

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590839

研究課題名 (和文) 性差からみた高血圧心における臓器障害の機序の解明

研究課題名 (英文) Gender differences in the mechanism of hypertensive organ damage in the heart

研究代表者 甲斐 久史 (KAI, HISASHI)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号 60281531

研究成果の概要：

圧負荷に対する心リモデリング(代償性心筋肥大、反応性心筋線維化)およびに拡張能障害に正常メス WKY とオス WKY に差はみられなかった。しかしながら、閉経後モデルである卵巣摘出を行った卵巣摘出 WKY では、血圧負荷の程度が正常メスおよびオスと変わらず代償性心筋肥大と同等であったにもかかわらず、反応性心筋線維化およびそれに伴う左室拡張能障害は有意に増悪した。圧負荷により心筋内血管および血管周囲組織に惹起される炎症反応が卵巣摘出メス WKY において助長されることが、その原因と考えられた。さらに卵巣摘出 WKY において酸化ストレスが持続的に亢進していることが炎症反応が助長される機序として考えられた。また、estradiol 補充により卵巣摘出の影響が抑制されたことから、卵巣摘出 WKY と正常メス WKY の圧負荷に対する反応の違いは、estradiol 欠乏によることが示唆された。血圧変動により高血圧性心リモデリングが増悪し収縮機能障害が進展するが卵巣摘出によりこの変化が助長される。現在、レーザーマイクロダイセクション法により、各モデルの心筋細胞、血管細胞、浸潤細胞における遺伝子発現の経時的変化、細胞間クロストークにつき、コンピュータ解析中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
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：心不全、高血圧、性差医学、炎症、分子生物学

1. 研究開始当初の背景

高血圧性心臓病はわが国における心不全の最も多い原疾患である(Tsutsui et al. *Circ J* 2006)。とくに心不全入院患者の半数を占める拡張不全による心不全の原因は高血圧で

あり、閉経後の高齢女性に多くみられる(Vasan. *J Am Coll Cardiol* 1999)。高血圧心の臓器障害における性差、閉経の影響が示唆されるが、その機序はあきらかでない。近年、種々の降圧薬が開発され“血圧値”を下げると

いう意味での降圧はかなり容易となった。しかし一見、血圧が下がったにもかかわらず心肥大が改善せず、心不全を繰り返す患者も多い。また、アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) などの降圧薬の治療効果に性差があることも報告されている。これは高血圧心臓器障害のメカニズムが充分解明されておらず、また、正しいターゲットに適切な治療が施されていないために他ならない。

申請者はこれまで科学研究費基盤研究 C (平成 13-14 年度、平成 15-16 年度、平成 17-18 年度) をうけ、圧負荷心拡張障害モデル (大動脈縮窄[AC]ラット) および血圧変動高血圧モデル (両側動脈圧受容体除神経[SAD]自然発症高血圧ラット; SHR+SAD) を開発した。これらのモデルから高血圧性肥大心における拡張障害は心筋線維化に起因すること、心筋内血管の炎症性変化・酸化ストレスが血管周囲への炎症細胞浸潤・線維芽細胞活性化を引き起こし心筋線維化が進展することを世界に先駆けて明らかとした (Kuwahara, Kai, et al. *Circulation* 2002, Kuwahara, Kai, et al. *Hypertension* 2003, Kuwahara, Kai, et al. *Hypertension* 2004, Tokuda, Kai, et al. *Hypertension* 2004, Kai et al. *Hypertens Res* 2005, Kai et al. *Hypertens Res* 2006, Kudo H, Kai H, et al. *Hypertension* 2006)。一方、心筋肥大には左室への機械的負荷が直接、重要な役割を果たすため、心筋肥大と心筋線維化は異なった機序で制御されていることが示唆される。

