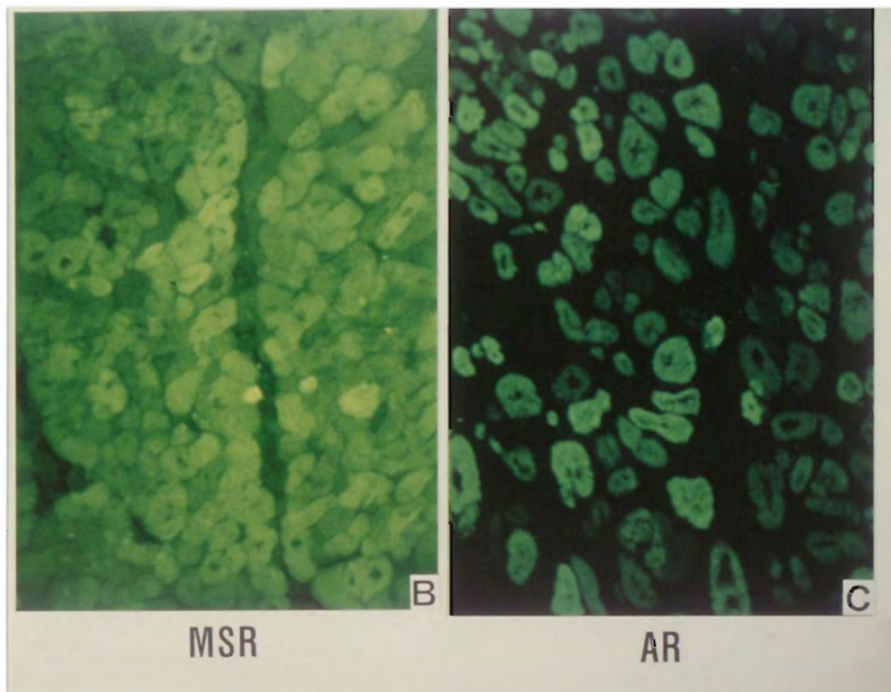


図 1 8. 心不全死亡例の中で α myosin を多数発現している症例

6) 心不全での myosin isozyme の検討

心不全死亡例 19 例で、心室の myosin isozyme の発現について検討した。図 18 に示したように心不全死亡例の中に α myosin を多数発現している症例がある。年齢、性、基礎心疾患、NYHA IV の持続期間、心重量と α myosin の発現頻度を検討した。

図 19 に見るように虚血性心疾患(IHD)、拡張型心筋症(DCM)、容積負荷による心不全死亡例の中に α myosin が多数の心筋細胞で発現している症例がある(図 19)が一方少ない例もある。同じ基礎疾患で心不全死亡していない症例でも検討しているが、甲状腺機能亢進以外では α myosin の著明な増加は認められない。各因子と α myosin の発現との間には相関は認められなかった。

唯一相関したのが、図 20 に示したように、死亡前に用いられた catecholamine の使用量である。主として dopamine、dobutamine、norepinephrine であるが、総使用量が少量の症例では健常者との差は認められない。しかし、多量使用例では、 α myosin の発現が有意に多くなっている。

ウサギに isoproterenol を皮下注射した時と同じく、ヒトでも多量の catecholamine を使用した時は α myosin を多数発現させることが明らかとなった。

