

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860184

研究課題名(和文)低酸素による右心室肥大の意義と心不全への変遷機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the transition mechanism of right ventricular hypertrophy to failure due to chronic hypoxia

研究代表者

稲垣 薫克 (Inagaki, Tadakatsu)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：20638366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺高血圧による右心室後負荷の増大が右冠動脈の血管拡張機能低下を引き起こすという仮説を検証した。実験には肺高血圧モデルであるSuHxラット、および正常ラットを用い、カテーテル法による右心機能評価および放射光微小血管造影法による右冠動脈血管機能評価をおこなった。その結果、SuHxラットでは右心機能の有意な低下が観察された。右冠動脈造影実験の結果から、SuHxラットでは内皮依存性および非依存性血管拡張機能が中・小動脈で低下していることが明らかとなった。本研究により重度肺高血圧患者の右心不全発症には右冠動脈血管拡張機能の低下が関与する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary hypertension (PH) causes cardiac hypertrophy in right ventricles (RV), and eventually leads to RV failure due to persistently elevated ventricular afterload. We hypothesized that the mechanical stress of RV associated with increased afterload impairs vasodilative function of the right coronary artery (RCA) in PH. Using microangiography, we compared the vascular function of RCA in the PH and control rats. Endothelium-dependent and -independent vasodilative responses were significantly attenuated in the middle and small arteries in the severe PH rats and the presence of abnormal constriction mechanism was revealed in the right coronary circulation of severe PH rat. The observed impaired vasodilative function of RCA in PH model suggests that impaired RCA function might have causal relationship with RV failure in the patients with severe PH.

研究分野：循環生理学、運動生理学

キーワード：右心肥大 右心不全 肺高血圧症 冠動脈 低酸素

### 1. 研究開始当初の背景

慢性低酸素下では、肺循環での低酸素性肺血管収縮により肺高血圧が生じ、右心室に対する後負荷が慢性的に起こることで心肥大から心不全へと変遷することが知られているが、その根底を成す機構については明らかではない。肺高血圧に伴う右心室肥大が心不全へと変遷する機構の解明のためには、右心室機能を経時的に捉える必要があると考えられる。これまでの右心機能評価には麻酔下における超音波画像診断による駆出率や心肥大評価、カテーテル法による右心室内圧測定が行われてきたが、測定者間でのばらつきが多いなどの問題点が挙げられ、右心不全を示す明確な指標が無いのが現状である。

一方、肥大した心臓の機能を維持するためには、心筋への酸素供給も同時に増大することが重要であると考えられる。最近では、代償性心肥大の段階では毛細血管の増加によって酸素供給も行われているが、心肥大から心不全への移行において血管新生の相対的低下が重要な因子であることが示唆されている。慢性的な圧負荷により生じる心筋の局所的な低酸素に対し、冠血管において機能的な変化が生じることが考えられるが、心肥大から心不全への過渡期における冠循環の機能変化に関する *in vivo* 研究は報告されていない。

また、心臓に対して高負荷が継続することによって、本来抑制されているはずの胎児期特異的な遺伝子が強く誘導されることも明らかになっている。心肥大から心不全への変遷時における心臓のリモデリングでは、心筋細胞ではアポトーシスやネクローシスといった細胞死が惹起される。これらの過程には細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度の増加が関与するが、NCS-1 (Neuronal  $Ca^{2+}$  sensor-1) は細胞内における  $Ca^{2+}$  の働きを仲介するセンサータンパク質のひとつである。最近、神経細胞や未成熟期の心臓に高発現している NCS-1 が、フェニレフリンに対する心肥大形成に関与することが示された。したがって、このタンパク質が肺高血圧に続発する右心室のリモデリングに関与することが考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、慢性低酸素による右心肥大適応から不全へと進展する機構を明らかにするため、心カテーテル法、プレチスモグラフィ法および放射光冠血管造影法により、慢性低酸素負荷時の心臓ポンプ機能、肺呼吸機能および冠血管・肺血管機能の経時的変化を *in vivo* 計測し、肺高血圧の心肺機能適応期から破綻期に渡って右心室心筋・冠血管の機能がどのように変遷するかを調べることを目的とした。

また、心肥大因子の遺伝子欠損マウスを用いて、右心室肥大・リモデリングの分子機構を探ることを目的とし、左心肥大に関係する事が報告されている  $\beta$  アドレナリン受容体

や NCS-1 に着目し、それぞれの遺伝子欠損マウスを用いて慢性低酸素モデルにより肺高血圧による右心肥大応答についての検討を行った。

### 3. 研究の方法

1) 右心室肥大・リモデリングの分子機構に関する検討として、1-ARKO マウスおよび NCS-1KO マウスを用いて、3 週間の低酸素曝露に対する右心肥大応答について、それぞれの Wild-type (WT) マウスとの比較を行った。低酸素負荷は  $FI_{O_2}=0.08$  の低酸素空気を持続的に導入したアクリルチャンバー内でそれぞれのマウスを 3 週間飼育することによりおこなった。低酸素曝露後に麻酔下、人工呼吸管理下での動脈圧および右心室圧をカテーテル法により計測し、安楽死後に心臓および肺組織を摘出して右心室重量比や肺血管リモデリングについての検討を行った。

