

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08506

研究課題名(和文) 心臓リモデリングにおける交感神経非依存的な新規の脳-心臓連環機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of novel sympathetic nerve-independent pathophysiological interactions between heart and brain in cardiac remodeling

研究代表者

大谷 健太郎 (Otani, Kentaro)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・研究室長

研究者番号：50470191

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)：先行研究にて我々は、内因性ナトリウム利尿ペプチド系を欠損したマウス(GC-A-KO)が授乳期に周産期心筋症様の心機能低下を伴う顕著な心肥大を呈することを見出した。GC-A-KOは授乳期に血漿アルドステロン濃度が著明に上昇し、脳内アルドステロン受容体の不活性化によりGC-A-KOの授乳誘発性心肥大変化が消失することから、GC-A-KOの授乳誘発性心肥大に脳内アルドステロン系の賦活化が関与する可能性が示唆される。しかし、その詳細な機序は未だ不明である。本研究では、GC-A-KOにおける授乳誘発性心肥大の発症機序を脳-心臓連環という新たな視点から解明することである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

周産期心筋症は心疾患既往のない女性が妊娠後期から産褥期にかけて心不全を発症し、拡張型心筋症に類似した病態を呈する疾患であり、疾患特異的な診断および治療法は未だ存在しない。これまでの一連の研究の結果、周産期心筋症の発症機序が少しずつ明らかになりつつある。今後、本研究結果を基にした周産期心筋症に対する疾患特異的な診断・治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that mice lacking guanylyl cyclase-A (GC-A-KO), a receptor for atrial and brain natriuretic peptides, exhibit the severe postpartum cardiac hypertrophy and cardiac dysfunction like postpartum cardiomyopathy (PPCM). The elevated plasma aldosterone level in lactating GC-A-KO and the disappearance of lactation-induced cardiac hypertrophy in GC-A-KO by the inactivation of neural aldosterone receptor depict that the neural aldosterone system might be involved in the lactation-induced cardiac hypertrophy. However, the underlying mechanisms remains unclear. The aim of this study was to clarify the mechanisms of lactation-induced cardiac hypertrophy in GC-A-KO, especially focusing on the novel pathophysiological interactions between brain and heart.

研究分野：循環器内科学

キーワード：周産期心筋症 ナトリウム利尿ペプチド 心肥大 授乳 臓器連環

1. 研究開始当初の背景

心不全は、全世界で罹患者数が約 4 千万人の心臓機能障害の総称であり、超高齢化社会となった本邦でも近い将来、患者数の急増が懸念される。心不全の病態生理には交感神経活動の亢進やレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAAS) の賦活化が関与するため、これら神経内分泌系の障害が現状の心不全治療の中心である。心不全の標準治療 (RAAS 抑制剤、 β 遮断薬など) にて治療中の慢性心不全患者に対し、選択的ミネラルコルチコイド受容体 (Mineralocorticoid receptor: MR) 拮抗薬の追加投与は予後改善および心血管イベント抑制に寄与する (*N Eng J Med* 2003)。しかし、心不全患者の血中アルドステロン濃度は必ずしも高値を示さず、心不全に対する選択的 MR 拮抗薬の作用機序には未だ不明な点が少なからず存在する。一方、心不全心では炎症細胞浸潤を認めることが多く、心不全発症と炎症の関連が近年指摘されている。

周産期心筋症 (Peripartum Cardiomyopathy: PPCM) は、心疾患既往のない女性が産褥期に突然の心機能低下を来して心不全を発症する疾患である。標準的な心不全治療に準じた利尿剤・強心薬・ACE (アンジオテンシン変換酵素) 阻害薬などの投与が現状の治療として行われてはいるものの、PPCM 重症例の中には補助人工心臓装着や心臓移植が検討される例、さらには死亡例も存在する。日本での PPCM 発症頻度は約 2 万分娩に 1 例であるが、35 歳以上の高齢出産では PPCM の発症頻度が約 2 倍に上昇することが明らかとなっている (*Circ J.* 2011)。本邦では晩婚化・晩産化が急速に進んでおり、今後 PPCM 罹患率の上昇が危惧される。そのため、PPCM の病態解明・画期的治療法開発は我が国にとって急務である。

