

9342 心肥大におけるナトリウムイオン交換系の役割に関する研究

助成研究者: 鎌田 武信(大阪大学 医学部)

共同研究者: 堀 正二, 鍵谷 俊文(大阪大学)

北風 政史, 大津 欣也(大阪大学)

佐藤 洋, 栗原 敏修(大阪大学)

【研究報告の要旨】

高血圧症では、心肥大が認められることが多いが、心筋細胞におけるナトリウムイオン交換系の制御因子や役割については、これまで殆ど明らかにされていない。そこで本助成研究においては、心筋細胞蛋白合成の情報伝達機構において、心筋細胞膜上にあるナトリウムイオン交換系がどのように関与しているかを心筋細胞および心筋症モデル動物において検討することを目的とした。

ラット単離心筋細胞において、心筋細胞内pHの変化を細胞内pH指示薬BCECF、心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度をfura-2を用いた蛍光分光分析で測定した。また、心筋細胞の蛋白合成を、神経・体液性因子の影響を除外できる無血清培地でのラット新生児培養心筋細胞を用いた心筋蛋白への放射活性アミノ酸の取り込みにより測定した。。

ノルエピネフリン、アンジオテンシンII、バソプレシンによる刺激は、 Na^+/H^+ 交換系を活性化して細胞内のpHを上昇させた。さらに、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系を介して心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた。これらの反応は Na^+/H^+ 交換系阻害薬により抑制された。また、これらの反応には、Cキナーゼが関与していると考えられた。

ノルエピネフリン刺激による培養心筋細胞蛋白への $[\text{3H}]$ phenylalanineの取り込みは、 Na^+/H^+ 交換系阻害薬により抑制された。また、アンジオテンシンII刺激による心筋蛋白合成も、同様にアミロライドにより阻害された。また、Cキナーゼ阻害薬スタウロスポリンは、ノルエピネフリン刺激による培養心筋細胞蛋白合成を抑制した。したがって、昇圧ホルモン刺激による心筋蛋白合成には、Cキナーゼ活性化と Na^+/H^+ 交換系の反応が関与していることが示された。

さらに、心筋症自然発症ハムスター (cardiomyopathic Syrian hamster) における Na^+/H^+ 交換系阻害薬アミロライドの長期投与は、本モデル動物の心肥大、心筋障害を軽減し、 Na^+/H^+ 交換系の反応が重要な役割を果たしていると考えられた。

以上のことより、in vitroのみならず in vivoにおいても、心肥大においてナトリウムイオン交換系が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

9342 心肥大におけるナトリウムイオン交換系の役割に関する研究

助成研究者: 鎌田 武信 (大阪大学 医学部)

共同研究者: 堀 正二, 鍵谷 俊文 (大阪大学)

北風 政史, 大津 欣也 (大阪大学)

佐藤 洋, 栗原 敏修 (大阪大学)

【研究目的】

塩（塩化ナトリウム）は、生体においてその浸透圧の維持・循環水分バランスの調節因子として重要な働きをしているが、高血圧症の危険因子でもある。その中でもナトリウムイオンは、細胞膜電位変化や細胞膜上にあるナトリウム/水素イオン交換系 (Na^+/H^+ 交換系) およびナトリウム・カルシウム交換系 ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系) を介して細胞内 H^+ や Ca^{2+} を変化させることにより、細胞内情報伝達をつかさどることが明らかになってきた。近年、血管平滑筋において、 α_1 アドレナリン受容体系の情報伝達機構であるプロテインキナーゼ C の活性化により Na^+/H^+ 交換系が活性化され、細胞内 Na^+ 流入が増加することが明らかとなり、これらの Na^+ 交換系が α_1 アドレナリン受容体活性の調節を受けることが示された。

一方、循環の中心的役割をつかさどる心臓の心筋細胞でも、①これらのナトリウム交換系がよく発達していること、② H^+ 、 Ca^{2+} は心筋の収縮性の規定因子であること、③ Na^+ は心筋細胞の成長・肥大に関与する可能性が示唆されていること、などの理由から Na^+/H^+ 、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系の存在が注目を集めている。しかしながら、心筋細胞におけるナトリウムイオン交換系の制御因子は、心臓の循環生理・病態解析の上で非常に重要であるにも拘らず、これまで殆ど明らかにされていない。

我々は、特発性心筋症や心臓に圧負荷のある先天性心疾患、心臓弁膜症、高血圧症などにおいて特徴的な病態である心肥大について、心筋症自然発症ハムスターや圧負荷肥大心では、 α_1 交感神経活性が心筋肥大進展に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた（文献1、2）。また、神経・体液性因子の影響を純粹に検討できる単離心筋細胞や培養心筋細胞をもちいて、 α_1 アドレナリン受容体刺激による心筋細胞蛋白合成の情報伝達機構において、心筋細胞膜上にあるナトリウムイオン交換系が関与していることを明らかにしつつある。