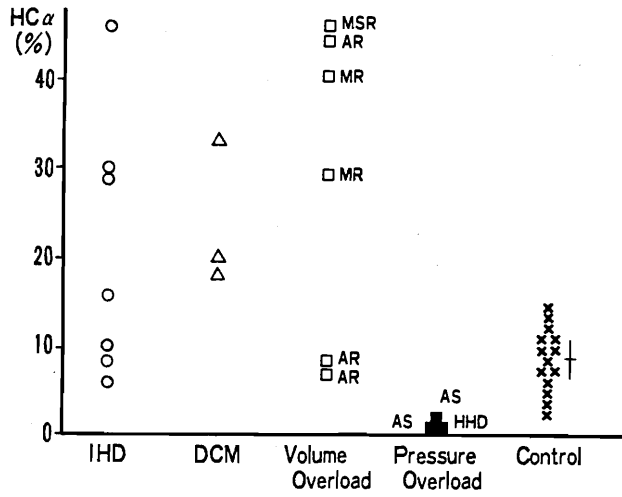


図 19. 基礎心疾患と心筋 α myosin の発現頻度

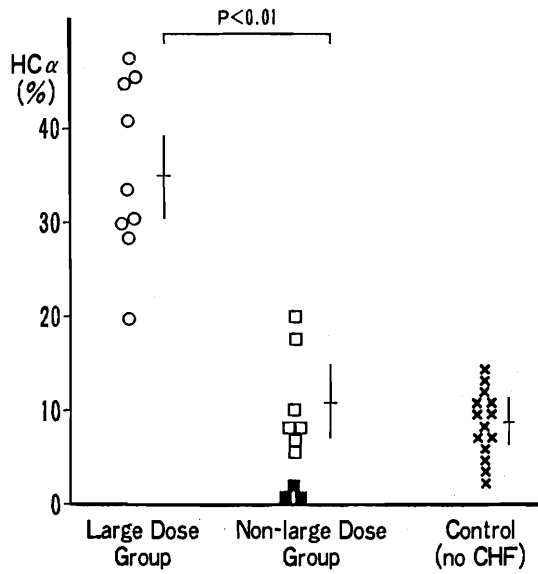


図 20. 死亡直前に使用した catecholamine 量と心筋細胞での α myosin の発現の度合い

4. 考察

1) 心筋 myosin isozyme 変換の要因

a) 圧負荷

心筋 myosin の isozyme として主なものが二つある。 α myosin は ATPase 活性が高く、収縮速度も速いが、エネルギー効率が悪い。これに対して β myosin は ATPase が低く、収縮速度は遅いが、エネルギー効率が良い⁴⁻⁶⁾。

心筋としては圧に抗する時は、速く収縮する必要がなく、エネルギー効率の良い β myosin に変換すると考えられる。このため、心腔内圧の高い心室では β myosin が圧倒的に多い⁴⁻⁶⁾。更に、直接圧を感じる心内膜側の方が心外膜側より β myosin 比率が高いことも同じ方向の変化だと考える^{10, 11)}。

心膜内圧を上昇させると同様の傾向が顕著となる。心房は α myosin が多いが、圧負荷によって減少することを土持³⁾が報告している。心室は β myosin が多く、 α myosin がほとんどなく特に心内膜側に少ない。このため心筋生検を用いての検討はうまく行かなかった。我々は、手術時に採集した乳頭筋を用いて検討した結果、圧負荷によって本来少ない α myosin が更に少なくなっていることを見つけた^{4-6, 10)}。これはエネルギー効率よりいっても有利である。

心筋は一方、myosin の生合成を高め、myosin 量を増加して心肥大を形成している。心筋の myosin の turnover は骨格筋に比べてはるかに速く⁷⁾ それだけ圧負荷時に myosin を増加させて心肥大を形成する速度も速い^{8, 9)}。これにより壁応力を減らし、長期間にわたり高い圧に対処することが可能に

なっている。ヒトの検討から見て、圧負荷のかかっている間、心肥大も α myosin の減少も続いている。壁応力の減少に対して、 α myosin を元に戻すという反応は見られない。

b) thyroxine

thyroxine は β myosin より α myosin に変換する最も強い因子である¹⁷⁾。この thyroxine による α myosin への変換はヒトでも認められ、thyroxine 量が減少すると正常に戻る事が確認出来た。

thyroxine によっても心肥大を生じてくる。同じ心肥大でも圧負荷の時は α myosin が減少し、thyroxine の時は増加する。心肥大と α myosin の変換は常に同じ方向に動くものではないことになる。thyroxine で心筋が速く収縮しなくてはならない状況下では α myosin が増加していると考えられる。

2) 交感神経の myosin isozyme 変換と筋小胞体 Ca^{++} ATPase への作用

交感神経の心臓に対する作用は、心拍数を増加し、心臓の収縮性を強め、心拍出量を増加させることである。これは緊急時に生体が対処するとき、大切な反応である。また心臓の収縮性が低下し、心拍出量が低下した心不全の時も、交感神経の刺激によって心拍出量を維持している。心不全の時も、この心拍出量では生体は維持できないで、生体が緊急時の対応をしていると考えられる。このため代償機能に数えられている。

この生理学的変化を、生化学的に更に検討を深めるのが今回の研究の目的である。この結果、交感神経の除神経の状態、心重量は不変であるが、 α myosin が著明に低下した^{18, 19)}。

