

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590803  
 研究課題名（和文） 拡張不全型心不全の分子機構における Rho キナーゼ経路の関与の解明  
 研究課題名（英文） Long-term Inhibition of Rho-kinase Ameliorates Diastolic Heart Failure in Hypertensive Rats  
 研究代表者 福本 義弘 (FUKUMOTO YOSHIHIRO)  
 東北大学・病院・講師  
 研究代表者番号：70363372

## 研究成果の概要：

慢性心不全は、現在増加傾向にある心臓病終末像であり、中でも左室拡張障害・心筋細胞の硬化・心室線維化を特徴とする拡張不全型心不全に対する薬物療法は確立されていない。

本研究では、心筋拡張障害・心室線維化における Rho キナーゼ経路の分子機構の解明および拡張不全型心不全における治療としての Rho キナーゼ阻害の検討を行い、心筋拡張障害・心室線維化における Rho キナーゼ経路の分子機構の解明、拡張不全型心不全における治療としての Rho キナーゼ阻害の検討を行った。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：慢性心不全、拡張不全、Rho キナーゼ、心筋拡張障害、心室線維化

## 1. 研究開始当初の背景

心不全は長らく、心臓収縮性が障害されかつ心拡大と関連した病態と見なされてきた。しかしながら、これまでの多くの研究により心不全は、とりわけ高血圧性心疾患のような心臓収縮性が保たれた患者においても発症してくる事が分かってきた。このような状態は、いわゆる収縮不全に対して拡張不全と称されている。現在では、拡張不全は心不全症状のある患者のおよそ半数を占め、かつその予後も収縮不全と同等に不良である事が分かって

きている。左室拡張機能障害を規定する主な因子としては、増大した心筋のスティッフネスと延長した弛緩が挙げられる。この内、心筋のスティッフネスは心筋間質の線維化や左室肥大などにより規定されるものであり、代償性の左室肥大から心不全症状を伴う拡張不全への進行において重要な役割を果たす事が知られている。しかしながら、拡張不全に至る詳細なメカニズムは未だ不明なままであり、かつその有効な治療法も確立されていない状況である。

これまでの研究で、生後7週齢から8%の高食塩食を投与されたダール食塩感受性高血圧ラットは高血圧性心疾患に起因する拡張不全の確立された動物モデルである事が報告されてきている。なぜなら、左室の拡大がなく左室収縮性が保たれているにもかかわらず、心不全症状を呈してくるためである。

Rho キナーゼは、血管平滑筋細胞においてその接着や増殖、あるいは過収縮といった機能において重要な役割を果たしている事が知られている。我々は、これまでの研究で Rho キナーゼ経路の活性化がマウス心筋梗塞後の左室リモデリングや、ラットのアンジオテンシンII 負荷モデルにおける心血管の肥大といった病態に関与している事を示してきた。しかしながら、Rho キナーゼ経路が拡張不全の病態に関与しているかどうかという点については未だ説明されておらず、また Rho キナーゼ経路の抑制が果たして拡張不全の病態を改善するのか否かといった点についても説明されていない。

## 2. 研究の目的

我々は本研究で、上述の確立された拡張不全の動物モデルであるダール食塩感受性高血圧ラットを用いて、高血圧性心疾患に起因する拡張不全およびその拡張機能障害の病態における Rho キナーゼ経路の役割について検討した。

## 3. 研究の方法

今回、我々は生後7週齢のダール食塩感受性高血圧雄ラットに8%の高食塩食投与を開始し、無作為に以下の3群に分け実験を行った；未治療の拡張不全群(DHF)、低用量ファスジル治療群(選択的Rhoキナーゼ阻害薬、30 mg/kg/day)および高用量ファスジル治療群(100 mg/kg/day)。その後17週齢まで10週間の介入を行った。週齢が同じコントロール群として、同じくダール食塩感受性高血圧雄ラットに実験期間を通して0.5%の普通食を投与した。収縮期血圧の測定は、tail cuff systemを用いて2週間毎に行った。また、低用量および高用量のファスジルの投与を行うために、予備実験の飲水量を参考に飲水中に含ませるファスジル濃度の調節を行った。さらに、我々はこれまでの研究で上記の用量のファスジルをラットに投与した際の血中濃度を測定し、その血中濃度がヒトに投与した場合の臨床的治療域に入る事を確認した。

心エコー検査は、7, 11, 13, 17週齢において10MHzのプロベを用いて施行した。実際の測定は、ケタミン塩酸塩(50 mg/kg, 腹腔内投与)とキシラジン塩酸塩(10 mg/kg, 腹腔内投与)による全身麻酔下に自発呼吸下で行った。左室乳頭筋レベルにおけるM-mode短軸像から、心室中隔壁厚(IVST)、左室後壁厚(LVPWT)、左

