

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17852

研究課題名(和文)敗血症性心筋症における 3アドレナリン受容体の誘導型NOS調節機構の解明

研究課題名(英文)Clarification of the mechanism for beta-3 adrenergic receptor regulation of Inducible nitric oxide synthase in septic cardiomyopathy

研究代表者

川口 哲(Kawaguchi, Satoshi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：60814217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究成果から、1)敗血症性心筋症で心筋 3アドレナリン受容体(3AR)は増加させる、2) 3ARは一酸化窒素(NO)を産生に寄与し、3ARからの誘導型一酸化窒素産生経路(iNOS)を介した独自のNO産生経路を有する可能性がある、3)敗血症性心筋症では心筋 3ARを遮断する事で、心筋代謝障害を抑制し、心機能低下を抑制する、事がわかった。この事から、心筋 3ARが敗血症性心筋症における新たな治療戦略となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症性心筋症は予後不良の合併症であり、その有効な治療法は存在しない。本研究では、リボポリサッカロイドを投与した敗血症マウスを用いて心筋 3アドレナリン受容体(3AR)の発現が増加する事を証明した。また、敗血症では過剰な一酸化窒素(NO)が産生される事で心筋代謝障害を引き起こすが、心筋 3ARは独自の一酸化窒素合成酵素(iNOS)を介したNO産生経路を持っている事がわかった。すなわち、敗血症での心筋 3ARを遮断する事で、過剰なNO産生を抑制し、これが心機能障害を抑制する事が示された。これらの結果から、3AR遮断が敗血症性心筋症に対する新たな治療法につながる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Our study identified three findings; 1) myocardial 3 adrenergic receptor (3AR) increases in cardiomyocytes in sepsis, 2) myocardial 3AR may have its particular pathway to produce nitric oxide via inducible nitric oxide synthase, 3) 3AR blockade contributes to attenuate cardiac dysfunction in sepsis (sepsis induced cardiomyopathy). These findings may lead to develop a new strategy for sepsis induced cardiomyopathy.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 心不全 敗血症性心筋症 心筋代謝 心機能障害 アドレナリン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症患者は増加の一途をたどっており、世界人口の5人に1人が敗血症で命を落とすと言われている。2017年の日本のビッグデータによれば、敗血症死亡者は年間6万人、さらには敗血症診療にかかる総額は3515億円(2010年)から5050億円(2017年)と急増傾向である。したがって、敗血症の死亡者を減らし、合併症や後遺症を減らして患者の社会復帰につなげる治療法の開発が急務の課題である。重症敗血症は20-60%に心機能障害を合併し、これは敗血症性心筋症といわれる。敗血症性心筋症は予後不良の合併症と考えられ、有効な治療法は存在しない。敗血症性心筋症は、過剰な一酸化窒素(NO)産生からの心筋ミトコンドリア機能障害による心筋代謝障害が原因の1つと考えられる。また、近年は $\beta 3$ アドレナリン受容体(以下、 $\beta 3AR$ )が心不全で増加し、 $\beta 3AR$ 刺激が心筋虚血や心不全に有用との報告がなされている。我々は、敗血症マウスの心筋でも $\beta 3AR$ が増加し、 $\beta 3AR$ 遮断薬を導入する事で、心機能障害を抑制し予後を改善する可能性を突き止めた。さらに、 $\beta 3AR$ を遮断する事でNOが減少する事に着目しており、 $\beta 3AR$ からの誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)を介したNO産生経路が存在している可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、敗血症マウスの敗血症心筋で心筋 $\beta 3AR$ の発現増加を確認し、心筋 $\beta 3AR$ 刺激・遮断を薬剂的に介入する事で心筋NO産生に関与するかを検討する。さらに、ラット心筋芽細胞(H9C2)細胞で $\beta 3AR$ をノックダウンし、 $\beta 3AR$ がiNOSを介した独自のNO産生経路を有するかどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

目的1: 敗血症マウスにおける $\beta 3AR$ 刺激・遮断薬投与後の心筋NOS、NO産生量の測定

敗血症モデルは、リポポリサッカロイド(LPS)を腹腔内投与したマウスを用い、 $\beta 3AR$ 刺激薬・遮断薬投与後に心筋を摘出して、心筋内のiNOS、内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)、NOの発現量を計測し、 $\beta 3AR$ 発現との関連を調べる。

