

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16505

研究課題名(和文) 3アドレナリン受容体は敗血症の心筋代謝障害及び予後を改善する治療標的となるか?

研究課題名(英文) The Beta-3 adrenergic receptor has a possibility to improve the mortality with sepsis-induced cardiac dysfunction by regulating cardiac metabolism.

研究代表者

川口 哲 (KAWAGUCHI, SATOSHI)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：60814217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、敗血症マウスモデルにおいて、3アドレナリン受容体(3AR)遮断薬を投与する事で、心機能障害および生存率を改善する事を証明した。敗血症における過剰な誘導型NOS(iNOS)や一酸化窒素(NO)は、心筋エネルギー代謝障害を引き起こす。3AR遮断薬は、敗血症性心不全における脂肪酸代謝障害、ミトコンドリア機能障害を改善し、心筋ATPを改善した。さらに、3ARは、独自のiNOS調節機構を有しており、3ARから生じるiNOS、NOをレギュレーションする事で、敗血症の心機能障害を抑制できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症敗血症の死亡率は高く、その主な合併症として敗血症性心機能障害が挙げられるが、その治療法はわかっていない。敗血症の心機能障害は、過剰な誘導型NOS(iNOS)や一酸化窒素(NO)による、ミトコンドリア機能障害、心筋エネルギー代謝不全が原因と考えられている。本研究では、敗血症マウスに3アドレナリン受容体遮断薬をする事で、敗血症の心筋エネルギー代謝を改善し、その生存率を改善する事を証明した。3受容体は、iNOSやNOの発生に関わっており、敗血症性心不全の治療ターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we demonstrated inhibition of beta3 adrenergic receptor (3AR) improved cardiac dysfunction and mortality in a cardiac dysfunction model of septic mice. It is known that excess induce nitric oxide synthase (iNOS) and nitric oxide (NO) impair cardiac metabolism in sepsis and 3AR is associated with NO generation. Blockade of 3AR improved fatty acid oxidation and mitochondrial synthesis for ATP in failing hearts in sepsis. In addition, our results suggested that 3AR had a particular pathway to generate iNOS and NO in septic hearts. 3AR may be a metabolic target in septic heart failure.

研究分野：救急、循環器

キーワード：敗血症 敗血症性心機能障害 3アドレナリン受容体 心筋エネルギー代謝 iNOS NO

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症は全身性の炎症反応であり、重症化すると致命的である。特に、近年は高齢者が急増している事もあり、その罹患率や死亡率も増加している。敗血症における心機能障害は重症合併症の一つであり、重症敗血症の20-60%に合併し予後不良である。敗血症における心機能障害は、心筋脂肪酸代謝障害およびミトコンドリア機能障害による心筋 ATP の枯渇と考えられているが、その治療方法はわかっていない[1]。一方、 β_3 アドレナリン受容体 (β_3 AR) は正常心筋にはほとんど存在していないが、心不全心筋で増加することが知られている[2]。近年の報告によれば、 β_3 AR 刺激薬が一酸化窒素合成酵素 (NOS) や一酸化窒素 (NO) を増加させ、慢性心不全を改善するとされている [3]。また、 β_3 AR は脂質分解作用を有することから、脂肪酸エネルギー代謝とも関係すると考えられる。しかし、これまでの研究で、敗血症性心不全における β_3 AR の役割、心筋エネルギー代謝との関係についての報告はほとんど存在しない。

2. 研究の目的

本実験では、マウスにリポポリサッカロイド (LPS) を腹腔内注射する事で敗血症モデルを作成し、その後に β_3 AR 刺激薬・遮断薬を投与して、その生存率や心筋エネルギー代謝機構にどのような影響をもたらすかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 敗血症マウスモデルの作成

8-10 週令の C57B1/6 マウスに LPS 10mg/kg を腹腔内注射し、敗血症モデルを作成した。その3時間後に、敗血症マウスを3群に分け、生理食塩水 250 μ L (NS 群)、選択的 β_3 AR 刺激薬の CL316243 1mg/kg (CL 群)、選択的 β_3 AR 遮断薬の SR59230A 1mg/kg (SR 群) を腹腔内注射した。また、初回の LPS 腹腔内注射を生理食塩水 250 μ L とするコントロール群 (CT 群) を作成し、各4群間での比較を行った (各群10匹ずつ)。