2) 右心室および肺機能の *in vivo* 多角的評価

肺高血圧ラットモデルであるモノクロタリン肺高血圧ラットや Sugen Hypoxia ラットを用いて、右心肥大から右心不全の過渡期における呼吸動態計測を Whole body プレチスモチャンバー法により計測した。また、モデル作成後にアドミッタンスカテーテルによる右心機能評価を行った。さらに、Spring-8 での放射光高速微小血管造影により、右冠動脈の血管機能評価も行った。

### 4. 研究成果

1) 右心室肥大・リモデリングの分子機構に関する検討

1-ARKO マウスでは慢性低酸素による右心負荷 (RVSP) は WT マウスと同程度であり、右心肥大応答も同様であったことから、低酸素性肺高血圧による右心肥大にはカテコラミンは関与しないことや受容体媒介の代償機構が働いたことなどが考えられた。次に、GPCR 下流シグナルである NCS-1 に着目し、NCS-KO マウスにおける低酸素性肺高血圧による右心肥大応答について検討した。その結果、NCS-1KO マウスでは、低酸素性肺高血圧による肺血管平滑筋肥厚および右心負荷の程度は WT マウスと同程度であったが、右心室リモデリングは有意に抑制されていた (Fig.1)。

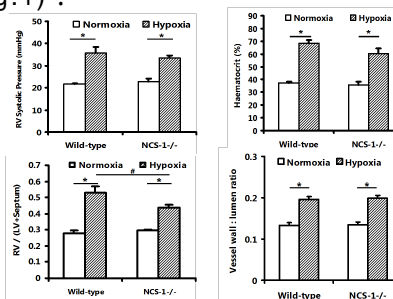


Fig. 1. Parameters of pulmonary hypertension and RV hypertrophy in hypoxic mice. Values are means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$  compared with each normoxic group. # $P < 0.05$  compared with wild-type mice in each treatment.

しかしながら，低酸素性肺高血圧マウスモデルはヒトの肺高血圧患者にみられる肺血管異常や右心不全発症といった病態を形成しないため，肺高血圧や右心不全モデルとしては不十分であることが指摘されている。そこで，申請者はこれまでに肺高血圧患者にみられる肺血管閉塞病変を呈する SuHx ラットモデルや右心不全モデルとして以前から汎用されているモノクロタリン肺高血圧ラットモデルを用いて以下の検討を行った。

## 2) 右心室および肺機能の in vivo 多角的評価

肺高血圧モデルとしてこれまで用いた慢性低酸素負荷およびモノクロタリン肺高血圧ラットに加え，ヒト肺高血圧症にみられる肺血管閉塞病変を呈する Sugen Hypoxia (SuHx) ラットモデルを対象に右心肥大適応期から破綻期にかけての生理学的パラメータの取得ならびに右心機能と血管機能の経時的な変化を明らかにすることを目的とした。SuHx ラットは VEGFR 阻害剤である Su5416 をラットに皮下投与後に低酸素下で3週間飼育し，その後常酸素下で飼育することにより肺血管閉塞病変を来することが知られている。本研究ではこのときの呼吸動態の変化について覚醒ラットにおけるホールボディプレシスモチャンパー法により検討した。その結果，SuHx4 週群では肺高血圧ならびに右心肥大が生じているが，分時換気量・呼吸数・酸素摂取量・二酸化炭素排出量は変化していなかった。一方，SuHx8 週群では，肺高血圧ならびに右心肥大の程度が悪化し，呼吸数の顕著な増加が生じていたが，酸素摂取量・二酸化炭素排出量は保たれていた(Fig.2)。

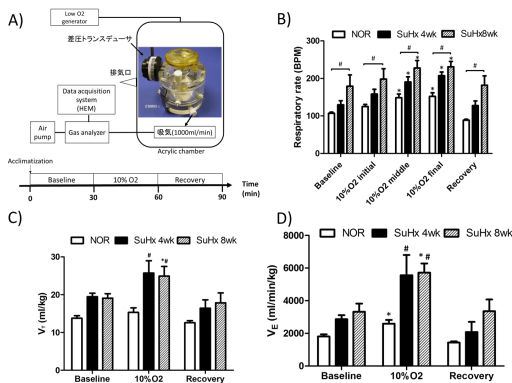


Fig.2 Whole body plethysmography法による呼吸動態計測  
実験装置の概略図と実験プロトコル(A)，正常(NOR)およびSuHxラット(4週，8週)群における安静時および急性低酸素負荷時の呼吸数変化(B)，一回換気量の変化(C)，および分時換気量の変化(D)  
Values are mean ± SEM. \*P<0.05 vs baseline, #P<0.05 vs NOR.