そこで本助成研究においては、心筋細胞蛋白合成の情報伝達機構において、心筋細胞膜

上にあるナトリウムイオン交換系がどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。そのなかで、神経・体液性因子の影響を純粹に検討できる単離心筋細胞や培養心筋細胞をもちいて、心筋細胞において、 Na^+/H^+ 、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系がカテコラミン、アンジオテンシン、バソプレシンなどの昇圧ホルモンにより、どのように調節されているかを解明した。また、これらの昇圧性ホルモンと細胞外のナトリウムイオン濃度変化が、心筋肥大におよぼす影響を、心筋蛋白合成の面から検討した。

さらに、当該年度においては、とくに実際の生体において、これらのイオン交換系が果たす役割を、ヒトの特発性心筋症のモデル動物である心筋症自然発症ハムスター（Cardiomyopathic Syrian hamster）において、ナトリウムイオン交換系阻害薬が心肥大に与える影響により検討することを目的に加えた。

【研究方法】

（1） Na^+/H^+ 交換系に対する昇圧ホルモン受容体刺激の影響

Wistar系成熟ラットより摘出した心臓をLangendorff灌流装置を用いてコラゲナーゼ処理し、心筋細胞を単離し、細胞内pH指示薬BCECF/AM、 $4\mu\text{M}$ 存在下に 37°C 、30分間インキュベートし、BCECFを心筋細胞内に取り込ませた。細胞を十分に洗浄した後、キュベット内で再びHEPES-Tyrode液中に浮遊させ、蛍光分光光度計（Hitachi, F-3000）を用い励起波長 500nm にて細胞内のBCECFを励起、 525nm の蛍光を測定することによって細胞内pHを測定した。

心筋細胞を β 受容体遮断薬存在下にノルエピネフリン、アンジオテンシンII、バソプレシンにより刺激、細胞内pHの変化について検討した。さらにそのpHの変化が Na^+/H^+ 交換系を介するものであるかを明らかにするため、細胞外液にNaClが存在しない条件、および Na^+/H^+ 交換系の特異的なブロッカーであるアミロライド、HMA（hexamethylene amiloride）、EIPA（ethyl-isopropyl-amiloride）存在下におけるpHの変化についても検討した。

（2） $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系に対する昇圧性ホルモン刺激の影響

ラットより単離した心筋細胞をHEPES-Tyrode液中に浮遊、細胞内 Ca^{2+} 指示薬fura-2/AM、 $2\mu\text{M}$ 存在下に 37°C 、30分間インキュベートし、fura-2を細胞内に取り込ませ、細胞を十分に洗浄した後、キュベット内で再びHEPES-Tyrode液中に浮遊させた。蛍光分光光度計を用い励起波長 340nm にて細胞内のfura-2を励起、 510nm の蛍光を測定することによって細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した。

心筋細胞を β 受容体遮断薬存在下にノルエピネフリンにて刺激（ α_1 受容体刺激）、細胞内 Ca^{2+} 濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化について検討した。さらに $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化と $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系および Na^+/H^+ 交換系との関係を明らかにするため、細胞外液に Ca^{2+} や Na^+ が存在しない条件、アミロライド存在下における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化について検討した。アンジオテンシンII、バソプ

レシンについても同様に検討した。

(3) 昇圧ホルモン刺激による心筋肥大に対するナトリウムイオン交換系の意義

神経・体液性因子の影響を除外できる無血清培地でのラット新生児培養心筋細胞を用いて、ノルエピネフリン、アンジオテンシンⅡ、バソプレシン刺激下に、心筋蛋白への $[^3\text{H}]$ phenylalanine の取り込み、に及ぼす Na^+/H^+ 交換系阻害薬 (アミロライドおよびEIPA)、Cキナーゼ阻害薬 (スタウロスポリン) の影響を検討した。

(4) ナトリウムイオン交換系阻害薬の心肥大抑制効果

α 受容体活性亢進がみられる心筋症ハムスターにおいて、ナトリウムイオン交換系阻害薬の *in vivo* 投与が心肥大進展を抑制するか否かを検討した。

このために、心筋症ハムスターの心肥大進展期にあたる生後120日より6ヵ月間、 Na^+/H^+ 交換系阻害薬アミロライド1mg/kg/day (1mg群)、5mg/kg/day (5mg群)、または β 遮断薬メトプロロール2mg/kg/day (メトプロロール群)を混餌法により投与し、心肥大、心筋障害に及ぼす影響を、非投与群を対照として比較検討した。