心臓で産生・分泌される循環ホルモンである心房性・脳性ナトリウム利尿ペプチド (ANP・BNP) は、利尿・ナトリウム利尿・血管拡張・心臓リモデリング抑制・虚血組織における血管新生促進等の多彩な生理作用を有する (*BBRC* 1984, *Nature* 1988)。我々は先行研究にて、ANP・BNP の共通受容体である Guanylyl Cyclase-A の遺伝子欠損マウス (GC-A-KO) が、産褥期に PPCM 様の心機能低下を伴う顕著な心肥大を呈することを明らかにした (*Otani et al. Circulation* 2020)。

ANP・BNP/GC-A 系は RAAS による心臓リモデリングに対して抑制的に作用することから、GC-A-KO における産褥期心不全の発症原因について、RAAS の関与を中心に探索を行った。その結果、GC-A-KO における PPCM 様心肥大は授乳により惹起され、授乳期の GC-A-KO では血漿アルドステロン濃度の著明な上昇、および心臓組織における腫瘍壊死因子- α (TNF- α) やインターロイキン-6 (IL-6) の遺伝子発現増加を認めた。一方、GC-A-KO と細胞特異的 MR 欠損マウスとの交配実験から、GC-A-KO における授乳誘発性心肥大は脳内アルドステロン - MR 系の賦活化による誘導されることが明らかとなった。

脳内アルドステロン - MR 系の活性化は酸化ストレスを介した中枢性交感神経亢進に關与する (*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008)。ところが、授乳期に抗酸化剤あるいは β 遮断薬を投与しても、GC-A-KO の授乳期心肥大は抑制できなかった (*Otani et al. Circulation* 2020)。この結果は、炎症性サイトカインの遺伝子発現上昇を伴う GC-A-KO における授乳期心肥大が、脳内 MR の活性化を介した交感神経非依存的なシグナルにより誘発されることを示唆するものである。

2 . 研究の目的

本研究の目的は、我々が世界で初めて確立した PPCM モデルマウス(GC-A-KO)を対象とし、脳内アルドステロン - MR 系の賦活化が如何に授乳誘発性心肥大を惹起するのか、その機序を脳 - 心臓連環という新たな視点から解明することである。

3 . 研究の方法

本研究では 10 週齢の雌性マウスを用い、未妊娠状態あるいは授乳 2 週目のタイミングで解析を行った。

初めに、未妊娠の雌性 C57BL/6 マウスの脳室内にアルドステロンを投与することにより、雌性 GC-A-KO で見られた授乳誘発性心肥大様の変化が誘発される得るかについて検討を行った。Alzet 浸透圧ポンプを接続した Alzet Brain Infusion Cannula (いずれも Durect 社) を側脳室に留置し、脳室内にアルドステロンを 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で持続投与した。対照群として溶媒 (2% エタノール) を同様に投与した雌性 C57BL/6 マウスを用い、アルドステロン投与 2 週間後に収縮期血圧の測定および心重量計測を行った。

脳内アルドステロン - MR 系の活性化は心血管系に炎症を誘発することが従来知られている。GC-A-KO では授乳により脳内アルドステロン - MR 系の活性化が示唆されたが、授乳が心筋内炎症細胞、特に心臓マクロファージ数に及ぼす影響は不明である。そこで、未妊娠および授乳 2 週目の GC-A-KO の心臓におけるマクロファージ数を抗 CD68 抗体を用いた免疫組織染色にて評価した。対照群として、未妊娠および授乳 2 週目の野生型マウスの心臓を用いた。1 視野内の全てのマクロファージ数を計測し、単位面積当たりマクロファージ数を算出し、比較検討した。

先行研究にて、中枢神経特異的な MR 欠損により GC-A-KO における授乳誘発性心肥大が抑制されることが示された。しかし、中枢神経特異的な MR 欠損が GC-A-KO の心臓における遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかは未だ不明である。そこで、GC-A-KO(GC-A-KO; *Nr3c2^{fl/fl}*; Cre -) および中枢神経特異的 MR 欠損 GC-A-KO (GC-A-KO; *Nr3c2^{fl/fl}*; *Nestin-Cre*) の心臓における遺伝子発現、特に心肥大に関連する胎児型遺伝子 (*Nppa*, *Nppb*, *Acta1*) への影響について定量 PCR による検討を行った。

