

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11729

研究課題名（和文）拡張不全における新規誘導型内皮由来過分極因子による末梢循環調節機構の解明

研究課題名（英文）Peripheral circulatory regulation mechanism by a novel induced endothelium-derived hyperpolarizing factor in diastolic dysfunction

研究代表者

工藤 利彩（Kudo, Risa）

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20347545

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ラット高血圧性心不全モデルの末梢血管において、血管弛緩作用をもつ新規メディエーターである誘導型血管内皮由来過分極因子iEDHFsの経路が活性化され、血圧上昇を抑制することにより末梢循環調節に寄与していることが初めて明らかになった。さらに、iEDHFsは、一酸化窒素（NO）による循環調節が優位である高血圧期には誘導されず、心不全の初期段階である拡張不全期からNOに代わって誘導されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、高齢者心不全の多くは、左室収縮機能が保持されつつ拡張機能障害を主体とする拡張不全である。拡張不全は予後不良であり、確立した治療法はなく、その発症および病態進展機序の解明、予後改善のための治療法の開発が急務となっている。拡張不全の発症基盤には高血圧があり、心臓単独の疾患ではなく心臓と動脈系の相互作用から惹起されることから、本研究で示したiEDHFsによる末梢循環調節機構の解明は、高血圧や拡張不全などの心血管病の治療法の開発の手がかりとなり、創薬への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study is the first to show that the pathway of inducible endothelium-derived hyperpolarizing factor (iEDHFs), which are novel mediators with vasorelaxant effects, was activated in the peripheral arteries of a rat model of hypertensive heart failure. It contributed to regulating peripheral circulation by suppressing increases in blood pressure. iEDHFs were not induced during the hypertensive phase, when circulatory regulation by nitric oxide (NO) is predominant. iEDHFs were induced to replace NO during the diastolic failure phase, the early stage of heart failure.

研究分野：血管学

キーワード：拡張不全 高血圧 血管内皮細胞由来過分極因子 末梢循環

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、高齢者心不全の多くは、左室収縮機能が保持されつつ拡張機能障害を主体とする拡張不全であることが明らかとなり、高齢化社会における我が国での心不全パンデミックの多くは拡張不全患者であるといわれている。拡張不全は予後不良であり、確立した治療法が全くないことが高齢化社会の深刻な問題となっており、その発症および病態進展機序の解明、予後改善のための治療法の開発が急務となっている。

拡張不全の発症基盤には高血圧があり、心臓単独の疾患ではなく心臓と動脈系の相互作用から惹起され、血管内皮機能障害が大きく関与している。なかでも、高血圧や拡張不全患者の末梢血管では、一酸化窒素 (NO) 産生の低下による血管内皮依存性弛緩反応の低下がみられるが、病初期においては血管内皮細胞由来過分極因子 (EDHFs) が代償し、内皮機能障害の進展を抑制することにより、血管の恒常性維持に重要な役割を果たすことが知られている。

我々はこれまで、アルコール性高血圧ラットの末梢血管において、新規メディエーターである誘導型血管内皮細胞由来過分極因子 (iEDHFs) が血流の変動により活性化され、弛緩を増大させることによって高血圧の発症を予防することを示した (Yuuji K, 2019)。iEDHFs は、血管内皮細胞膜にあるアラキドン酸 (AA) から 15-リポキシゲナーゼ (15-LO) により代謝されるヒドロキシエポキシエイコサトリエン酸 (15-H-11, 12-EETA) と、その可溶性エポキシドヒドロラーゼ (sEH) 加水分解産物のトリヒドロキシエイコサトリエン酸 (11, 12, 15-THETA) であり、血管平滑筋の小コンダクタンスカルシウム依存性カリウムチャネル (SK<sub>Ca</sub> channel) を活性化することにより過分極による弛緩反応を引き起こす。15-LO は、血流の変動をはじめ血管の炎症や低酸素、脂質異常などの内部環境変化で活性化されるため、15-LO 代謝物である iEDHFs が拡張不全における末梢循環調節の重要な役割を果たしていると推察される。

