

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861739

研究課題名(和文) 梗塞後心筋障害における腎交感神経の役割の検討

研究課題名(英文) Renal Nerve-Mediated Erythropoietin Release Confers Cardioprotection During Remote Ischemic Preconditioning.

研究代表者

大場 豊治(OBA, TOYOHARU)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10389257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにFormoteol 100 µg/kgを腹腔内投与し、投与後1時間で腎臓においてEPO mRNAの上昇を認めた。また免疫染色でFormoteol投与後1時間でHIF1 $\alpha$ の発現の増加を認めた。以上からFormoteol投与後マウス腎臓においてHIF1 $\alpha$ -EPOの発現亢進が起こることが確認された。さらにマウス心臓で投与後心筋保護シグナルのリン酸化は明らかに亢進しており、投与後マウス心筋梗塞の梗塞範囲が縮小することをEvans-blue TTC染色を用いて確認した。以上からFormoteol投与後腎臓におけるHIF1 $\alpha$ -EPO経路の活性化が心筋梗塞層の縮小をもたらす可能性があることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Screened circulating cardioprotective JAK-STAT-activating cytokines in mice unexpectedly revealed increased serum erythropoietin (EPO) levels after formoteol injection. In mice, RIPC rapidly upregulated EPO mRNA and its main transcriptional factor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF1 $\alpha$ ), in the kidney. Formoteol activated cardio-protective signaling pathways such as STAT3, AKT, ERK in mice heart, and reduced infarct size calculated by Evans-blue TTC staining. These results suggest that the activation of the HIF1 $\alpha$ -EPO course in the kidney might bring reduction of the myocardial infarct size after the Formoteol dosage.

研究分野：循環器内科

キーワード：サイトカイン 心筋保護 プレコンディショニング 臓器連関 2刺激

### 1. 研究開始当初の背景

心筋逸脱酵素の上昇で表される心筋障害は、虚血性心疾患患者の予後を規定すると言われている (J Am Coll Cardiol 2002;40: 1961-67) (Anesthesiology 2003; 99: 270-74) (Circulation 2006; 114: 1468-75) (Am J Cardiol 2004; 94: 879-81)。

近年 EPO の投与により心筋梗塞後、梗塞層の縮小や虚血再灌流障害の軽減が生じるとの報告が相次いでなされている (J Am Coll Cardiol 2006;48:176-84) (Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:11612-17)。EPO 投与は心筋保護シグナルのリン酸化を亢進し、心筋アポトーシス抑制や血管新生を亢進し、虚血による心筋障害を軽減するとされている (J Clin Invest 2010;120:2016-29)。

しかし人において、外因性の EPO 投与の心筋保護効果については、一定の見解が得られていないのが現状である (JAMA 2011;305:1863-72)。

一方、2 刺激薬である Fenoterol 投与が、人において内因性 EPO 分泌を亢進させる方向がある (Br J Clin Pharmacol 1999;48:631-34)。内因性の EPO 分泌には、神経および液性調節の関与が報告されているが (J Physiol. 2011;589:1251-58) (Am J Physiol. 1976;230:508-13) (J Pharmacol Exp Ther. 2006;319:111-6) 2 刺激薬が内因性 EPO 分泌を亢進させる機序は明らかにはなっていない。2 刺激は心筋虚血後の心筋保護作用を有するとの報告も数多く散見される (Circulation 2006;114:936-44) (Circulation Res 2003;93:896-906)。人において、2 刺激薬の投与により補助人工心臓からの離脱が可能であった症例の報告がある (N Engl J Med 2006;355:1873-84)。

さらに、近年臓器連関の概念が注目を集めている。中でも心血管疾患において、腎機能低下は独立した危険因子であり、心腎連関として提唱されている (Circulation 2006;114:2850-70)。我々は一過性四肢虚血がもたらす心筋保護現象である remote ischemic preconditioning には、一過性四肢虚血後、腎神経を介した腎血流低下による HIF1 $\alpha$ -EPO 分泌の亢進が重要であることを見だし、骨格筋-腎臓-心臓の新たな臓器連関を確認している。

