

## 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 3月 21日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780284

研究課題名（和文）交感神経系によるアルドステロン調節メカニズムの基礎的・臨床的解析

研究課題名（英文）Basic and clinical investigation of the mechanism in the aldosterone regulation by the sympathetic system

研究代表者

堀 泰智 (HORI YASUTOMO)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：20406896

研究成果の概要（和文）：

本研究では①in vitro において交感神経受容体を介した直接的なアルドステロンの調節機序を解析すると共に、②in vivo においてアルドステロン受容体阻害薬を介した心筋線維化の抑制機序と臨床的効果を解析した。In vitro では、心臓線維芽細胞の交感神経  $\beta 1$  受容体刺激を介して培養上清中のアルドステロン濃度が有意に増加し、Gs 蛋白ならびにアデニル酸シクラーゼを阻害するとアルドステロン濃度の増加が抑制された。In vivo では、アルドステロン受容体阻害作用を持つスピロノラクトンは交感神経刺激心疾患ラットの心肥大・心筋線維化率、collagen-I ならびにマトリックス・メタロプロテアーゼの発現・活性の増加を有意に減少させた。以上のことは、副腎外での交感神経受容体を介した直接的なアルドステロンの産生・分泌機序が存在し、心筋線維化に関与していることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Our objective was to investigate the effects of doxycycline, a matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor (MMPi) on  $\beta$ -agonist-induced myocardial fibrosis and MMP expression. Rats were divided into 3 groups: control, Isoproterenol (ISO), and Isoproterenol with doxycycline (ISO + DOX). Compared to the control, ISO induced the myocardial hypertrophy and cardiac fibrosis, but were attenuated by co-treatment with DOX. MMP-2 activity also increased in the ISO treatment, but decreased by co-treatment with DOX. Similarly, immunoblotting showed significant increase in MMP-2 level in the ISO, and decreased levels in the DOX co-treatment. Our results suggest that the enhanced expression of MMP-2 plays a prominent role in promoting myocardial fibrosis in  $\beta$ -agonist signaling pathway, and that MMP-inhibiting compounds may attenuate myocardial fibrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：内科、心臓病、アルドステロン、線維化

## 1. 研究開始当初の背景

心疾患動物では神経体液性調節因子である交感神経系とレニン・アンギオテンシン・アルドステロン (RAA) 系は共に賦活化されており、それぞれ独立して血圧・心拍出量を維持している。しかし、慢性的な神経体液性調節因子の賦活化は心筋線維化を惹起し心不全への進展を助長させる増悪因子であると考えられている。また、RAA 系の最終産物であるアルドステロンは受容体を介して心筋線維化を惹起する重要な因子である。アルドステロンの産生・分泌はアンギオテンシン II によって調節されており、①アンギオテンシン II の産生阻害によってアルドステロンの制御も可能だと考えられてきたため、心不全治療では一般的にアンギオテンシンの産生抑制ならびに交感神経受容体の阻害が推奨されている。

しかし、近年、人医療において一般的な心不全治療を受けている患者の血中アルドステロン濃度が上昇しており、スピロノラクトン (SPI: 非特異的ミネラルコルチコイド受容体阻害薬) を併用すると心不全患者の生命予後が改善されることが報告された。また、交感神経を活性化させたトランスジェニックマウスの心臓では RAA 系が亢進しており、交感神経は RAA 系を調節している可能性が示唆されている。しかし、②細胞レベルでの交感神経受容体を介した直接的なアルドステロンの調節機序は解明されておらず、アルドステロンの分泌調節ならびにアルドステロンを介した心筋線維化の調節機序には不明な点がある。さらに、これまでアルドステロン受容体を特異的に阻害することは困難であったため、③細胞レベルでのアルドステロンを介した心筋線維化の調節機序は十分に解明されていなかった。近年、アルドステロン受容体の特異的阻害薬 (エプレレノン) が開発されたが降圧薬として認可を受け、④アルドステロン受容体の特異的阻害による心筋線維化への影響は解明されていない。

上記①~④から、アルドステロン制御の基礎獣医学的ならびに臨床的意義は十分に確立されておらず、心不全治療法としてのアルドステロン受容体阻害薬の認識は低いと考える。

## 2. 研究の目的

上述から、本研究では心不全の病態を理解し心不全治療を発展させるために、心臓局所におけるアルドステロンの調節機序ならびにアルドステロンを介した心筋線維化のメカニズムを解明し、アルドステロン受容体阻害薬の臨床的意義を明らかにすることを目的とした。このため本研究では基礎的・臨床的解析の両面から遂行し、①細胞レベルにおける交感神経受容体を介した直接的なアル

