

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 6 月 8 日現在

| | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 機関番号： | 34401 |
| 研究種目： | 基盤研究(C) |
| 研究期間： | 2009～2011 |
| 課題番号： | 21591806 |
| 研究課題名（和文） | ラットでの大動脈弁狭窄症術後肥大心筋の治癒過程の研究：エプレレノン投与は有用か？ |
| 研究課題名（英文） | Effects of mineralocorticoid receptor blockade on reverse remodeling of the left ventricle after pressure load reduction |
| 研究代表者 | |
| | 小澤 英樹 (Ozawa Hideki) |
| | 大阪医科大学・医学部・助教 |
| | 研究者番号： 20277156 |

研究成果の概要（和文）：ミネラルコルチコイド（アルドステロン）受容体拮抗薬（エプレレノン）1mg/kg/日の経口投与により無治療で残存する左心室求心性肥大形態は正常化し、拡張特性は無治療に比し改善した。エプレレノン投与群では無治療群に比し心筋細胞径と間質線維化が軽度であり mRNA の β/α ミオシン重鎖の比率と TGF- β 1 発現の正常化を伴った。無治療群でのミネラルコルチコイド受容体およびアンギオテンシン 1- α 受容体 mRNA 過剰発現がエプレレノン投与では正常化していた。

研究成果の概要（英文）：Eplerenone (EPL), a mineralocorticoid receptor blocker, accelerates reverse remodeling process from hypertrophy to normal in the left ventricle (LV) after after-load reduction in rat model of LV hypertrophy induced by transverse aortic constriction.

EPL ameliorated concentric hypertrophic morphology and impaired LV diastolic dysfunction remaining in the untreated LV. Histological examination showed less diameter of cardiomyocytes and interstitial fibrosis in EPL-treated LV along with less mRNA expression of β/α -myosin heavy chain ratio and TGF- β 1 when compared to un-treated LV. Moreover, EPL normalized the mRNA expression of mineralocorticoid receptor and angiotensin-1 α -receptor that were over-expressed in the untreated LV.

Blocking mineralocorticoid signaling may be an effective alternate treatment for residual LV hypertrophy and diastolic dysfunction after after-load reduction, such as aortic valve replacement.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2011年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| | | | |
| 総計 | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学系臨床医学・胸部外科学

キーワード：大動脈弁狭窄・左心室肥大・間質線維化・大動脈弁置換術・リモデリング・アルドステロン系・ミネラルコルチコイド受容体拮抗、エプレレノン

1. 研究開始当初の背景

(1) 大動脈弁狭窄によって生じた求心性左室肥大による心機能特に拡張障害は大動脈弁置換手術を契機に速やかに改善するものではない。多くの場合では大動脈弁狭窄解除（弁置換手術）後の肥大心では、著しい後負荷（圧力負荷）の消失により心筋細胞の断面積は速やかに正常化に向かうが、増大した細胞外基質の変化は時間を要する過程を経る。このため術後は心筋細胞が心筋全体に占める割合が減少し、結果として弾性が減少し拡張障害を中心とした心不全に陥ると説明される。

(2) 心機能の正常化には手術後長期間を要する場合や改善を期待できない場合がある。この肥大心の手術後の推移の研究は意外に少なく、簡便な臨床指標での改善の報告 (Schwartz F et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 1978;75:854-864) がある一方で、詳細な生理学的検討による他の報告では回復が否定されおり一定の見解がない。また分子生物学的・組織学的評価に至っての報告は皆無である。

事実多くの患者の大動脈弁置換術後の生活活動性の改善は遅く、薬剤介入によってこの改善を図る治療は存在していない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では慢性的求心性肥大左心室の圧力負荷解除後の心筋構築と心拡張機能の継時的変化を観察する。大動脈弁狭窄—解除を行うラットモデルを用いて病態を模倣し時間軸に沿って分析する。求心性肥大からの逆リモデリング過程において心筋機能障害の原因となる組織構築や分子生物学上の問題点が抽出し、適切な介入によってその問題点が解決可

能かどうかを探索する。

(2) 左室心筋の肥大過程においてアルドステロン系とレニン—アンギオテンシン系の賦活化の関与が明らかにされており、その抑制薬が肥大の程度とそれに伴う心機能低下を改善することが報告されている。しかしながら圧力負荷解除後の肥大心の変化の過程でのアルドステロン系とレニン—アンギオテンシン系の関与についての研究はない。現在降圧剤として臨床投与されるようになった選択性の高いアルドステロン受容体拮抗剤エプレレノンを逆リモデリング過程で投与し心筋構築と機能の回復を観察することでアルドステロン系の関与と同系の修飾が治療となりえるかについて検討する。