1) 薬剤の長期経口投与における安定性は、HPLC法にて検討した。

2) 心肥大、心筋障害は、心筋重量とトレースにより定量化した病理組織学的検索を施行した。

3) 心筋ノルエピネフリン含量をHPLC法で、また心筋カルシウム含量を原子吸光法にて測定した。

【結果】

(1) Na^+/H^+ 交換系に対する昇圧ホルモン受容体刺激の影響

β 遮断薬プロプラノロール存在下で、ノルエピネフリン刺激はラット単離心筋細胞内のpHiを上昇させ (Fig. 1 左上)、反応は濃度依存的であった。このpHiの上昇は、 α_1 受容体遮断薬プラゾシンにより抑制されたが、 α_2 遮断薬ヨヒンピンでは抑制されず、 α_1 受容体を介した反応であると考えられた。また、このノルエピネフリン刺激による細胞内アルカリ化は、細胞外ナトリウムイオンの非存在下では認められず、細胞外液への塩化ナトリウム添加により認められた。さらに、このノルエピネフリン刺激による細胞内アルカリ化は、 Na^+/H^+ 交換系阻害薬 (アミロライドおよびHMA) により抑制された (Fig. 1 右上)。したがって、 α_1 受容体刺激は、 Na^+/H^+ 交換系を介して細胞内のpHを上昇させると考えられた。

アンジオテンシンⅡも、心筋細胞内pHを上昇させた (Fig. 2 上)。この反応は、濃度依存性を示し、saralasin([Sar¹, Val⁵, Ala⁸]-angiotensin II)により阻害された。また、こ

の細胞内アルカリ化も、 Na^+/H^+ 交換系阻害薬HMAにより抑制された。

同様に、バソプレシン刺激によっても、心筋細胞内pHは上昇し、その反応は Na^+/H^+ 交換系阻害薬EIPAにより抑制された。

Cキナーゼ阻害薬H-7やカルモデュリン阻害薬W-7により、 α_1 受容体刺激による細胞内アルカリ化は抑制された。さらに、強力なCキナーゼ活性化作用を持つPMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)により、心筋細胞内pHは上昇し、この反応はHMAにより抑制された。したがって、Cキナーゼの活性化が心筋形質膜における Na^+/H^+ 交換に強く関与していることが示唆された。

(2) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系に対する昇圧性ホルモン刺激の影響

ノルエピネフリン (10^{-5}M) は、心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を $202.7 \pm 20.6\text{nM}$ から $347.5 \pm 5.1\text{nM}$ へと有意に増加させた (Fig. 1 左下)。この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は、細胞外液中にナトリウムイオンが存在しない状態では認められず、細胞外液に塩化ナトリウムを加えると認められるようになった (Fig. 1 右下)。細胞外液に、塩化ナトリウムに代えて、同じ浸透圧になるように塩化コリンを加えても、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は認められないことから、この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加には、細胞外液中のナトリウムイオンが必要なことが示唆された。

さらに、 Na^+/H^+ 交換系阻害薬HMAは、ノルエピネフリン刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を抑制した。したがって、心筋細胞に対する α_1 受容体刺激は、Cキナーゼを介して Na^+/H^+ 交換系を活性化され、細胞内ナトリウムイオンの増加により、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系を介したカルシウムイオンの流入を引き起こすことが示唆された。

アンジオテンシンIIも、心筋細胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を増加させ (Fig. 2下)、その反応は Na^+/H^+ 交換系阻害薬により抑制された。

また、バソプレシン刺激によっても、同様に心筋細胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は増加し、その反応は Na^+/H^+ 交換系阻害薬により抑制された。

(3) 昇圧ホルモン刺激による心筋肥大に対するナトリウムイオン交換系の意義

ノルエピネフリン、アンジオテンシンII、バソプレシン刺激により、ラット新生児培養心筋細胞蛋白への $[\text{^3H}]$ phenylalanine の取り込みは有意に増加した (Fig. 3)。ノルエピネフリン刺激による心筋蛋白合成は、プラゾシンにより抑制され、 α_1 受容体を介したものであることが確認された。

ノルエピネフリン刺激により、培養心筋細胞でオンコジーン発現が活性化することが知られているが、アンジオテンシンII刺激によっても、オンコジーン (c-fos, c-myc) 発現が活性化された。したがって、これら昇圧ホルモン刺激による心筋肥大には、遺伝子レベルでの蛋白合成調節機構が関与していると考えられた。

ノルエピネフリン刺激による培養心筋細胞蛋白への $[\text{^3H}]$ phenylalanine の取り込みは、

Na⁺/H⁺交換系阻害薬（アミロライドおよびEIPA）により抑制された（Fig. 4）。また、アンジオテンシンⅡ刺激による心筋蛋白合成も、同様にアミロライドにより阻害された。

また、Cキナーゼに比較的特異性が高い阻害薬スタウロスポリンは、ノルエピネフリン刺激による培養心筋細胞蛋白合成を抑制した。したがって、昇圧ホルモン刺激による心筋蛋白合成には、Cキナーゼ活性化とNa⁺/H⁺交換系の反応が関与していることが明らかとなった。

（4）ナトリウムイオン交換系阻害薬の心肥大抑制効果

混餌飼料中のアミロライド（0.02%）およびメトプロロール（0.12%）は、それぞれ4℃および25℃において、3カ月まで安定であることが確認された（Table 1）。