ドステロン分泌調節ならびにエプレレノンによる心筋線維化の抑制機序の解明、②組織レベルにおけるアルドステロン受容体阻害薬を介した心筋線維化の抑制機序と臨床的効果の解析を行った。

### (1) in vitro における交感神経受容体を介したアルドステロンと collagen の調節機序解析

慢性心不全患者の心臓では心筋細胞の肥大、アポトーシスに加え線維芽細胞の増殖、collagen産生などが進行し、特にcollagen産生は心筋線維化の主な要因であると考えられている。アルドステロンと交感神経ホルモンは共に心不全患者で血中濃度が上昇しており、それぞれの受容体を介して心筋線維化を誘導する。しかし、副腎外における両者の直接的な関係は解明されていない。本研究ではラット心臓線維芽細胞を分離培養し、交感神経受容体刺激を介したアルドステロン産生・分泌と線維化に関わる細胞内シグナル伝達因子、細胞障害・心筋肥大因子、細胞増殖因子などを分子生物学的に精査する。また、アルドステロン受容体の特異的阻害薬を用いた心筋線維化抑制のメカニズムを解析することで、細胞レベルでの交感神経受容体刺激を介した直接的なアルドステロン産生・分泌とcollagen産生の調節機序を解明する。

### (2) in vivo におけるアルドステロン受容体阻害を介した心筋線維化抑制の臨床的解析

超音波検査や心臓カテーテル検査などを指標とした心機能や血行動態の評価は、心不全動物において病態や治療効果の解明に大きく貢献する情報である。心不全患者の交感神経は慢性的に賦活化されており、実験動物の交感神経を慢性的に刺激すると心機能が低下すると共に心筋線維化が誘導されることが知られている。本研究では、交感神経刺激による心不全モデルラットを作出し、アルドステロン受容体阻害を介した心機能・血行動態の変化を解析すると共に組織レベルでの心筋線維化を解析することで、アルドステロン受容体阻害薬を用いた心筋線維化治療の臨床応用に向けた基礎的情報を集積する。

## 3. 研究の方法

### (1) in vitro における交感神経受容体を介したアルドステロンと心筋線維化の調節機序解析

① 薬 剤 : Norepinephrine (NE), Isoproterenol, Phenylephrine, Forskolin, H-89, Fadrozole, Eplerenone は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。GP antagonist-2A, NF449, SQ22536, wortmannin は Calbiochem (Germany) から購

入した。Forskolin, H-89, Wortmannin, Fadzozole, Eplerenone は DMSO で溶解した。NF449 は蒸留水を用いて溶解した。NE, Isoproterenol, Phenylephrine, GP antagonist-2A, SQ22536 は DMEM (Sigma-Aldrich) を用いて溶解した。

② 心臓線維芽細胞の分離・培養：研究には雄の Wistar Kyoto rat (4 週齢) を使用し、心臓線維芽細胞の初代分離培養を行った。左心室は細切した後にコラゲナーゼ処理 (60 分) を行った。細胞浮遊液を濾過した後に上清を遠心分離し、沈渣に含まれる線維芽細胞は 10%FBS 加 DMEM で培養した (37° C; 5% CO<sub>2</sub>)。細胞は 10000~15000 cells/well になるように 6 穴プレートに播種し、24 時間インキュベートした。その後、無血清 DMEM に置換し、48 時間インキュベートした細胞を実験に使用した。

③ ウェスタンブロット：細胞はライシスバッファーを用いて蛋白抽出を行い、4 μg/lane になるよう 10%SDS-ポリアクリルアミドゲルにアプライし電気泳動した。泳動後、ゲルは PVDF 膜 (Immobilon RP, Millipore, Bedford, MA) に転写し、1 次抗体でオーバーナイトした：anti-collagen-I, 1:500 (Rockland Immunochemicals); anti-β-actin, 1:1,000; anti-CYP-11B, 1:500 (Santa Cruz Biotechnology)。PVDF 膜は 2 次抗体 (1:10,000-20,000; Santa Cruz Biotechnology) でインキュベートし発光試薬 (ECL plus Western blotting detection reagents; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて発光した。