3. 研究の方法

(1) Adult ラット（雄、生後8-10 週）を用い、その大動脈弓部（右腕頭動脈と左総頸動脈の間）を外科的に絞扼し、後負荷（圧力負荷）を増加させることで左心室求心性肥大を誘導する。8週後に心肥大が誘導されていることを心臓超音波検査で確認ののち、絞扼を解除し（外科的に帯状の人工物を除去）圧力負荷を正常化させる。解除後を逆リモデリング過程と定め、その8週後に心臓超音波検査で心臓のサイズ、壁厚、心機能を測定する。また動物を犠牲死させ、心臓を摘出し後日の組織学的、分子生物学的解析を加える

(2) 測定項目

心臓超音波検査（心室形態、心機能）；左心室拡張・収縮末末期径、同拡張末期短/長軸径

比、同拡張末期および収縮末期後壁厚、同短軸収縮分画率、ドップラーエコー（左室流入、Tei-indexなど）

組織学的検査（心筋細胞サイズ、間質線維化）；HE 染色、Azan 染色

分子生物学的検査；各種細胞外伝達系タンパクまたはmRNA 発現測定、コラーゲン代謝マーカー測定（タイプIII プロコラーゲン-N-ペプチド）

(3) 実験群；

①Sham群—外科的大動脈を露出のみ、無治療

②Vehicle群—大動脈絞扼—解除、無治療

③エプレレノン治療群—解除、エプレレノン経口投与（1mg/kg/日）

各群10 個体ずつのデータが必要である。

4. 研究成果

(1) 心臓超音波検査 1—絞扼解除後 8 週での測定

| | Sham 群 |
|--------------|---------------|
| 左室駆出率, % | 73.4±6.2 |
| 左室後壁厚, mm | 14.7±0.11 |
| 左室拡張末期内径, mm | 7.86±0.20 |
| 左室短軸/長軸径比 | 1.00±0.04 |
| | Vehicle 群 |
| 左室駆出率, % | 79.2±7.1 |
| 左室後壁厚, mm | 1.61±0.17* |
| 左室拡張末期内径, mm | 7.77±0.24 |
| 左室短軸/長軸径比 | 0.73±0.05** |
| | エプレレノン群 |
| 左室駆出率, % | 73.4±8.9 |
| 左室後壁厚, mm | 1.53±0.10 |
| 左室拡張末期内径, mm | 7.93±0.23 |
| 左室短軸/長軸径比 | 0.92±0.09 † † |

平均値±標準偏差, *p<0.05 vs. Sham, **p<0.01 vs. Sham, †p<0.05 vs. Vehicle,

† †p<0.01 vs. Vehicle

心臓超音波検査 2(組織ドップラー法)

| | Sham 群 |
|-------------------|-----------------|
| 僧房弁輪速度拡張早期波, cm/s | 3.89±0.33 |
| 僧房弁輪速度拡張後期波, cm/s | 3.12±0.55 |
| 左室等容性収縮時間, ms | 16.1±2.3 |
| 左室等容性拡張時間, ms | 24.3±2.3 |
| 左室 Tei index | 0.48±0.04 |
| | Vehicle 群 |
| 僧房弁輪速度拡張早期波, cm/s | 3.02±0.41** |
| 僧房弁輪速度拡張後期波, cm/s | 3.98±0.50* |
| 左室等容性収縮時間, ms | 18.3±3.0 |
| 左室等容性拡張時間, ms | 32.1±4.1** |
| 左室 Tei index | 0.64±0.04** |
| | エプレレノン群 |
| 僧房弁輪速度拡張早期波, cm/s | 3.42±0.18 |
| 僧房弁輪速度拡張後期波, cm/s | 3.98±0.24* |
| 左室等容性収縮時間, ms | 1.7±3.7 |
| 左室等容性拡張時間, ms | 27.3±3.7 † |
| 左室 Tei index | 0.56±0.04** † † |

平均値±標準偏差, *p<0.05 vs. Sham, **p<0.01 vs. Sham, †p<0.05 vs. Vehicle, † †p<0.01 vs. Vehicle, Tei index=(等容性収縮時間+等容性拡張時間)/駆出時間