次に，モノクロタリン 5 週群および SuHx8 週群において，血管機能評価を放射光微小血管造影によりおこなった。その結果，両群では同程度の右心室収縮期圧および右心室重量の増加が生じ，右心機能の低下が観察された。また，右冠動脈の第二，三分岐において ACh 依存性血管拡張，および NO 応答性の低下が観測された。また，MCT ラットでは NOS/COX 阻害により，SuHx ラットでは EDHF 阻害によ

り血管攣縮が観察された。以上のことから，肺高血による右心負荷の増大により，右冠動脈の血管拡張機能が低下していることが明らかになった (Fig.3)。

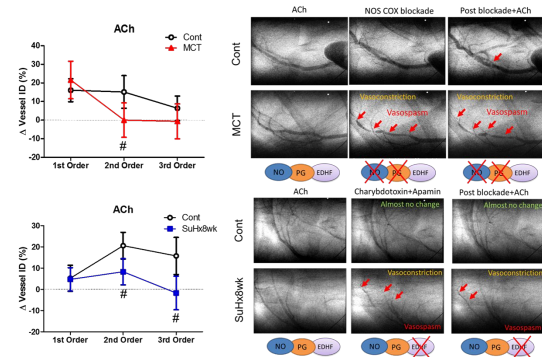


Fig.3 MCTラットおよびSuHxラットにおけるACh誘発血管拡張応答の低下と異常血管収縮機構

また，SuHx8 週モデルにおける右心機能評価をアドミッタンスカテテル法によりおこなったところ，このモデルでは右心室の拡張機能が低下し，心不全を発症していることを確認できた(Fig.4)。

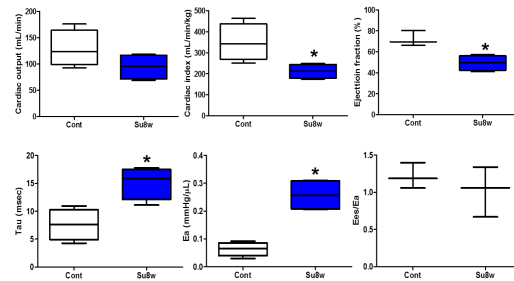


Fig.4 SuHxラットにおける心機能評価  
SuHxラットでは正常ラット(Cont)と比較して，右心機能における心係数および駆出率の低下が認められた。また，後負荷の増大と拡張時間の延長による拡張機能の低下も認められた。  
Values are mean ± SE. N=4 in each group. \*P<0.05 by 2-tailed Student's t-test

以上のことから，本研究により重症肺高血圧患者における右心不全の発症に右冠動脈の血管機能低下が関与してい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 8 件)

1. Chen YC, Inagaki T, Fujii Y, Schwenke DO, Tsuchimochi H, Edgley AJ, Umetani K, Zhang Y, Kelly DJ, Yoshimoto M, Nagai H, Evans RG, Kuwahira I, Shirai M, Pearson JT. Chronic intermittent hypoxia accelerates coronary microcirculatory dysfunction in insulin resistant Goto-Kakizaki rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016 Jun 1;ajpregu.00112.2016. [Epub ahead of print] (査読有)
2. Inagaki T, Akiyama T, Du CK, Zhan DY, Yoshimoto M, Shirai M. Monoamine oxidase-induced hydroxyl radical production and cardiomyocyte injury