④ ELISA：培養上清中のアルドステロン濃度は ELISA 法を用いて測定した。96well プレートに 2 次抗体 (1:800; Anti-IgG (H+L), Rabbit, Goat-Poly, Rockland Immunochemicals, Inc, USA) をコーティングし、1 次抗体 (1:100,000; Anti Aldosterone-3-CMO-BSA, COSMO BIO, Tokyo, Japan) を重層した。プレートには西洋ワサビペルオキシダーゼ標識アルドステロン (1:300; Aldosterone-3-HRP, COSMO BIO) とペルオキシダーゼ基質 (ABTS, MOS, USA) を加えマイクロプレートリーダー (405nm; Bio-Rad Laboratories, USA) で吸光度を測定した。

(2) in vivo におけるアルドステロン受容体阻害を介した心筋線維化抑制の臨床的解析

① ラット：研究には雄の Wistar Kyoto rat (4 週齢) を使用した。ラットはコントロール群、イソプロテレノール (ISO) 群、ISO+スピロラクトン (SPI) 群の 3 群に分けた。コントロール群には生理食塩水を投与した。心疾患モデルラットは浸透圧ポンプを用いて交感神経作動薬 (イソプロテレノール, ISO : 2.0

mg/kg/日) を 14 日間連続投与することで作成した。同時に、ISO+SPI 群には ISO に加えアルドステロン受容体阻害作用を持つスピロラクトン (40 mg/kg/日) を腹腔内に 14 日間連続投与した。

② 血行動態の解析：ラットはペントバルビタール (60 mg/kg) を腹腔内投与し、麻酔下で心エコー図検査ならびに心臓カテーテル検査を行った。経胸壁心エコー図検査は 12MHz の高周波数超音波プローブを用いて実施した (SONOS 5500; Hewlett Packard, Littleton, MA)。左室短軸断面から M-モード画像を記録し、拡張末期左心室壁厚、左心室拡張末期径、左心室内径短縮率を計測した。心臓カテーテル検査では 3.5F のマイクロマンメーターカテーテル (Model SPR-524; Millar Instruments, Houston, TX) を頸動脈から左心室に挿入し、左心室圧ならびに心機能に関する血行動態を解析した。記録したデータは Notocord HEM 3.1 (Notocord Systems SA, Croissy-sur-Seine, France) を用いて解析した。

③ 病理組織学的解析：組織学的変化を解析するため、左心室を切除し、ホルマリン固定した後、定法に従いアザン染色を用いて心筋線維化率ならびに心筋横断面積 (MCSA) を算出した。

④ ウェスタンブロット：左心室はライシスバッファーを用いてホモジナイズし、1 次抗体には anti-collagen-I, 1:500 (Rockland Immunochemicals); anti-β-actin, 1:1,000; and anti-MMP-2, 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology) を用い、前述と同様の手技で行った。

⑤ ザイモグラフィ：左心室はライシスバッファーを用いてホモジナイズし、上清をサンプルバッファーと混合した。0.6% のゼラチンを含む 10%SDS-ポリアクリルアミドゲルにサンプル (5 μg/lane) をアプライし電気泳動した。ゲルは extraction buffer で洗浄した後に蒸留水で洗浄し、incubation buffer でオーバーナイト (37°C) した。その後、ゲルはクーマシー染色液で染色した。

#### 4. 研究成果

(1) in vitro における交感神経受容体を介したアルドステロンと心筋線維化の調節機序解析

実験①では PL 群と NE10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-4</sup>M 群を作成し、インキュベート (24 時間) した。心臓線維芽細胞に NE を暴露した時の上清アルドステロン濃度は濃度依存性に増加し、NE10<sup>-4</sup>M 群では PL 群と比較して有意に増加した。さらに、10<sup>-4</sup>M NE を暴露した時の上清アルドステロン濃度は時間依存性に増加し、1 時間後ならびに 24 時間後で 0 分 (無処置) と比較して有意に増加した。

