

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23日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590943

研究課題名（和文）心筋—血管クロストークの解析：前高血圧期への介入による高血圧発症予防の分子機序

研究課題名（英文）Analysis of the Crosstalk between Myocardium and Vasculature: Mechanism of Prevention of Hypertension by Intervention in Prehypertensive Stage

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（和文）：

レーザーマイクロダイセクション法を用いて、高血圧肥大心の心筋標本から心筋細胞領域と血管領域を個別に切離、選択的に収集し遺伝子発現を解析する方法を確立した。前高血圧期への降圧薬介入が心血管系に及ぼす効果を検討するため、脳卒中易発症自然発症高血圧ラットの前高血圧期（4-7週齢）にアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬(ARB)を投与した。ARBで前介入した群においては、その後の全経過において非介入群と比較して有意に血圧上昇が抑制され、脳卒中発症率、死亡率が抑制されていた。ARB前介入群・非介入群において、前高血圧期（7週齢）と高血圧性心肥大期（24週齢）のLMD法を用いて心筋領域および血管領域の遺伝子発現プロファイル変化の検討を行った。自然発症高血圧ラット(SHR)に両側圧受容体神経切離術を施行し血圧変動増大高血圧ラットモデルを開発した。血圧変動増大は正常血圧ラットに対しては軽度の心肥大と線維化を引き起こすのみであった。SHRでは血圧変動増大により高血圧性心肥大・心筋線維化が著明に助長され心収縮能が低下した。血圧変動増大がSHRの心筋内血管の慢性炎症を引き起こし心リモデリングを惹起することが明らかとなった。高血圧と血圧変動の合併により特異的に心筋領域・血管領域で発現亢進する遺伝子の解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：

We established a selective and comprehensive gene expression pattern analysis separating the myocardium and vasculature in the heart using the laser microdissection (LMD) method. To investigate the effects of pharmacological intervention at the prehypertensive phase on the development of hypertension, an angiotensin II receptor blocker (ARB) was administered to stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHR-SP) of 4-7 weeks old. SHR-SP with early exposure to ARB showed significantly lower blood pressure at hypertensive stage than those without ARB treatment. Also, the incidence of stroke and the incidence of all cause death were significantly lower in SHR-SP with ARB early exposure than those without ARB. The mRNA expression patterns of the myocardium area and vascular area were being compared separately between SHR-SP with and without ARB early exposure. A rat model of a combination of hypertension and large blood pressure variability (BPV) was created by performing a sino-aortic denervation in spontaneously hypertensive rats. In normotensive rats, increased BPV induced only limited cardiac hypertrophy and fibrosis. In contrast, large BPV exaggerated cardiac hypertrophy and fibrosis, leading to LV systolic dysfunction in SHR. It was revealed that chronic inflammation of the intramyocardial arterioles elicited the large BPV-induced aggravation of cardiac remodeling. The gene expression profile changes induced specifically by a combination of hypertension and large BPV were being investigated separately in the myocardium area and vascular area.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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・分子心臓病態学

キーワード：高血圧、心筋細胞、血管平滑筋、遺伝子発現、細胞間クロストーク

1. 研究開始当初の背景

TROPHY 試験では正常高値血圧期にアンジオテンシン II 受容体拮抗薬(ARB)を2年間投与すると、その後の高血圧発症リスクが減少した(Julius ら N Engl J Med.2006)。したがって、正常高値血圧者への早期介入により高血圧発症・進展を予防することが、脳卒中や心疾患発症を減少させ、勤労世代の健康を保持し、健やかな長寿社会を築くために公衆衛生上有用と思われる。高血圧自然発症ラット(SHR)を用いた動物実験でも、前高血圧期のアンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACEI)投与によって高血圧発症を予防できた(Harrap ら Hypertension 1990;Wu ら Hypertension 1993)が、その分子学的機序は明らかになっていない。

