

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300188

研究課題名(和文) 心臓リハビリテーションにおける運動療法：臓器保護効果の機序解明

研究課題名(英文) Mechanism behind cardioprotective effect after chronic exercise in heart failure rats.

研究代表者

森 信芳 (Mori, Nobuyoshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50463790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,400,000円

研究成果の概要(和文)：手術により心筋梗塞を作成したラットに1ヶ月間の回復、リモデリング期間を与え心不全ラットを作成した。心不全ラットは非運動群、運動群、カンデサルタン投与群に分け、その後8週間の飼育を行った。非運動群は通常飼育を継続し、運動群は小動物用トレッドミルによる運動療法を行った。運動強度は呼気ガス分析試験の結果に基づき、有酸素運動を行った。体重あたりの肺重量は運動群で低下し、体重あたりの心重量はカンデサルタン群にて低下した。心エコー検査ではカンデサルタン群の左室駆出率が改善傾向を示したが、運動群では見られなかった。現在血管作動物質やペリオスチンの変化について検討中である。

研究成果の概要(英文)：Rats underwent left coronary artery ligation to induce CHF and were randomly assigned to sedentary, treadmill exercise or Candesartan-treat groups 4 weeks after myocardial infarction. Eight weeks later, left ventricular ejection fraction of Candesartan-treated group showed an improvement trend in echocardiography. Lung weight per body weight ratio was reduced in the exercise group. Heart weight per body weight ratio was reduced by Candesartan group. It is being analyzed for changes in vasoactive substances and extracellular matrix proteins.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：心不全 運動療法

### 1. 研究開始当初の背景

心不全は多くの心疾患、心負荷状態の終末像として見られる症候である。慢性心不全は急性増悪期には入院を余儀なくされ、それ自体が症候を進行させることにより、急性増悪の頻度を増加させ、増悪時の回復までの期間も長くなる。身体活動の制限因子となり QOL 低下の原因ともなり、医療費上昇の一因ともなる。

リハビリテーション分野において広く取り入れられてきた治療法の一つに運動療法がある。安定した慢性心不全患者の長期的な運動療法が運動時の下肢血流量の増加を介して運動耐容能を改善することを Sullivan らが示して以来(Circulation 1988)、心不全患者の運動療法とその末梢での効果が数多く報告されている。さらに適切な運動療法は心室リモデリングの抑制により心不全進展を抑制することが示唆されており、自律神経系の関与も示唆されている。運動療法は虚血性心疾患の一次予防および二次予防に有効であり、動脈硬化の進展抑制、退縮の可能性も注目されている。虚血性心疾患の運動療法に関しては冠危険因子の是正、生命予後の改善も得られている。心・血管疾患一般では運動療法による QOL の改善も示されており、運動療法は心臓・血管系いずれも有効と考えられている。しかしながら、運動療法の有効性の機序に関しては十分な分析がなされていない。

近年、新たな血管作動物質が次々と発見されている。その中にはウロテンシン (U ) および構造の類似したウロテンシン 関連ペプチド (urotensin -related peptide; URP) のように強力な血管収縮作用を示すものがある。いずれも U 受容体に結合し、血管床により血管収縮に作用することもあり、また、内皮依存性の血管拡張物質を介して血管拡張に作用することもあることが確認されている。研究分担者により、U は高血圧症や糖尿病等疾患に関連して血中・尿中濃度の変化が見られることが示されており、また培養細胞で、細胞増殖作用が認められることも示されている。ラットにおいては URP の方が U に比べ発現量が多いと考えられている。URP はラットの種々の臓器で発現していることが確認され、申請者は心筋虚血心不全モデルラットの心において URP の mRNA 発現が亢進していることを共同研究者として報告し、また高血圧自然発症ラットおよび 5/6 腎摘腎不全ラットの腎において URP および U 受容体の mRNA 発現が亢進していることを報告した。U 受容体の拮抗薬も開発され、臨床での使用の期待が高まっている。