一方、isoproterenol で心臓の β 受容体を刺激すると心肥大を生じ、 α myosin が著明に増加した^{18, 19)}。isoproterenol の刺激と交感神経の刺激とは同一ではなく、isoproterenol に他の作用があることは確かである。しかし、 β 受容体を刺激していることは同じであり、これをもって交感神経の刺激の代用と考えると、交感神経の刺激は心肥大を生じ、 α myosin を増加することになる。今回の仕事から見て、myosin を増加し心肥大を生じているのと、 α myosin へ変換するのがほぼ平行しておこると考えられる。交感神経で刺激を受けると、 α myosin を増加して速く収縮出来る状態にし、刺激がなくなると α myosin を減らし、緩っくり収縮する状態にしているように見える。

同じ方向の変化が、除神経時の筋小胞体の $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$ にも認められた。 $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$ の活性が低下すると同時に、mRNA のレベルでも低下しており、 Ca^{++} 動員系も緩っくり収縮する方向に変わっている^{18, 19)}。前述の圧負荷の時には、 α myosin が減り、緩っくり収縮する体制となっているが、この時も mRNA のレベルで筋小胞体の $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$ が減少していることを永井が見ている²⁰⁾。

収縮速度が遅いか速いかという変化時には、 α myosin の変換と、筋小胞体の $\text{Ca}^{++}\text{ATPase}$ の活性は同一方向に動く。しかし myosin を生合成し、心肥大を生ずる反応とは必ずしも同一方向ではない。このことから見て松下らが見つけた ornithine decarboxylase の活性の増加による myosin 合成の増加と^{21, 22)}、Mahdavi ら²³⁾ の見つけた同じ遺伝子上の α myosin と β myosin の生合成のスィ칭ングとは、異なる刺激

系によって生じていると考えられる。

3) 心不全例の心筋 myosin isozyme の変化

心不全例の心筋 myosin の isozyme がどのように変化しているのか関心がある。大動脈弁狭窄では左室の α myosin は減少している。大動脈弁狭窄による心不全で死亡した症例を調べた。図4で示したように、正常では心内膜側で α myosin が少ないが、心外膜側に行くと多くなる^{10, 11)}。しかし同じ図4で示したように大動脈狭窄の心不全による死亡例では、左室は一様に α myosin が低下しているのが認められる。しかも同時に右室壁でも α myosin の抑制が認められた¹⁰⁾。これは、心筋線維が中壁から外壁にかけては両心室を取り囲む様に走行していることなどが関係していると考えられる。一方、ファロー四徴、肺動脈弁狭窄のように右室圧の上昇している症例では、右室壁の α myosin が抑制されていた¹⁰⁾。一方甲状腺機能亢進の心不全例では、 α myosin が著明に増加しており、機能が正常化するにつれて α myosin の発現量も正常化して行く。このように心筋の α myosin の発現は、基礎心疾患によって規定されており、心不全になったか否かでは変化しないと考えられる。

ところが心不全の死亡例で著明に α myosin の発現している症例が認められた。この原因について検討したが、基礎心疾患などとは関係なく、死亡直前に使用した catecholamine 量と関係していた。ヒトの心筋でも多量の catecholamine によって α myosin が多く発現することが明かとなった。交感神経の興奮で同様のことが生ずるかは不明であるが、その方向に変わりうることは考えられる。

a) 代償機転の overshoot

現在、心不全の治療について二つの大きな問題が提起されている。一つは交感神経の活性をはじめとした代償機転の overshoot が心不全の状態を悪くし、予後を悪くしているのではないかとの考えである。心拍出量の変化に対して交感神経は血管の α 受容体を刺激し、皮膚、骨格筋、消化管などの末梢動脈を収縮し、血圧を上昇すると同時に、重要臓器への血流を確保している。しかし反面、後負荷の増大は弱った心筋への負担を大きくし、心臓は更に収縮性を低下し、心拍出量を減少するという悪循環に入るものと考えられる。

また、心拍出量の低下に対して交感神経は心臓を刺激し、心拍数を増加し、心収縮性を増強し、心拍出量を少しでも多くしようと働く。この代償機転も、心筋酸素消費量を増加し、弱った心臓にとって回復の機会を失うだけでなく、さらに悪くなって行く可能性がある。また、 α myosin の比率が増加すると、同一の方向の悪化に拍車をかけることになると考えられる。

この交感神経の刺激に対して、体の対応としては、心臓は交感神経の刺激をあまり受けないように β 受容体の down regulation を行なう²⁴⁾。このことは、交感神経の刺激によって、心筋細胞内に生ずる変化を少しでも減らす効果をもち、生体防御反応とも云える。しかし見方によると、down regulation で反応性が鈍くなった心臓に対して、交感神経の活性が更に高まり、外からの薬によるサポートも効果がなくなるという、悪循環を生じてくる可能性がある。これに対する治療法として β 遮断薬を用い、交感神経の刺激をブロック