したがって、高血圧心臓器障害 (心肥大、心筋線維化) のメカニズムをより正しく理解し、適切な治療法を開発するためには、心筋細胞、心筋線維芽細胞、血管壁構成細胞 (内皮細胞、平滑筋細胞)、浸潤した炎症細胞といった心筋を構成する各細胞群において、心筋細胞肥大・心筋線維化・細胞死・炎症に関与する遺伝子発現を個別にかつ網羅的に解析することが必要である。しかし、このような解析はこれまで不可能であった。近年開発されたレーザーマイクロダイセクション法は、顕微鏡下で組織標本の微細領域 (細胞 1 個も可能) をレーザー光で切離し回収するシステムである。この新しい手技を用いることで採取したサンプルから DNA・mRNA・蛋白質を抽出し、微細領域別の分析が可能となる。しかしなが

ら、これまで心臓病研究の領域に本手法を用いた研究報告はみられない。

そこで、申請者は、レーザーマイクロダイセクション法を応用して、心筋構成細胞別の遺伝子発現を解析しその相互作用を明らかにすることで、高血圧心臓器障害の詳細なメカニズムを解明することを着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、性差、閉経が高血圧心臓器障害におよぼす影響とそのメカニズムを明らかにすることである。具体的には、これまでにわれわれが開発した圧負荷心拡張障害モデルおよび血圧変動高血圧モデルを用いて、オス、メス、卵巣摘出メスの比較検討をおこなう。オスの両モデルの心リモデリング予防に有効であった ARB の治療効果についても比較する。形態学的・組織学的解析、生理的解析 (心機能) に加えて、レーザーマイクロダイセクション法を用いることで、①心筋構成細胞ごとに遺伝子発現を解析し、②それらの相互作用を明らかにする。その結果に基づき、性差を考慮した新しい臓器障害の予防法・治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 圧負荷心拡張障害モデルを用いた検討
a. オス WKY およびメス WKY、6 週齢に卵巣摘出を摘出したメス WKY (閉経後モデル) に対して、10 週齢に腎動脈直上で腹部大動脈縮窄 (AC) を行い圧負荷肥大心を作成。対照群には sham 手術を施行。
b. 大動脈縮窄施術 3, 7, 28 日後に無麻酔無拘束状態で動脈圧を測定。心筋肥大・心筋線維化を組織学的に評価。ED-1 染色にて炎症細胞 (マクロファージ) 浸潤・アポトーシス等を免疫組織法にて解析。酸化ストレス (ROS) 産生を DHE 染色で検討。リアルタイム RT-PCR 法にて MCP-1、TGF- β 発現を評価。
c. 心エコー法にて左室拡張期内径・収縮能の指標として左室内径短縮率・拡張能の指標として左室流入血流波形 E/A 比を測定。
d. 卵巣摘出 WKY に卵巣摘出術翌日より生理的範囲内の estradiol (E2) を連日皮下投与 (E2 補充卵巣摘出 WKY) し、圧負荷の影響を正常メス WKY と比較検討。
e. レーザーマイクロダイセクション法にて、各モデルの心筋細胞・血管平滑筋細胞・浸潤細胞サンプルを回収。マイクロチップ法による遺伝子発

現の網羅的解析法を施行。4 倍以上発現亢進あるいは減少した遺伝子について現在 RT-PCR 法にて有意性を確認。

(2) 血圧変動高血圧モデルを用いた検討

- a. オス SHR、メス SHR、6 週令に両側卵巣摘出術を施行したメス SHR に対して、8 週令に SAD を施行。各対象群には sham 手術を施行。
- b. SAD 術後 9 週目に腹部大動脈にカテーテルを挿入し血圧テレメトリー装置を留置。術後 10 週目に無麻酔・無拘束下の 24 時間血圧をモニターし、脈拍、血圧、平均血圧の標準偏差・共変動（血圧変動の指標）を計測。SAD 術後 10 週目に心エコー法にて左室拡張期内径・収縮能の指標として左室内径短縮率・拡張能の指標として左室流入血流波形 E/A 比を測定。心筋肥大・心筋線維化を組織学的に評価。ED-1 染色にて炎症細胞（マクロファージ）浸潤・アポトーシス等を免疫組織法にて解析。酸化ストレス（ROS）産生を DHE 染色で検討。リアルタイム RT-PCR 法にて MCP-1、TGF- β 発現を評価。
- c. 卵巣摘出 WKY に卵巣摘出術翌日より生理的範囲内の estradiol (E2) を連日皮下投与（E2 補充卵巣摘出 WKY）し、圧負荷の影響を正常メス WKY と比較検討。
- d. レーザーマイクロダイセクション法にて、各モデルの心筋細胞・血管平滑筋細胞・浸潤細胞サンプルを回収。マイクロチップ法による遺伝子発現の網羅的解析法を施行。4 倍以上発現亢進あるいは減少した遺伝子について現在 RT-PCR 法にて有意性を確認。

