

## 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 25 年 1 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591981

研究課題名（和文）心室肥大における VIP 受容体の機能解明と遺伝子治療の検討

研究課題名（英文） Involvement of VIP Signaling in Right Cardiac Hypertrophy

研究代表者

渡辺 至 (WATANABE ITARU)

横浜市立大学・附属病院・講師

研究者番号：20534142

研究成果の概要（和文）：VIP と PACAP は 70% アミノ酸相同性を持つ神経伝達物質であり多様な生理活性を持つ。しかし心肺にも多く分布しているにもかかわらず機能は不明な点が多い。モノクロタリン誘発右心肥において、PACAP が減少する一方 PACAP 選択的受容体 PAC1 と VIP/PACAP の共通受容体 VPAC2 は発現亢進していた。VIP ではなく PACAP が心肥大発症によりドミナントな関与が疑われた。

研究成果の概要（英文）：Elevated PACAP but not VIP signaling was associated with right ventricular hypertrophy and heart failure induced with monocrotaline in rats. PACAP-preferring receptor PAC1 and the common receptor VPAC2 were up-regulated in both ventricles. Thus, PACAP signaling may play a more predominant role during cardiac hypertrophy and 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	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
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：麻酔

科研費の分科・細目：麻酔

キーワード：右心肥大、PACAP/VIP、心臓神経叢、遺伝子治療、レンチウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) と pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) は 70% アミノ酸相同性を持つ神経伝達物質であり多様な生理活性を持つ。心臓には Neuropeptide Y や VIP 等のノルアドレナリン、アセチルコリン以外の伝達物質を含有する神経線維が存在する。

VIP/PACAP も心肺にも多く分布して VIP は心筋、伝導系細胞、冠動脈で存在し、心臓、肺循環、呼吸機能に、PACAP は臓器保護に関与するとされるが、詳細なメカニズムは不明である。VIP/PACAP は 3 つの受容体 VPAC1, VPAC2, (VIP/PACAP 共通受容体)、PAC1 (PACAP 選択的受容体) を持ち多用な生理作用を示す。しかし心臓におけるそれぞれの機能、メカニズムは

不明な点が多く、特に心肥大発症における VPAC1, 2 の役割は殆ど報告がない。

当教室では研究分担者水野、川上が肺高血圧モデルにおける遺伝子治療の検討（若手研究 B 20791088）を平成 20 年より行っていたが、その過程で肥大した右室組織内において VIP/PACAP 共通受容体である VPAC2 の発現が数倍亢進していることを観察した。VIP/PACAP は心臓においては陽性変時、変力作用を示すが(Cadiovascular research 49, 2001; 27-37)、VIP 受容体に関する報告は非常に少なかった。また VIP は冠動脈拡張作用を有し、一方 PACAP は心筋保護作用を持つとされ、ともに心筋に対し保護的に作用すると期待されていた。一方、治療効果の判定として心臓組織内の P53、VEGF の発現量の変化が心肥大が代償期から非代償期への移行の指標として有用との報告がなされていた。治療効果を評価した報告はまだなく、VIP/PACAP 投与による治療効果の評価として興味深いと思われた。また VPAC1, VPAC2, そして PAC 1 の発現局在は心筋以外にも、冠動脈、心房、心臓神経叢でもあり、これらの心肥大に関する関与の報告がなく、これらは本研究が初めての報告となり得る。

## 2. 研究の目的

(1) 第一にラット右室肥大モデルを用い、心臓におけるVIP, VIP受容体の局在、発現量、心室肥大発症による影響を調べる。心肥大の非代償心不全化の指標としてp53, VEGF発現量との相関を検討する。また心筋肥大、線維化の程度を評価する。

(2) VIPは冠動脈拡張、心筋保護作用も報告されており、冠動脈におけるVIPによる弛緩反応の機序、pathwayを各種阻害剤を用い薬理的に解析し、心肥大による影響を検討する。