- during myocardial ischemia-reperfusion in rats. *Free Radic Res.* 2016 Jun;50(6):645-53. (査読有)
3. Katare R, Rawal S, Munasinghe PE, Tsuchimochi H, Inagaki T, Fujii Y, Dixit P, Umetani K, Kangawa K, Shirai M, Schwenke DO. Ghrelin Promotes Functional Angiogenesis in a Mouse Model of Critical Limb Ischemia Through Activation of Proangiogenic MicroRNAs. *Endocrinology.* 2016 Feb;157(2):432-45. (査読有)
  4. Hashimoto-Kataoka T, Hosen N, Sonobe T, Arita Y, Yasui T, Masaki T, Minami M, Inagaki T, Miyagawa S, Sawa Y, Murakami M, Kumanogoh A, Yamauchi-Takahara K, Okumura M, Kishimoto T, Komuro I, Shirai M, Sakata, Y, Nakaoka: Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015 May 19;112(20):E2677-86. (査読有)
  5. Nagai H, Kuwahira I, Schwenke DO, Tsuchimochi H, Nara A, Ogura S, Sonobe T, Inagaki T, Fujii Y, Yamaguchi R, Wingenfeld L, Umetani K, Shimosawa T, Yoshida K, Uemura K, Pearson JT, Shirai M: Pulmonary macrophages attenuate hypoxic pulmonary vasoconstriction via 3AR/iNOS pathway in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *PLoS One*, 2015 Jul 1;10(7):e0131923. (査読有)
  6. Waddingham MT, Edgley AJ, Astolfo A, Inagaki T, Fujii Y, Du CK, Zhan DY, Tsuchimochi H, Yagi N, Kelly DJ, Shirai M, Pearson JT: Chronic Rho-kinase inhibition improves left ventricular contractile dysfunction in early type-1 diabetes by increasing myosin cross-bridge extension. *Cardiovasc Diabetol*, 2015, Jul 22;14:92. (査読有)
  7. Nagai H, Kuwahira I, Schwenke DO, Tsuchimochi H, Nara A, Inagaki T, Ogura S, Fujii Y, Umetani K, Shimosawa T, Yoshida K, Pearson JT, Uemura K, Shirai M. 2-Adrenergic receptor-dependent attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction prevents progression of pulmonary arterial hypertension in intermittent hypoxic rats. *PLoS One*, 2014 Oct 28;9(10):e110693. (査読有)
  8. Shirai M, Tsuchimochi H, Nagai H, Gray E, Pearson JT, Sonobe T, Yoshimoto M, Inagaki T, Fujii Y, Umetani K, Kuwahira I, Schwenke DO: Pulmonary vascular tone is dependent on the central modulation of sympathetic nerve activity following chronic intermittent hypoxia. *Basic Res Cardiol*, 2014 Sep;109(5):432. (査読有)
- [学会発表](計 12 件)
1. 稲垣薫克. 放射光微小血管造影法による肺高血圧モデルラットの冠血管機能評価. 第 6 回 Basic and Clinical PH Conference, 2016 年.
  2. 稲垣薫克, 秋山剛, 白井幹康. 心臓間質におけるヒドロキシラジカル測定法の開発. 第 70 回日本体力医学会大会, 2015 年.
  3. Tsuchimochi H, Inagaki T, Shirai M. Even Small Changes in Body Temperature Can Affect the Cardiac Function in Anesthetized Mice. *Experimental Biology* 2015.
  4. Tsuchimochi H, Inagaki T, Shirai M. The Role of TRPV1-Expressing Neurons in the Control of Heart Rate During Dynamic Exercise in Rats. *Experimental Biology* 2015.
  5. Waddingham MT, Edgley AJ, Astolfo A, Inagaki T, Fujii Y, Tsuchimochi H, Kelly DJ, Yagi N, Shirai M, Pearson JT. Rho Kinase Inhibition Improves Cardiac Cross-Bridge Dynamics in Early Diabetic Cardiomyopathy. *Experimental Biology* 2015.
  6. 稲垣薫克, 秋山剛, 戦冬雲, 杜成坤, 白井幹康. モノアミンオキシダーゼによる心筋虚血再灌流時のヒドロキシラジカル産生. 第 92 回日本生理学会大会, 2015 年.
  7. 若林繁夫, 中尾周, 稲垣薫克, 土持裕胤, 西谷友重, 白井幹康. トレッドミル有酸素運動は Ca<sup>2+</sup>センサー蛋白質の遺伝子欠損マウスで起こる肥満を解消できる. 第 92 回日本生理学会大会, 2015 年.
  8. 土持裕胤, 稲垣薫克, 白井幹康. 麻酔下マウス心機能評価における体温調節の重要性. 第 92 回日本生理学会大会, 2015 年.
  9. 稲垣薫克, 秋山剛, 戦冬雲, 杜成坤, 白井幹康. 4-HBA を用いた心筋虚血再灌流時のヒドロキシラジカル測定. 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年.
  10. 森島真幸, 長川賢, 稲垣薫克, 土持裕胤, 白井幹康, 小野克重. 低酸素環境における心筋 T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルの役割. 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年.
  11. 土持裕胤, 吉本光佐, 稲垣薫克, 曾野部崇, 白井幹康. ラットの一回性低酸

素暴露時の非圧受容器反射性徐脈応答にはアデノシンおよび M2 アセチルコリン受容体が関与している. 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年.

12. 片岡崇弘, 中岡良和, 曾野部崇, 保仙直毅, 稲垣薫克, 樋口香織, 有田陽, 安居琢, 池岡邦泰, 正木豪, 瀧原圭子, 白井幹康, 小室一成. 低酸素誘発性肺高血圧モデルで IL-6/Th17 細胞シグナルは肺血管リモデリングに必須である. 第 21 回日本血管生物医学会学術集会, 2013 年.

〔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〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

稲垣 薫克 (Inagaki Tadakatsu)

国立循環器病研究センター・研究所・上級  
研究員

研究者番号: 20638366