

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590893

研究課題名（和文） 拡張不全発症・進行における食塩感受性の役割について  
内因性ステロイド物質の関与研究課題名（英文） The role of salt sensitivity in the development of heart failure  
with preserved ejection fraction and the relation of intrinsic steroids

研究代表者

坂田 泰史（SAKATA YASUSHI）

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00397671

研究成果の概要（和文）：内因性ステロイド物質の一つである ouabain は特に高食塩にさらされている状況において、心筋に直接働き、特に線維化を亢進させる可能性が示唆された。また、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX) reverse mode を選択的に阻害する SEA0400 を血圧低下させない 0.3mg/kg の SEA0400 の投与が行われた高食塩食群は、高食塩食のみを負荷した群に比し、拡張不全の発症が抑制され、有意に予後が改善した。ウアバインを心筋線維芽細胞に投与したところ、細胞外カルシウムの流入を増やす形で細胞内カルシウム濃度を上昇させ、p41/44 MAPkinase のリン酸化を亢進させ、3H-prolin の取り込みを亢進させた。これらの影響は、SEA0400 により抑制された。以上より、内因性ステロイドは主に NCX reverse mode を活性化することにより高血圧性拡張不全発症に関係し、その阻害薬は、拡張不全治療に寄与すると考えられた。今後は、さらに内因性ステロイドに対する治療戦略の構築を目指し、創薬につなげていきたいと考える。

研究成果の概要（英文）： The production of CTS was enhanced in hypertensive HFPEF model. Ouabain activated p42/44 MAPKs and enhanced collagen production through the elevation of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration via NCX entry mode. SEA0400, the potent inhibitor of NCX entry mode, prevented the development of LV fibrosis and stiffening and the transition to HFPEF with the improvement of survival rate in the animal models. Thus, CTS and the subsequently activated  $\text{Ca}^{2+}$  entry mode of NCX may play an important role in the development of LV fibrosis and hypertensive HFPEF, and the blockade of the entry mode of NCX is likely a new therapeutic strategy for this phenotype of heart failure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
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、拡張機能、食塩感受性

## 1. 研究開始当初の背景

心不全症例の約 6%は心臓の収縮機能指標である左室駆出率 (LVEF) が低下した症例 (収縮不全) であるが、約 40%では左室駆出率が保持された症例であることが報告されている。このような心不全は、心機能としては主に拡張機能障害により引き起こされると考えられ、拡張不全と呼ばれている。拡張不全では、左室後方不全をきたし、臨床症状としては、呼吸困難感が主体となる。

海外での報告によると、1980年代からの経時的な入院数は、収縮不全では増加していないが、拡張不全は増加傾向にある。また、収縮不全の予後は年々良くなっているにもかかわらず、拡張不全の予後はあまり変化がない (Owan TE, et al. NEJM 2006; 355:251)。これらは、収縮不全に相当する症例が、以前から基礎研究の積み重ね、また多くの大規模臨床研究の結果より、診療が進んでいる一方、拡張不全はその病態形成や発症機序など不明なことが多く、特異的な診断・治療法が確立されていないことが原因と考えられる。

我々は、ダール食塩感受性高血圧ラットを用いて現時点で確認されている範囲内では唯一の拡張不全モデルを作成し、その病態や発症機序の解明に努めてきた。その結果、1) 拡張不全は、左室肥大の進行とともに左室弛緩能の低下がおき、その後線維化を主とする左室スティフネスの悪化を引き金として心不全へ移行すること、2) 肥大進行期にはカルシニューリン系、心不全移行期にはレニン・アンジオテンシン系が関与し、その作用を阻害すると、心不全発症が抑制されること、3) 線維化促進の機序として MMP/TIMP が重要な役割を果たしていること、4) 血圧上昇時のみならず、代償性肥大期からのアンジオテンシン系の不活性化にて心不全発症が抑制されること、5) 収縮不全で有効性が確認されている  $\beta$  遮断薬にても主に酸化ストレスの抑制を介して、心筋スティフネス悪化を改善し心不全発症が抑制されること、などを報告し、一部は臨床にて確認されつつある。しかし、現時点でも拡張不全発症機序・病態解明は十分とはいえない。

そこで、我々は、ダール食塩感受性高血圧ラットが唯一の拡張不全発症モデルであることから、ダールラットの最大の特徴である食塩感受性と拡張不全の関連に注目した。食塩感受性高血圧の臨床的特徴は、高齢、女性、高血圧、糖尿病、腎機能障害などを有すると既に報告されている拡張不全の疫学的特徴と極めて類似する。よって、食塩感受性が拡張不全の発症機序・病態に深く関与すると考えられた。