(3) VIP/PACAP の心肥大発症時における機能を明らかにした上で、最終的にVIP/PACAP 補充による心肥大に対する治療効果を検討する。

## 3. 研究の方法

モノクロタリン誘発右室肥大ラットを用いて以下の実験を行った。心室肥大と各測定結果との相関を解析し、VIP の心肥大に関する役割を検討する。

### (1) 血中VIP濃度測定、循環動態測定(右室圧、血圧、心拍数、気道内圧等)。右室、左室重量測定。

右室肥大モデルはモノクロタリン 60mg/kg をSDラットに皮下注射し肺高血圧を誘導し作成する。モノクロタリン投与4週間後に循環動態(右室圧、体血圧、心拍数、心拍出量)、心室肥大(右室/左室、右室/体重比)を確認する。気管挿管し人工呼吸とし全身麻酔下に管理した。実体顕微鏡下に右内頸静脈よりカテーテルを挿入し右室圧を測定した。右室に入ったことは圧ラインの波形から判断する。大腿動脈にカテーテルを挿入し体血圧を測定する。左頸動脈から大動脈弓まで温度センサーを挿入し、熱希釈法により心拍出量を算出した。これらの実験終了後に血液サンプルは血漿を遠心分離、凍結保存し、市販のキットにてVIP/PACAP 濃度を測定する。測定後に心臓を摘出し右室/左室+中隔重量比、右室/体重比より右室肥大の評価を行う。

### (2) 免疫組織染色によるVIP, VPAC1, 2の心臓での局在、発現量の評価。心室肥大の免疫組織染色、病理学的検討。

上記の実験後、一部のラットは心臓組織を4%パラホルムアルデヒドで固定し、心室肥大による線維化、虚血の有無等の形態的变化をHE染色で評価した。またVIP, VPAC1, VPAC2, PAC1 抗体を用い免疫組織染色を行い局在、発現の程度を明らかにする。

### (3) 心臓組織中(右室、左室、右房、左房)のVIP, VPAC1, VPAC2, p53, VEGFのタンパク、mRNA 定量(Western blot, 定量的Real-time PCR)。

上記2)の実験後、素早く心臓組織を右室、左室、右房、左房に分けmRNA, western blot用に液体窒素で凍結する。市販のキットを使用しmRNA抽出し、cDNA作製、real-time PCRを行いVIP, VPAC1, VPAC2のmRNAを定

量する。また電気泳動サンプルを作製し SDS-PAGE で分離した後、VPAC1, VPAC2, PAC1 抗体を用い western blot により発現量を定量する。

#### (4) VIP, PACAP 持続投与による治療効果の判定

モノクロタリン投与及び正常ラットに浸透圧ポンプ皮下に留置し PACAP、VIP を持続投与した。評価の上記の循環動態測定で行った。

### 4. 研究成果

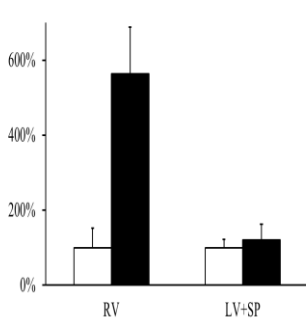
#### (1) 血行動態評価

モノクロタリン投与ラットでは右心圧は正常ラットに比較し有意に上昇していた。また右心室/左心室+中隔重量比でも同様に有意に上昇しており、右心肥大モデルが確立された。また熱希釈法による循環拍出量測定においてもモノクロタリン投与ラットにおいて有意に低下していた。

#### (2) 心室組織内 VIP, PACAP mRNA 発現

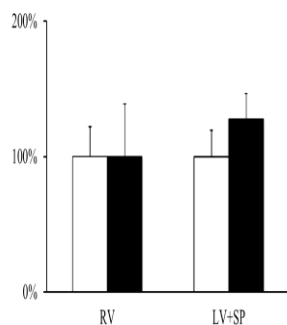
右心室組織内の VIP 発現量は左右心室で差はなかった。一方、PACAP はモノクロタリン投与後の肥大した右心室組織内で発現の上昇がみられた。またタンパク発現量でも PACAP は発現の上昇がみられたが、VIP は上昇していなかった。(下図)

