

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300198

研究課題名（和文） 心障害モデルの運動療法と血管作動物質発現の関係の検討

研究課題名（英文） Expression of vasoactive substances in heart failure model of exercise therapy.

研究代表者

森 信芳（MORI NOBUYOSHI）

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50463790

研究成果の概要（和文）：心筋梗塞のラットに運動療法を行なった。心エコー法では非運動群に比べ運動群で左室駆出率の改善がみられた。体重あたりの湿肺重量、血漿 BNP が運動療法にて低下した。心不全の運動療法は心機能改善の可能性もあることが示された。心ではレニン・アンギオテンシン・アルドステロン系のひとつ、（プロ）レニンレセプターの mRNA 発現が亢進していることが確認され、運動療法の有効性の機序として（プロ）レニンレセプターの関与を検討した。

研究成果の概要（英文）：Exercise therapy was performed in rats with myocardial infarction. Improvement in echocardiography of left ventricular ejection fraction was observed in the exercise group compared to non-exercise group. Wet lung weight per body weight and plasma BNP level was decreased by exercise therapy. Exercise therapy of heart failure there is also the possibility of improvement of cardiac function has been shown. mRNA expression of (pro) renin receptor, one of the renin-angiotensin-aldosterone system, has been increased is confirmed. The mechanisms of the effectiveness of exercise therapy, was to investigate the influence of (pro) renin receptor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	7,300,000	2,190,000	9,490,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション医学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション 運動療法 心筋梗塞 心不全

1. 研究開始当初の背景

急性期医療、慢性期の維持治療の進歩により、慢性心不全患者の長期生存が可能となってきた。心不全は多くの心疾患、心負荷状態の終末像として見られる症候である。慢性心不全は急性増悪期には入院を余儀なくさ

れ、それ自体が症候を進行させることにより、急性増悪の頻度を増加させ、増悪時の回復までの期間も長くなる。身体活動の制限因子となり QOL 低下の原因ともなり、医療費上昇の一因ともなる。

リハビリテーション分野において広く取り

入れられてきた治療法の一つに運動療法がある。安定した慢性心不全患者の長期的な運動療法が運動時の下肢血流量の増加を介して運動耐容能を改善することを Sullivan らが示して以来(Circulation 1988)、心不全患者の運動療法とその末梢での効果が数多く報告されている。さらに適切な運動療法は心室リモデリングの抑制により心不全進展を抑制することが示唆されており、自律神経系の関与も示唆されている。運動療法は虚血性心疾患の一次予防および二次予防に有効であり、動脈硬化の進展抑制、退縮の可能性も注目されている。虚血性心疾患の運動療法に関しては冠危険因子の是正、生命予後の改善も得られている。末梢血管疾患の運動療法では、血管内皮機能障害の改善、歩行能力、有酸素運動能力低下の改善、筋代謝低下の改善がエビデンスとして示されている。心・血管疾患一般では運動療法による QOL の改善も示されており、運動療法は心臓・血管系いずれにも有効と考えられている。しかしながら、運動療法の有効性の機序に関しては十分な分析がなされていない。

近年、新たな血管作動物質が次々と発見されている。その中にはウロテンシン II (U II) および構造の類似したウロテンシン II 関連ペプチド (urotensin II -related peptide; URP) のように強力な血管収縮作用を示すものがある。いずれも U II 受容体に結合し、血管床により血管収縮に作用することもあり、また、内皮依存性の血管拡張物質を介して血管拡張に作用することもあることが確認されている。研究分担者により、U II は高血圧症や糖尿病等疾患に関連して血中・尿中濃度の変化が見られることが示されており (Peptides 2004(Totsune et al.)), Clin Sci 2003(Totsune et al.)), また培養細胞で、細胞増殖作用が認められることも示されている (Peptides 2003(Takahashi et al.))。ラットにおいては URP の方が U II に比べ発現量が多いと考えられている。URP はラットの種々の臓器で発現していることが確認され、申請者は心筋虚血心不全モデルラットの心において URP mRNA 発現が亢進していることを共同研究者として報告した (Peptides 2008(Nakayama et al.))。動脈壁のコレステロール蓄積への関与、自律神経系への作用も注目されている。最近、U II 受容体の拮抗薬が開発され、臨床での使用の期待が高まっている。

2. 研究の目的

心不全モデルラットにおける運動療法、薬物療法の有効性の機序として、血管作動物質の関与を仮定し検討する。

3. 研究の方法

心筋虚血心不全モデルラットを作成し、運動療法、薬物療法の効果をタンパクレベルあるいは遺伝子レベルにて検討する。

1. 病態モデルラットの作成

申請者らによる病態モデルラットの作成はすでに技術的に確立され、実験に供されている。心筋虚血心不全モデルはペントバルビタール Na 麻酔のもとに人工呼吸管理下での左開胸、心露出、心膜剥離、周囲心筋を含めた冠動脈結紮、閉胸によって作成する。死亡率は高く、手術結果にばらつきも大きい。経過中には心エコー法による評価、動物実験終了時には心重量/体重比、肺重量/体重比を測定し、採血を行い、血漿 BNP 濃度を測定し、重症の程度を総合的に判断する必要がある (Peptides 2008(Nakayama et al.)), Eur J Heart Fail. 2008(Hirose et al.))。心エコー法は当大学医学系研究科循環器内科所有の Toshiba 製エコーを借用して行う予定である。