本研究における動物実験は実験動物愛護に充分配慮し、かつ動物実験計画書を国立循環器病研究センター動物実験委員会に提出し、承認を受けた上で実施した。

4 . 研究成果

溶媒 (2% エタノール) 群に比し、アルドステロン脳室内投与群では未妊娠雌性野生型マウスの収縮期血圧が軽度ながらも有意な上昇を認めた ($98.8 \pm 1.5 \text{ mmHg}$ vs. $105.0 \pm 1.5 \text{ mmHg}$)。しかし、アルドステロン投与 2 週間後の心重量に有意な差は認められなかった (心重量脛骨長比 (mg/mm) : 4.38 ± 0.12 [溶媒群] vs. 4.28 ± 0.12 [アルドステロン群])。これらの結果から、授乳により GC-A-KO に誘発される周産期心筋症様の心肥大変化は、単に中枢神経におけるアルドステロン - MR 系の活性化だけで誘導されるものではなく、妊娠・授乳に伴う母体環境の変化が重要である可能性が示唆された。

次に、心臓マクロファージ数について検討したところ、未妊娠時の心臓マクロファージ数は野生型マウスと GC-A-KO の間で有意な差を認めなかった（野生型マウス： $87.7 \pm 11.2 /\text{mm}^2$ vs. GC-A-KO： $105.2 \pm 19.2 /\text{mm}^2$ ）。野生型マウスでは授乳に伴い、心臓マクロファージ数が有意に低下した（ $32.7 \pm 6.2 /\text{mm}^2$ ）。一方、GC-A-KO では授乳に伴う心臓マクロファージ数の低下は認められず（ $103.0 \pm 10.0 /\text{mm}^2$ ）。結果として授乳期 GC-A-KO の心臓マクロファージ数は授乳期野生型マウスに比し有意に高値を示した。この結果から、GC-A-KO の授乳誘発性心肥大の病態形成に心臓マクロファージが関与する可能性が示唆された。

最後に、中枢神経特異的な MR 欠損が GC-A-KO の心臓の遺伝子発現に与える影響を検討した。中枢神経特異的な MR 欠損マウス（*Nr3c2^{fl/fl}; Nestin-Cre*）の視床下部では、MR の発現が対照マウス（*Nr3c2^{fl/fl}; Cre -*）に比し約 50% に低下することを初めに確認した。GC-A-KO; *Nr3c2^{fl/fl}; Cre -* では授乳により *Nppa*、*Acta1* の発現上昇を認めた。一方、未妊娠の GC-A-KO; *Nr3c2^{fl/fl}; Nestin-Cre* では、未妊娠の GC-A-KO; *Nr3c2^{fl/fl}; Cre -* に比し、*Nppa*、*Nppb*、*Acta1* 発現が低い傾向が認められた。また、GC-A-KO; *Nr3c2^{fl/fl}; Nestin-Cre* では授乳による *Nppa* および *Acta1* の発現上昇が抑制されることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 徳留 健、大谷健太郎	4. 巻 44
2. 論文標題 ANPによる血圧調節の分子メカニズム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 血管	6. 最初と最後の頁 9-18
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 有
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 -

1. 著者名 大谷健太郎、神谷千津子、徳留 健	4. 巻 89
2. 論文標題 妊娠中および産褥期における心臓ナトリウム利尿ペプチドの生理的意義の解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 循環器内科	6. 最初と最後の頁 386-394
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 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kentaro Otani
2. 発表標題 Deficiency of cardiac natriuretic peptide signaling promotes peripartum cardiomyopathy-like remodeling in the mouse heart
3. 学会等名 The 5th JCS Council Forum on Basic Cardio Vascular Research
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大谷健太郎
2. 発表標題 授乳期心臓リモデリングにおける心臓ナトリウム利尿ペプチド系の病態生理学的意義
3. 学会等名 第25回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大谷健太郎、徳留 健
2. 発表標題 Physiological roles of endogenous natriuretic peptides during gestation and peripartum period
3. 学会等名 第24回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 神谷千津子、大谷健太郎	4. 発行年 2021年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 432
3. 書名 循環器内科学レビュー 最新主要文献とガイドラインでみる 2022-23	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 周産期心筋症治療剤	発明者 大谷健太郎、徳留 健、神谷千津子	権利者 国立循環器病研 究センター、中 外製薬株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/040927	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------