4. 研究成果

(1) 圧負荷心拡張障害モデルを用いた検討

- A. メス WKY とオス WKY の比較
 - a. 我々がこれまでに科学研究費補助金を受け報告した通り、大動脈結紮による圧負荷により進行性の心肥大が進展した。血圧上昇と左室重量/体重比を指標とした左室肥大の程度は、オスとメスで有意差を認めなかった。
 - b. 圧負荷 28 日後に、組織学的検討を行ったところ、心筋細胞肥大と血管周囲線維化を主体とした反応性線維化を特徴とする心肥大がみられた。心エコー上、収縮能は保たれている拡張能障害を呈した。組織学的変化、拡張能障害の程度はオスとメスでは同程度であった。
 - c. オス、メスともに圧負荷 3 日後にピークとする

MCP-1 発現亢進と心筋内血管周囲への ED-1 陽性マクロファージ浸潤ならびに心筋内血管での ROS 産生を認めた。28 日後には MCP-1 発現、マクロファージ数ともに減少し、ROS 産生は消失した。

B. 正常メス WKY と卵巣摘出メス WKY の比較

- a. 大動脈結紮による血圧上昇は正常 WKY と卵巣摘出 WKY に差はなかった。さらに圧負荷 28 日後の左室肥大の程度は、両群で有意差を認めなかった。
- b. 圧負荷 28 日後の組織学的検討により、心筋細胞肥大と血管周囲線維化を主体とした反応性線維化を特徴とする心肥大がみられた。心筋細胞肥大の程度は両群で有意差を認めなかったが、卵巣摘出 WKY において血管周囲線維化が著明に拡大した。心エコー上、収縮能は両群ともに正常であったが、卵巣摘出 WKY において拡張能障害がさらに悪化していた。
- c. 正常メスともに圧負荷 3 日後にピークとする MCP-1 発現亢進と心筋内血管周囲への ED-1 陽性マクロファージ浸潤ならびに心筋内血管での ROS 産生を認めた。28 日後には MCP-1 発現、マクロファージ数ともに減少し、ROS 産生は消失した。これに対して、卵巣摘出 WKY では MCP-1 発現と炎症細胞浸潤数が増加したのみならず、そのピークが圧負荷後 3-7 日まで延長した。ROS 産生は 28 日後まで認められた。

C. 卵巣摘出 WKY に対する Estradiol 補充の効果

- a. Estradiol 補充卵巣摘出 WKY に sham 手術を加えても血圧、心重量に影響を及ぼさず、心筋細胞肥大、心筋線維化、炎症細胞浸潤、ROS 産生はみられなかった。また、MCP-1 発現も亢進しなかった。Estradiol 補充卵巣摘出 WKY に大動脈縮窄術を加えた群では、血圧上昇、心重量/体重比は卵巣摘出 WKY と変化なかったが、卵巣摘出によって増悪した心筋線維化、炎症反応（マクロファージ浸潤・MCP-1 発現）および拡張能障害が、正常メス WKY に圧負荷を加えた群と同程度まで改善した。

D. まとめ

圧負荷に対する心リモデリング（代償性心筋肥大、反応性心筋線維化）および拡張能障害に正常メス WKY とオス WKY に差はみられなかった。しかしながら、閉経後モデルである卵巣摘出を行った卵巣摘出 WKY では、血圧負荷の程度が正常メスおよびオスと変わらず代償性心筋肥大と同等であったにもかかわらず、反応性心筋

