

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580463

研究課題名(和文) 交感神経 受容体を介したアルドステロン調節メカニズムの解析

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism in the aldosterone regulation through the beta-adrenergic receptor

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：イソプロテレノール(ISO)はラット左心室の線維化とI型コラーゲン mRNA/蛋白の発現を増加させた。これらの反応はアルドステロン受容体阻害薬(エプレレノン：EPL)の併用によって抑制された。また、ISOによってリン酸化されたERK1/2は、EPLによって抑制された。ISOは心臓線維芽細胞のI型コラーゲンおよびリン酸化ERK1/2の発現を増加させたが、EPLはこれらの反応を抑制した。しかし、左心室/心臓線維芽細胞にはアルドステロン合成酵素の遺伝子発現が認められなかった。ラット左心室/線維芽細胞では交感神経受容体を介したI型コラーゲン産生にアルドステロン受容体の関与していることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：In vivo study, the isoproterenol (ISO) increased cardiac fibrosis and expression of collagen-I mRNA/ protein in rat left ventricle. These responses were inhibited by the simultaneous administration of the aldosterone receptor inhibitor, eplerenone; EPL. In addition, phosphorylation of ERK1/2 induced by ISO was inhibited with the simultaneous administration of EPL. However, gene expression of aldosterone synthases was neither detected in the left ventricle nor cardiac fibroblast. In vitro study, the ISO increased expression of collagen-I and phosphorylation of ERK1/2 in the cardiac fibroblasts. ISO-induced these responses were inhibited by the simultaneous treatment of EPL. These results suggested that the aldosterone receptor participates in the collagen-I synthesis through the adrenergic receptor in the rat left ventricle/cardiac fibroblast.

研究分野：獣医内科学

 キーワード：循環器 線維化 アルドステロン ミネラルコルチコイド受容体 エプレレノン 交感神経 受容体  
コラーゲン

## 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・アンジオテンシン・アルドステロン(RAA)系が共に独立して血圧・心拍出量を維持しているが、長期的に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、アルドステロンの産生・分泌はアンジオテンシンによって制御されており、副腎皮質で産生・分泌された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。このことからアンジオテンシン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おり、心不全治療ではアンジオテンシンの産生抑制が第一選択となっている。しかし近年、ヒト心不全患者においては一般的な心不全治療を受けているにもかかわらず血中アルドステロン濃度が上昇していることや、心不全犬においてはアルドステロン受容体阻害薬が生命予後を改善することが報告された。また、我々は交感神経を刺激した心不全ラットにおいてアルドステロン受容体阻害薬が心筋線維化を抑制することを明らかにしている。これらのことから既存の治療法ではアルドステロン制御が不十分であり、心臓局所では交感神経受容体刺激を介した未知のアルドステロン産生機序が存在している可能性が示唆される。しかし、心臓局所におけるアルドステロン合成酵素の局在は知られておらず、細胞レベルでの交感神経受容体を介したアルドステロンの調節機序は解明されていない。さらに、これまではアルドステロン受容体を特異的に阻害することが困難であったため、細胞レベルでのアルドステロン受容体を介した心筋線維化の調節機序を解明することが困難であった。また、近年では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ていることから、アルドステロン受容体を介した心筋線維化の調節機序は未だに解明されていない。上記～から、心不全の病態において心臓局所でのアルドステロン調節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確立することは、心不全の病態を理解しアルドステロン制御を通じた心不全治療を確立するために急務であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究ではアルドステロン受容体阻害を中心とした心不全治療の臨床的意義を確立するために、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受容体を介した心筋線維化のメカニズムを解明する。このため本研究は、心線維芽細胞におけるアルドステロン合成酵素の遺伝子・蛋白レベルでの発現調節の探索、細胞レベルでの交感神経受容体を介したアルドステロン合成経路の解明、エプレレノン

による心筋線維化の抑制機序の解明ならびに心不全治療におけるアルドステロン受容体阻害の臨床的意義の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

### ラット

4週齢の Wister rat (雄)を使用した。

### 試薬

(-)-イソプロテレノール、エプレレノンは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)から購入した。PD98059 は Calbiochem(La Jolla, CA, USA)から購入した。

### in vivo 研究

ラットには交感神経受容体作動薬(イソプロテレノール; 4.5 mg/kg/日、IP)またはアルドステロン受容体阻害薬(エプレレノン; 100 mg/kg/日、PO)を3日間投与した。最終投与終了後に、ラットの心臓を採材し、病理検査、PCR 解析、ウェスタンブロット解析に用いた。

### in vitro 研究

心臓線維芽細胞の初代分離培養には雄の Wistar Kyoto rat(4週齢)を用い、左心室を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15000~30000cells/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。線維芽細胞はエプレレノン(10<sup>-5</sup>M、2時間)を前処置した後にイソプロテレノール(10<sup>-5</sup>M)を添加しインキュベートした(24時間)。

### ウェスタンブロット

細胞または左心室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。1次抗体には anti-collagen-I, 1:500 (Rockland Immunochemicals)、phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)、p44/42 MAPK (ERK1/2)、phospho-CREB、CREB antibody(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、anti-β-actin, 1:1,000(Santa Cruz Biotechnology)を使用した。

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。

### PCR

細胞および左心室の RNA は TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて抽出した。First-strand cDNA の合成には Transcript First Strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan)を用いた。Real-Time PCR には StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems)と SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を使用した。Collagen-I、アルドステロン合成酵素(CYP11-B2)、ミネラルコルチコイド受容体(MR = アルドステロン受容体)、GAPDH のプライマーを設計し、PCR に用いた。

