

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590820

研究課題名（和文）C型ナトリウム利尿ペプチドを用いた難治性心筋炎の診断・治療法の開発

研究課題名（英文）The new diagnosis and therapy of intractable myocarditis with C type natriuretic peptide

研究代表者

添木 武 (SOEKI TAKESHI)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：60393211

研究成果の概要：心筋炎に対するC型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）の効果とメカニズムの解明を行った。ラットの自己免疫性心筋炎モデルを作製し、2週間CNPまたは5%ブドウ糖液（対照群）の持続静注を行った。CNP投与群において心臓のリモデリングが抑制され、心機能の改善等がみられた。CNP投与群は対照群に比べ左室の線維化が有意に抑制され炎症スコアも低下していた。さらに、CNP投与群の心筋では、自己免疫性心筋炎の発症・進展に関わるとされるヘルパーT細胞のTh1系サイトカイン/Th2系サイトカインのバランスが改善していた。これらのことから、自己免疫性心筋炎に対する心保護薬としてCNPが有用である可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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：①循環器・高血圧 ②生理活性 ③薬理学 ④心臓病

1. 研究開始当初の背景

C型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）は1990年に分担研究者の寒川らによりブタ脳より発見されたペプチドホルモンであり、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）および脳性ナトリウム利尿ペプチドと類似構造をもつ。ANPやBNPが主に心臓より分泌されるホルモンとして血圧や体液量調節に関与するのに対し、CNPは当初、中枢神経系においてのみ

分泌される神経ペプチドと考えられていた。しかし、その後の研究により、CNPは血管内皮細胞、動脈硬化巣のマクロファージ、血管平滑筋細胞などから分泌されることが明らかにされ内皮由来血管弛緩因子として注目されるようになった。すなわち、血管内皮細胞から分泌されるCNPはinterleukin-1、transforming growth factor- β 、tumor necrosis factor- α などの炎症性サイトカイ

ンにより著明に増加し、これらサイトカインによる血管平滑筋細胞の増殖を強力に抑制することが報告されている。このように1990年代にはCNPは血管壁の局所因子として注目されていたが、心筋細胞におけるCNPの発現が非常に少ないことなどから心臓での作用については不明であった。

2000年代に入り、申請者らは世界で初めて、CNPの心臓での作用をin vitro並びにin vivoの両面から検討した。すなわち、CNPが培養ラット心線維芽細胞から分泌され、その受容体(B型ナトリウム利尿ペプチド受容体;以下NPR-B)は心線維芽細胞だけでなく心筋細胞にも発現していること、心線維芽細胞の増殖並びにコラーゲン合成をANP、BNPよりも強く抑制し心筋細胞の肥大抑制作用を有することを報告した(Endocrinology 2003;144:2279-84)。さらに、CNPの投与が心筋梗塞ラットの残存心筋における間質の線維化と心筋肥大を著明に抑制し、心筋梗塞後の心臓リモデリングの進展を抑えることを初めて明らかにした(J Am Coll Cardiol 2005;45:608-16)。また、心筋梗塞後、内因性のCNP発現は心臓線維芽細胞において著明に増加しており、内因性のCNPがオートクライン、パラクライン的に心臓リモデリングを抑制していることを示した。

しかしながら、急性心筋梗塞に対するCNPの臨床応用に関しては、冠血行再建術という劇的効果を有する治療法が確立されていることからCNPは補助的な薬剤として期待されるにとどまっている。これに対し、急性心筋炎は死亡率が約10%と言われており予後不良であるにもかかわらず、未だ確立された根本的治療法がない疾患である。また、急性心筋炎急性期～亜急性期の病理学的特長は多数の大小単核細胞の浸潤、間質の浮腫あるいは細線維増加、心筋間質の線維化などがあげられ、上記のようなCNPの特徴を考えると、本疾患に対するCNPの効果が期待される。さらに、CNPは肺においても強い抗炎症作用を持つことが最近報告されており、心臓での抗炎症作用についても期待できる。このようなことから、本研究では、難治性心筋炎に対するCNPの効果を検討し、そのメカニズムを解明することを最大の目的とする。さらに、将来的な臨床応用を視野に、心筋炎をはじめとするヒト心臓病における血漿CNP濃度を調べることにより、CNPの診断的有用性についても検討する。

2. 研究の目的

ラットの自己免疫性心筋炎モデルを用いて、心筋炎における心臓でのCNPの病態生理学的意義を検討する。まず、CNPおよびその受容体(NPR-B)の遺伝子およびタンパク

の発現量と局在を調べる。次に、心筋炎モデルにCNPを投与しその効果を検討するとともにメカニズムの解明を行う。特にCNPの抗炎症作用に注目して研究を行い、難治性心筋炎に対する新しい治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