敗血症モデル: 8-10週令C57Bl/6Jの雄マウスに、27ゲージ針で10mg/kgのLPSを腹腔内投与する。この敗血症モデルは、約3時間程度で心機能が低下し始め、6-12時間で左室駆出率(EF)が最も低下し、その後、24時間かけて改善していく。本実験では、LPS投与12時間後の心筋をサンプルとして用いた。LPS投与3時間後に生理食塩水、 $\beta 3AR$ 刺激薬(CL316243, 1mg/kg)、もしくは、 $\beta 3AR$ 遮断薬(SR59230A, 1mg/kg)を腹腔内投与した。LPSの代わりに生理食塩水を投与するコントロール群(CT群)、LPS投与後に生理食塩水を投与する群(NS群)、 $\beta 3AR$ 刺激薬を投与する群(CL群)、 $\beta 3AR$ 遮断薬を投与する群(SR群)の4群で比較検討した。

NOS、NO測定: LPS投与12時間後に心筋を摘出し、NOS(iNOS、eNOS)及びNOを測定する。NOSはqPCR法、ウエスタンブロット法で測定し、NO量はNO測定キットを用いて比色法で定量化した。炎症因子の測定: iNOS以外の炎症因子(TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ )をqPCR法で定量化した。さらには、inflammatory mediator 各種の上流にあるNF $\kappa$ Bも測定した。

心筋ATP測定: 4群間におけるルシフェラーゼアッセイでの心筋ATP産生を測定、および心筋ミトコンドリア抽出後に酸化的リン酸化(OXPHOS)に関わるcomplex I-Vをウエスタンブロットで比較検討する。

目的2: H9C2細胞における $\beta 3AR$ ノックダウンモデルでの $\beta 3AR$ -NO産生経路の証明

さらには、ラット心筋芽細胞(H9C2)で $\beta 3AR$ をノックダウンし、LPSに暴露して $\beta 3AR$ がNOの独自の産生経路を有する事を証明する。

$\beta 3AR$ ノックダウン細胞の作成: H9C2細胞を培養し、siRNAによる $\beta 3AR$ のノックダウンを行う。ノックダウン効率は15%以下を目指し、ノックダウン効率が一定になるように手技を安定させる。LPS投与量は10 $\mu$ g/ml(LPS群)、CL316243暴露は1 $\mu$ g/ml(CL群)とする。

NOS、NO測定: LPS暴露6時間におけるコントロール(si-NC)群、LPS群、CL+LPS群、 $\beta 3AR$ ノックダウン+LPS(si- $\beta 3AR$ +LPS)群の4群比較を行う。NOS(iNOS、eNOS)はリアルタイムPCR法で定量化する。NO測定については、NO測定キットを用いて比色法で定量化する。

$\beta 3AR$ -iNOS-NO発現経路: 古典的経路としてNF $\kappa$ BからのiNOS産生があげられる。NF $\kappa$ BをリアルタイムPCR法で定量化し、その影響を調べる。(各群でNOS発現に差が生じ、NF $\kappa$ Bに差がでなければ $\beta 3AR$ を介したNOS発現と考えることができる。)

#### 4. 研究成果

- (1) LPS 投与により、心筋  $\beta$ 3AR の発現は有意に増加する事が確認された。SR 群は、NS 群と比較し有意に生存率が改善し、CL 群では NS 群と比較し有意に生存率が低下した(図 1)。また、心機能の変化は LPS 投与 6-12 時間後において、SR 群は NS 群と比較し、有意に EF が増加し、CL 群は NS 群と比較して有意に EF が低下していた。なお、どの群においても時間経過で生存マウスの EF は正常に回復していく経過となった(図 2)。

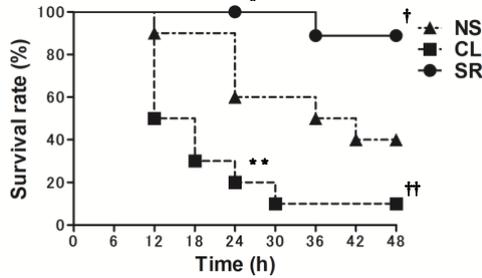


図 1. 各群における LPS 投与後の生存率の比較。

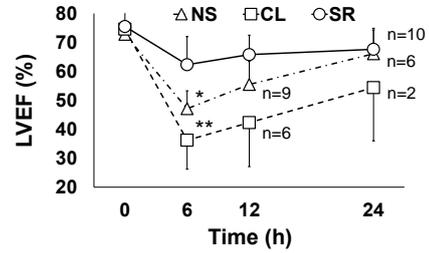


図 2. 各群における LPS 投与後の EF の時間経過。

- (2) LPS 投与 12 時間後の心筋 NO 産生量は、CL 群では NS 群と比較して有意に増加しており、SR 群では有意に低下していた(図 3)。さらに、心筋 iNOS、eNOS の発現において、iNOS は NS 群、CL 群で有意に増加していたが(図 4. A)、eNOS は各群で発現に差を認めなかった(図 4. B)。