#### 病理解析

ホルマリン固定した左心室は 4 μm の厚さに薄切し、常法に従いシリウスレッド染色およびアザン染色を行った。

#### 4. 研究成果

ラットの左心室におけるレニンおよびアルドステロン合成酵素の遺伝子発現は認められず、ミネラルコルチコイド受容体の遺伝子発現のみが確認された。同様に、心臓線維芽細胞においてもミネラルコルチコイド受容体の遺伝子発現のみが確認された(図 1)。

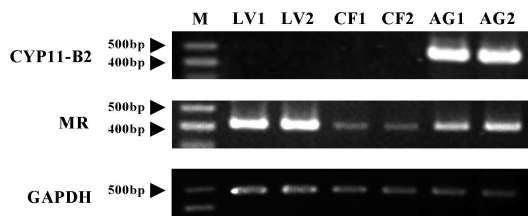


図 1. 左心室、心臓線維芽細胞、副腎におけるアルドステロン合成酵素およびミネラルコルチコイド受容体 mRNA の発現

M: マーカー、LV:左心室、CF: 心臓線維芽細胞、AG: 副腎、CYP11-B2: アルドステロン合成酵素、MR: ミネラルコルチコイド受容体

in vivo 研究において、イソプロテレノールを投与した心不全モデルラットでは心重量および左心室重量の有意な増加が認められ、この反応はエプレレノンの併用によって有意に抑制された。同様に、心不全モデルラットでは左心室の心筋線維化が亢進しており、この反応はエプレレノンの併用によって抑制された(図 2)。

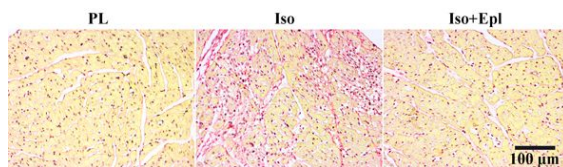


図 2. ラット左心室のシリウスレッド染色  
PL: 対照群、Iso: イソプロテレノール投与群、Iso+Epl: イソプロテレノールとエプレレノンの併用群

Iso 群では赤色に染色された膠原繊維が

認められるが、Iso+Epl 群では膠原繊維の増生が抑制されている。

心不全モデルラットでは左心室の I 型コラーゲン mRNA および蛋白の発現が有意に増加しており、これらの反応はエプレレノンの併用によって有意に抑制された(図 3)。さらに、心不全モデルラットでは細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK1/2)のリン酸化が有意に増加しており、エプレレノンは ERK1/2 のリン酸化を抑制していた。

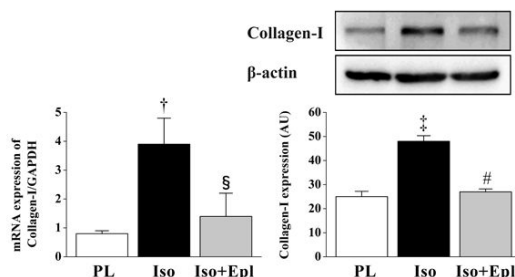


図 3. ラット左心室における I 型コラーゲン mRNA および蛋白の発現

PL: 対照群、Iso: イソプロテレノール投与群、Iso+Epl: イソプロテレノールとエプレレノンの併用群

†;  $P < 0.01$  vs PL, ‡;  $P < 0.001$  vs PL, #;  $P < 0.05$  vs Iso, §;  $P < 0.01$  vs Iso.

in vitro 研究において、イソプロテレノールを暴露した心臓線維芽細胞では I 型コラーゲンおよびリン酸化 ERK1/2 の発現量が顕著に増加していたが、エプレレノンを前処置した細胞ではこれらの反応が抑制された(図 4)。同様に、ERK1/2 阻害剤(PD98059)を前処置した細胞ではイソプロテレノールによって誘導されたリン酸化 ERK1/2 の発現を抑制した。

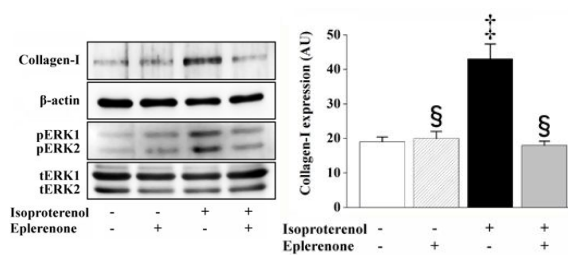


図 4. ラット心臓線維芽細胞における I 型コラーゲンおよびリン酸化 ERK1/2 の発現

†;  $P < 0.001$  vs PL, §;  $P < 0.001$  vs Iso.

平成 24・25 年度に実施した本研究課題の成果より、ラット左心室および心臓線維芽細胞においてアルドステロン受容体が存在すること、交感神経受容体を介した心筋線維化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。平成 26 年度に実施した研究成果より、ラット心臓線維芽細胞における交感神経受容体を介した I 型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。

これらのことは、交感神経受容体を介した心臓線維化の機序にアルドステロン受容体が直接的に関与していることを示唆している。今後は細胞内での交感神経受容体を介したアルドステロン受容体の調節機構を解明する必要がある。

#### 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)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者：山岸真貴・堀 泰智・五十嵐慎也・近澤征史朗・金井一享・伊藤直之・星史雄  
演題：心臓線維芽細胞における  $\beta_2$  交感神経受容体( $\beta_2$ -AR)を介した Collagen-I 産生機序の解明。

会場・日時：第 100 回日本獣医循環器学会、2014 年 6 月大宮ソニックシティ(さいたま市)

〔図書〕(計 1 件)

堀 泰智、インターズー、Veterinary Circulation「スピロラクトン」、2015、15 号

#### 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