(2) 生存率及び心機能評価

各群における LPS 投与直後から24時間後までの死亡率を評価した。また、LPS 投与前、LPS 投与6、12、24時間後について、各群での生存マウスを心エコー図法で評価した。心機能評価項目として、%left ventricular fractional shortening (%LVFS)、left ventricular ejection fraction (LVEF)、heart rate (HR) を経時的に観察した。

(3) 心筋組織における分子生物学的学評価

LPS 投与12時間後に各群のマウスの心臓を摘出し、qPCR 法およびウエスタンブロット法により、左室心筋の β アドレナリン受容体 (β_1 , β_2 , β_3)、心筋 ATP 産生関連因子、iNOS および内皮型 NOS (eNOS) の遺伝子・蛋白発現を評価した。また、心筋 ATP 量をルシフェラーゼ光学活性法により測定した。さらに、心筋 NO 量を測定キットを用いて比色法により測定した。

(4) ミトコンドリア蛋白の評価

ミトコンドリア抽出キットにより、心筋組織からミトコンドリア抽出を行った。その後、抽出ミトコンドリア蛋白より、electron Transport Chain (ETC) complex I-V 蛋白をウエスタンブロット法で評価した。

(5) 組織学的評価

各群の摘出心筋より組織標本を作成し、oil red O 染色、Cyclooxygenase1 (COX1) の免疫染色、電子顕微鏡を用いての組織学的評価を行い、比較検討した。

4. 研究成果

(1) 生存率

LPS 投与 24 時間後、SR 群の生存率は 100%であった。一方、NS 群の生存率 60%に対して、CL 群は 20%と生存率は悪化した(図 1)。

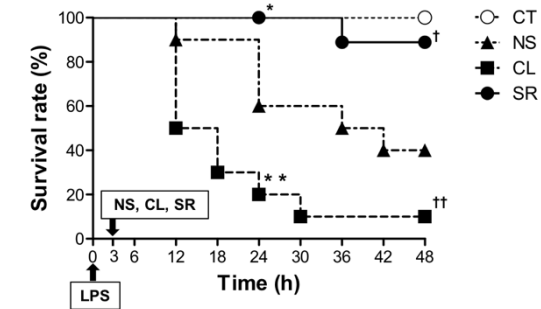


図 1. 各群における生存率

(2) 心機能への影響

LPS 投与 6 時間後に心機能は最も低下し、NS 群は%LVFS, $24.5 \pm 3.6\%$ 、LVEF, $47.1 \pm 6.2\%$ であった。これに対し、SR 群は有意に心機能が改善 (%LVFS, $32.5 \pm 6.4\%$ 、LVEF, $62.3 \pm 9.7\%$) し、CL 群では有意に心機能が悪化 (%LVFS, $19.4 \pm 5.9\%$ 、LVEF, $24.5 \pm 3.6\%$) した。その後、各群とも時間経過で改善し、24 時間で正常化した(図 2)。

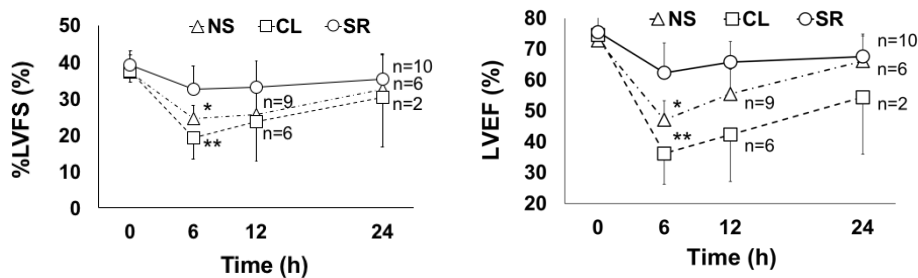


図 2. 心エコー評価

(3) β アドレナリン受容体の発現

β_1 アドレナリン受容体は、CT 群と比較し各群で有意に低下していた(図 3A)。一方、 β_2 アドレナリン受容体は各群で有意差を認めなかった(図 3B)。 β_3 アドレナリン受容体は、CT 群と比較し各群で有意に増加しており、各群での発現に有意差を認めなかった(図 3C)。