レニン・アンギオテンシン系においては (プロ)レニン受容体 (PRR) が確認された。PRR の遺伝子多型が左室肥大に関与していることが研究分担者により報告され、また、申請者は心不全ラットの心では PRR の

mRNA 発現が亢進していることも共同研究者として報告している。

血管拡張作用を示す血管作動物質としてアドレノメデュリン (ADM) およびアドレノメデュリン 2 (AM2) がある。どちらも、二つの受容体の複合体と結合して活性を示す、カルシトニン遺伝子関連ペプチドファミリーの一員である。AM2 は、心筋の虚血再灌流モデルでの心保護が示唆され、申請者は共同研究者として心筋虚血心不全モデルラット心での AM2 の mRNA 発現亢進を報告している。AM2 に関しては高血圧および腎不全ラットの腎にてその mRNA 発現が減少していることも共同研究者として報告している。

一酸化窒素合成酵素 (NOS) に関してはラットの腎において運動療法により eNOS と nNOS タンパク発現が増加することを確認している (未発表)。一酸化窒素は血管内皮に直接作用し血管拡張作用を示す。今までに、アンギオテンシン変換酵素阻害薬と運動療法との併用による臓器保護作用に関してはすでに研究分担者からの報告がみられる。新たにアンギオテンシン 受容体拮抗薬、カルシウム拮抗薬、レニン阻害薬、アルドステロン拮抗薬などの降圧作用、臓器保護作用の可能性が示され、運動療法との併用によるそれら作用の増強も期待がもたれているが、まだ十分な解明がなされていない。慢性心不全、虚血性心疾患患者の運動療法を含めた包括的心臓リハビリテーションは生命予後を改善すること、心不全患者の運動療法は運動耐容能を改善させ、QOL を改善させ、さらには生命予後をも改善させることが既に報告されている。本研究では心不全モデルラットにおける運動療法、薬物療法の有効性の機序として、上記の血管作動物質の関与を仮定し、その調節機構を検討する。

### 2. 研究の目的

心臓リハビリテーションの一環である運動療法のエビデンスとして、冠動脈疾患および虚血性心不全における生命予後の改善などがある。左室拡張機能の改善や冠動脈病変の進行抑制に関してもエビデンスが示されている。2009 年からの研究費による検討では運動療法により、心筋梗塞による心不全ラットでの肺うっ血の軽減など、中枢性効果の可能性が示されている。運動療法の臓器保護作用の機序が解明されることにより、運動療法の効果をより高める方法や、十分な運動ができない患者における臓器保護の方法という、新しい知見を得る可能性がある。心不全の発症・進展には血管作動物質ならびに線維化が関与している可能性が示唆されており、本研究では運動療法の有効性の機序としての血管作動物質の発現調節、線維化進展の調節に関して解明を試みる。

### 3. 研究の方法

心筋虚血心不全モデルラットを作成し、運

動療法、薬物療法の効果をタンパクレベルあるいは遺伝子レベルにて検討する。具体的には以下の各ステップを経て行う。

#### (1) 病態モデルラットの作成

申請者らによる病態モデルラットの作成はすでに技術的に確立され、実験に供されている。心筋虚血心不全モデルはペントバルビタール Na 麻酔のもとに人工呼吸管理下での左開胸、心露出、心膜剥離、周囲心筋を含めた冠動脈結紮、閉胸によって作成する。死亡率は高く、手術結果にばらつきも大きい。経過中には心エコー法による評価、動物実験終了時には心重量/体重比、肺重量/体重比を測定し、採血を行い、血漿 BNP 濃度を測定し、重症の程度を総合的に判断する必要がある (Peptides 2008(Nakayama et al.), Eur J Heart Fail 2008(Hirose et al.))。心エコー法は当大学医学系研究科循環器内科所有の Toshiba 製エコーを借用して行う予定である。