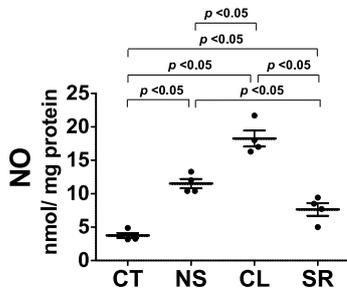


図 3. 各群における心筋 NO 産生量の比較。

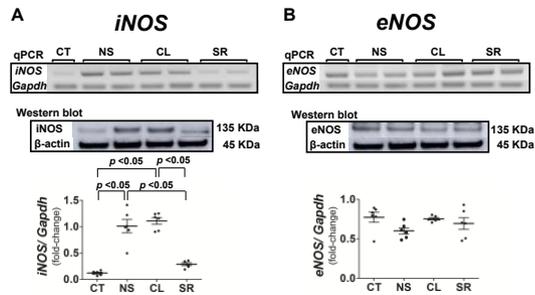


図 4. A. 各群における心筋 iNOS の qPCR およびウェスタンブロットの比較。B. 各群における心筋 eNOS の qPCR およびウェスタンブロットの比較。

- (3) LPS 投与 12 時間における心筋 NF $\kappa$ B は LPS 投与により発現は有意に増加した。しかし、NS 群、CL 群、SR 群間においては差を認めなかった(図 5)。なお、Tnf $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  の発現に関しても、LPS 投与により発現は増加するが、NS 群、CL 群、SR 群間においては差を認めなかった事を確認している。

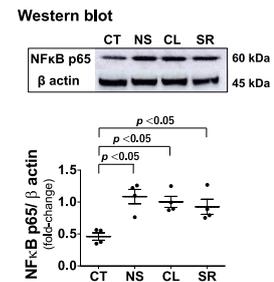


図 5. 各群における心筋 NF $\kappa$ B の比較。

- (4) 心筋 ATP は、LPS 投与 12 時間において、CT 群と比較し、NS 群、CL 群で有意に低下した。一方、SR 群については、ATP 量が保たれており、CT 群と差が無かった(図 6)。また、酸化リン酸化に関わるミトコンドリアの complex I-V において、NS 群、CL 群では発現が減少しており、SR 群では発現が保たれていた(図 7)。

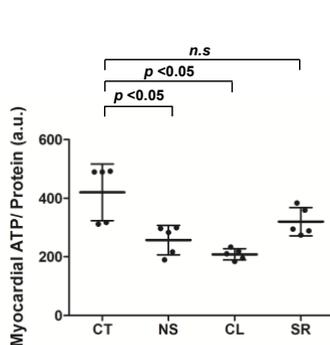


図 6. 各群の ATP 産生量の比較。

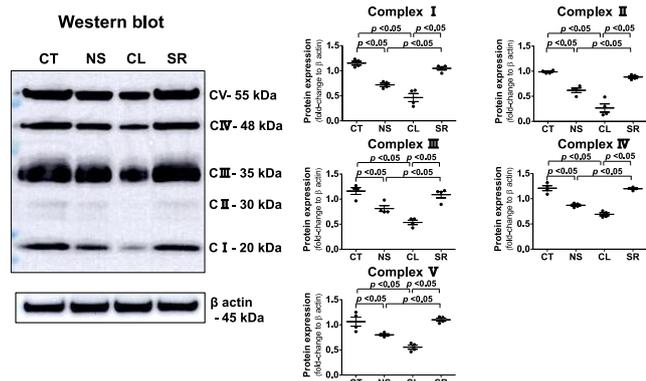


図 7. 各群における OXPHOS の complex I-V の発現比較。

- (5) H9C2 細胞は、LPS 暴露 6 時間で  $\beta$  3AR 発現が上昇した。一方、CL 刺激では  $\beta$  3AR は増加しなかった。 $\beta$  3AR をノックダウンすると、LPS 暴露でも  $\beta$  3AR の発現は増加しないことを確認した(図 8. A)。次に、si-NC 群、LPS 群、CL+LPS 群、si- $\beta$  3AR+LPS 群において、ミトコンドリア機能の指標として PGC1 $\alpha$ 、TFAM を計測した。LPS 群では、PGC1 $\alpha$ 、TFAM の発現は有意に低下し、CL+LPS 群ではさらに低下した。一方、si- $\beta$  3AR+LPS 群では、PGC1 $\alpha$ 、TFAM の発現は保たれていた(図 8. B)。