実験②では isoproterenol (交感神経  $\beta$  1 受容体作動薬;  $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-8}$ M)ならびに phenylephrine(交感神経  $\alpha$  1 受容体作動薬;  $10^{-4}$ M,  $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M)を2時間作用させた時の上清アルドステロン濃度を測定した。isoproterenol を暴露した時の上清アルドステロン濃度は濃度依存性に増加したが、Phenylephrine では変化しなかった。さらに、PL 群、阻害剤単独群、NE 単独群、併用群を作成し、2時間作用させた時の上清アルドステロン濃度を測定した。上清アルドステロン濃度はNE単独群でPL群と比較して有意に増加したが、 $G_s$  蛋白阻害剤(NF449;  $10^{-5}$ M)ならびにアデニル酸シクラーゼ阻害剤(SQ22536;  $5 \times 10^{-5}$ M)、CYP11B2 阻害剤(Fadrozole;  $2.5 \times 10^{-6}$ M)の併用群では上清アルドステロン濃度の増加を抑制した。しかし、プロテインキナーゼ A 阻害剤(H-89;  $5 \times 10^{-5}$ M)、 $G_q$  蛋白阻害剤(GP antagonist-2A;  $10^{-7}$ M)、フォスホキナーゼ 3 リン酸阻害剤(Wortmannin;  $10^{-6}$ M)の併用では NE による上清アルドステロン濃度の上昇は抑制されなかった。

実験③では PL 群、Eplerenone 単独群(アルドステロン受容体阻害剤;  $10^{-5}$ M)、NE ( $10^{-5}$ M) 単独群、併用(NE+Epl)群を作成し、48時間インキュベートした時の collagen-I 発現量を精査した。NE 単独群の collagen-I 発現量は PL 群と比較して有意に増加した。しかし、NE 単独群で認められた collagen-I 発現量の増加は Epl を併用すると抑制された(Fig. 1)。

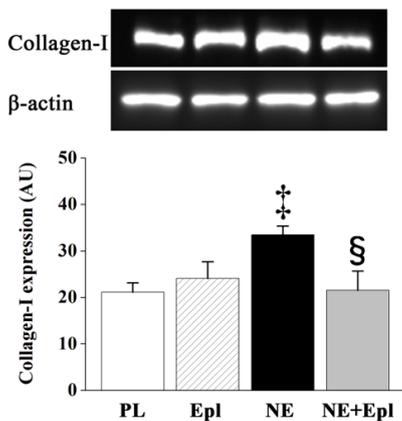


Fig. 1 心臓線維芽細胞における collagen-I 発現量の比較

‡ vs. PL;  $P < 0.001$ , § vs. NE;  $P < 0.05$ .

(2) in vivo におけるアルドステロン受容体阻害を介した心筋線維化抑制の臨床的解析

コントロール群と比較して、ISO 群の拡張末期左室圧と  $\tau$  は有意に上昇し、 $-dP/dt$  は有意に低下した。同様に、ISO 群の左室内径短縮率(FS)と相対的壁厚(RWT)は有意に増加した(Fig. 2)。

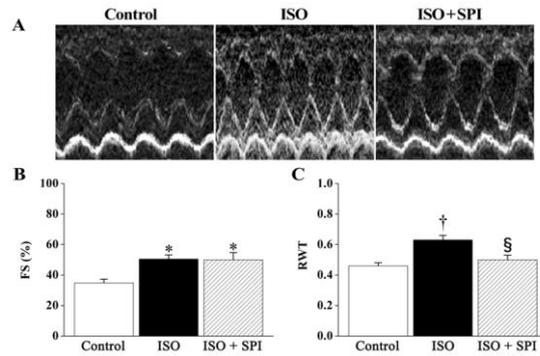


Fig. 2 各群における心エコー図検査所見の比較

\* vs. Control;  $P < 0.05$ , † vs. Control;  $P < 0.01$ , ‡ vs. Control;  $P < 0.001$ , § vs. ISO;  $P < 0.05$ .