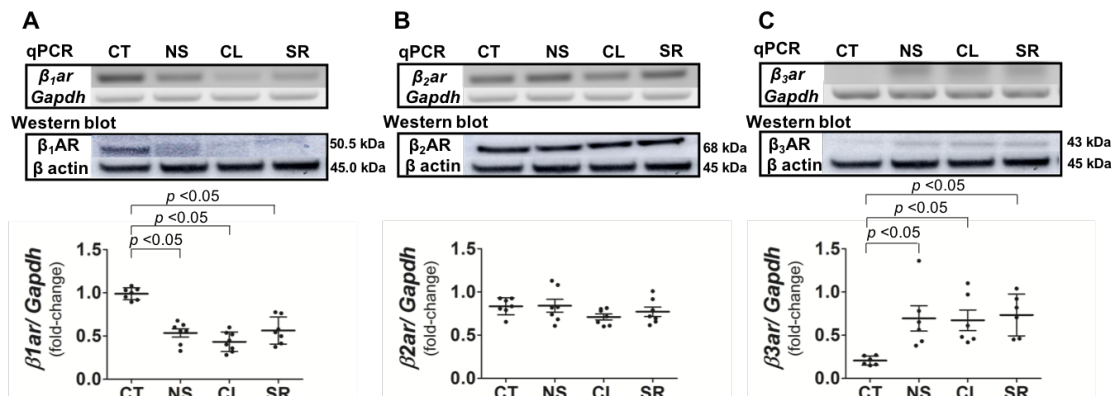


図 3. 敗血症モデルにおける β アドレナリン受容体の発現

(4) 心筋エネルギー代謝への影響

心筋ATP量は、NS群、CL群で有意に低下し、SR群はCT群と同等レベルで維持されていた(図4)。心筋ATP産生関連遺伝子として、脂肪酸代謝およびミトコンドリア生合成に関わるPGC1 α 、ERR α 、PPAR α は、SR群において、NS群およびCL群と比較し発現が高く維持されていた。また、脂肪酸の細胞内輸送蛋白であるCD36は、全群において有意差を認めなかった。一方、ミトコンドリア内への脂肪酸輸送に重要なCPT1は、SR群で有意に発現量の増大を認めた。また、糖代謝に関わるGLUT4はSR群で有意に増加し、PDK4はSR群で有意に低下していた(図5)。

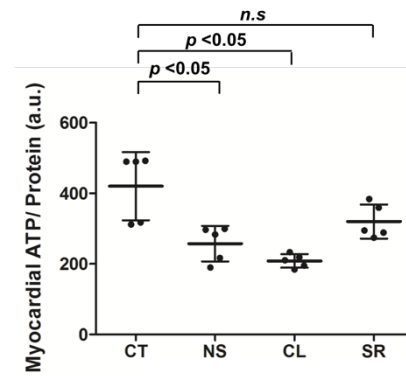


図4. 心筋ATP評価

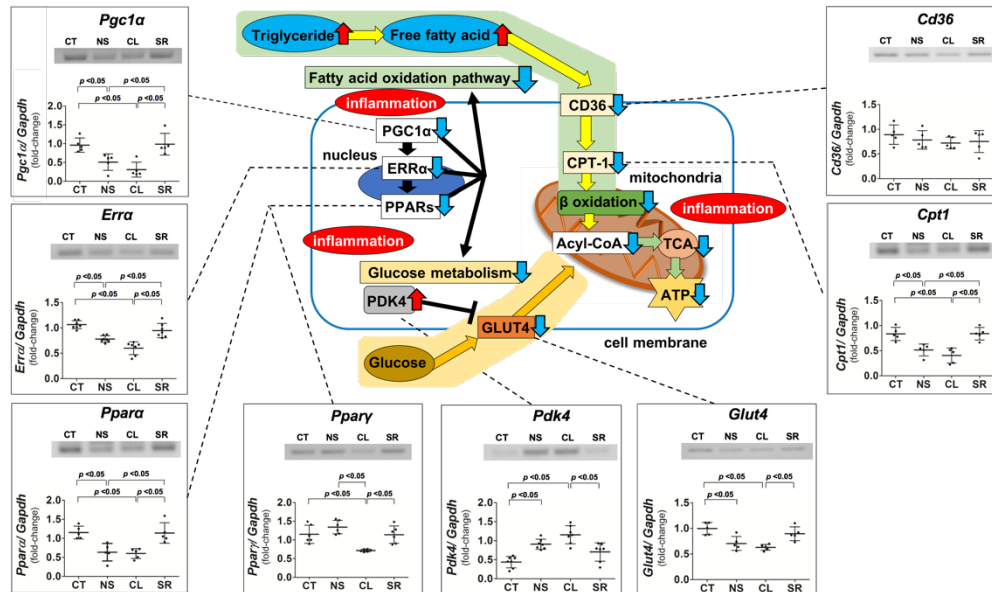


図5. 各群における敗血症心筋のエネルギー代謝調節因子の発現

(5) ミトコンドリア蛋白の評価心筋

ミトコンドリア抽出後のETC complex I-V蛋白の発現は、CT群と比較し、NS群、CL群で有意に低下していた。一方、SR群では、CT群と同等に発現が維持されていた(図6)。