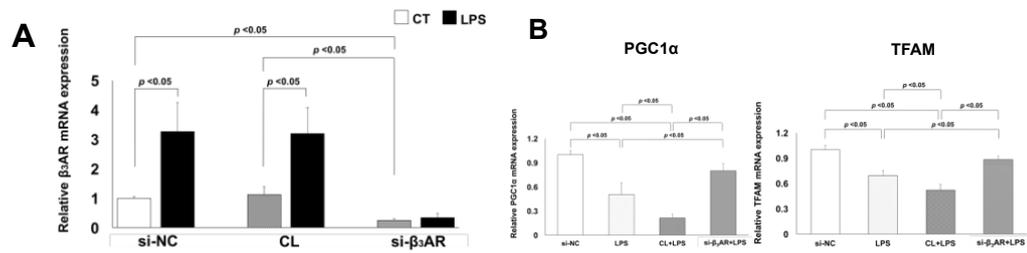


図 8. A. H9C2 の LPS 暴露 6 時間後における各群の  $\beta$  3AR の発現比較。 B. 各群における PGC1 $\alpha$ 、TFAM の発現比較。

- (6) si-NC 群、LPS 群、CL+LPS 群、si- $\beta$  3AR+LPS 群の 4 群において、iNOS、eNOS の発現を確認したところ、iNOS は CL+LPS 群で LPS 群より有意に増加し、si- $\beta$  3AR で発現が低下した(図 9. A)。eNOS は 4 群間で差を認めなかった(図 9. B)。NO 産生量は、CL+LPS 群で LPS 群より有意に増加し、si- $\beta$  3AR+LPS 群で LPS 群より有意に低下した(図 9. C)。また、NF $\kappa$ B の発現は、LPS 暴露で発現は増加するが、各群で発現に差は認めなかった(図 9. D)。

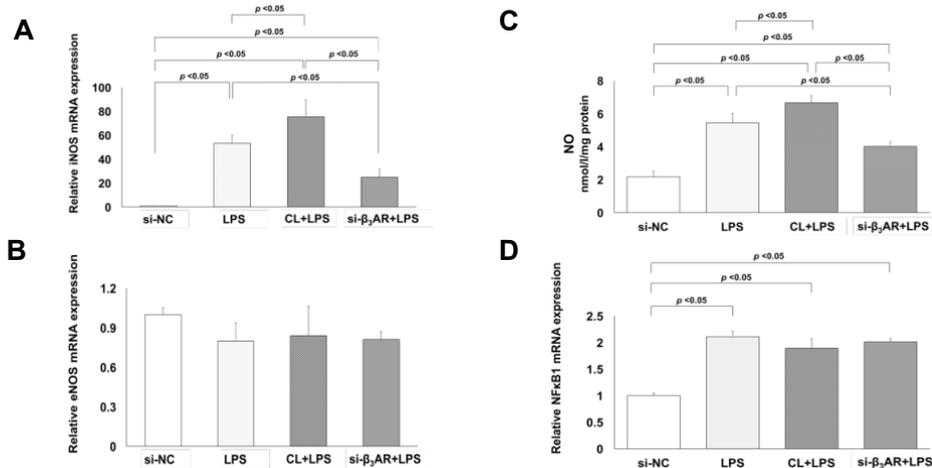


図 9. A. LPS 暴露 6 時間後における iNOS 発現の比較。 B. LPS 暴露 6 時間後における eNOS 発現の比較。 C. LPS 暴露 6 時間後における各群の NO 産生量の比較。 D. LPS 暴露 6 時間後における NF $\kappa$ B 発現の比較。

上記、研究成果により、敗血症性心筋症において心筋  $\beta$  3AR は、NF $\kappa$ B を経由しない独自の NO 産生経路を持っており、この経路に iNOS の発現が関与する事が示された。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawaguchi Satoshi, Okada Motoi	4. 巻 11
2. 論文標題 Cardiac Metabolism in Sepsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 846 ~ 846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo11120846	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 -

1. 著者名 Satoshi Kawaguchi, Motoi Okada et al.	4. 巻 318
2. 論文標題 3-Adrenergic receptor blockade reduces mortality in endotoxin-induced heart failure by suppressing induced nitric oxide synthase and saving cardiac metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H283-H294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00108.2019	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 Tatsuki Kuroshima, Satoshi Kawaguchi and Motoi Okada	4. 巻 25(9)
2. 論文標題 Current Perspectives of Mitochondria in Sepsis-Induced Cardiomyopathy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms25094710.	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川口 哲
2. 発表標題 敗血症性心筋症の病態生理 (教育セッション)
3. 学会等名 第88回日本循環器学会総会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024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
--	---------------------------	-----------------------	----

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