一方、高血圧患者における血圧変動性増大が高血圧性合併症や心血管イベントの独立した危険因子であることが近年注目されている(Kikuya ら Hypertension 2008; Rothwell ら Lancet 2010)。しかしながら、血圧変動が高血圧性心血管障害を増悪する機序は全く解っていない。また、前高血圧期での血圧変動性の影響も知られていない。

われわれはこれまで、圧負荷心拡張障害モデルを開発し、高血圧性肥大心における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で初めて解明した(Kuwahara, Kai ら Circulation 2002)。そこで高血圧心臓器障害の機序解明には、心筋細胞と血管系を個別に解析し、そのクロストークを解明することの重要性が示唆された。

近年開発された LMD 法は、顕微鏡下で組織標本の微細領域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、心臓病研究の

領域に本手法を用いた研究報告はなかった。

LMD 法を用いることで、前高血圧期への薬物介入が及ぼす影響あるいは高血圧期の血圧変動による高血圧性臓器障害進展を、心臓・腎臓・大動脈といった高血圧の標的臓器を構成する細胞群別に遺伝子発現を解析し、そのクロストークを明らかにすることが可能となり、高血圧発症予防の詳細な分子機序を解明できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、前高血圧期から高血圧発症にいたる機序ならびに早期薬物介入が高血圧発症を予防する分子機序を解明すること、前高血圧期・高血圧期における血圧変動性増大が臓器障害を引き起こす分子機序を解明することである。そのために、レーザーマイクロダイセクション(LMD)法を用いることで、心臓から心筋細胞・血管細胞・浸潤細胞を個別に回収し、各細胞群ごとの遺伝子発現プロファイルに及ぼす効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)LMD法の確立：

- ・Leica社 LMD6000 system を用いて、正常血圧ラット WKY および高血圧期(24週齢)自然発症高血圧モデル SHR-SP の凍結心臓切片から、心筋領域(心筋細胞群)、心筋内血管領域(血管細胞群)、血管周囲組織(浸潤細胞群)をレーザービームにより個別に切離、選択的に個別に収集。

- ・各構成細胞群ごとに mRNA を抽出。

- ・RT-PCR法により心筋マーカー遺伝子 BNP、血管平滑筋細胞マーカー α -smooth muscle actin の発現を解析し、サンプル特異的マーカー遺伝子発現パターンを示すことを確認する。

(2)血圧変動モデルを用いた実験

- ・WKY および SHR に両側圧受容体神経切離

術(sinoaortic denervation:SAD)を施し、平均血圧は変化しないが血圧変動性の指標である平均血圧の共変動(coefficient of variance:CV)が約2倍に増大するモデルを開発。

・安定正常血圧群(WKY+Sham)、血圧変動増大正常血圧群(WKY+SAD)、安定高血圧群(SHR+Sham)、血圧変動増大高血圧群(SHR+SAD)を作成。

・慢性期(9週間後)にテレメトリ法により血圧・心拍測定、心エコー法による心機能評価、心筋の形態学的評価、免疫染色による浸潤細胞評価、通常的心筋全体を用いたRT-PCR法による遺伝子発現変化、さらにLMD法を用いた心筋細胞群・血管細胞群・浸潤細胞群ごとの遺伝子発現パターンの網羅的検索を行い、各モデル群間の比較を行う。

(3)SHR-SPを用いた研究

・SHR-SPの前高血圧期(3-7週齢)にARBを投与した早期薬剤介入群と非介入群を作成。生存曲線を作成。

・各週ごとに血圧測定。

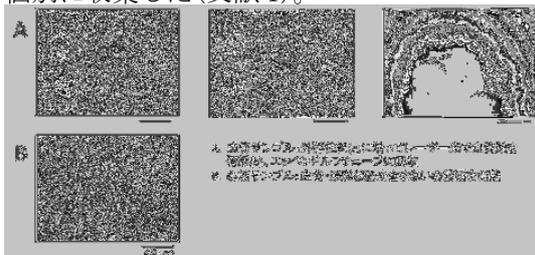
・介入直後(7週齢)と24週齢に心エコーによる心機能の評価。

・7週齢と24週齢に各群において、心筋顕微鏡学的形態学的評価、免疫染色による浸潤細胞評価、通常臓器全体を用いたRT-PCR法による遺伝子発現変化、さらにLMD法を用いた心筋細胞群・血管細胞群・浸潤細胞群ごとの遺伝子発現パターンの網羅的検索を行い、各モデル群間の比較を行う。