している間に、心臓の β 受容体の up regulation をもたらすとの考え方で β 遮断薬療法が行なわれており、その有効性が認められている。

ACE阻害薬によって心不全の予後がよくなる事が認められている²⁵⁾。これは心不全時に renin-angiotensin-aldosterone 系が活性化し、末梢血管の収縮による後負荷増大、腎での利尿効果の抑制による体液貯留から来る前負荷増大などが相乗して悪い作用をしていると云われている。この overshoot を抑制するだけでなく、交感神経系との相互作用の問題も解明されつつある。

b) 強心薬による心不全の治療

強心薬は心筋酸素消費量を増し、心筋障害を進める等、患者の予後を悪くするので良くないとの考え方がある。しかし論拠となっているのは、多量の catecholamine を用いたときで、経口治療薬で問題があるのかについての研究はあまりなされていない。この問題を考えるのに参考となる論文が二つある。一つは Colucci²⁶⁾の仕事で、心不全の患者の冠動脈の中に dobutamine を冠注すると、血中の norepinephrine 濃度が低下するという指摘である。血中 norepinephrine が上昇しているというのは、生体が緊急体制と判断して交感神経を活性化しているのだと思う。それを心臓に強心薬を作用させ、収縮性を増してやると、緊急体制を解くのではないか。もう一つの大切な仕事が、Bristow²⁴⁾によって出された。死亡前に少量の dobutamine を用いていた症例より、多量を用いていた症例の方が β 受容体が多いことを見いだしている。氏は dobutamine によって、 β 受容体の up regulation を生じたと考

えている。我々としては、先の Colucci の仕事と合わせ考えると、強心薬を用いると、生体が緊急体制を解き、血中 norepinephrine の濃度を低下させる。dobutamine にはあまり down regulation を生ずる作用がなく、血中 norepinephrine が主に down regulation を生じており、この濃度の低下が up regulation という現象を作っているのではなかろうかと考えている。

強心薬といっても作用機序は色々である。このため全てを一括して討論するのは無理である。 β 受容体をほぼ選択的に刺激する denopamine について検討してみたが、かなり多量を用いても down regulation は生じて来なかった²⁷⁾。 β 受容体を刺激しても down regulation を生じないと云うことは、刺激的物質によって β 受容体の反応は一様でないのかも知れない。

経口強心薬を長期用いるにあたって、もう一つの大切な指標が予後に対する効果である。今まで発表された経口強心薬の予後におよぼす効果について検討してみた。少なくとも vesnarinone では予後をよくしている。不整脈の増減を介しての作用もあるが、生体の緊急状態を改善しての効果も考えられる。

今回は、交感神経の心筋 myosin isozyme に対する作用を中心とした研究であったが、考察の所で述べたように多くの側面から検討を加えて行く内容を持っており、これからも研究を続けたいと考えている。

文献

- 1) Packer M : Role of the sympathetic nervous system in chronic heart failure. A Historical and philosophical perspective. *Circulation* 82(Suppl I) : I-1~I-6,1990.
- 2) Kimata S : Changes of catecholamines after complete cardiac sympathectomy. *Jap.Circul.J.* 29:11~15,1965.
- 3) Kimata S : Distribution of cardiac sympathetic nerves. *Jap.Circul.J.* 29:17~20,1965.
- 4) Tsuchimochi H, Kuro-o M, Takaku F, Yoshida K, Kawana M, Kimata S, Yazaki Y : Expression of myosin isozymes during the developmental stage and their redistribution induced by pressure overload. *Jap.Circul.J.* 50:1044~1052,1986.
- 5) 川名正敏、木全心一、高橋早苗、土持英嗣、矢崎義雄 : 肥大心および心不全にみられるヒト心筋ミオシンの変化 *Therap. Res.* 7:45~51,1987.
- 6) 木全心一、川名正敏、平敦子、石塚尚子、矢崎義雄、土持英嗣、小柳仁、橋本明政、広沢弘七郎 : 心筋肥大の悪化と改善 呼吸と循環 35:723~733,1987.
- 7) Kimata S, Morkin E : Comparison of myosin synthesis in heart and red and white skeletal muscles. *Am. J. Physiol.* 221:1706~1713,1971.
- 8) Morkin E, Kimata S, Skillman JJ : Myosin synthesis and degradation during development of cardiac hypertrophy in the rabbit. *Circul.Res.* 30:690~702,1972
- 9) Morkin S, Kimata S : Replacement of myosin during development of cardiac hypertrophy. *Circul.Res.* 34 and 35 (Supple III),

Ⅲ-50～Ⅲ-57,1974.

