

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592309

研究課題名(和文) レンチウイルスベクターを用いた肺高血圧症治療

研究課題名(英文) Usege of lentiviral vector for treatment of pulmonary hypertension

研究代表者

渡辺 至 (WATANABE, Itaru)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員教授

研究者番号：20534142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：心臓の神経支配は交感、副交感神経以外に多種の神経ペプチドが関与していることが知られている。心肥大、心不全を来した場合、交感神経系は代償性に亢進し順応するが、他の神経ペプチドの心肥大、心不全における役割、順応の影響等の詳細は不明である。本研究では、神経伝達物質PACAPシグナル系が右心負荷、右肥大に対して順応し、PACAP静脈内投与によりcontrol群と同様の心拍出量が得られた。右心肥大から来る心不全の機序解明につながる可能性があり、今後は、MCTモデル以外の右心負荷におけるPACAPの関与を検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a multifunctional neuropeptide. Although the heart has VIP and PACAP signaling systems including the ligand and receptors, however, involvement of PACAP in cardiac hypertrophy and subsequent heart failure are still unknown. Recently, VIP and PACAP have been reported to have cardioprotective effect and be associated with heart failure. In this study, elevated PACAP signaling was associated in hypertrophic right ventricles and heart failure induced with monocrotaline in rats. In addition, intravenous administration of PACAP but not VIP improved cardiac output. Therefore, PACAP may play an important roles in right cardiac hypertrophy. However, further study will be necessary to clarify the role in detail and the mechanism.

研究分野：麻酔学

キーワード：右室肥大 PAC1 PACAP 心臓神経

## 1. 研究開始当初の背景

心臓の神経支配は交感、副交感神経以外に多種の神経ペプチドが関与していることが知られている。心肥大、心不全を来した場合、交感神経系は代償性に亢進し順応するが、他の神経ペプチドの心肥大、心不全における役割、順応の影響等の詳細は不明である。

神経伝達物質 vasoactive intestinal peptide (VIP) は 70% アミノ酸相同性を持つ pituitary adenylate activating polypeptide (PACAP) と共に血管拡張、臓器保護作用を示し、呼吸循環機能に関与しているとされる(5)。原発性肺高血圧患者、実験的肺高血圧モデルに対する VIP 投与による改善(3)、また VIP 遺伝子及び PACAP 受容体 PAC1 遺伝子ノックアウトマウスが肺高血圧を呈したこと等から、VIP/PACAP は肺循環に関与し、肺高血圧、右心肥大に保護的に作用すると考えられた(1, 2, 4)。しかし、VIP/PACAP の心機能、肺循環における機能の解明は、心肥大、心不全のメカニズム解明に寄与すると考えられるにも関わらず、詳細は不明なままであった。

## 2. 研究の目的

我々はモノクロタリン MCT 誘発肺高血圧モデルを使用し、右心肥大の右心室組織において PACAP とその受容体である VPAC1, VPAC2, PAC1 の発現が亢進していることを見出した。右心負荷、右心肥大に対する心臓における神経ペプチドとその受容体の代償的な反応と推定された。そこで、VIP, PACAP アナログの心拍出量等の心機能、循環動態における影響を比較検討した。モノクロタリン肺高血圧モデル用い、体・肺動脈圧、体・肺血管抵抗、心拍出量等の循環パラメーターから検証した。当初予定していた PACAP の長期投与における肺高血圧への影響は、PACAP が右室圧を低下させなかったことから、行わなかった。

## 3. 研究の方法

モノクロタリン誘発ラットモデル(MCT 群)を、モノクロタリン 60mg/kg を皮下注射することで作製し、4週間後以下の測定を行った。

- (1) 循環動態測定 (右室圧/血圧、心拍出量、心拍数、全肺血管抵抗、全血管抵抗) 右室・左室重量測定

正常及び MCT 群において、セボフルランによる全身麻酔下に気管挿管し人工呼吸させた。実体顕微鏡下に大腿動脈にカテーテルを挿入し体血圧、心拍数を測定した。右頸静脈よりカテーテルを挿入し右室圧を測定する。右室に入ったことは圧ラインの波形から判断した。心拍出量は熱希釈式で行い、プローブは左頸動脈から挿入し先端は大動脈弓に留置した。体・肺血管抵抗は血圧、肺血圧を心拍出量で除し算出する。静脈ラインは大腿静脈に確保した。

PACAP、VIP アナログ等を静脈ラインよりボース投与し、上記循環パラメーターを記録した。各薬剤は濃度依存性の反応を評価した。薬剤ボース投与後、次の投与は各種値が正常値になるまで十分に時間を取った。データ取得、解析は Powerlab(ADInstruments)で行った。