心室組織内  
PACAP mRNA 発現



□ 正常 ■モノクロタリン投与

VIP mRNA



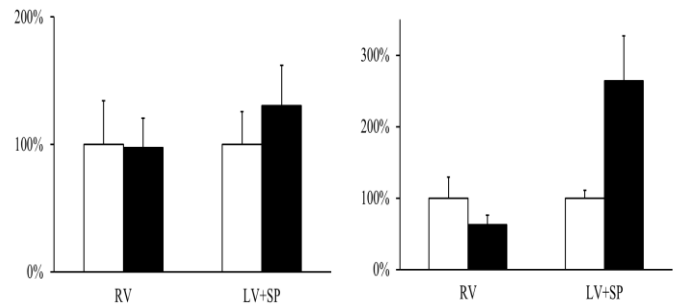
一方でVIP/PACAP受容体であるVPAC1, VPAC2, PAC1 発現においては、PAC1 が右心室組織内で増加していた。一方、VPAC2 は左心室で増加しており、VPAC1 は正常と有意差はなかった。タンパク発現も同様の結果であった。

(下図)

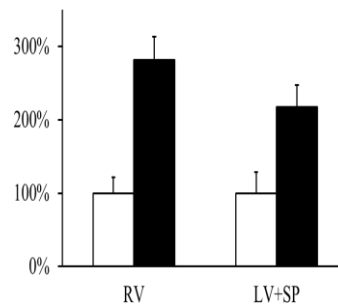
心室組織内

VPAC1 mRNA

VPAC2 mRNA



PAC1 mRNA



□ 正常 ■モノクロタリン投与

一方、血漿VIP濃度は正常、モノクロタリン投与ラットで有意差はなかった。

次にモノクロタリン誘発肺高血圧ラットに対する浸透圧ポンプを用いた4週間PACAP持続投与では、ラットの生存率上昇を認めた。更に心臓の局所的PACAP発現を行うため、PACAP遺伝子をコードしたレンチウイルスベクターを構築した。生存率に加え、循環導体などのデータを現在蓄積中である。

## まとめ

モノクロタリン誘発肺高血圧右肥大ラットにおいて、右心筋組織中の PACAP 発現低下とその受容体である PAC1 と VPAC2 の発現亢進が認められた。一方、関連タンパクの VIP では変化は見られなかった。近年、PACAP の臓器保護作用が脳梗塞、心筋梗塞などで報告されている。また本実験においては PACAP 持続投与ラットで生存率の改善がみられた。以上から右心肥大における心筋組織中の PACAP 低下に対し、PAC1, VPAC2 が代償的に増加している可能性が考えられた。

興味深いことに今回の実験では VIP 発現は変化が認められず、心肥大発症における関与は否定的であった。VIP 遺伝子ノックアウトマウスが肺高血圧、右心肥大を呈する報告がされたが、発症原因、モデルなどにより差異がみられる可能性はある。

今後 PACAP の心肥大における詳細な機序解明と、局所的発現方法の開発が今後求められた。

## 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 Altered expression in pituitary adenylate cyclase - activating polypeptide and its receptors in monocrotaline - induced pulmonary hypertension in rats. Mizuno Y, Koga M, Irie T, Goto T. Eur. J. Anaesthesiol, 2011, Vol128. p 67 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

① Involvement of PACAP Signaling in Right Cardiac Hypertrophy Induced With Monocrotaline in Rats.

Motokazu Koga, Yusuke Mizuno, Hiromasa Kawakami, Itaru Watanabe, Takahisa Goto, American Society of Anesthesiologists. Annual meeting 2012, Washington, DC, USA, 2012 Oct. 14.

② Altered Expression of VIP/VPAC2 in Hypertrophic Right Ventricle Induced with Monocrotaline in Rats. Motokazu Koga, Hiromasa Kawakami, Yusuke Mizuno et al. American Society of Anesthesiologists Annual meeting 2009, New Orleans, USA, 2009 Oct 20.

[その他]

ホームページ

横浜市立大学麻酔科ホームページに記載

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~masui/ka/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡辺 至 (WATANABE ITARU)

横浜市立大学・附属病院・講師

研究者番号：20534142

### (2) 研究分担者

水野 祐介 (MIZUNO YUSUKE)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：80433192

川上 裕理 (KAWAKAMI HIROMASA)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：90407958

### (3) 連携研究者

なし