室拡張末期径(LVDd)および左室収縮末期径(LVDs)を測定した。左室内径短縮率(LVFS)は以下の計算式により測定した；

$LVFS = [(LVDd - LVDs) / LVDd] \times 100$ 。また、心尖部四腔断面像からカラードップラー法による僧帽弁流入血流の評価として、拡張早期血流波(E)、心房収縮期血流波(A)およびその比(E/A比)を測定した。

血行動態の評価として、17週齢の心エコー検査終了後同じく全身麻酔下に、2Fのミラーカテーテルを右総頸動脈から挿入し、逆向性に左室へ挿入した。得られた左室圧と心電図をコンピューターシステムに取り込む事により、左室拡張末期圧(LVEDP)、peak positive dP/dtおよびpeak negative dP/dt、さらには左室弛緩能の指標となる $\tau$  (タウ)の測定を行った。

心筋スティッフネスの定数(myocardial stiffness constant, MSC)として、左室圧の計測と心エコーでの左室M-modeの計測を同時に行う事により以下のように測定した。まず、左室壁局所にかかるwall stress( $\sigma$ )を以下の計算式により測定した； $\sigma = PD/4H$ 、ここでPは左室圧、Dは左室短軸径、Hは対象部位の壁厚を示している。そして、拡張期のwall stress( $\sigma$ )が最小となるポイントから拡張末期のポイントまでの間におよそ15ポイントプロットし、以下の指数関数式で近似する事により； $\sigma = C \exp[K \ln(1/H)]$ 、得られた定数Kを対象部位のMSCとして測定した。MSCは心室中隔(IVS)および左室後壁(PW)それぞれについて測定した。

上記の血行動態の評価が終了後、左室重量と肺重量をそれぞれ測定した。前者は左室肥大の指標であり、後者は左心不全に伴う肺うっ血の指標とした。その後左室乳頭筋レベル以下の心尖部側組織を10%ホルマリン溶液で24時間固定し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色とシリウスレッド染色を行った。HE染色により心筋細胞の横径(cross-sectional diameter, CSD)を測定し、またシリウスレッド染色からコンピューター解析法により心筋間質の線維化(percentage area of interstitial fibrosis)を定量化した。

残りの左室の一部を用いて、左室局所の1型コラーゲンと3型コラーゲンの発現をウエスタンブロッティング法により評価し、その比(collagen type I/III ratio)をコラーゲンのphenotypeのシフトの指標とした。

また、左室局所の酸化ストレスの評価のために残りの左室の一部から凍結切片を作製し、dihydroethidium(DHE)染色を行いコンピューター解析法により左室局所のスーパーオキシドの産生を定量化した。

左室局所のRhoキナーゼの活性を測定するため、Rhoキナーゼの器質となるERM (ezrin, radixin, moesin) familyのウエスタ

ンブロット法を行った。実際、リン酸化ERMとtotal ERMの発現をそれぞれの抗体で測定し、その比を左室局所のRhoキナーゼの活性と定義した。

#### 4. 研究成果

高食塩食を10週間投与された3つのDHF群では、17週齢においてコントロール群に比して顕著にかつ同程度の高血圧を呈した。

未治療のDHF群では、心エコー上コントロール群に比して11週齢から17週齢にかけて左室壁厚が進行性に増大した。これに対して高用量のファスジル投与群では左室壁厚の増大が有意に抑制された。また、LVdとLVFSは実験期間を通して4群間で有意差なく同程度であったが、この事は左室収縮性が4群全てで保たれていた事を示している。未治療のDHF群においては、E/A比が11週齢から13週齢にかけて一旦有意に低下し（遷延弛緩障害パターン）、その後17週齢において再び増加した（拘束性障害パターン）が、これは拡張不全の発症に伴うLVEDPの高度の上昇を示唆している。これに対して今回のファスジルによる治療は、前者の弛緩障害については改善効果を示さなかったが、最終的な17週齢での拘束性障害パターンへの移行を防ぐ効果を示した。

LVEDPは17週齢においてコントロール群に比して未治療のDHF群において有意に高かったが、ファスジル治療により有意に改善した。またpeak positive dP/dtは、左室収縮性の良い指標と考えられているが、4群間で同程度であった。この結果は上記の心エコーの結果と一致するものである。それに反して、peak negative dP/dtと $\tau$ はいずれも左室弛緩能の良い指標と考えられているが、コントロール群に比して未治療のDHF群で有意に障害されていた。そしてこれらの2つのパラメータに関しては今回のファスジル治療により改善効果は得られなかった。一方で拡張機能障害のもう一つの重要な規定因子である、心筋のステイフネス(MSC)は心室中隔と後壁の両方において未治療のDHF群で有意に増大していたが、ファスジル治療により用量依存的に改善した。この事はファスジルによる長期治療が心筋自体の硬さを改善した事を示している。