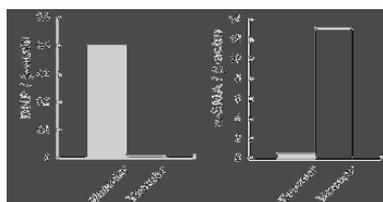
4. 研究成果

(1)LMD法の確立:

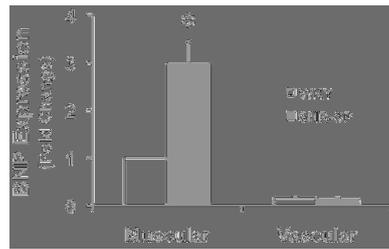
・24週令のラット(WKYおよびSHR-SP)から左室凍結切片を作成し、LMD法を用いて顕微鏡下に心筋細胞領域と心筋内血管領域とを個別に収集した(文献1)。



リアルタイム RT-PCR法により、心筋細胞マーカーである脳性利尿ペプチド(BNP)が心筋サンプルで発現していたが、血管サンプルでは発現を認めなかった。一方、血管平滑筋細胞マーカーである α -smooth muscle actinは血管細胞でのみ発現を認めた。



さらに、SHR-SPの心筋サンプルではWKYのそれに比べ有意に高いBNPの発現を認めた。



・浸潤細胞群に関しては、RT-PCRに適した純度のmRNAを十分量精製することに難儀した。現在、精度・収量の安定性改善のためのトラブルシューティング中である。

(2)血圧変動性増大が高血圧性臓器障害を引き起こす機序の解明;

・WKYおよびSHRにおいて血圧変動性の増大は心筋細胞肥大、心筋線維化を惹起することを明らかにした。心筋リモデリングにともない血管周囲のマクロファージ浸潤、MCP-1やTGF- β 発現の亢進がみられた。しかし、心筋線維化、炎症細胞浸潤、炎症性サイトカイン発現は、血圧変動増大高血圧群において高血圧あるいは血圧変動性増大単独で見られる変化と比較してはるかに大きく相乗的であった。また、血圧変動増大高血圧群においてのみ心筋アンジオテンシンII受容体・アンジオテンシノーゲン発現亢進がもられ、さらに心収縮力低下を認めた。また、心筋RhoAおよびRas-ERK系の活性化が見られた。

・非降圧量のARBを血圧変動増大高血圧群に投与すると、平均血圧および血圧変動性には影響しないが、血圧変動性増大によるマクロファージ浸潤、MCP-1・TGF- β 発現亢進がブロックされ、心筋肥大・心筋線維化の増悪および心機能低下を予防することが出来た。すなわち、血圧変動性増大は高血圧と合併することで血管周囲に慢性炎症を惹起し臓器障害を助長することを明らかにした(文献13)。

・スタチンを投与すると、Rho活性を抑制し左室収縮障害進展、左室肥大を抑制したが、心筋線維化、慢性炎症関連遺伝子発現には影響を及ぼさなかった(文献9)。

・LMD法を用いた解析により、安定高血圧群と血圧変動性増大高血圧群、および血圧変動正常血圧群と血圧変動性増大高血圧群の両方に共通して4倍以上の発現上昇を認めた約80遺伝子(血管約50遺伝子、心筋約30遺伝子)について現在、機能解析を行っている。