線維化およびそれに伴う左室拡張能障害は有意に増悪した。圧負荷により心筋内血管および血管周囲組織に惹起される炎症反応が卵巣摘出メス WKY において助長されることが、その原因と考えられた。さらに卵巣摘出 WKY において酸化ストレスが持続的に亢進していることが炎症反応が助長される機序として考えられた。また、**estradiol** 補充により卵巣摘出の影響が抑制されたことから、卵巣摘出 WKY と正常メス WKY の圧負荷に対する反応の違いは、**estradiol** 欠乏によることが示唆された。

以上のことから、これまで明らかでなかった拡張能障害が高血圧患者、特に高齢の女性に降圧していたメカニズムの一部が明らかとなった。すなわち、閉経による **estradiol** 欠乏が、圧負荷により惹起される酸化ストレス・炎症反応を助長させ、その結果として心筋線維化を増加し心筋スティッフネスを増加させるものと考えられた。本研究の結果は、国内外の循環器・高血圧・心不全学会で発表したのち、現在、米国の英文専門誌に投稿中である。

(2) 血圧変動高血圧モデルを用いた検討

A. メス血圧変動高血圧モデルとオス血圧変動高血圧モデルの比較

a. 我々がこれまでに科学研究費補助金を受け報告した通り、SHR に両側動脈圧受容体除神経術 (**sino-aortic denervation; SAD**) を施すと、SHR と平均血圧は変わらないが、血圧変動が増大した高血圧のモデルを作成できる。今回、メス SHR に SAD を施し、オス SHR と比較した。血圧変動の指標である平均血圧の標準偏差および共変動にメス血圧変動高血圧モデルとオス血圧変動高血圧モデルの間に有意差は認められなかった。

b. オス血圧変動高血圧モデルにおいて、**sham** 手術を施したオス安定高血圧モデルを比較すると、平均血圧は変わらないにもかかわらず、左室重量/体重比、心筋線維化が増加した。心筋線維化は血管周囲の反応性心筋線維化のみならず心筋壊死・脱落にともなう置換性線維化もみられた。血圧変動高血圧モデルにおいては、心エコー上、求心性心肥大と左室駆出分画低下が認められたが、左室拡張末期径に著変を認めなかった。血圧変動高血圧モデルでは、心筋内血管周囲を中心とするマクロファージ浸潤と **MCP-1**・**アンジオテンシノーゲン** 発現が著明に亢進していた。

c. これらの変化について、明らかな性差は見ら

れなかった。

B. 正常メス血圧変動高血圧モデルと卵巣摘出メス血圧変動高血圧モデルの比較

a. 平均血圧および血圧変動の指標である平均血圧の標準偏差および共変動に正常メス血圧変動高血圧モデルと卵巣摘出メス血圧変動高血圧モデルに差は無かった。左室肥大の程度は、両群で有意差を認めなかった。心エコー上、卵巣摘出群においてさらなる左室駆出分画低下と左室拡張末期径増大が見られた。

b. 心筋線維化面積が正常メス血圧変動高血圧モデルと比較して卵巣摘出メス血圧変動高血圧モデルにおいて著明に増加していた。特に置換性線維化がびまん性に拡大していた。現在、これらの卵巣摘出の影響のメカニズムを、免疫染色、**DHE** 染色、リアルタイム **RT-PCR** 法により解析中である。

C. まとめ

血圧変動の増大は、平均血圧上昇に依存せず高血圧性心リモデリング（左室肥大、心筋線維化）を助長し、収縮障害を引き起こす。血圧変動により心筋内血管および血管周囲組織の炎症が惹起されることがその機序として重要であることが示唆された。以上に関して、国内外の循環器・高血圧・心不全学会で発表したのち、現在、米国の英文専門誌に投稿中である。

血圧変動によって引き起こされる変化に関しては、正常メスではオスに明らかな性差はなかった。しかしながら、閉経後モデルではこの変化が助長され、心機能障害の増悪に関与していることが示唆されたため、現在更なる検討を行っている。

