

マウス心筋細胞の成長にともなう DNA 合成の 部位差についての検討

(昭和63年6月9日受付)

(平成元年1月20日受理)

1) 京都府立医科大学小児科学教室

2) 滋賀医科大学第一病理学教室

中川 雅生¹⁾ 浜岡 建城¹⁾ 服部 隆則²⁾ 沢田 淳¹⁾

key words : DNA 合成, マウス心筋細胞, 循環動態の変化, 部位差

要 旨

種々の日齢のマウスに³H-thymidine による autoradiography を施行し, DNA 合成を行なっている心筋細胞の分布の成長にともなう変化について検討した。

生直後から2週齢までは, 心臓のどの部位でも心筋細胞は活発に DNA 合成を行なっていたが, これは心筋細胞数の増加のためと考えられた。しかしそれ以後は, DNA 合成を行なっている心筋細胞の数は急激に減少し, 体重及び心重量がプラトーに達する100日齢以後では張力の最も大きい左室自由壁及び心室中隔左室側の心内膜下のみ認められただけで, 右室自由壁や心室中隔右室側, 左室心外膜下にはみられなかった。

DNA 合成を行なっている心筋細胞の分布は成長にともない変化したが, これは循環動態の変化に対して合目的であると考えられた。

一般に成熟期の心臓は, 細胞動態のうえでは安定した状態, すなわち DNA 合成を行なわない臓器であると考えられてきたが, 今回の結果からは, 張力の最も大きくかかる部位では DNA 合成がつづいて行なわれていることが明らかとなった。

緒 言

心疾患の病態解明のために分子生物学的観点から多くの研究がある。しかし, 心臓の正常な成長過程で心筋細胞の増殖や肥大がどの様におこなわれているか, については十分に解明されていない。これまで著者らは, ³H-thymidine による autoradiography を用いて, マウス心筋細胞の生後の DNA 合成について検討し, マウス心筋細胞は生直後は活発に, 成熟期にも少数ではあるが DNA 合成を行なっていることを明らかにした¹⁾²⁾。

今回, マウス心筋細胞について, 成長にともなう DNA 合成の変化を心臓の部位別に検討したので最近の細胞工学的研究の知見とあわせて考察し報告する。

材料と方法

日齢 0, 3, 7, 10, 14, 20, 30, 50, 100, 150, 200日の ICR 系雄マウスそれぞれ3匹, 計33匹に体重 g 当たり $1\mu\text{Ci}$ の ³H-thymidine を腹腔内に1回投与し, 1時間後に屠殺した。摘出した心臓はホルマリン固定, パラフィン包埋し, 厚さ 4μ の連続切片を作製, 試料とした。dipping には Kodak ARG 用乳剤 NTB2 を用い 4°C で3週間露光後 FD 111の現像液で 18°C , 3分間現像した。

染色には Hematoxylin-Eosin 染色法を用いた。

各心臓の連続切片より左室自由壁, 心室中隔, 右室自由壁, 各々について5,000個, 計15,000個の心筋細胞核を数え, そのうち³H-thymidine で標識された細胞核(核に5個以上の銀粒子のあるもの)数の百分率を Labeling Index (L.I.) とした。