同様に、ISO 群の左室重量/心重量比(LVW/BW)、MCSA、線維化領域は Control 群と比較して有意に増加したが、ISO+SPI 群では ISO 群と比較して LVW/BW、MCSA、線維化領域は有意に低下した(Fig. 3)。

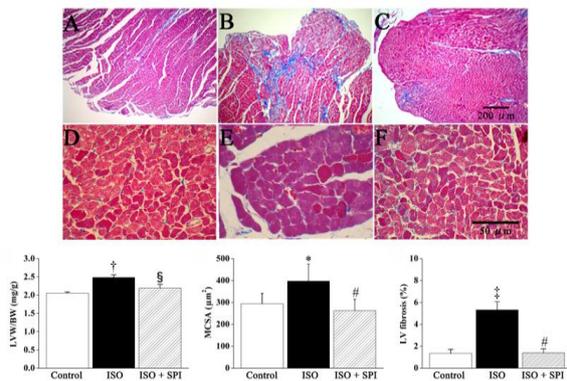


Fig. 3 各群における病理組織学的検索の比較

\* vs. Control;  $P < 0.05$ , † vs. Control;  $P < 0.01$ , ‡ vs. Control;  $P < 0.001$ , § vs. ISO;  $P < 0.05$ , # vs. ISO;  $P < 0.01$ .

同様に、ISO 群の MMP-2 発現量/活性は共に Control 群と比較して有意に増加したが、ISO+SPI 群の MMP-2 発現量/活性は ISO 群と比較して有意に低下した。さらに、ISO 群の Collagen-I 発現量は Control 群と比較して有意に増加したが、ISO+SPI 群では ISO 群と比較して有意に低下した(Fig. 4)。

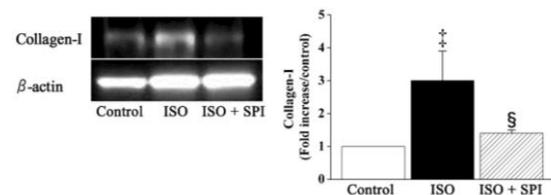


Fig. 4 各群における Collagen-I 発現量の比較

‡ vs. Control;  $P < 0.001$ , § vs. ISO;  $P < 0.05$ .

#### 考察

レニン・アンジオテンシン・アルドステロン(RAA)系の一因子であるアルドステロンは心不全の進展に関わる重要な因子である。アルドステロンの産生・分泌はアンジオテンシン II によって調節されており、アンジオテンシン II の産生阻害によってアルドステロンの制御も可能だと考えられてきたため、心不全治療においてアルドステロンの制御は重要視されていなかった。近年、交感神経系による RAA 系の調節機構が示唆され、心不全治療におけるアルドステロン制御の重要性が再認識されている。しかし、心臓局所におけるアルドステロン産生・分泌の調節機序は十分に解明されておらず、アルドステロン受容体阻害による心筋線維化治療の基礎的情報は未だ不足している。本研究ではアルドステロン受容体阻害を通じた心筋線維化治療の発展を目的とし、①心臓線維芽細胞における交感神経受容体を介した直接的なアルドステロン調節機序の解明、②in vivo におけるアルドステロン受容体阻害薬を介した心筋線維化の抑制機序と臨床的効果の解析を行った。

In vitro 研究では、分離培養したラットの心臓線維芽細胞を用いて、交感神経受容体を介したアルドステロン産生・分泌の調節機序を精査した。NE は生体内で産生されるカテコラミンであり、線維芽細胞においては細胞増殖や collagen 産生、アポトーシスを誘導することが知られている。本研究ではラット心臓線維芽細胞に NE を暴露すると、濃度依存性・時間依存性に上清アルドステロン濃度の上昇することが確認された。NE は交感神経受容体の  $\alpha$  受容体と  $\beta$  受容体の 2 種類の受容体に作用すること知られているため、我々は  $\alpha 1$  受容体作動薬(Phenylephrine)と  $\beta 1$  受容体作動薬(Isoproterenol)を用いて上清アルドステロン濃度の変化を評価した。Isoproterenol では上清アルドステロン濃度は濃度依存性に増加したが、Phenylephrine では変化しなかった。さらに、NE によって誘導された上清アルドステロン濃度の増加は CYP11B2 阻害剤(Fadrozole)の併用によって抑制された。これらのことから交感神経  $\beta 1$  受容体刺激は心臓線維芽細胞においてアルドステロン産生の一因であることが推察される。