(3) レーザーマイクロダイセクション法による心筋構成細胞別の遺伝子発現を解析

A. 圧負荷心拡張障害モデルを用いた検討

a. 各モデルの心筋細胞・血管平滑筋細胞・浸潤細胞サンプルを回収した。マイクロチップ法による遺伝子発現の網羅的解析法を施行した。4倍以上発現亢進あるいは減少した遺伝子について現在 **RT-PCR** 法にて有意性を確認した。

b. **MCP-1** は、オス・メス WKY とともに圧負荷によって3日後をピークに血管のみにおいて発現誘導された。**BNP** は心筋細胞のみに発現誘導された。**TGF- β** は血管、心筋、浸潤細胞ともに発現亢進を認めた。卵巣摘出 WKY では、血管での **MCP-1** 発現が、**TGF- β** 発現は得に血

管・浸潤細胞で特異的に亢進していた。これに対して BNP はメス WKY と著変なかった。

c. 現在、炎症性サントカインネットワークの心筋、血管、浸潤細胞間クロストークにつき、コンピュータ解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Mori T, Kai H, Koga M, Ikeda A, Fukui D, Yasukawa H, Kai M, Imaizumi T. Estrogen withdrawal prolonged vascular inflammation and oxidative stress and aggravated diastolic function in pressure-overloaded female rats. (投稿中).
2. Kudo H, Kai H, Koga M, Takayama N, Mori T, Ikeda A, Yasuoka S, Kajimoto H, Mifune H, Kato S, Hirooka H, Imaizumi T. Exaggerated blood pressure variability superimposed on hypertension aggravates cardiac remodeling in rats via angiotensin II-mediated chronic inflammation. (投稿中).
3. Mizuta Y, Kai H, Mizoguchi M, Osada K, Tahara N, Nakaura H, Kuwahara F, Imaizumi T. Long-term treatment with valsartan improved cyclic variation of the myocardial integral backscatter signal and diastolic dysfunction in hypertensive patients -The echocardiographic assessment- *Hypertens Res* 2008; 31(10):1843-1849.
4. Takeshita Y, Katuski Y, Katsuda Y, Kai H, Saito Y, Arima K, Sasaki K-I, Imaizumi T. Vitamin C reversed the malfunction of peripheral blood-derived mononuclear cells in chronic smokers through the anti-oxidative property *Circ J* 72(4):654-659, 2008.
5. Kanahara M, Kai H, Okamura T, Wada T, Suda K, Imaizumi T, Sagawa K. Usefulness of high concentration calcium chloride solution for correction of activated partial thromboplastin time (APTT) in patients with high hematocrit value. *Thromb Res* 121 (6):781-785, 2008.
6. Koga M, Kai H, Egami K, Murohara T, Ikeda A, Yasuoka S, Egashira K, Matsuishi T, Kai M, Kataoka Y, Kuwano M, Imaizumi T. Mutant MCP-1 Therapy Inhibits Tumor Angiogenesis and Growth of Malignant Melanoma in Mice. *Biochem Biophys Res Comm* 365 (2):279-284, 2008.
7. Tahara N, Kai H, Nakaura H, Ishibashi M, Hayabuchi N, Imaizumi T. The Prevalence of inflammation in carotid atherosclerosis -First prospective analysis with fluorodeoxyglucose positron emission tomography and carotid ultrasonography- *Eur Heart J* 2007; 28 (18):2243-2248.
8. Kai H, Tahara N, Ishibashi M, Imaizumi T. Reply to a letter to the Editor. Simvastatin attenuates plaque inflammation. -Evaluation by fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol* 2007;49 (19):1991-1992.
9. Tahara N, Kai H, Yamagishi S, Mizoguchi M, Nakaura H, Ishibashi M, Kaida H, Baba K, Hayabuchi N, Imaizumi T. Vascular inflammation evaluated by [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography is strongly associated with the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2007;49 (14):1533-1539.
10. Koga M, Kai H, Yasukawa H, Yamamoto T, Kato S, Kusaba K, Kai M, Egashira K, Kataoka T, Imaizumi T. Inhibition of progression and stabilization of plaques by postnatal interferon- γ function blocking in ApoE-KO mice. *Circ Res* 2007;101 (4): 348-356.
11. Kusaba K, Kai H, Koga M, Takayama N, Ikeda A, Yasukawa H, Seki Y, Egashira K, Imaizumi T. Inhibition of intrinsic interferon- γ function prevents neointima formation after vascular injury. *Hypertension* 2007;49 (4):909-915.
12. 甲斐久史: 治療抵抗性高 LDL コレステロール血症に対するアプローチ. *Medical Practice* 25 (3): 536, 2008.
13. 甲斐久史、今泉 勉: 高用量ストロングスタチン服用を必要とする難治性高 LDL コレステロール血症に対するエゼチミブ隔日投与併用療法の有用性. *Progress in Medicine* 28 (1): 159-163, 2008.