別刷請求先: (〒602) 京都市上京区河原町通り広小路
上ル梶井町465 京都府立医科大学小児
科 中川 雅生

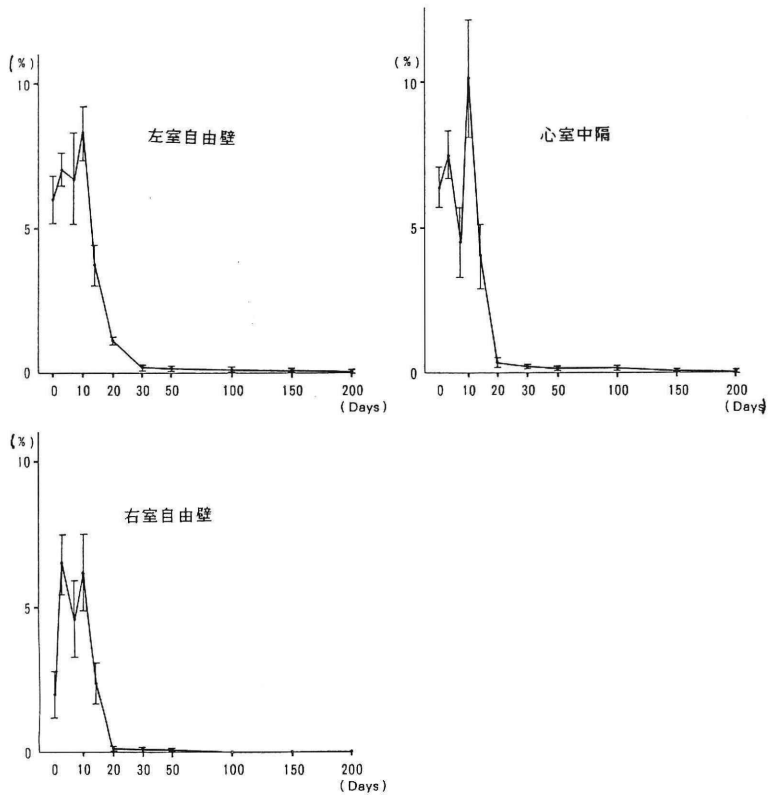


図1 左室自由壁、心室中隔、右室自由壁における心筋細胞の標識率の変化。生後2週間は、マウスの心臓のいずれの部位においても標識率は2.0%より高く、以後急減した。100日齢のマウスにおいても左室自由壁及び心室中隔左室側で、DNA合成を行っている心筋細胞がみられた(標識率:0.06%)が、右室自由壁には全く認められなかった。

結果

各日齢における左室自由壁、心室中隔、右室自由壁の心筋細胞核のL.I.を図1に示した。3, 5, 10日齢ではいずれの部位でも大きな差はなかったが、いずれの日齢でも左室自由壁のL.I.は右室自由壁に比べて高値であった。その最高値は10日齢で、左室自由壁、心室中隔、各々平均8.3%, 10.1%であった。一方、右室自由壁の最高値は3日齢で平均6.5%であった。100日齢や200日齢では左室自由壁及び心室中隔のL.I.はともに平均0.06%で、左室心内膜下に局限していた。しかし、右室自由壁には100日齢以後には標識された細胞核はなかった。0日齢, 50日齢, 100日齢の標識された細胞核の分布状況を左室自由壁心外膜側, 同心内膜側, 心室中隔左室側, 同右室側, 右室自由壁心外膜側, 同心内膜側に分け図2に模式図として表わした。

考察

心臓は、心筋細胞の数の増加(増殖)と容量の増加(肥大)により成長する。そして、このいずれにもDNA合成が直接関係しており、心筋細胞のDNA合成を心臓の部位別に経時的に検討することは、すなわち細胞組織レベルでの心臓の成長をより詳細に知ることを可能にするだけでなく、肥大大心をはじめとする心臓の病態の発生を知る基礎であると考えられる。

生直後(0日)から2週までは心臓のいずれの部位でもDNA合成は活発で、そのピークは右室側で3日、左室側で10日齢であった。

このDNA合成は胎仔期からの臓器形成の継続で細胞数の増加を主としていること、また胎仔循環から肺循環への変化に対して右室から左室優位となっていくことを表わしていると思われた。