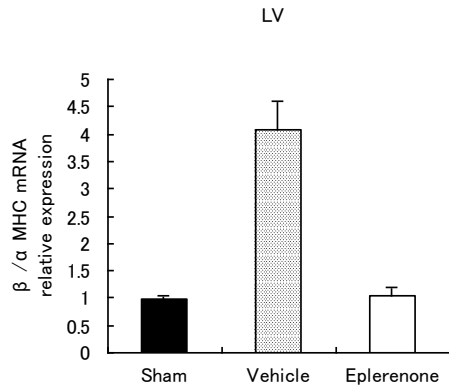
2) 組織学検査—HE 染色

| | Sham |
|------------------------------|-----------------|
| 左室心筋細胞横断面積, μmm^2 | 287.3±71.3 |
| 左室心筋間質線維化面積比, % | 2.6±0.4 |
| | Vehicle |
| 左室心筋細胞横断面積, μmm^2 | 771.5±131.3** |
| 左室心筋間質線維化面積比, % | 8.2±0.6** |
| | エプレレノン群 |
| 左室心筋細胞横断面積, μmm^2 | 293.8±105.9 † † |
| 左室心筋間質線維化面積比, % | 4.3±0.3 † † |

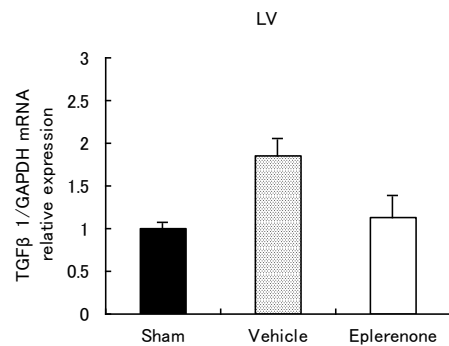
(3) 分子生物学的検査—左室心筋組織、

RT-PCR 法

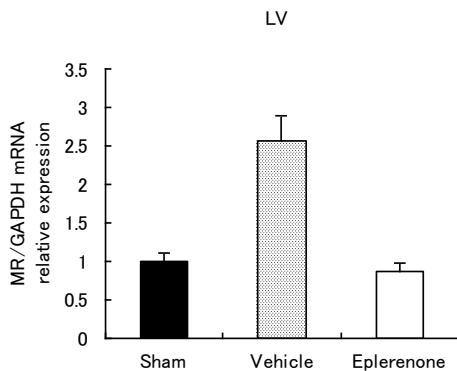
β/α ミオシン重鎖 mRNA の比率



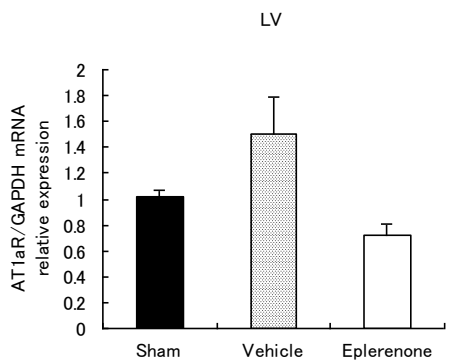
TGF- β 1 の mRNA 発現



ミネラルコルチコイド受容体 mRNA 発現



アンジオテンシン 1- α 受容体 mRNA 発現



(4) 結果のまとめ

心臓超音波検査ではエプレレノン投与群では無治療群に比較し、より正常に近い心室形態となりドップラー法では左心室の等容拡張と流入がより改善した。Tei-index に代表される心機能パラメーターも改善した。組織学的にはエプレレノン投与群では無治療群に比較し、心筋細胞径と間質線維化が軽度であった。これは分子生物学的には β/α ミオシン重鎖 mRNA の比率と TGF- β 1 の mRNA 発現の正常化を伴っていた。またエプレレノンの投与によって無治療群で見られたミネラルコルチコイド受容体とアンジオテンシン 1- α 受容体の mRNA の過剰発現がエプレレノンの投与によって正常化された。

当初計画していた線維化コラーゲン代謝を検討するまでには至らなかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 英樹 (Ozawa Hideki)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：20277156

(2) 研究分担者

根本 慎太郎 (Nemoto Shintarou)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20237811

高井 真司 (Takai shinji)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80288703

星賀 正明 (Hoshiga Masaaki)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：90309154

(3) 連携研究者

羽森 貫 (Hamori Kan)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：90581207

佐々木 智康 (Sasaki Tomoyasu)
大阪医科大学・医学部
研究者番号：10411365