(3)前高血圧期における早期薬物介入が高血圧発症・臓器障害・予後に及ぼす影響

・前高血圧期にARBで前介入した群においては、非介入群と比較して有意に血圧上昇が抑制された。さらに、 Kaplan-Meier曲線において、非介入群と比較して、有意に脳卒中発症率、死亡率が抑制されていた。現在、症例数を増やして確認実験中。

・ARB 前介入群において、薬物治療終了時(7週齢)まで飼育した7W飼育群と高血圧性心肥大期(24週令)まで飼育した24W飼育群にて腎臓・大動脈に及ぼす効果を検討。摘出標本による組織形態学的・免疫組織学的評価、LMD法を用いた遺伝子発現プロファイル変化の検討。現在、有意に変化した遺伝子についてRT-PCR法で発現確認・定量を行っている。

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 13 件)

1. Ikeda A, Kai H, Kajimoto H, Yasuoka S, (他2名2番目). Selective gene expression analysis of muscular and vascular components in hearts using laser microdissection method. *Int J Vasc Med (in press)* 査読有
2. Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Anegawa T, (他5名2番目). Inhibition of eNOS phosphorylation mediates endothelial dysfunction in renal failure: new effect of asymmetric dimethylarginine. *Kidney Int* 81:762-768, 2012. 査読有
3. Anegawa T, Kai H, (他11名2番目). High-sensitive troponin T is associated with atrial fibrillation in a general population. *Int J Cardiol* 156:98-100, 2012. 査読有
4. Koiwaya H, Kai H, Anegawa T, (他14名2番目). Stent-anchored coil embolotherapy – Novel treatment procedure for huge pulmonary arterio-venous malformation in hereditary hemorrhagic telangiectasia – *Int J Cardiol* 157 (1):122-124, 2012. 査読有
5. Ueda T, Kai H, Imaizumi T, on behalf of MAPPY Study Investigators. Losartan/hydrochlorothiazide combination versus high dose losartan in patients with morning hypertension - A prospective, randomized, open-labeled, parallel-group, multicenter trial – *Hypertens Res* online publication, March 8, 2012. 査読有
6. Kai H, (他6名1番目), on behalf of CREDO-Kyoto Investigators. Low diastolic blood pressure may not be an independent risk for cardiovascular death in revascularized coronary artery disease patients. *J Hypertens* 29(10):1889-1896, 2011. 査読有
7. Mori T, Kai H, Kajimoto H, Ikeda A, Yasuoka S, Anegawa T, (他 5 名 2 番目). Enhanced cardiac inflammation and fibrosis in ovariectomized hypertensive rats -A possible mechanism of diastolic dysfunction in postmenopausal women- *Hypertens Res* 34:496-502, 2011. 査読有
8. Sugi Y, Kai H, (他 9 名 3 番目). Reduction and activation of circulating dendritic cells in patients with decompensated heart failure. *Int J Cardiol* 147 (2):258-264, 2011. 査読有
9. Takayama N, Kai H, Yasuoka S, Anegawa T, Kajimoto H, (他 4 名 2 番目). Simvastatin prevents large blood pressure variability-induced aggravation of cardiac hypertrophy in hypertensive rats by inhibiting RhoA/Ras-ERK pathways. *Hypertens Res* 34:341-347, 2011. 査読有
10. Arima K, Kai H, (他 9 名 9 番目). Autologous Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells Improved Ischemic Peripheral Neuropathy in Humans. *J Am Coll Cardiol* 56 (3): 238- 239, 2010. 査読有
11. Arima K, Kai H, (他 8 名 8 番目). Inhibition of pigment epithelium-derived factor (PEDF) augments vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced recovery of