- 10) 石塚尚子：正常心および病的心におけるヒト心筋ミオシンアイソザイムの分布——モノクローナル抗体を用いた免疫組織学的研究 東京女子医大誌 57:1557～1566,1987.
- 11) Kawana M, Kimata S, Taira A, Isizuka N, Hirosawa K : Distribution of cardiac myosin isozyme in normal and pressure overload human ventricular myocardium. The 8th International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society. Oosaka, 1987.
- 12) Katz AM, Repke DI, Rubin BR : Adenosinetriphosphatase activity of cardiac myosin. Circul.Res. 19:611～621,1966.
- 13) Tsuchimochi H, Sugi M, Kuro-o M, Ueda S, Takaku F, Furuta S, Shirai T, Yazaki Y : Isozyme changes in myosin of human atrial myocardium induced by overload. J Clin Invest 74:662,1984.
- 14) Kimata S, Tarjan EM : Effects of in vivo and in vitro administered thyroxine on substrate metabolism of isolated rabbit ventricle mitochondria II . Characteristics of oxidative phosphorylation in mitochondria of euthyroid, hyperthyroid and thyrotoric rabbits. Endocrinol 89:378～384,1971.
- 15) Tarjan EM, Kimata S : Effects of in vivo and in vitro administered thyroxine on substrate metabolism of isolated rabbit ventricle mitochondria III . Substrate effects on pyridine nucleotide reduction on the reversal of electron transport, and on the "respiratory control by ATP" Endocrinol 89:385～396, 1971.

- 16) Tarjan EM, Kimata S : Thyrotoxicosis and reversal of the electron transport. Bull.N.Y.Acad.Med. 46:1010,1970.
- 17) Gustafson TA, Markhan BE, Morkin E : Effects of thyroid hormone on α -actin and myosin heavy chain gene expression in cardiac and skeletal muscles of the rat : Measurement of mRNA content using synthetic oligonucleotide probes. Circul.Res. 59:194~201,1986.
- 18) 川名正敏、木全心一、細田瑛一：心肥大に伴う心筋収縮蛋白の変化とこれの対する交感神経活性の影響 シンポジウム「心肥大の病態と対策」第53回日本循環器学会総会(名古屋) 1989.
- 19) 木全心一、慢性心不全の治療 パネルディスカッション「心不全の治療：up to date」第38回日本心臓病学会総会(広島) 1990.
- 20) Nagai R, Zarain-Herzberg A, Brandl CJ, Fujii J, Tada M, MacLennan DH, Aepert NR, Periasamy M : Regulation of myocardial Ca^{++} ATPase and phospholamban mRNA expression in response to pressure overload and thyroid hormone. Proc.Nate.Acad Sci. 86:2966~2970,1989.
- 21) Matsushita F, Fanburg BL : Pyrimidine nucleotide synthesis in the normal and hypertrophying rat heart. Circul.Res. 27:415,1970.
- 22) Matsushita S, Sogani RK, Raben US : Ornithine decarboxylase in cardiac hypertrophy in the rat. Circul.Res. 29:699,1972.
- 23) Mahdavi V, Periasamy M, Nadal-Ginard B : Molecular

characterization of two myosin heavy chain genes expressed in the adult heart. *Nature* 297:659~664,1982.

- 24) Bristow MR, Hershberger RE, Port JP, Gilbert EM, Sandoval A, Rasmussen R, Cates AE, Feldman AM : β -adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation* 82(Supple I) : I -12~ I -25,1990.
- 25) The Consensus Trial Study Group : Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS) *N Engl J Med* 316:1429 ~1435,1987.
- 26) Colucci US : In vivo studies of myocardial β -adrenergic receptor pharmacology in patients with congestive heart failure. *Circulation* 82(Supple I) I -44~ I -51,1990.
- 27) 松本直行、伊藤直人、川越康博、松村研二、本田喬、堀江俊伸、高橋早苗、木全心一、広沢弘七郎：難治性心不全例に対する新強心薬TA-064 の効果の検討——初回投与時と1カ月後の血行動態の指標を中心として 呼吸と循環 34:1113~1120,1986.