アミロライドの長期投与により、心筋症ハムスターの心臓重量は、非投与群に比し5mg群で有意に小さく（1.03±0.15 g in no treatment vs 0.73±0.04 g in amiloride 5mg, mean±SE, p<0.01）、心体重比は1mg群、5mg群でそれぞれ3%および14%減少していた（4.7±0.2 in no treatment, 4.6±0.1 in amiloride 1mg, 4.1±0.1* in amiloride 5mg, *p<0.05）（Fig. 5）。病理組織学的検索でも、アミロライド投与により心肥大の改善と心筋障害の軽減が認められた（Fig. 6）。

メトプロロール群でも心体重比の減少（4.2±0.1*, *p<0.05）と心筋障害の抑制が認められた（Fig. 5,6）。

心筋ノルエピネフリン濃度は、薬剤投与群で低い傾向があったが、有意の差は認めなかった。また、心筋カルシウム含量も、各群で有意の差を認めなかった（Fig. 7）。

【考察】

本助成研究を含め、我々は心筋形質膜におけるナトリウムイオン交換系の情報伝達における役割を明らかにしてきた（文献3、4）。Fig. 8に、心筋蛋白合成の情報伝達機構のひとつの可能性を示す（文献5）。ノルエピネフリン刺激は、よく知られているようにα₁受容体を介してフォスホリパーゼCを活性化し、diacylglycerol (DG) とイノシトール3リン酸 (IP3) を生じる。DGはCキナーゼを活性化することが知られている。Cキナーゼの活性化は、本研究でも示したようにNa⁺/H⁺交換系を活性化し、心筋細胞へのナトリウムイオンの流入をもたらす。すると、心筋形質膜に存在するNa⁺/Ca²⁺交換系の働きにより、ナトリウムイオンに代わってカルシウムイオンの流入がおこり、カルシウムイオンにより心筋蛋白合成遺伝子の発現が惹起されると考えられる。近年、進展刺激により心筋の蛋白合成が促進されることが報告されている。その場合においても、形質膜上のメカノレセプターを介したナトリウムイオン流入が重要な役割を果たしていると考えられている。したがって、神経・体液性因子による心肥大と、進展刺激による心肥大にはある時点からの共

通の情報伝達機構の存在が示唆される。以上のことより、心肥大においてナトリウムイオン交換系が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

さらに、ヒトの特発性心筋症のモデル動物である心筋症自然発症ハムスター (Cardiomyopathic Syrian hamster) における検討により、ナトリウムイオン交換系阻害薬アミロライドの長期投与が、心肥大、心筋障害を抑制することが示された。

以上のことより、*in vitro* のみならず *in vivo* においても、心肥大においてナトリウムイオン交換系が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

【今後の課題】

本助成研究により、単離心筋細胞におけるイオン交換系の機能や培養心筋細胞の蛋白合成においてイオン交換系が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

しかしながら、イオン交換系の詳細な分子機構については、その遺伝子構造、発現制御など不明の点も多く、今後の解明が期待されている。

さらに、実際のモデル動物においても、これらのイオン交換系が心肥大において重要な役割を果たしており、ナトリウムイオン交換系阻害薬が心肥大を抑制したことより、心肥大、心筋症治療における臨床応用の可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Tamai J., Hori M., Kagiya T., Iwakura K., Iwai K., Kitabatake A., Watanabe Y., Yoshida H., Inoue M., Kamada T. :
Role of α_1 -adrenoceptor activity in progression of cardiac hypertrophy in guinea pig hearts with pressure overload.
Cardiovasc. Res. 23: 315-322, 1989
- 2) Kagiya T., Hori M., Iwakura K., Iwai K., Watanabe Y., Uchida S., Yoshida H., Kitabatake K., Inoue M., Kamada T. :
Increased α_1 -adrenergic activity in cardiomyopathic Syrian hamster.
Am. J. Physiol. 260: H80-H88, 1991
- 3) Iwakura K., Hori M., Watanabe Y., Kitabatake A., Cragoe E.J., Yoshida H., Kamada T. :
 α_1 -Adrenoceptor stimulation increases intracellular pH and Ca^{2+} in cardiomyocytes through Na^+/H^+ and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange.
Eur. J. Pharmacol. 186: 29-40, 1990
- 4) Hori H., Nakatsubo N., Kagiya T., Iwai K., Sato H., Iwakura K.,