- (2) 心室組織における VIP, PACA の mRNA 発現定量 precursor タンパク定量。PAC1, VPAC2, PAC1 受容体のタンパク発現の定量。各タンパクの定量は心室、中隔組織をホモジナイズし、western blot で定量した。mRNA 発現量は、組織から全 RNA を抽出後、逆転写し cDNA を得て Real-time PCR で各発現を定量した。

## 4. 研究成果

- (1) VIP, PACAP アナログ静注による循環動態への影響

正常及び MCT 群において PACAP は容量依存性

に血圧 SBP を低下させる傾向にあったが（図 1）有意な差ではなかった。また心拍数も変化させなかった。MCTP 群において PACAP は MCT 群において高容量で右室圧 RVSP をわずかに上昇させた（図 2）。しかし心拍数 HR は変化なかった。（図 3）

また、PACAP は両群ともに心拍出量 CI を増加させた（図 4）。しかし、VIP は血圧を低下させる一方で CI は増加させなかった。

図 1 Systemic blood pressure (SBP)

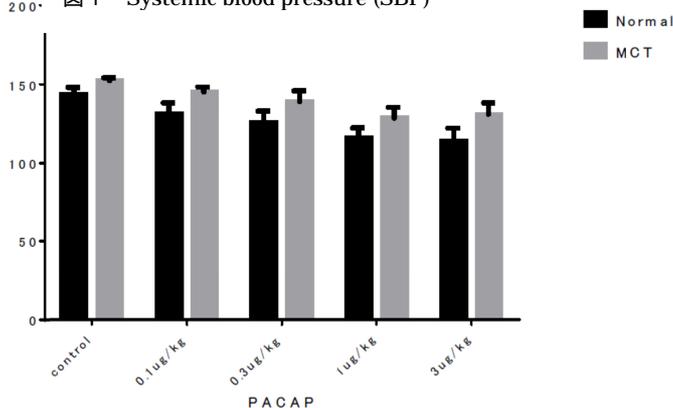


図 2 Right ventricular systolic pressure (RVSP)

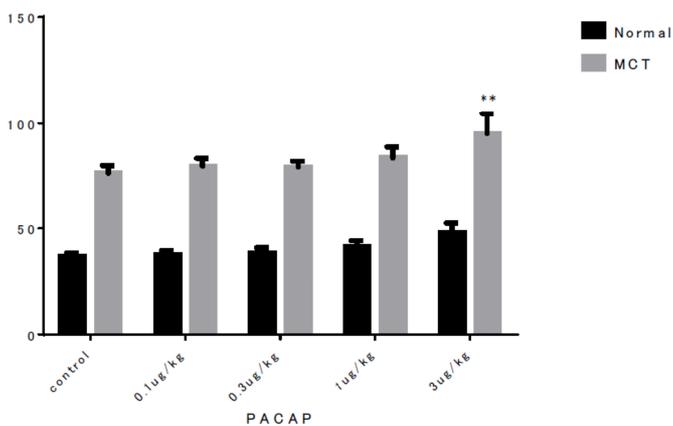


図 3 Heart rate

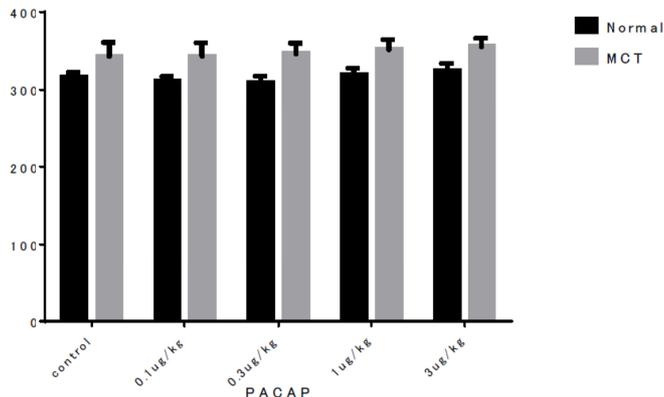
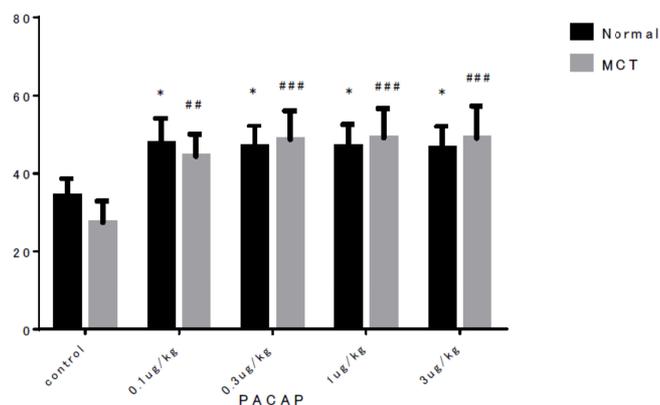