### 2. 研究の目的

本研究では、高血圧性心不全モデルとして確立しているダール食塩感受性 (Dahl-S) ラットの腸間膜動脈を用い、高血圧期と拡張不全期における iEDHFs による末梢循環調節機構を NO とのクロストークを中心に解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高血圧症モデルおよび拡張不全モデルの作製

日本では高血圧患者の約半数を食塩感受性高血圧が占めることから Dahl-S ラットを用いた。Dahl-S ラットは 7 週齢より 8%食塩含有食を摂取させることで、12 週齢頃に心肥大を伴う高血圧症をきたし、19 週齢頃に拡張不全をきたすことが以前の研究から明らかである。本研究では、雄性 Dahl-S ラットに 7 週齢より 8%食塩含有食を摂取させ、高血圧群は 12 週齢まで、拡張不全群は 19 週齢まで飼育し、普通食 (0.3%食塩含有食) で飼育した食塩非感受性 (Dahl-R) ラットの 12 週齢を高血圧群に対する対照群、19 週齢を拡張不全群に対する対照群とした。

#### (2) 病態解析

各モデルについて次の指標を用いて病態解析を行った。

- ① 経時的な体重、血圧、心拍数の測定
- ② 心エコー検査による左室壁厚および左室内腔径の測定と左室駆出率・左室内径短縮率の算出
- ③ 病理組織学的検査による心筋線維化の評価

#### (3) 高血圧症モデルおよび拡張不全モデルにおける血管機能解析

高血圧症モデルは 12 週齢で、拡張不全モデルは 19 週齢でそれぞれ屠殺し、摘出した腸間膜動脈を用い、等尺性張力測定および関連酵素の発現量の測定を行い、末梢循環調節における iEDHFs 経路の関与を検討した。

- ① フェニレフリン収縮下に弛緩剤 (アセチルコリン (Ach)、アラキドン酸 (AA)) を段階的に添加し、内皮依存性弛緩反応を各病期モデルの 2 群間で比較検討した。

- ② NO、cyclooxygenase (COX)、iEDHFs、epoxyeicosatrienoic acids (EETs)のそれぞれの経路の阻害剤を組み合わせる前処置した後、①と同様に内皮依存性弛緩反応を比較検討し、NO、COX、iEDHFs、EETsの経路を介する弛緩反応の寄与度を明らかにした。
- ③ 上腸間膜動脈における各経路に関連する酵素 eNOS、15-lipoxygenase (15-L0)、チトクロム P450 2J2 (Cyp2J2)等の mRNA 発現量を測定し、各経路の末梢循環調節に対する関与について比較検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 高血圧期および拡張不全期モデルの病態解析

12週齢と19週齢のいずれにおいても、R群に比べS群で有意に体重低下と心重量/体重比の増加がみられた。血圧については収縮期血圧・拡張期血圧・平均血圧のいずれもR群に比べS群で有意に高値を示した。心拍数は2群間に差はみられなかった。左室壁の肥厚、左室拡張末期径および左室収縮末期径の減少は12週齢のS群で顕著であり、19週齢のS群では左室拡張末期径の減少は改善されていた。また、12週齢と19週齢のいずれにおいても、左室収縮能を表わす左室駆出率・左室内径短縮率は両群とも正常範囲内であった。病理組織学的検査において、12週齢のS群では心筋細胞の肥大が認められ、19週齢のS群では一部の心筋組織において線維化が認められた。

##### (2) 高血圧期における末梢循環調節機構

###### ① Achによる弛緩における iEDHFs の作用

12週齢の高血圧ラット(12W S)と対照群(12W R)から摘出した上腸間膜動脈を用い、Achによる血管内皮細胞依存性弛緩について、NOとEDHFsの経路別に比較したところ、R群に比べS群でNOの経路の弛緩が有意に増大したのに対し、EDHFsの経路の弛緩は有意に低下した(図1)。これらの結果から、高血圧期の末梢血管では恒常的なEDHFsの作用が減弱しており、NOの経路がこれを代償することにより血圧および循環調節に寄与していることが示唆された。