- Kitabatake A., Kamada T. :
 The role of Na⁺/H⁺ exchange in norepinephrine-induced protein synthesis in neonatal cultured rat cardiomyocytes.
 Jpn. Circ. J. 54 (5): 535-539, 1990
- 5) Kagiya T., Hori M., Nakatsubo N., Sato H., Iwai K., Iwakura K.,
 Kitabatake A., Cragoe Jr. E.J. :
 The role of Na⁺/H⁺ exchange in norepinephrine-induced protein synthesis in neonatal cultured rat cardiomyocytes.
 Circulation 82 (4): III-562, 1990
- 6) Kagiya T., Hori M., Iwai K., Sato H., Iwakura K., Takashima S.,
 Kitakaze M., Koretsune Y., Kamada T. :
 Role of sodium ion exchange in plasma membrane in cardiac hypertrophy.
 In "Seventh Symposium on Salt". Vol.II p371-375, 1993 Elsevier, Amsterdam
- 7) 鍵谷俊文、堀 正二、高島成二、須藤有二、井上通敏、鎌田武信：
 Na⁺/H⁺ 交換阻害薬の心筋症自然発症ハムスターにおける心肥大抑制作用。
 Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther. 24 (1): 17-18, 1993

Table 1

Stability of Agents in Laboratory Chow

drugs	concentration	25°C	25°C	4 °C	4 °C
		1 month	3 month	1 month	3 month
amiloride	0.020 %	102.6	103.7	107.8	110.0
metoprolol	0.120 %	96.0	100.0	103.0	100.8

Values are % to control in MF laboratory chow.
 Drug concentration was determined by HPLC.

Fig. 1 Effects of Norepinephrine on Intracellular pH and $[Ca^{2+}]_i$ in Isolated Rat Cardiomyocytes

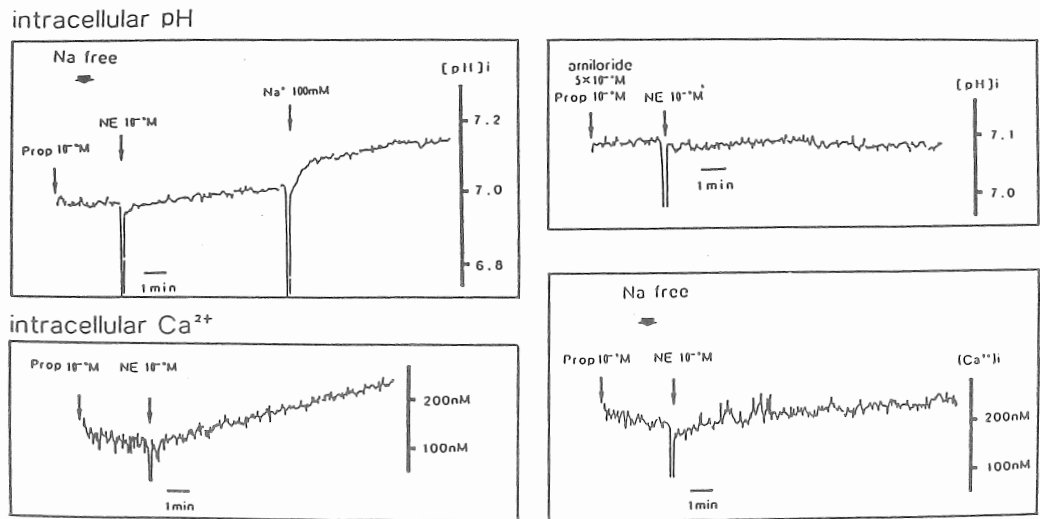


Fig. 2 Effects of Angiotensin II on Intracellular pH and $[Ca^{2+}]_i$ in Isolated Rat Cardiomyocytes

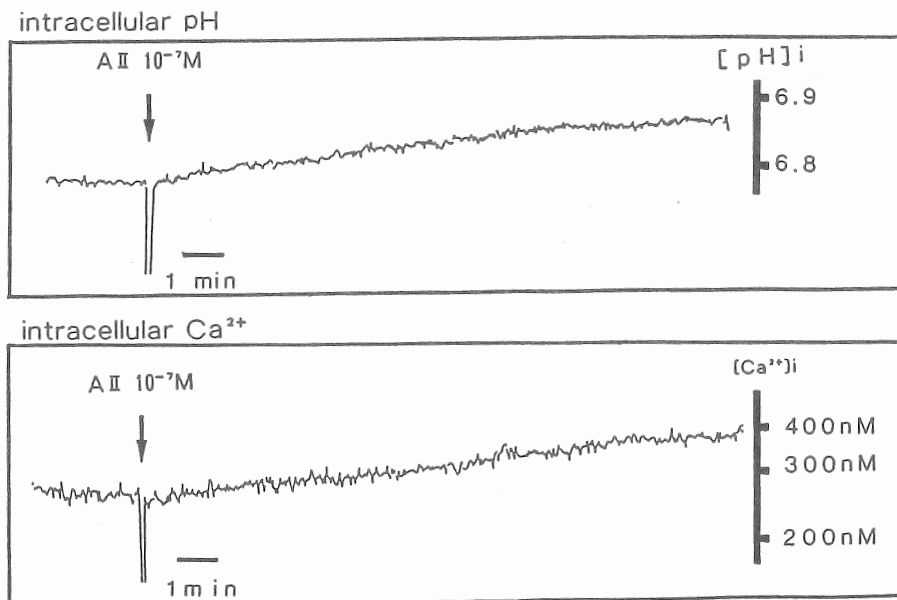


Fig. 3

Enhanced Protein Synthesis by Various Vasoactive Hormones in Cultured Neonatal Cardiomyocytes