劇症型を呈しやすいと報告されている自己免疫性心筋炎モデルを対象とする。9週齢Lewisラットの後肢掌に精製ブタミオシンを皮下投与する。すなわち、第0日に、ブタ心筋ミオシン3mg相当量をLewisラットの下肢に皮下注射し免疫化させ、第7日にも同様の操作を行い、計6mgのミオシンを投与した。ミオシン感作後2から3週目に自己免疫性心筋炎(ヒトにおける巨細胞性心筋炎に相当)が発症したラットを対象とする。

1) 心筋炎における心臓CNPの病態生理学的意義の検討

定量PCR法により本モデルにおける心臓でのCNP並びにその受容体(NPR-B)の発現を調べる。さらに、免疫組織化学(Santa Cruz Biotechnology社の抗CNP-53抗体を使用)を用いてCNPとNPR-Bの心臓内での局在を検討する。

2) 心筋炎に対するCNPの効果とメカニズムの解明

まず、本モデルに対し心臓超音波検査(ラット・マウス用の12MHzプローブを使用)を行い、ベースラインの心機能を評価する。次に、浸透圧ミニポンプ(Alzet社2002/2004)を用いて $0.1\mu\text{g/kg/min}$ のCNPを持続静注するかまたは5%ブドウ糖液の持続静注を2~4週間行う。その後、超音波による心機能並びに形態の評価を行い、心臓カテーテルによる心内圧の測定を行う(AD Instruments社製PowerLab systemを使用)。安楽死処置後心臓を摘出し、Hematoxylin-eosin染色により炎症の程度をスコア化する。次にSirius Red染色により形態学的コラーゲン密度を定量する。また、線維化関連因子(collagen1&3, transforming growth factor- β 1等)、炎症関連因子(macrophage inflammatory protein-1 α , tumor necrosis factor- α 等)あるいは心不全関連因子(ANP)の遺伝子発現を定量PCR法(Applied Biosystems 7500)により解析する。また、自己免疫性心筋炎の発症・進展には1型ヘルパーT細胞(Th1)が関与し治癒には2型ヘルパーT細胞(Th2)が関与しているとされており、それらに関連したサイトカイン(Th1: interferon- γ , interleukin-2; Th2: interleukin-4, interleukin-10)についても詳しく調べる。

4. 研究成果

1) 心筋炎における心臓 CNP の病態生理学的意義の検討

Lewis ラットにブタ心筋ミオシンを皮下注射し自己免疫性心筋炎モデルを作製し、定量 PCR 法により本モデルにおける心臓での CNP 並びにその受容体 (NPR-B) の発現を調べたところ、コントロール群に比し CNP および NPR-B の mRNA 発現量は増加傾向を示していた。

2) 心筋炎に対する CNP の効果とメカニズムの解明

20 匹の Lewis ラットを感作させ、浸透圧ミニポンプを用いて経静脈的に CNP を投与する群 (CNP 群、n=10) と、同様に 5% 糖液を投与する群 (Vehicle 群、n=10) の 2 群に分けた。ブタ心筋ミオシンに免疫化させることなくミニポンプの植込みのみを行う群 (Sham 群、n=10) を対照とした。心筋炎の 2 群はその後 2 週間 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の CNP または 5% ブドウ糖液の持続静注を行った。そして、心エコー、心カテーテル、形態学的コラーゲン密度定量により評価した。心エコー検査では、CNP 投与群において (対照群に対する) 左室径の拡大並びに左室内径短縮率の減少が有意に抑制されていた (図 1)。

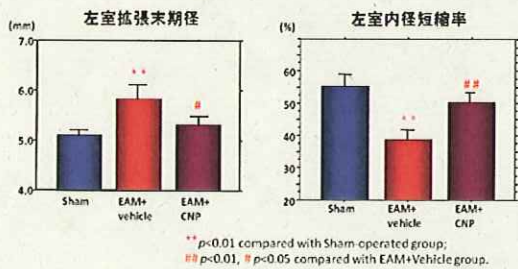


図1 心エコー図検査

また、CNP 投与により左室拡張末期圧の上昇が有意に抑制され (Vehicle 群 16.0 ± 1.6 vs CNP 群 11.3 ± 0.8 mmHg, $p < 0.05$)、dP/dt は増加していた。一方、CNP による血圧への影響は認められなかった (図 2)。

Sirius Red 染色による病理組織学的検討では、対照群に比し Vehicle 群では左室コラーゲン密度が著明に増加していたが、CNP 群は Vehicle 群に比べ左室コラーゲン密度が有意に減少していた (図 3)。また、Hematoxylin-eosin 染色による炎症スコアは CNP 投与群で有意に低下していた。