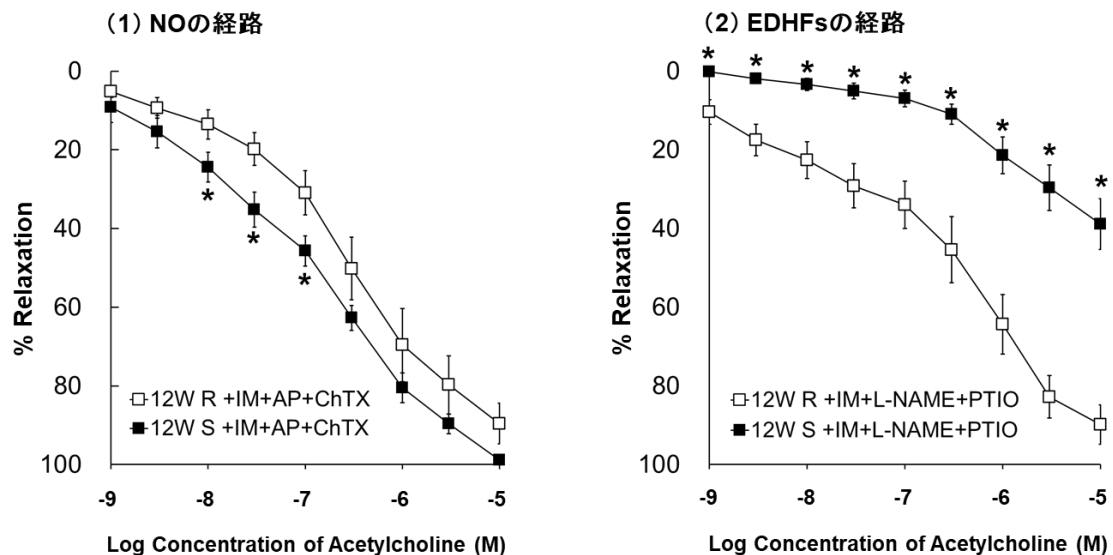


図1. 12週齢の上腸間膜動脈におけるAch弛緩に対するNOおよびEDHFsの経路の関与。

12W R群および12W S群のAch投与による弛緩率を表す。(1) 10 μM indomethacin, 0.1 μM apamin, 0.1 μM charybdotoxin存在下におけるAch弛緩を示す。(2) 10 μM indomethacin, 1 mM L-NAME, 300 μM carboxy-PTIO存在下におけるAch弛緩を示す。弛緩率は平均値±標準誤差を示す。\*P < 0.05 vs. 12W R群。

###### ② AAによる弛緩における iEDHF の作用

12週齢の高血圧ラット(12W S)と対照群(12W R)から摘出した上腸間膜動脈を用い、AAによる血管内皮細胞依存性弛緩について、COX、iEDHFs、EETsの3つの経路別に比較したところ、

R 群に比べ S 群で COX の経路の弛緩が低下したのに対し、iEDHFs と EETs の経路の弛緩は増大傾向を示した (図 3-1)。これらの結果から、高血圧期の末梢血管では COX の経路の収縮物質である TXA2 が増大し、弛緩を低下させた可能性が考えられる。一方、iEDHF や EETs は弛緩を増大させることにより血圧および循環調節に寄与していることが示唆された。

### ③各経路に関連する酵素の mRNA 発現量

12 週齢のラットから摘出した上腸間膜動脈における各酵素の mRNA 発現量を 2 群間で比較検討したところ、R 群に比べ S 群で eNOS および EETs 変換酵素 Cyp2J2 の増大がみられたが、iEDHFs の変換酵素 15-L0 の発現量には 2 群間の差はみられなかった。

### (3) 拡張不全期における末梢循環調節機構

#### ①Ach による弛緩における iEDHFs の作用

19 週齢の拡張不全ラット (19W S) と対照群 (19W R) から摘出した上腸間膜動脈を用い、Ach による血管内皮細胞依存性弛緩について、NO と EDHFs の経路別に比較したところ、NO の経路の弛緩は両群に差が見られなかったが、EDHFs の経路の弛緩は有意に増大した (図 2)。これらの結果から、拡張不全期の末梢血管では残存している血管内皮細胞から iEDHFs が誘導され、血圧および循環調節に寄与していることが示唆された。