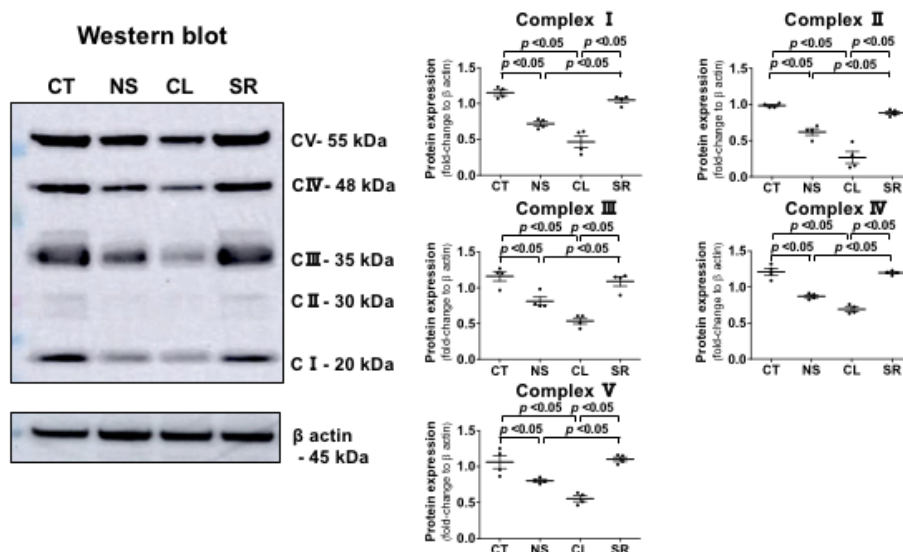


図6. 各群におけるETC complex I-V蛋白の発現

(6) 心筋 NOS および NO 量の評価

iNOS の発現は、NS 群、CL 群で増加し SR 群で有意に低下した (図 7A)。一方で、eNOS の発現は、各群間で有意差を認めなかった (図 7B)。NO 産生量は、NS 群で増加し CL 群ではさらなる増加を認めた。一方、SR 群では有意に NO 産生が抑制された (図 8)。

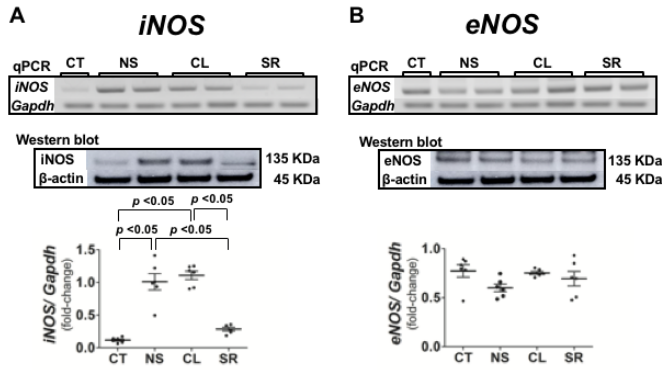


図 7. 各群における eNOS、iNOS の発現

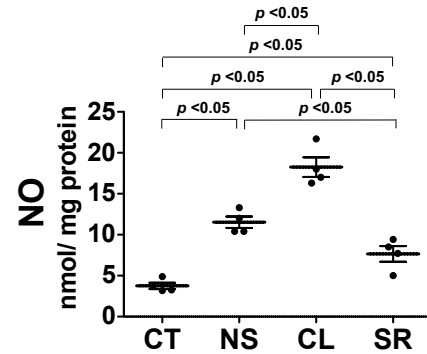
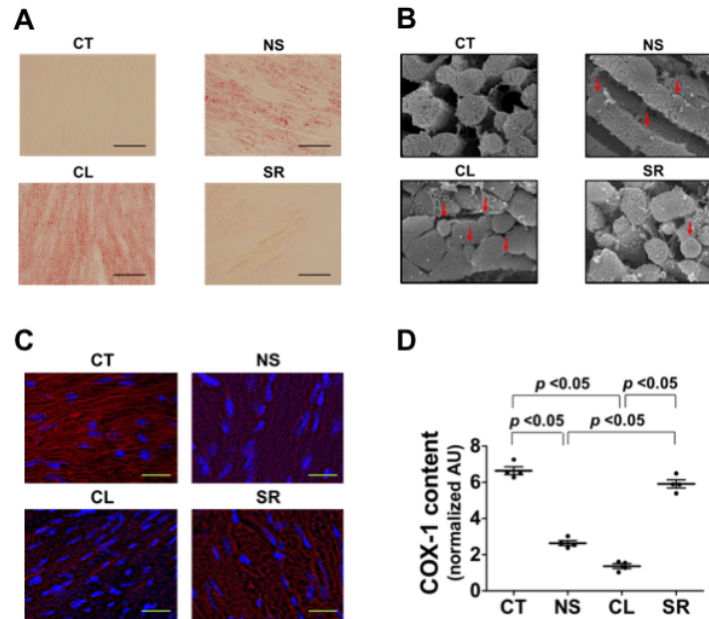