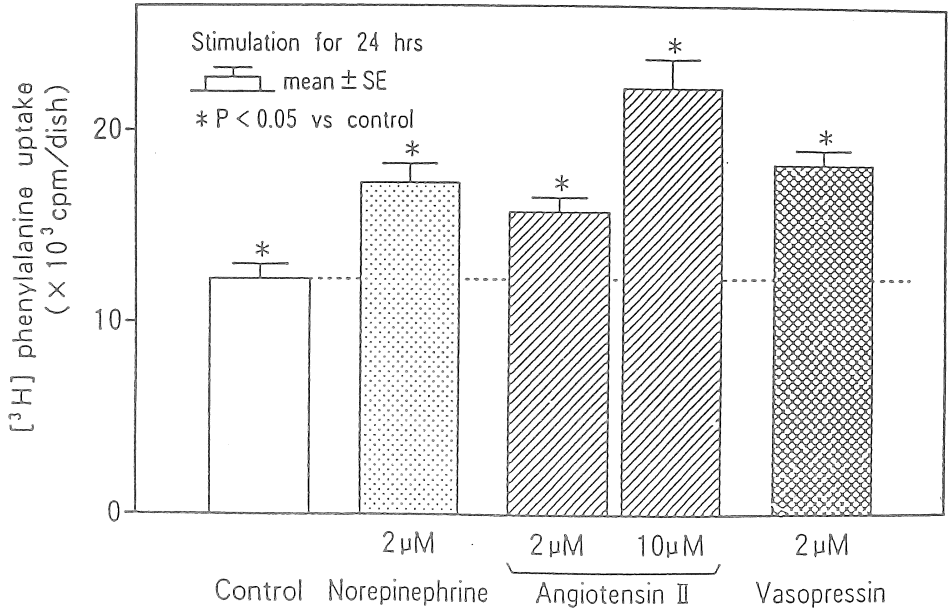


Fig. 4

Dose-dependent Effects of Norepinephrine on Protein Synthesis and Inhibitory Effects of Amiloride