左室重量体重比および肺重量体重比の両方ともコントロール群に比して未治療のDHF群で増加しており、この事はDHFに伴う左室肥大とうっ血性心不全（肺水腫）の存在を示している。ファスジルによる治療は血圧に影響することなく、左室肥大および肺水腫の状態を有意に改善した。また、心筋細胞の横径(CSD)はコントロール群に比して未治療のDHF群において有意に増大していたが、これもまたファスジル治療により有意にかつ用量依存的に改善した。さらに、左室間質の線維化(percentage area of interstitial fibrosis)

もまた未治療のDHF群で有意に増加していたが、ファスジル治療により用量依存的に抑制された。

ウエスタンブロット法により評価した左室局所の1型コラーゲンと3型コラーゲンの発現の比(collagen type I/III ratio)は、コントロール群に比して未治療のDHF群では有意に増加していた。この事は拡張不全の進展に伴って左室局所においてコラーゲンのphenotypeが3型から1型へシフトした事を示している。これに対して、ファスジル治療群ではそのコラーゲンのphenotypeのシフトが有意に改善された。

次に、dihydroethidium (DHE)染色により評価した左室局所のスーパーオキシドの産生は、コントロール群に比して未治療のDHF群において有意に亢進していたが、ファスジル治療により有意に改善した。

さらに、左室局所のRhoキナーゼの活性は、コントロール群に比して未治療のDHF群において有意に亢進していたが、ファスジル治療により有意に改善した。重要な事として、左室局所のRhoキナーゼ活性と、心室中隔および左室後壁についてそれぞれ求めた心筋のステイフネス(MSC)との間に強い相関関係を認めた( $R=0.74$ , 左室後壁,  $R=0.63$ , 中隔,  $P<0.001$ )。この事は拡張不全の病態における局所のRhoキナーゼ活性と心筋の硬さとの密接な関係を示唆している。左室局所のRhoキナーゼ活性はまた、上記のDHE染色により得られた酸化ストレスの程度とも有意な相関関係を示した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Fukui S, Fukumoto Y, Suzuki J, Saji K, Nawata J, Shinozaki T, Kagaya Y, Watanabe J, Shimokawa H. Diabetes Mellitus Accelerates Left Ventricular Diastolic Dysfunction through Activation of Renin-Angiotensin System in Hypertensive. *Hypertension Research*. 2009 *in press*. 査読有

② Fukui S, Fukumoto Y, Suzuki J, Saji K, Nawata J, Tawara S, Shinozaki T, Kagaya Y, Shimokawa H. Long-term Inhibition of Rho-kinase Ameliorates Diastolic Heart Failure in Hypertensive Rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008 Mar;51(3):317-326. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

① 第73回日本循環器学会総会・学術集会  
大阪 平成21年3月22日(日)

Diabetes Mellitus Accelerates Left Ventricular Diastolic Dysfunction through Activation of Renin-Angiotensin System in Hypertensive Rats  
Shigefumi Fukui, Yoshihiro Fukumoto, Jun Suzuki, Kenya Saji, Jun Nawata, Kohichiro Sugimura, Yutaka Miura, Yutaka Kagaya, Hiroaki Shimokawa

②第73回日本循環器学会総会・学術集会  
大阪 平成21年3月21日(土) Plenary  
Session 4 (IHD)

Yoshihiro Fukumoto, Yutaka Miura, Shigefumi Fukui, Toshiro Miura, Masunori Matsuzaki, Kazunori Shimada, Yoshitaka Iwama, Atsutoshi Takagi, Hiroyuki Daida, Takaki Tsutsumi, Akira Yamada, Shintaro Kinugawa, Hiroyuki Tsutsui, Masanori Asakura, Hitonobu Tomoike, Hiroaki Shimokawa.

Current Status and Future Perspectives of Diastolic Heart Failure in Japan -Possible Importance of Metabolic Syndrome-

③第73回日本循環器学会総会・学術集会  
大阪 平成21年3月20日(金)

Evidence for Rho-kinase Activation in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension.