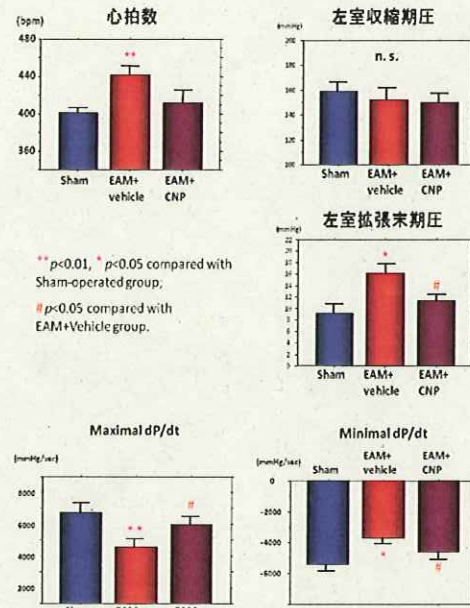


図2 血行動態

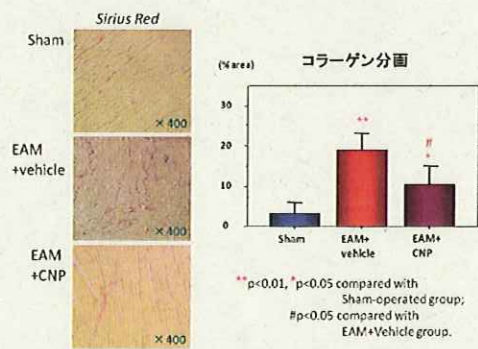


図3 自己免疫性心筋炎における線維化に対するCNPの効果

さらに、CNP 投与群の心筋では、Th1 系サイトカイン (IFN- γ 、IL-2) の mRNA の発現が減少し、Th2 系サイトカイン (IL-4、IL-10) の mRNA の発現が増加していた (図 4)。また、CNP 投与により MCP-1 および TNF α の mRNA 発現も減少していた (図 5)。

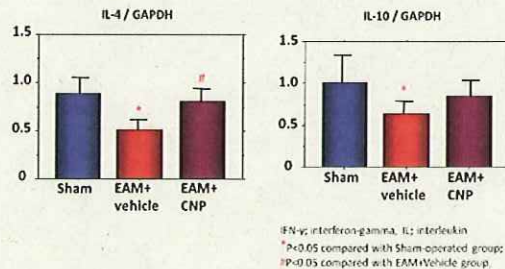


図4 自己免疫性心筋炎における遺伝子発現に対するCNPの効果 ~ Th サイトカイン ~

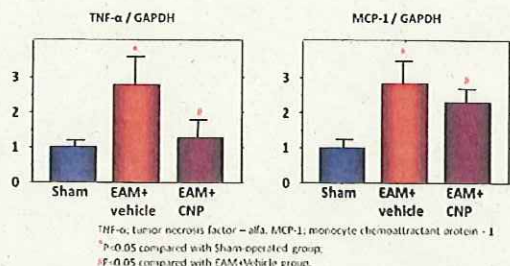


図5 自己免疫性心筋炎における遺伝子発現に対するCNPの効果
 ～他の炎症性サイトカイン～

本研究により、ラット自己免疫性心筋炎に対するCNPの保護作用の機序として、ヘルパーT細胞のTh1/Th2バランスの修飾や心筋線維化の抑制、抗炎症作用などの可能性が示された。これらのことから、難治性自己免疫性心筋炎に対する心保護薬としてCNPが有用である可能性が示唆された。

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 Soeki T, Kishimoto I, Schwenke DO, Tokudome T, Horio T, Yoshida M, Hosoda H, Kangawa K. Ghrelin suppresses cardiac sympathetic activity and prevents early left ventricular remodeling in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H426-32. (査読有)
- ② Kishimoto I, Tokudome T, Horio T, Soeki T, Chusho H, Nakao K, Kangawa K. C-type natriuretic peptide is a Schwann cell-derived factor for development and function of sensory neurones. *J Neuroendocrinol.* 2008. [Epub ahead of print] (査読有)

[学会発表] (計 1件)

- ① Soeki T, et al. C-type natriuretic peptide ameliorates the progression of experimental autoimmune myocarditis. *European Society of Cardiology Congress 2008* 2008. 9. 3 ミュンヘン

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

添木 武 (SOEKI TAKESHI)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 60393211

(2) 研究分担者

寒川賢治 (KANGAWA KENJI)

国立循環器病センター・研究所・所長

研究者番号: 00112417