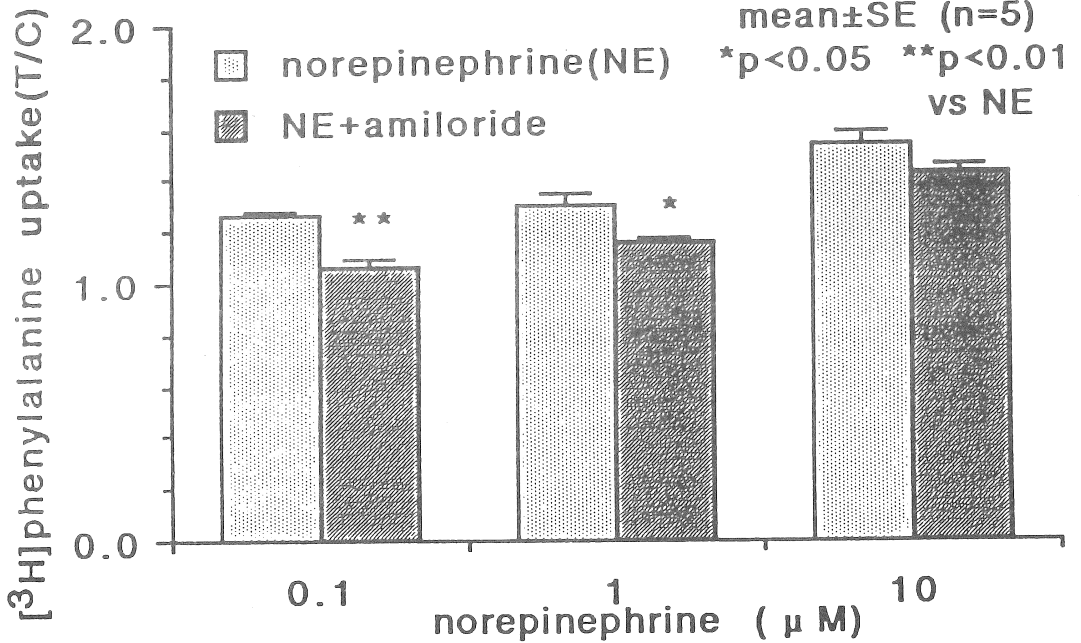


Fig. 5

Effects of Long-term Amiloride Treatment in Cardiomyopathic Syrian Hamsters

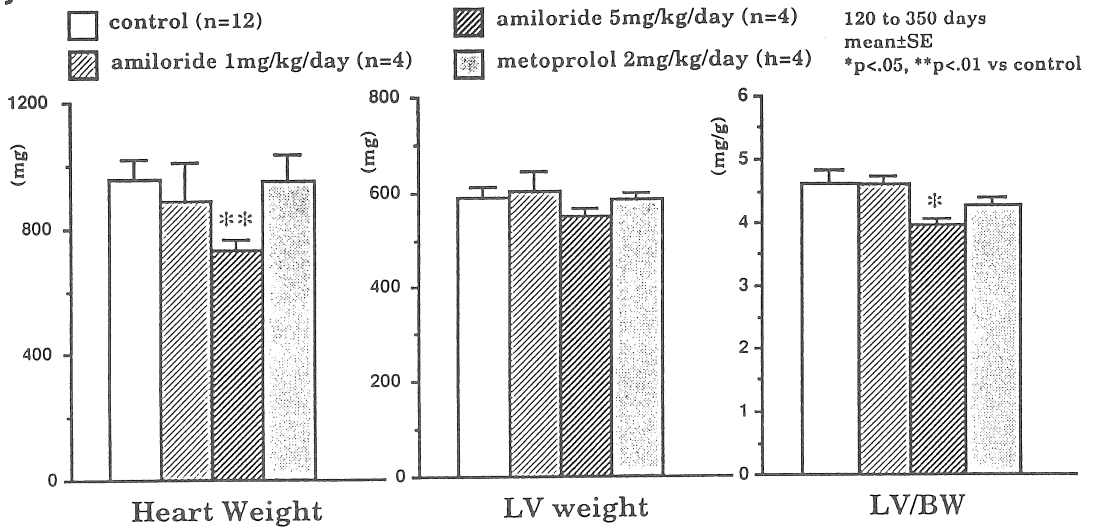


Fig. 6

Results of Histopathological Examination after Amiloride Treatment in Cardiomyopathic Syrian Hamsters

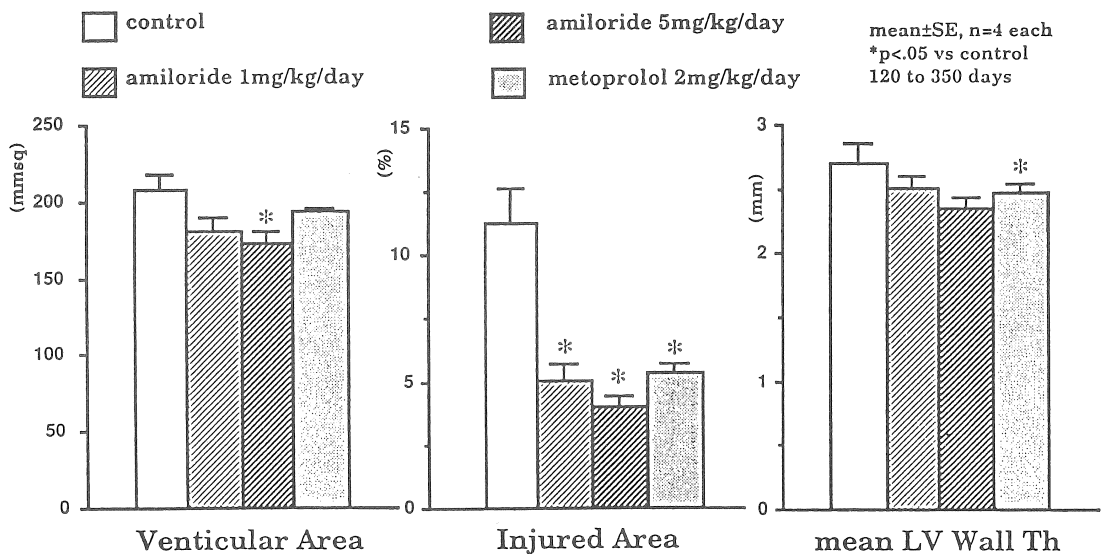


Fig. 7

Myocardial Contents of Norepinephrine and Calcium after Amiloride Treatment in Cardiomyopathic Syrian Hamsters