Doe Zhulanqigige, Yoshihiro Fukumoto, Aya Takaki, Shunsuke Tawara, Junko Ohashi, Makoto Nakano, Tomohiro Tada, Kenya Saji, Kohichiro Sugimura, Hiroshi Fujita, Yasushi Hoshikawa\*, Jun Nawata, Takashi Kondo\*, Hiroaki Shimokawa

④Scientific Sessions of the American Heart Association 2008, New Orleans, Nov 11, 2008

Evidence for Rho-kinase Activation in Patients with Pulmonary Hypertension  
Shigefumi Fukui, Yoshihiro Fukumoto, Jun Suzuki, Kenya Saji, Jun Nawata, Zhulanqigige Do. e, Yoshihiro Fukumoto, Aya Takaki, Shunsuke Tawara, Junko Ohashi, Makoto Nakano, Tomohiro Tada, Kenya Saji, Kohichiro Sugimura, Hiroshi Fujita, Jun Nawata, Yasushi Hoshikawa, Takashi Kondo, Hiroaki Shimokawa

⑤Scientific Sessions of the American Heart Association 2008, New Orleans, Nov 11, 2008

Diabetes Mellitus Accelerates Left Ventricular Diastolic Dysfunction through Activation of Renin-Angiotensin System in

Hypertensive Rats  
Shigefumi Fukui, Yoshihiro Fukumoto, Jun Suzuki, Kenya Saji, Jun Nawata, Kohichiro Sugimura, Yutaka Miura, Yutaka Kagaya, Hiroaki Shimokawa

⑥ESC Congress 2008, Munich, Sep 1, 2008

Diabetes mellitus exacerbates left ventricular diastolic dysfunction through activation of rennin-angiotensin system in hypertensive rats.

Shigefumi Fukui, Yoshihiro Fukumoto, Jun Suzuki, Jun Nawata, Koichiro Sugimura, Tsuyoshi Shinozaki, Yutaka Kagaya, Hiroaki Shimokawa

⑦第56回 日本心臓病学会学術集会、東京、平成20年9月10日

肺高血圧症患者における Rho キナーゼ活性の亢進

道額珠蘭其其格、福本義弘、縄田淳、田原俊介、中野誠、多田智洋、佐治賢哉、藤田央、星川康、近藤丘、下川宏明

⑧第56回 日本心臓病学会学術集会、東京、平成20年9月8日

パネルディスカッション2 肺高血圧の診断と治療の進歩

肺高血圧症における新たな分子治療標的：Rho キナーゼの重要性  
福本義弘、下川宏明

⑨第3回宮城循環器談話会 一般演題 仙台 平成20年5月31日

慢性心不全におけるメタボリックシンドロームの役割  
福本義弘

⑩第14回甲陵いずみ会 特別講演 仙台 平成20年5月27日

慢性心不全におけるメタボリックシンドロームの関与  
福本義弘

⑪第8回日本NO学会学術集会、仙台、平成20年5月10日

肺高血圧症患者に対する Rho キナーゼ阻害薬吸入療法の急性効果  
福本義弘

⑫第72回日本循環器学会総会・学術集会 福岡 平成20年3月29日(土)

Inhibition of Rho-kinase Ameliorates Diastolic Heart Failure in Hypertensive Rats.

Shigefumi Fukui, Yoshihiro Fukumoto, Jun Suzuki, Kenya Saji, Jun Nawata, Shunsuke

Tawara, Yutaka Kagaya, Hiroaki Shimokawa  
⑬第72回日本循環器学会総会・学術集会  
福岡 平成20年3月28日(金)

Diabetes Mellitus Accelerates Left  
Ventricular Diastolic Dysfunction through  
Activation of Renin-angiotensin System in  
Hypertensive Rats.

Shigefumi Fukui, Yoshihiro Fukumoto, Jun  
Suzuki, Kenya Saji, Jun Nawata, Yutaka  
Kagaya, Hiroaki Shimokawa

⑭Scientific Sessions of the American  
Heart Association 2007, Orlando, Nov 5,  
2007

Long-Term Inhibition of Rho-kinase  
Ameliorates Diastolic Heart Failure in  
Hypertensive Rats

Shigefumi Fukui, Yoshihiro Fukumoto, Jun  
Suzuki, Kenya Saji, Jun Nawata, Shunsuke  
Tawara, Tsuyoshi Shinozaki, Yutaka Kagaya,  
Hiroaki Shimokawa

⑮京都循環器フォーラム、京都、平成19年8  
月4日

動脈硬化：炎症と Rho キナーゼ  
福本義弘

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福本 義弘 (FUKUMOTO YOSHIHIRO)  
東北大学・病院・講師  
研究者番号：70363372

### (2) 研究分担者

下川 宏明 (Shimokawa Hiroaki)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：00235681

### (3) 連携研究者

なし