偽手術群、偽手術後運動群、手術群、手術後運動群、手術後薬物投与群、手術後運動・薬物併用群の 6 群を設ける。

2. 運動療法

ラットの運動療法にはトレッドミルを用いる。トレッドミルは当教室所有の、傾斜・速度を自由に設定できる夏目製作所製のものを用いる。また、運動強度の測定には、呼気ガス分析試験を行うが、これにも当教室所有のものを利用する。運動量は、嫌気性代謝閾値レベル程度、あるいはより弱い強度にて、60 分間/回、1 回/日、5 日間/週、8 週間の設定で行う。

3. 薬物療法

薬物は確実な内服のために、水に溶解、あるいは懸濁して強制的に経ロゾンデにて内服させる。

4. 血圧測定

一部のラットを用いて、血管内にカテーテルを留置して、圧トランジューサを介した血圧測定を行う。変換された圧トランジューサの電圧データは当研究室所有の PowrLab を用いて記録する。

5. タンパク抽出、RNA 抽出

運動終了後 48 時間以上の時間をあけて、運動の急性期効果が弱くなってから、ラットの心組織の採取を行う。採取組織から血管作動物質、あるいはその受容体の発現を確認するための手技として、既に確立しているタンパクの抽出、RNA の抽出を行う。RNA の抽出には、GITC 法 (guanidinium isothiocyanate/cesium chloride method) を用いる。抽出したタンパクからは、ウェスタンブロット法により目標とするタンパク発現の有無の確認を、また同じ抗体を用いて、組織切片の免疫組織染色を行い、発現部位を確認する。抽出した RNA からは RT-PCR 法に

より mRNA の検出を行い、可能であれば半定量競合的 RT-PCR 法により発現量の多寡を評価する。また、ペプチドの受容体の発現について、ウエスタンブロット法、免疫組織化学、RT-PCR 法にて検討する。サーマルサイクラー、電気泳動装置などは当教室所有の機器を使用する。

4. 研究成果

直接ウエスタンブロット法によるラット可溶性 (プロ) レニンレセプターの検出を確立した。ELISA が確立していなかったため、これまでは免疫沈降法などを組み合わせて検出していたが、この方法により血中、尿中の可溶性 (プロ) レニンレセプターの検出、分子量確認が可能となった。第 14 回国際内分泌学会では (プロ) レニンレセプターの第一人者であるフランスの Genevieve Nguyen らと可溶性 (プロ) レニンレセプターの存在意義について意見を交わしている。その後 ELISA キットが数種発表されているが、そのキャラクターの検討が十分に行われたものはない。我々もサンドイッチ ELISA を現在作成中であるが、ELISA が確立するまでの間は本方法が研究の中心となっていることには変わりはない。

心筋虚血心不全モデルラットにおいて、心では (プロ) レニンレセプターの mRNA 発現が亢進していることが確認され報告した。変化は心房で 1.6 倍、右心室で 1.4 倍、非梗塞部で 1.6 倍、梗塞部で 1.7 倍であった。経過中トラブルによりサンプルを失い、新たに作成したが、サンプル数が不足したため、十分なデータではないが、血漿中の可溶性 (プロ) レニンレセプターは長期的な運動によって変化しない可能性があることがわかった。今後更なる検討が必要と考えられた。心筋梗塞部、非心筋梗塞部では心不全により (プロ) レニンレセプターのタンパク量は変化しない可能性も見られた。また運動療法による心での (プロ) レニンレセプター蛋白発現も変化が見られなかった。心筋梗塞による心不全ではタンパクの発現が時期的に変化する可能性も考えられ、心不全進展時期の 2~4 週間の時期の検討も行うべきであると考えられた。現在、(プロ) レニン受容体フォーラムなど国内外研究者の集まる機械での情報提供をしつつ、他施設と各種疾患モデルでの変化を評価、検討し合っている。

また、心筋梗塞後に心不全状態となっているラットに対する運動療法が、心エコー上の左室駆出率を改善し、血漿 BNP 濃度を低下させ、体重当たりの湿肺重量の低下をもたらす可能性が示唆された。今まで運動療法は末梢効果は証明されているが心への直接的な効果を示すデータは少なく、今後確認の上発表を予定している。その際、

calcitonin/calcitonin gene-related peptide family の血管拡張物質である Adrenomedullin、Adrenomedullin2 やその受容体、また血管収縮物質 Urotensin II や Urotensin II 関連ペプチドとその受容体なども評価を行っていきたい。

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 1 件)

(1) Takuo Hirose, Nobuyoshi Mori, Kazuhiro Totsune, Ryo Morimoto, Takahiro Maejima, Takuya Kawamura, Hirohito Metoki, Kei Asayama, Masahiro Kikuya, Takayoshi Ohkubo, Masahiro Kohzuki, Kazuhiro Takahashi, Yutaka Imai. Gene expression of (pro)renin receptor is upregulated in hearts and kidneys of rats with congestive heart failure. Peptides. 30: 2316-2322. 2009. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

(1) Mori Nobuyoshi, et al. Soluble Form of the (Pro) Renin Receptor in Plasma. 14th International Congress of Endocrinology. Kyoto, Japan. 26-30 March 2010.

(2) 川村卓也 他. (プロ)レニン受容体の遺伝子・タンパク質発現: 心不全モデルでの検討. 第 32 回 日本高血圧学会. 滋賀県大津市. 2009 年 10 月 1-3 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 信芳 (MORI NOBUYOSHI)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50463790

(2) 研究分担者

上月 正博 (KOHZUKI MASAHIRO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70234698

伊藤 修 (ITO OSAMU)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00361072

高橋 和広 (TAKAHASHI KAZUHIRO)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：80241628

戸恒 和人 (TOTSUNE KAZUHITO)
東北大学・薬学研究科・教授
研究者番号：80241628

金澤 雅之 (KANAZAWA MASAYUKI)
東北大学・医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：60282050

(3) 連携研究者

()

研究者番号：