さらに、ダール食塩非感受性ラットに、感受性ラットの腎臓を移植することにより、または、相互の循環器系を連結し交叉還流を行

うと、非感受性ラットが感受性を獲得すると報告されていることより、食塩感受性を決定しているものは腎臓に関係し、血液中に存在するものが疑われた。

## 2. 研究の目的

食塩感受性と関連が考えられている物質の中から、上記の観点から検討した結果、我々は、内因性ステロイド物質が、食塩感受性を介して拡張不全発症機序・病態に関与しているという仮説を構築した。内因性ステロイド物質として、hydrophilic cardenolide ouabain, bufadienolides marinobufagenin (MBG), telecinobufagin (TCB) などが報告されている。

これらの物質は血中の Na retention が生じると血中で副腎などから放出され、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 阻害効果により、細胞質内  $\text{Na}^+$  濃度を上昇させ、それを代償するために働く  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger の活性化を介して、最終的に細胞質内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させることにより、心筋細胞や血管平滑筋細胞の収縮性を高め、血圧上昇効果、また長期的に心筋細胞や平滑筋細胞のリモデリングをもたらすと考えられている。

本研究の目的は、この仮説を検証し、さらに臨床応用を考えることである。

## 3. 研究の方法

(1) ダール食塩感受性ラット高食塩負荷モデルの心不全進行における内因性ステロイド物質の動態を排泄尿より確認した。

(2) ouabain の心筋組織への影響を検討するために、SD ラットに osmotic pump を用いて ouabain を注入。この条件での食塩の影響も同時に検討するために、高食塩食負荷をす群と、通常食塩食にて飼育する群に分け、計 4 群で、心肥大、心筋線維化を検討した。

(3) 心筋線維芽細胞を用いて、ouabain による細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  流入効果を検討した。

(4)  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX) の病態への関与を検討するために、ダール食塩感受性ラットによる拡張不全モデルに対して、NCX reverse mode を選択的に阻害する SEA0400 を投与し、その効果を検討した。

(5) 拡張不全患者における内因性ジギタリス物質の関与を見るため尿中 MBGi の排泄量を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) ダール食塩感受性ラットでは、拡張不全の進行に伴い左室重量係数の増大をきたした。尿中 ouabain 濃度、尿中 MBGi 濃度は心不全発症前より高値を示した。よって、心肥大、拡張不全進行に内因性ステロイド物質の関与が考えられた。

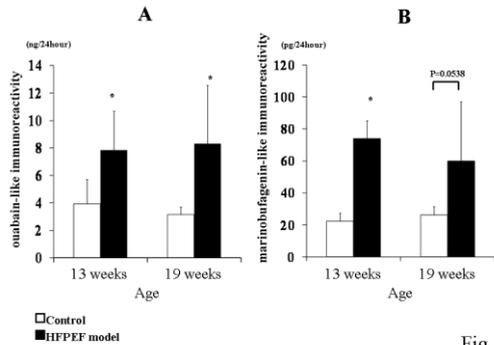
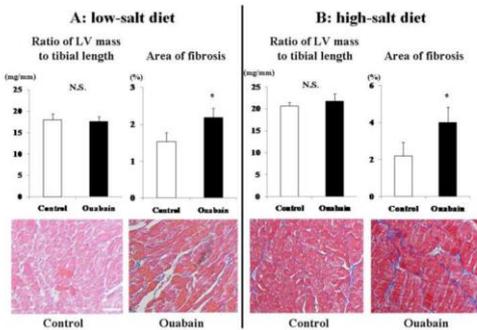


Fig 1

(2) ouabain の心筋組織への影響を検討するために、SD ラットに osmotic pump を用いて ouabain を注入した。この条件での食塩の影響も同時に検討するために、高食塩食負荷をする群と、通常食塩食にて飼育する群に分け、計 4 群での比較を行った。結果、心肥大に関しては、高食塩食負荷ラットは、通常食塩食負荷ラットに比し、心重量の増大を認め、ouabain の投与にては、さらなる差を見出すことはできなかった。しかし、組織線維化に関しては、右図のごとく、それぞれの食塩食での比較では、ouabain を投与することにより線維化の亢進を認め、その効果は、ouabain を投与した高食塩食負荷ラットに最も大きく見出された。