2週齢以後、50日齢まではDNA合成をしている細

DISTRIBUTION OF DNA SYNTHESIZING CARDIOMYOCYTES

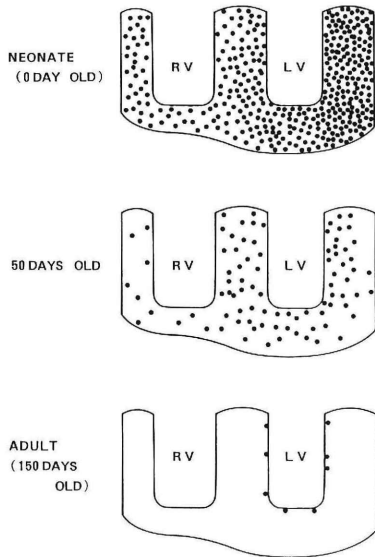


図2 生直後、50日齢、150日齢のマウス心臓におけるDNA合成を行なっている心筋細胞の分布の模式図。生直後ではDNA合成を行なっている心筋細胞は心臓のどの部位にも認められたが、以後その数は減少し、15日齢では左室周囲の心内膜下においてみられるのみとなった。

胞は激減し、その分布は左室壁を中心としていた。この時期は体重及び心重量の増加が急速な時期で(図3)、左室の仕事量はそれだけ増加する一方、肺循環が確立し、右室は仕事量や成長の面ではほぼ平衡に達する時期と考えられる。すなわち左室の心筋細胞の容量が増加するためのDNA合成と考えられる。

100日齢以後の成熟期では左室壁及び心室中隔左室側の心内膜下にごく少数のDNA合成を認める細胞があった。心臓の張力は左室心内膜下が最も大きく、右室や左室心外膜側は小さいと思われる。したがって、成熟期のDNA合成は強い張力がかかる部位にのみみられることが明らかとなった。心臓に生理的な範囲を越える強い負荷が加わると、その反応として心筋の肥厚が生じることが実験的に知られている。これは細胞レベルでみると心筋細胞の肥大や多倍体化によるものであることが明らかにされているが、肥大や多倍体化が生じるにはDNA合成が不可欠である。これらの現象は今明らかになされた成熟期にみられるDNA合成が増幅された結果であるとも考えられた。