[学会発表] (計 30 件)

**European Society of Cardiology Congress
2007 (2007.9.1-5, Wien, Austria)**

1. Kudo H, Kai H (他 6 名 2 番目) Blood pressure variability-induced aggravation of end-organ damages is another achievable target of hypertension treatment –Effects of angiotensin receptor blocker in animal model-
2. Mori T, Kai H (他 6 名 2 番目) Estrogen withdrawal aggravates myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded female rats by enhancing perivascular inflammation and oxidative stress.
3. Takemiya K, Kai H (他 11 名 2 番目) Mesenchymal stem cell-based prostacyclin synthase gene therapy for monocrotaline-induced pulmonary hypertension.
4. Mizuta Y, Kai H (他 2 名 2 番目) Valsartan attenuated myocardial fibrosis and diastolic dysfunction of hypertensive hypertrophied hearts in humans. Assessment using integrated backscatter analysis.

**American Heart Association Scientific
Sessions 2007 (2007.11.4-7, Orlando, USA)**

1. Kudo H, Kai H (他 9 名 2 番目) Blood pressure variability-induced aggravation of end-organ damages is another achievable target of hypertension treatment –Effects of angiotensin receptor blocker in animal model-
2. Ikeda A, Kai H (他 2 名 2 番目) Interferon-gamma-mediated CD40/CD40 ligand pathway activation mediates atherosclerotic plaque progression and destabilization in apoE-knockout mice.

**62nd High Blood Pressure Research
Conference 2008 and Scientific Sessions
of the Council for High Blood Pressure
Research (2008.9.17-20, Atlanta, USA)**

1. Mizuta Y, Kai H, (他 4 名 2 番目) Valsartan improved myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in hypertensive patients, preferentially in patients with severe fibrosis.
2. Takayama N, Kai H, (他 8 名 2 番目) Simvastatin attenuates large blood pressure

variability-induced aggravation of cardiac hypertrophy, but not myocardial fibrosis, by inhibiting Ras-ERK and Rho A pathways in hypertensive rats. –New cardioprotective effects of statins-

3. Kajimoto H, Kai H, (他 3 名 2 番目) Role of Asymmetric Dimethylarginine in endothelial dysfunction in renal failure mice.

第 30 回日本高血圧学会 (2008.10.9-11, 札幌)

1. 池田理望、甲斐久史、安岡逸、梶本英美、今泉勉. レーザーマイクロダイセクション法を用いた心筋構成細胞の選択的遺伝子発現解析法の開発

※他 20 演題は紙面の都合で割愛する

○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

甲斐 久史 KAI, HISASHI
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号 60281531

(2) 研究分担者

工藤 博司 KUDO, HIROSHI
久留米大学・医学部・助教
研究者番号 10373135
池田 理望 IKEDA, AYAMI
久留米大学・医学部・助教
研究者番号 80412500

(3) 連携研究者

森隆宏 MORI, TAKAHIRO
久留米大学・医学部・助教
高山成政 TAKAYAMA, NARIMASA
久留米大学・医学部・助教
安岡 逸 YASUOKA, SUGURU
久留米大学・医学部・助教
梶本英美 KAJIMOTO, HIDEKI
久留米大学・循環器病研究所・助教
古賀允久 KOGA, MITSUHISA
久留米大学・循環器病研究所・研究員
廣岡良隆 HIROOKA, YOSHITAKA
九州大学・医学部・講師