- limb perfusion after ischemia in Klitho mouse. *Lett Drug Des Discov* 7 (7):541-545, 2010. 査読有
12. Takemiya K, Kai H, (他 4 名 2 番目). Mesenchymal stem cell-based prostacyclin synthase gene therapy for pulmonary hypertension in rats. *Basic Res Cardiol* 105:409-417, 2010. 査読有
 13. Kudo H, Kai H, Kajimoto H, Ikeda A, Yasuoka S, Anegawa T, (他 7 名 2 番目). Exaggerated blood pressure variability superimposed on hypertension aggravates cardiac remodeling in rats via angiotensin II system-mediated chronic inflammation. *Hypertension* 2009;54:832-838. 査読有
- [学会発表] (計 23 件)
1. **American Heart Association Scientific Meeting 2011, Orlando, USA, 2011.11.12-16.** Kajimoto H, Kai H, Aoki Y, Yasuoka S, Anegawa T, Aoki H, Imaizumi T. Inhibition of CaMKII- and ERK-mediated eNOS phosphorylation impairs endothelial function in renal failure rats: New effect of asymmetric dimethylarginine.
 2. **American Heart Association Scientific Meeting 2011, Orlando, USA, 2011.11.12-16.** Yasuoka S, Kai H, Kajimoto H, Kudo H, Takayama N, Anegawa T, Aoki Y, Iwamoto Y, Fukuda K, Imaizumi T. p21-activated kinase-mineralocorticoid receptor pathway aggravates cardiac inflammation and remodeling in hypertensive rats with large blood pressure variability.
 3. **第 34 回日本高血圧学会総会、宇都宮、2011.10.20-22.** 甲斐久史、今泉勉：パネルディスカッション「血圧変動の新たな視点」Beyond Blood Pressure Variability Lowering Effect -ARB の新たな可能性-
 4. **European Society of Cardiology Congress 2011, Paris, France, 2011.8.27-31.** Kai H, Ueno T, Kimura T, Adachi H, Furukawa Y, Kita T, Imaizumi T, on behalf of CREDO-Kyoto Investigators. Low diastolic blood pressure is not an independent risk for cardiovascular death in revascularized coronary artery disease patients – A subanalysis CREDO-Kyoto study –
 5. **第 75 回日本循環器学会学術集会、横浜、2011.8.3-4.** Kai H, Imaizumi T. JCS-APCS Joint Symposium. “Diastolic dysfunction” fibroinflammatory changes and diastolic dysfunction in hypertensive hypertrophied hearts - From the bench to the bedside –
 6. **American Heart Association Scientific Meeting 2010, Chicago, USA, 2010.11.13-17.** Kajimoto H, Kai H, Aoki H, Yasuoka S, Anegawa T, Imaizumi T. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase protect vascular damage in CKD mice.
 7. **第 33 回日本高血圧学会総会、福岡、2010.10.15-17.** 安岡逸、甲斐久史、工藤博司、高山成政、梶本英美、姉川敬裕、今泉勉：エプレレノンは自然発症高血圧ラットにおいて血圧変動の増大により引き起こされる高血圧性心リモデリングを抑制する
 8. **第 14 回日本心不全学会、東京、2010.10.7-9.** 安岡逸、甲斐久史、工藤博司、高山成政、梶本英美、姉川敬裕、今泉勉：Eplerenone Prevented the Large Blood Pressure Variability-Induced Aggravation of Hypertensive Cardiac Remodeling and Left Ventricular Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Rats
 9. **European Society of Cardiology Congress 2010, Stockholm, Sweden, 2010.8.28-9.1.** Yasuoka S, Kai H, Kajimoto H, Kudo H, Takayama N, Anegawa T, Imaizumi T. Eplerenone prevented the large blood pressure variability-induced aggravation of cardiac remodeling by inhibiting of perivascular inflammation in spontaneously hypertensive rats.
 10. **第 52 回日本老年医学会学術集会、神戸、2010.6.24-26.** 工藤博司、甲斐久史、高山成政、安岡逸、今泉勉：血圧変動による高血圧性臓器障害の増悪—アンジオテンシン II の重要性—
 11. **19th Korean Society of Hypertension Annual Congress, Seoul, Korea, 2010.5.15-16.** Kai H. Korea-Japan Joint Symposium : Clinic, Home, Ambulatory and Central BP in Hypertensive Management: Impact of large blood pressure variability on hypertensive cardiac remodeling – Lesson from animal models –
 12. **第 74 回日本循環器学会学術集会、京都、2010.3.5-7.** Kai H, Ueno T, Adachi H, Kimura T, Furukawa Y, Kita T, Imaizumi T. Effects of diastolic blood pressure levels on long-term prognosis in patients with stable coronary artery disease -Subanalysis of