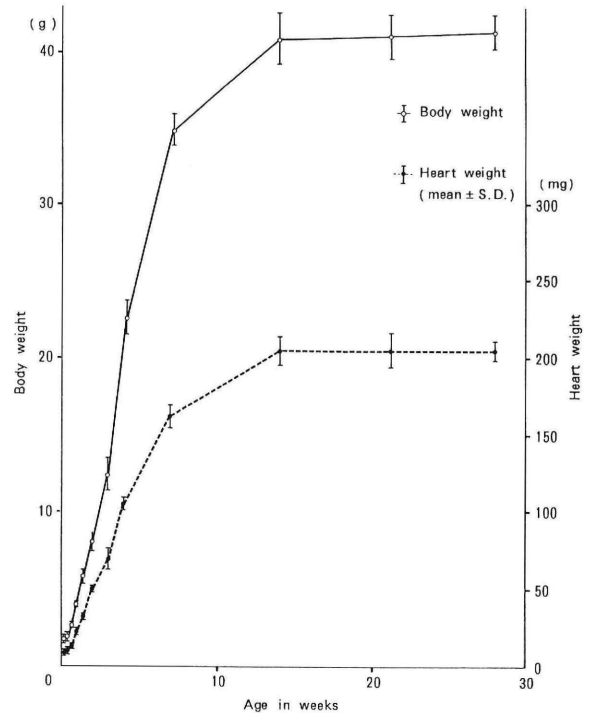


図3 マウスの体重と心重量の増加曲線。生後1週から7週にかけて急激な増加がみられ、14週頃からプラトーに達する。

近年、モノクローナル抗体を用いた心筋ミオシンのアイソザイムの検索が行なわれ、ATP ase 活性の異なる2つのタイプ(α , β)が存在し、これらが容易に変換されるということが報告された^{3)~8)}。この変換は、個体発生から成長の過程で観察されること⁷⁾⁸⁾、また、ラットで実験的に作製した圧負荷により生じる心筋の肥厚とよく相関すること⁷⁾⁸⁾が明らかにされている。圧負荷心におけるこの様なミオシンアイソザイムの変換はATP ase 活性を低くすることによりエネルギー効率を改善するための適応として説明されている。一方、成長過程でのミオシンアイソザイムの変換については種々の因子が関与していると考えられてはいるがまだ明らかにされていない。しかしラット心筋で α タイプミオシンの存在する部位とマウス心筋でDNA合成が全くみられない部位とが比較的よく一致している様に思われる。マウス心筋細胞のDNA合成は、成長にともないその循環動態の変化をはじめとする環境の変化に適応すべく部位毎で異なることが今回の研究の結果から明らかとなったが、ラット心筋でのミオシンアイソザイムの変換も環境の変化に対する適応の一つの

結果であるのかもしれない。

成長にともなうマウス心筋細胞のDNA合成を心臓の部位毎に検討しその意義について考察したが、成熟期にみられるDNA合成は、すべての心筋細胞が細胞動態的に安定した状況、すなわち細胞周期でいうGo期にあることを意味するのではなく、肥大や多倍体化をおこす可能性を示しているものと推測された。

文 献

- 1) 中川雅生, 清沢伸幸, 楠 智一, 浜岡建城, 高松哲郎, 服部隆則: 心筋細胞の生後のDNA合成能. 医学のあゆみ, 134: 191—192, 1985.
- 2) 中川雅生, 浜岡建城, 清沢伸幸, 楠 智一, 服部隆則: 心筋細胞の成長に関する研究—³H-thymidine autoradiographyによる生後のDNA合成能—. 心筋の構造と代謝, 7: 133—134, 1985.
- 3) Hoh, J.F.Y., McGrath, P.A. and Hale, P.: Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin; effects of hypophysectomy and thyroxine replacement. J. Mol. Cell. Cardiol., 10: 1053—1076, 1978.

- 4) Tsuchimochi, H., Kuro-o, M., Takaku, F., et al.: Expression of myosin isoenzymes during the developmental stage and their redistribution induced by pressure overload. Jpn. Circ. J., 50: 1044—1052, 1986.
- 5) 矢崎義雄, 小室一成, 倉林正彦, 土持英嗣: 心筋ミオシンを指標としたヒト心筋病態生理の解析. 心臓, 19: 1474—1482, 1987.
- 6) Bernard Nadal-Ginard (倉林正彦, 他訳) 発生および肥大心における遺伝子発現の調節機序. 心臓, 19: 1467—1473, 1987.
- 7) Gorza, L., Pailletto, D., Pessina, A.C., Sartore, S. and Schiaffino, S.: Isomyosin distribution in normal and pressure overloaded rat ventricular myocardium. An immunohistochemical study. Circ. Res., 49: 1003—1009, 1981.
- 8) Mercadier, J.J., Lompre, A.M., Wisnewsky, C., Samuel, J.L. Bercovici, J., Swynghedauw, B. and Schwartz, K.: Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. Circ. Res., 49: 525—532, 1981.

Distribution of DNA-Synthesizing Cardiomyocytes in Mice —Alterations with Growth—

Masao Nakagawa¹⁾, Kenji Hamaoka¹⁾, Takanori Hattori²⁾ and Tadashi Sawada¹⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Kyoto Prefectural University of Medicine

²⁾Department of the 1st Pathology, Fukui Medical College

Autoradiographic examinations were performed on various aged mice to determine the distribution of DNA-synthesizing cardiomyocytes.

In the first 2 weeks after birth, cardiomyocytes were observed to synthesize DNA actively, all over the heart muscle cells and it may have contributed to the increase in the cell number.

Thereafter, the number of DNA-synthesizing cardiomyocytes decreased abruptly, and in the 100-day-old mouse heart, they could be seen only in the subendocardial muscles of the left ventricle. In mature mice no cardiomyocytes synthesizing DNA were discovered in heart muscles of the right ventricle or the subepicardium of the left ventricle.

The distribution of DNA synthesizing cardiomyocytes was shown to alter with growth, which could well reflect an alteration in circulatory conditions.