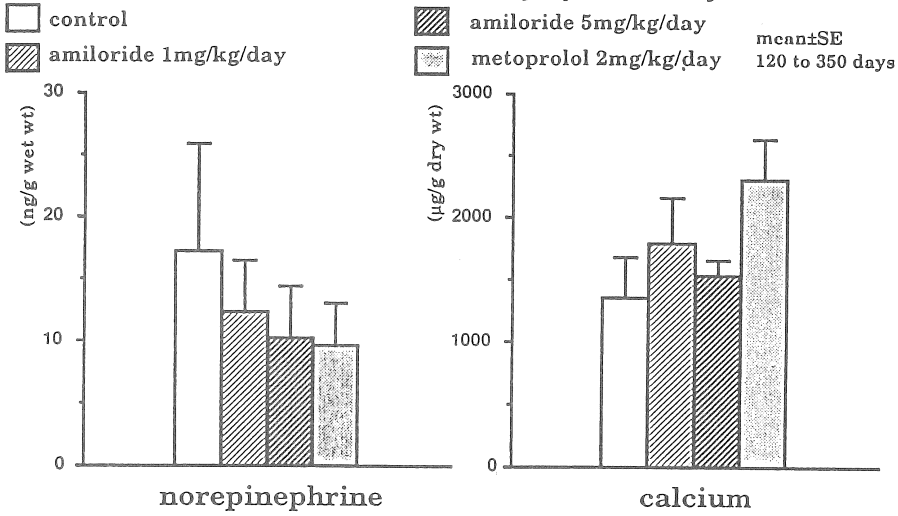
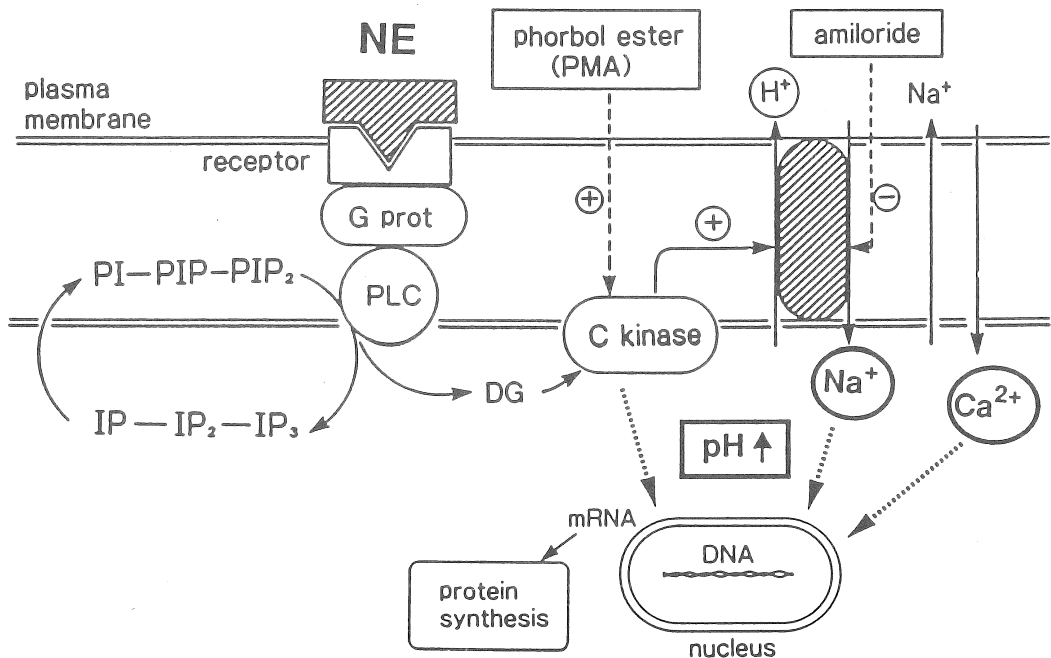


Fig. 8

Possible Mechanism Controlling Protein Synthesis



Role of Sodium Ion Exchange in Plasma Membrane
in Cardiac Hypertrophy *in vitro* and *in vivo*

Takenobu Kamada, Masatsugu Hori, Toshifumi Kagiya,
Masafumi Kitakaze, Kinya Otsu, Hiroshi Sato, Tosinao Kurihara

The First Department of Medicine, School of Medicine,
Osaka University, Suita 565, Japan

Summary

To test whether Na^+/H^+ exchange plays an important role in cardiac hypertrophy, the effects of Na^+/H^+ exchange inhibitor were studied in cultured neonatal rat cardiomyocytes and in cardiomyopathic Syrian hamsters (Bio 14.6). Na^+/H^+ exchange inhibitors, amiloride and ethyl-isopropyl-amiloride inhibited the norepinephrine-induced protein synthesis in cultured cardiomyocytes in serum free medium, suggesting that α_1 -adrenergic stimulation enhanced the protein synthesis through activation of Na^+/H^+ exchange *in vitro*. Moreover, treatment with amiloride (5mg/kg/day, *p.o.*) of the hamsters (Bio 14.6) from 120 to 350 days in age decreased ventricular/body weight ratio by 14 %, compared with the no-treatment controls. Histological examinations showed that the amiloride treatment reduced ventricular cross-sectional area (207 ± 10 to 172 ± 9 mm^2 , $p < 0.05$, mean \pm SE), and % area of calcification and fibrosis (11.4 ± 1.4 to 4.0 ± 0.4 %, $p < 0.01$). These results indicate that amiloride attenuates the myocardial hypertrophy in the cardiomyopathic hamsters. Thus, we conclude that Na^+/H^+ exchange is involved in pathogenesis of cardiac hypertrophy both *in vitro* and *in vivo*.