- CREDO-Kyoto Registry-
13. **第 74 回日本循環器学会学術集会、京都、2010.3.5-7.** Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Ane-gawa T, Imaizumi T. Smad-Msx-2 Pathway Plays an Initial Role in Vascular Calcification in CKD Mice.
 14. **第 74 回日本循環器学会学術集会、京都、2010.3.5-7.** Yasuoka S, Kai H, Kajimoto H, Kudo H, Takayama N, Ane-gawa T, Imaizumi T. Eplerenone prevented the large blood pressure variability-induced aggravation of perivascular inflammation and cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats.
 15. **American Heart Association Scientific Meeting 2009, Orlando, Florida, 2009.11.15-17.** Kajimoto H, Kai H, Yasuoka S, Ane-gawa T, Aoki H, Imaizumi T. Asymmetric dimethylarginine plays a triggering role in vasculo-renal interaction in CKD mice.
 16. **American Heart Association Scientific Meeting 2009, Orlando, Florida, 2009.11.15-17.** Mori T, Kai H, Kajimoto H, Kudo H, Takayama N, Ikeda A, Yasuoka S, Ane-gawa T, Imaizumi T. Enhanced cardiac inflammation and myocardial fibrosis in ovariectomized, pressure- overloaded rats -A possible mechanism of aggravation of diastolic dysfunction in the post-menopause-
 17. **第 13 回日本心不全学会学術集会、福岡、2009.10.30-11.1.** 甲斐久史：「心筋リモデリングの分子機構」血圧変動による高血圧心リモデリング助長のメカニズム.
 18. **第 13 回日本心不全学会学術集会、福岡、2009.10.30-11.1.** 梶本英美、甲斐久史、安岡逸、青木浩樹、姉川敬裕、今泉勉：Asymmetric Dimethylarginine が慢性腎不全における血管機能を制御している.
 19. **第 13 回日本心不全学会学術集会、福岡、2009.10.30-11.1.** 安岡逸、甲斐久史、池田理望、梶本英美、姉川敬裕、今泉 勉：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の選択的遺伝子発現解析法
 20. **第 50 回日本脈管学会学術集会、東京、2009.10.29-31.** 甲斐久史：「内皮と脈管疾患」腎-血管連関-ADMA による内皮障害-
 21. **第 32 回日本高血圧学会、大津、2009.10.1-3.** 梶本英美、甲斐久史、安岡逸、青木浩樹、姉川敬裕、今泉勉：腎不全マウスにおける血清 Asymmetric Dimethylarginine の上昇が血管内皮に与える影響.
 22. **第 57 回日本心臓病学会学術集会、東京、**

23. **2009.9.18-20.** 甲斐久史：「高血圧ガイドラインと心臓病診療」虚血性心疾患.
- 第 56 回日本心臓病学会、札幌、2009.9.18-20.** 梶本英美、甲斐久史、安岡逸、青木浩樹、今泉勉：血清 Asymmetric dimethylarginine の増加腎不全マウスにおける内皮機能障害を起こす

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

梶本 英美 (KAJIMOTO HIDE MI)
久留米大学・循環器病研究所・助教
研究者番号：50349700

安岡 逸 (YASUOKA SUGURU)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：10461435

姉川 敬裕 (ANAGAWA TAKAHIRO)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：00511833

池田 理望 (IKEDA AYAMI)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号：80412500
(2009 年度～2010 年度)

(3) 連携研究者

なし