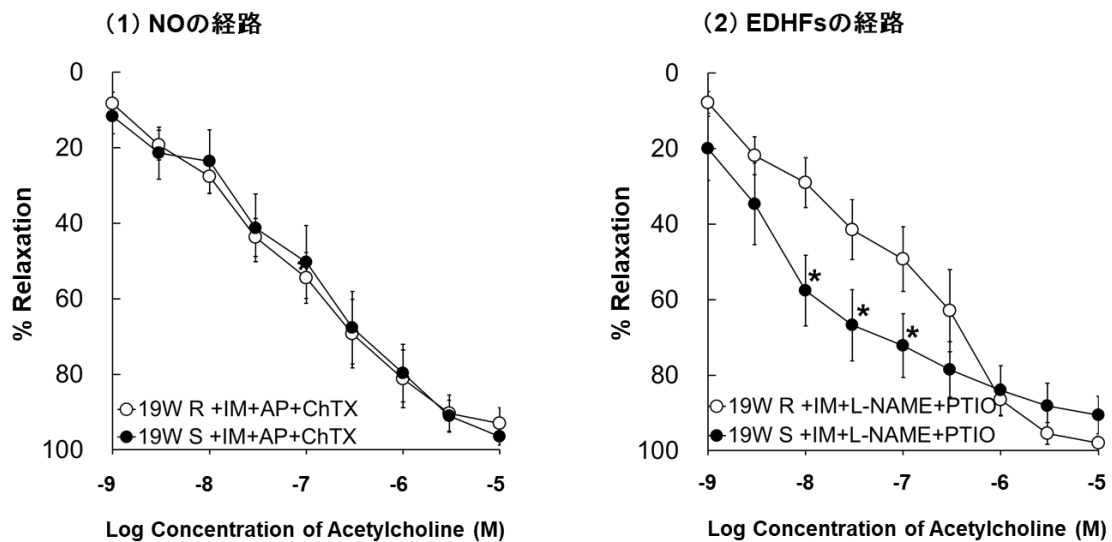


図 2. 19 週齢の上腸間膜動脈における Ach 弛緩に対する NO および EDHFs の経路の関与。

19W R 群および 19W S 群の Ach 投与による弛緩率を表す。(1) 10  $\mu$ M indomethacin, 0.1  $\mu$ M apamin, 0.1  $\mu$ M charybdotoxin 存在下における Ach 弛緩を示す。(2) 10  $\mu$ M indomethacin, 1 mM L-NAME, 300  $\mu$ M carboxy-PTIO 存在下における Ach 弛緩を示す。弛緩率は平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。\*P < 0.05 vs. 19W R 群。

#### ②AA による弛緩における iEDHFs の作用

19 週齢の拡張不全ラット (19W S) と対照群 (19W R) から摘出した上腸間膜動脈を用い、AA による血管内皮細胞依存性弛緩について、COX、iEDHFs、EETs の経路別に比較したところ、COX の経路の弛緩は両群に差が見られなかったが、EETs の経路の弛緩は増大し、iEDHFs の経路の弛緩は有意に増大した (図 3-2)。これらの結果から、拡張不全期の末梢血管では iEDHFs や EETs が血圧および循環調節に寄与しており、特に iEDHFs の寄与度が高いことが示唆された。

### ③各経路に関連する酵素の mRNA 発現量

19 週齢のラットから摘出した上腸間膜動脈における各酵素の mRNA 発現量を 2 群間で比較検討したところ、R 群に比べ S 群で 15-L0 の増大がみられたが、eNOS および Cyp2J2 の発現量には 2 群間の差はみられなかった。