図 4 Cardiac Index (CI)



## (2) VIP、PACAP mRNA の変化

PACAP の右心室における発現量は MCT 群において control と比較し有意に増加していた。しかし左心室においては変化がなかった。一方、VIP は MCT, control 群で右室、左室ともに差がなかった。

VPAC1, VPAC2, PAC1 タンパク発現量の変化  
PACAP の特異的受容体である PAC1 の右心室の発現量は MCT 群において有意に増加していた。VPAC2, VPAC1 は左右心室において MCT 群で増加していたが、右室における増加が著しかった。

以上の結果から、MCT 群において PACAP シグナル系は右心室で発現が亢進し、PACAP の投与が血圧を上昇させずに心拍出量を増加させることが示された。これにより PACAP は心収縮力の亢進と全身血管抵抗の低下を来すことが示唆された。また、VIP は心拍出量を増加させなかった頃から、これらの作用には PAC1 受容体が関与していると考えられた。交感神経の心不全、心肥大における亢進はよく知られているが、心臓における神経伝達物質 PACAP シグナル系が右心負荷、右肥大に対して順応したことは、これらの神経支配の報告と矛盾しない。本研究で得られた知見は、右心肥大から来る心不全の機序解明につながる

る可能性があるが、今後 MCT モデル以外の右心負荷における PACAP の関与を検討する必要がある。

尚、当初予定した、PACAP アナログの長期投与は PACAP に右室圧低下作用が認められず行わなかった。

#### 4. 引用文献

1. Dickson L, and Finlayson K. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther* 121: 294-316, 2009.

2. Habre W, Albu G, Janosi TZ, Fontao F, von Ungern-Sternberg BS, Beghetti M, and Petak F. Prevention of bronchial hyperreactivity in a rat model of precapillary pulmonary hypertension. *Respiratory research* 12: 58, 2011.

3. Petkov V, Mosgoeller W, Ziesche R, Raderer M, Stiebellehner L, Vonbank K, Funk GC, Hamilton G, Novotny C, and Burian B. Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *Journal of Clinical Investigation* 111: 1339-1346, 2003.

4. Said SI, Hamidi SA, Dickman KG, Szema AM, Lyubsky S, Lin RZ, Jiang YP, Chen JJ, Waschek JA, and Kort S. Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene. *Circulation* 115: 1260-1268, 2007.

5. Sano H, Miyata A, Horio T, Nishikimi T, Matsuo H, and Kangawa K. The effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cultured rat cardiocytes as a cardioprotective factor. *Regulatory peptides* 109: 107-113, 2002.

#### 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 2件)

Koga M, Mizuno Y, Watanabe I, Kawakami H, Goto T. Role of VPAC2 receptor in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol*.2014 15;117(4):383-91.

doi:10.1152/jappphysiol.00861.2013. 査読あり

Mizuno, Y., Koga, M., Kashiwagi, S., Watanabe, I., & Goto, T.. Effect of VPAC2 agonist on improving cardiac output in pulmonary hypertension. *The FASEB Journal*, 27 (1) 2013, 1140.19. 査読あり

[学会発表](計 2件)

Yusuke Mizuno, Hironobu Shinbori, Takahisa Goto. Involvement of increased protein arginine methyltransferases 2 and decreased dimethylarginine dimethylaminohydrolases in impaired NOS activity in pulmonary hypertension in rats. *European Society of Anesthesia Annual meeting*. 2 June 2014, Stockholm, Sweden.

Yusuke Mizuno, Motokazu Koga, Shizuka Kashiwagi, Itaru Watanabe, Takahisa Goto. Effect of VPAC2 agonist on improving cardiac output in pulmonary hypertension. *Experimental Biology*. 22 April 2013, Boston, USA

[図書](計 0件)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 至 (WATANABE, Itaru)

横浜市立大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：20534142

(2)研究分担者

水野 祐介(MIZUNO, Yusuke)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号：80433192

川上 裕理(KAWAKAMI, Hiromasa)

横浜市立大学・市民総合医療センター・助教

研究者番号：90407958

馬場 靖子(BABA, Yasuko)

横浜市立大学・市民総合医療センター・講師

研究者番号：80453041

(3)連携研究者なし