偽手術群、偽手術後運動群、手術群、手術後軽負荷運動群、手術後中等度負荷運動群、手術後薬物投与群、手術後運動・薬物併用群の 7 群を設ける。

#### (2) 運動療法・薬物療法

ラットの運動療法にはトレッドミルを用いる。トレッドミルは当教室所有の、傾斜・速度を自由に設定できる夏目製作所製のものを用いる。また、運動強度の測定には、呼気ガス分析試験を行うが、これにも当教室所有のものを利用する。運動量は、嫌気性代謝閾値レベル程度、あるいはより弱い強度にて、60 分間/回、1 回/日、5 日間/週、8 週間の設定で行う。

薬物は確実な内服のために、水に溶解、あるいは懸濁して強制的に経口ゾンデにて内服させる。

#### (3) 血圧測定

一部のラットを用いて、血管内にカテーテルを留置して、圧トランジューサを介した血圧測定を行う。変換された圧トランジューサの電圧データは当研究室所有の PowrLab を用いて記録する。

#### (4) タンパク抽出、RNA 抽出 タンパク発現、mRNA 発現評価

運動終了後 48 時間以上の時間をあけて、運動の急性期効果が弱くなってから、ラットの心組織の採取を行う。採取組織から血管作動物質、あるいはその受容体の発現を確認するための手技として、既に確立しているタンパクの抽出、RNA の抽出を行う。RNA の抽出には、GITC 法 (guanidinium isothiocyanate/cesium chloride method) を用いる。抽出したタンパクからは、ウエスタンブロット法により目標とするタンパク発現の有無の確認を、また同じ抗体を用いて、

組織切片の免疫組織染色を行い、発現部位を確認する。抽出した RNA からは RT-PCR 法により mRNA の検出を行い、可能であれば半定量競合的 RT-PCR 法により発現量の多寡を評価する。また、ペプチドの受容体の発現について、ウエスタンブロット法、免疫組織化学、RT-PCR 法にて検討する。サーマルサイクラー、電気泳動装置などは当教室所有の機器を使用する。

心不全モデルとして心筋虚血心不全モデル (CHF) を作成し、コントロールとしては偽手術群を用いる。CHF、コントロールラットに対し、運動群は 8 週間の長期的なトレッドミルによる運動療法を行う。嫌気性代謝閾値を呼気ガス分析によって求め、トレッドミルの傾斜、速度を適宜設定し、軽度の運動、あるいは中等度の運動負荷をかける。また薬物投与群には経口ゾンデによる強制的な内服を行う。最終時に一部のラットで、カテーテルを血管内に留置しての直接法による血圧測定を行う。血圧測定の後、麻酔下に採血、心摘出を行い、それら組織中から、タンパク、RNA を抽出する。抽出したタンパク、RNA は -80 度にて保存する。

血管作動物質としてはウロテンシン II (U)、ウロテンシン 関連ペプチド (URP)、アドレノメデュリン (ADM)、アドレノメデュリン 2 (AM2) およびそれらの受容体ならびに (プロ) レニン受容体 (PRR)、一酸化窒素合成酵素 (NOS) を予定している。

#### 4. 研究成果

心筋梗塞による心不全ラットでは、運動療法により体重あたりの肺重量が低下した。その一方で、心エコーによる評価では、左室駆出率には大きな改善が見られなかった。運動により肺うっ血が軽減しており、心不全の重症度は低下している可能性が示唆されたが、その機序として左室の収縮力以外の要素も関与している可能性が示唆された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 信芳 (MORI, Nobuyoshi)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50463790

### (2) 研究分担者

伊藤 修 (ITO, Osamu)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00361072

戸恒 和人 (TOTSUNE, Kazuhito)

東北福祉大学・総合福祉学部・教授

研究者番号：10217515

廣瀬 卓男 (HIROSE, Takuo)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20599302

上月 正博 (KOHZUKI, Masahiro)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70234698

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：