前述の結果を受けて、我々は交感神経受容体シグナルを介したアルドステロンの産生・分泌に関する細胞内シグナル伝達経路を解

析した。交感神経受容体にカテコラミンが結合すると受容体に接続している G 蛋白が活性化しアデニル酸シクラーゼ活性を刺激する。さらに、アデニル酸シクラーゼは ATP を cAMP に変換し、プロテインキナーゼ A を活性化させることで生物学的反応を誘起する。本研究では  $G_s$  蛋白阻害剤ならびにアデニル酸シクラーゼ阻害剤を NE と併用すると、NE 単独で確認された上清アルドステロン濃度の増加を抑制することができた。しかし、プロテインキナーゼ A 阻害剤、 $G_q$  蛋白阻害剤、フォスフォキナーゼ 3 リン酸阻害剤を NE と併用した時には NE による上清アルドステロン濃度の上昇は抑制されなかった。さらに、心臓線維芽細胞に Forskolin(アデニル酸シクラーゼを活性化させ細胞内 cAMP 濃度を増加させる)を暴露すると濃度依存性に上清アルドステロン濃度は上昇し、アデニル酸シクラーゼ阻害剤は Forskolin の効果を有意に抑制することが確認された。以上のことから、心臓線維芽細胞においては副腎外でのアルドステロン合成系が存在すること、交感神経  $\beta 1$  受容体を介した cAMP 産生がアルドステロンの産生・分泌に関与していることが示唆される。

交感神経受容体刺激は心筋線維化を助する一因であり、心筋線維化では心筋細胞のアポトーシス、線維芽細胞の増殖や膠原繊維(collagen)の産生などが進行する。この中で、線維芽細胞は膠原繊維の一種である collagen-I を産生することが知られている。我々は、交感神経受容体刺激を介した collagen-I 産生にアルドステロン受容体が関与しているのか精査するために、ミネラルコルチコイド受容体の特異的阻害薬(Eplerenone)を用いて交感神経受容体を介した collagen-I 発現量の変化を解析した。本研究では NE によって刺激された collagen-I 発現量の増加は Eplerenone によって有意に抑制された。このことは交感神経受容体を介した collagen-I 産生にアルドステロン受容体が関わっていることを示唆している。

In vivo 研究では、心不全モデルラットを作出し、アルドステロン受容体阻害薬を介した心筋線維化の抑制機序と臨床的効果の解析を行った。心疾患動物では交感神経は持続的に賦活化されており、交感神経受容体刺激は心筋の収縮力や心拍数を増加させると共に、血管を収縮させることによって血圧や心拍出量を維持している。しかし、慢性的な交感神経の興奮は心筋のカテコラミンへの反応性を低下させると共に心筋線維化を誘導し心機能を低下させるため心不全進展の一因であると考えられている。本研究においては、ISO 群の拡張末期左心室圧と拡張能の指標である  $\tau$  はコントロール群に比較して有意に上昇していた。同様に、拡張能の指標で

ある-dP/dt はコントロール群に比較して ISO 群で有意に低下した。さらに、ISO 群の LVW/BW、MCSA、左心室線維化率はコントロール群に比較して有意に上昇していた。これらは Isoproterenol の慢性投与によって心筋線維化が誘導されると共に心機能が低下したことを示唆している。

一方、Isoproterenol とスピロノラクトンを併用すると、Isoproterenol の慢性投与によって誘発された心機能の低下ならびに心筋線維化が有意に改善することが明らかとなった。過去の報告では、交感神経受容体刺激によって心臓局所でのアンギオテンシン変換酵素の活性が上昇することや心筋アンギオテンシン II 濃度が増加することが報告されている。今回の研究では心筋局所での RAA 系の変化は評価していないが、アルドステロン受容体阻害は心臓局所でも交感神経を介した心筋線維化に関与していることが推察される。

平成 22・23 年度に実施した本研究課題の成果より、①心臓線維芽細胞において副腎外アルドステロン合成系が存在すること、②交感神経受容体を介したアルドステロンの産生・分泌機序が存在すること、③交感神経受容体を介したコラーゲン産生にアルドステロン受容体が関わっていることが明らかとなった。

## 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)

Hori Y, Kanai K, Hoshi F, Itoh N, Higuchi S. Spironolactone decreases Isoproterenol-induced ventricular fibrosis and matrix metalloproteinase-2 in rats. *Biol Pharm Bull.* (査読あり) 2011. 34. 61-65.

[学会発表] (計 1 件)

心筋線維芽細胞における交感神経受容体を介したアルドステロン分泌機序の解明  
藤栄大輔, 堀 泰智 (10 名、2 番目)  
第 94 回日本獣医循環器学会, 2011 年 6 月 11 日, (大宮)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀 泰智 (HORI YASUTOMO)  
北里大学・獣医学部・講師  
研究者番号: 20406896