(3) そこで、ouabain の心筋組織への直接の影響を確認するために、neonatal wister rat の fibroblast を用いて検討したところ、ouabain により 3H-proline の取り込み亢進を認めた。また、この効果は Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX) reverse mode を選択的に阻害する SEA0400 にて有意に抑制された。さらに、以前より内因性ステロイドのシグナル伝達系と考えられている p42/44 MAPK の関与を検討

するために、p42 リン酸化について western blotting を用いて検討したところ、p42 リン酸化は ouabain にて有意に亢進したが、SEA0400 にてその亢進は抑制された。以上より、ouabain は特に高食塩にさらされている状況において、心筋に直接働き、特に線維化を亢進させ、少なくともその一部は p42/44 MAPK を介している可能性が示唆された。

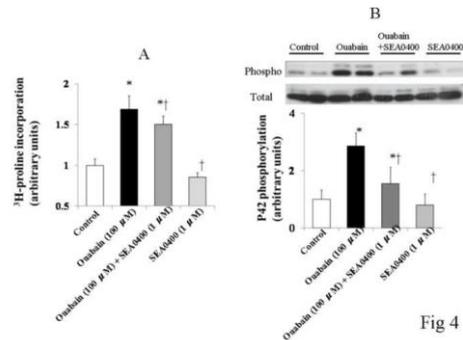


Fig 4

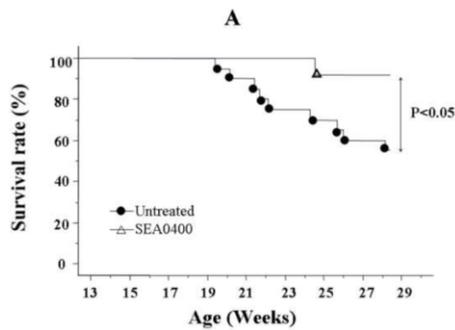
(4) NCX の病態への関与を検討するために、ダール食塩感受性ラットによる拡張不全モデルに対して、SEA0400 を投与し、その効果を検討した。結果は、血圧を低下させない 0.3mg/kg の SEA0400 の投与が行われた高食塩食群は、高食塩食のみを負荷した群に比し、拡張不全の発症が抑制され、有意に予後が改善した。

また、この機序として、心筋線維化への影響を検討したところ、非投与群に比し、SEA0400 群は、病理組織による area of fibrosis, 心筋組織による collagen type 1 mRNA level, hydroxy-proline 量のどちらも低下させており、心筋線維化を軽減することによって心不全を改善したものと考えられた。このことは、NCX reverse mode を修飾することによって、線維化を軽減、拡張機能を改善し拡張不全の進行を抑制する可能性を示唆したものと考えられた。

(5) 臨床への応用を考慮するため、まず拡張不全症例 9 名、健常者 12 名で spot 尿における MBGi 濃度を測定した。

結果、拡張不全群において、尿中の MBGi 排泄量は正常群との間で有意差を認めなかった。よって、少なくとも尿中 MBGi は診断マーカーにはならないと推定された。

以上の結果は、食塩感受性そのものが内因性ステロイドを介して、拡張不全の発症・進行に影響している可能性を示唆するものである。既に我々は、心筋線維化が拡張不全モデルにおける心筋ステイフネス上昇に強く関与することを報告しており、本結果と合わせて考えると、ouabain を代表とする内因性ステロイドの拡張不全病態進行への寄与を強く示唆するものと考えられた。



SEA0400 は残念ながら頭痛などの副作用により臨床応用は見送られている。しかし、この分野において、他の内因性ステロイド物質の関与、新しい阻害薬の開発など、道の部分は多く、さらなる研究が必要と考えられた。

#### 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 1 件)

- ① Kamimura D, Ohtani T, Sakata Y, Mano T, Tkaeda Y, Tamaki S, Omori Y, Tshkamoto Y, Furutani K, Komiyama Y, Yoshika M, Takahashi H, Matsuda T, Baba A, Umemura S, Miwa T, Komuro I, Yamamoto K.  
Ca<sup>2+</sup> Entry Mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger as A New Therapeutic Target for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction  
Eur Heart J, 査読有, 2011 年(in press)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

坂田 泰史 (SAKATA YASUSHI)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：00397671

##### (2) 研究分担者

山本 一博 (YAMAMOTO KAZUHIRO)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号：90303966

真野 敏昭 (MANO TOSHIKI)  
大阪大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：90379165