図 8. 各群における NO の発現

(8) 病理組織

Oil red O 染色では、NS 群の心筋細胞に多くの脂肪滴の沈着を認め、CL 群ではさらに多量の脂肪沈着を認めた。一方で、SR 群はほとんど脂肪滴を認めなかった (図 9A)。また、電子顕微鏡においても、NS 群、CL 群で多量の脂肪滴を認めた (図 9B)。また、COX1 免疫染色において、COX1 活性は NS 群、CL 群では有意に低下し、SR 群では高く維持されていた (図 9C, D)。



<引用文献>

[1] Drosatos K, Khan RS, Trent CM, Jiang H, Son NH, Blaner WS, Homma S, Schulze PC, Goldberg IJ. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation prevents sepsis-related cardiac dysfunction and mortality in mice. *Circ Heart Fail* 6: 550-562, 2013.

[2] Cannavo A, Koch WJ. Targeting β 3-Adrenergic Receptors in the Heart: Selective Agonism and β -Blockade. *J Cardiovasc Pharmacol* 69:71-78, 2017.

[3] Niu X, Watts VL, Cingolani OH, Sivakumaran V, Leyton-Mange JS, Ellis CL, Miller KL, Vandegaer K, Bedja D, Gabrielson KL, Paolocci N, Kass DA, Barouch LA. Cardioprotective effect of beta-3 adrenergic receptor agonism: role of neuronal nitric oxide synthase. *J Am Coll Cardiol* 59: 1979-1987, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawaguchi S, Okada M, Ijiri E, Koga D, Watanabe T, Hayashi K, Fujita S, Hasebe N	4. 巻 318
2. 論文標題 3 adrenergic receptor blockade reduces mortality in endotoxin-induced heart failure by suppressing induced nitric oxide synthase and saving cardiac metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H283-H294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1152/ajpheart.00108.2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Satoshi Kawaguchi, Motoi Okada, Satoshi Fujita, Naoyuki Hasebe
2. 発表標題 Beta-3 adrenergic receptor blockade reduces mortality with septic cardiomyopathy by saving cardiac energy metabolism and mitochondrial function
3. 学会等名 5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM NEW FRONTIERS in CARDIOVASCULAR RESEARCH (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Kawaguchi, Motoi Okada, Satoshi Fujita, Naoyuki Hasebe
2. 発表標題 The Blockade of Beta-3 Adrenergic Receptor Improves Prognosis of the Sepsis-Related Heart Failure by Stabilization of the Heart Metabolism
3. 学会等名 第82回日本循環器学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Kawaguchi, Motoi Okada, Satoshi Fujita, Naoyuki Hasebe
2. 発表標題 Myocardial Metabolic Regulation by the Beta-3 Adrenergic Receptor in Sepsis
3. 学会等名 The European Society of Cardiology congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Kawaguchi、Motoi Okada、Naoyuki Hasebe、Satoshi Fujita
2. 発表標題 Blockade of beta-3 adrenergic receptor ameliorates septic cardiomyopathy through the improvement of cardiac fatty acid oxidation
3. 学会等名 31st European Society of Intensive Care Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Kawaguchi、Motoi Okada、Satoshi Fujita、Naoyuki Hasebe
2. 発表標題 Endotoxin Induced Cardiac Metabolic Shift is Controlled Through the Regulation of Fatty Acid Oxidation by a Beta-3 Adrenergic Receptor
3. 学会等名 American Heart Association 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Kawaguchi、Motoi Okada、Satoshi Fujita、Naoyuki Hasebe
2. 発表標題 Cardiac Metabolism was Improved by Regulation of Nitric Oxide Synthase Through The Beta-3 Adrenergic Receptor in Endotoxin-induced Failing Heart
3. 学会等名 American Heart Association 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----