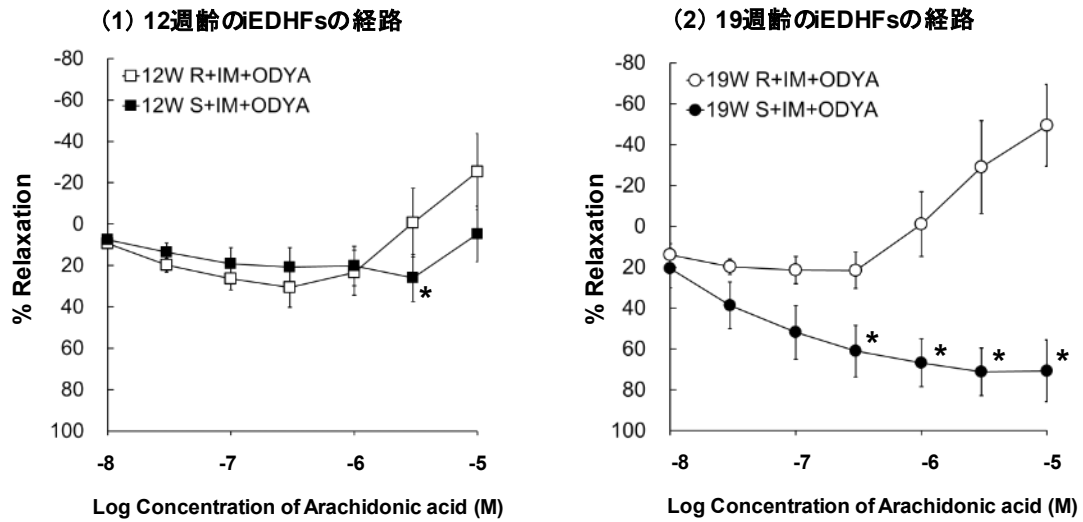


図3. 12週齢および19週齢の上腸間膜動脈におけるAA弛緩に対するiEDHFの経路の関与。12Wおよび19WのR,S群におけるAA投与による弛緩率を表す。10  $\mu$ M indomethacin, 50  $\mu$ M 17-ODYA存在下におけるAA弛緩を示す。弛緩率は平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。\* $P < 0.05$  vs. 12W or 19W R群。

上述のように、高血圧患者の末梢血管では、一酸化窒素 (NO) 産生の低下による内皮依存性弛緩反応の低下がみられ、恒常型 EDHFs により代償されることが知られているが、今回用いたラット高血圧モデルの末梢血管では恒常型 EDHFs の作用が減弱しており、血管内皮細胞由来の NO がこれを代償し、内皮機能障害の進展を抑制することにより、高血圧下における血圧調節および循環調節に寄与していることが示唆された。このように、恒常型 EDHFs と血管内皮細胞由来の NO は互いにクロストークすることによりそれぞれの機能低下を補うことで恒常性維持に役立っているものと考えられる。一方、拡張不全期においては、NO に代わり、誘導型である iEDHF の経路が活性化されることにより、血圧および循環調節に寄与していることが示唆され、拡張不全期の末梢血管において iEDHF が誘導されることを本研究で初めて見出した。この新たな iEDHF による末梢循環調節機構の解明は、高血圧や拡張不全などの心血管病の治療法の開発の手がかりとなり、創薬への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kudo Risa, Yuui Katsuya, Kasuda Shogo	4. 巻 14
2. 論文標題 Endothelium-Independent Relaxation of Vascular Smooth Muscle Induced by Persimmon-Derived Polyphenol Phytocomplex in Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 89 ~ 89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu14010089	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

1. 著者名 Yuui Katsuya, Kudo Risa, Kasuda Shogo	4. 巻 20
2. 論文標題 Arterial thromboxane A2-induced transient contraction after IL-1 exposure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Inflammation	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1721727X221077946	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

1. 著者名 工藤利彩、勇井克也、粕田承吾	4. 巻 36(3)
2. 論文標題 心血管イベントにおける誘導型内皮由来過分極因子の役割	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 97-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 勇井克也、工藤利彩、森本真未、井上伸、運輸恭子、粕田承吾
2. 発表標題 高血圧ラットの末梢循環における内皮依存性弛緩因子のクロストーク
3. 学会等名 第107次 日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 勇井克也、工藤利彩、森本真未、井上伸、蓮輪恭子、粕田承吾
2. 発表標題 炎症時における一過性の血管収縮と病態への関与
3. 学会等名 第106次 日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 勇井克也、工藤利彩、粕田承吾
2. 発表標題 末梢血管における炎症反応へのプロスタノイド類の関与について
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	勇井 克也 (Yuui Katsuya)  (50783875)	奈良県立医科大学・医学部・助教  (24601)	
研究分担者	粕田 承吾 (Kasuda Shogo)  (70434941)	奈良県立医科大学・医学部・教授  (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------