EPO による心筋保護の報告は数多くなされてはいるものの、外因性 EPO 投与の心筋保護効果には現状では限界がある。2 刺激薬の心筋保護効果は人においても証明されているが、その機序は不明な点が多い。特に 2 刺激による内因性 EPO 分泌亢進が心筋保護効果をもたらすかどうかについての検証は現状ではなされておらず。内因性 EPO 分泌を亢進させる機序も現段階では不明である。

### 2. 研究の目的

我々は本研究で、2 刺激による腎交感神経を介した EPO 分泌、さらに心筋保護機構を検証し、虚血による心筋障害に対する新たな治療法を見いだすことを目的としている。

### 3. 研究の方法

我々は、まず 2 刺激後マウス腎臓において、内因性 EPO 分泌の亢進を認めるカリアルタイム PCR を用いて検証し、血清 EPO 濃度の測定を行う。さらに 2 刺激後マウス心臓において、心筋保護シグナルのリン酸化を western blot で検証し、マウス抗 EPO 抗体をもちいて、それら心筋保護シグナルが、2 刺激により得られた内因性 EPO 依存性であることを証明する。また同抗体を用いて 2 刺激後の梗塞後心筋障害抑制が内因性 EPO 依存性であることも、心筋梗塞モデルマウスを用いて評価する。2 刺激後腎臓での内因性 EPO 分泌亢進及び心筋障害抑制への腎交感神経の関与を、10%フェノール塗布を用いた、マウス腎除神経モデルを使用し評価を行う。

具体的には

(1) 2 刺激薬投与後、マウス腎臓における EPO 発現の確認および血清 EPO 濃度の測定  
マウス：8 - 12 週 Balb/c

マウス腹腔に formoteol 100  $\mu$ g/kg で投与し、投与後 1 時間 3 時間後の血清 EPO 濃度と腎臓 m-RNA の発現の経時変化を検証する。コントロールとして Formoterol 溶媒の DMSO を用いる。

(2) 2 刺激薬投与後、心臓での細胞内シグナルの活性化の評価

心臓：2 刺激薬投与前、投与後 3 時間、6 時間、24 時間、48 時間で左室を回収し western blot で心筋細胞での細胞内シグナル (JAK-STAT, AKT, ERK) の活性化を検証する。

(3) 2 刺激薬投与による心筋梗塞後梗塞縮小効果の検証

マウスに 2 投与後 3 時間で左前下降枝結紮を行い、心筋梗塞モデルを作成する。梗塞後 3 時間でマウス心臓を回収し Evans-blue TTC 染色を行い梗塞層を評価する。

(4) 2 刺激後心筋細胞内シグナルリン酸化及び梗塞層縮小効果への EPO の関与の検証

2 刺激薬投与後の心筋細胞内シグナルリン酸化及び梗塞層の縮小に、内因性 EPO 分泌が関与しているかを検証するために、マウス抗 EPO 抗体を用いて、2 刺激後の心筋細胞内シグナルのリン酸化を検証する。同時に同抗体を用いて、2 刺激後の心筋梗塞作成後、梗塞層の評価も行う。

(5) 2 刺激後腎臓での EPO 分泌亢進及び梗塞層縮小効果への腎交感神経の関与の検証

マウス腎交感神経を 10%フェノールで除神経し、その後 2 刺激薬 formoteol 100  $\mu$ g/kg

投与を行う。投与後の腎臓からの EPO 分泌の検証と、2 刺激薬投与後 3 時間で心筋梗塞を作成し、梗塞層の評価を行う。

#### 4. 研究成果

マウスに Formoteol 100 µg/kg を腹腔内投与し、腎臓からの EPO 分泌の増加を確認した。投与後 1 時間でマウス腎臓において EPOmRNA の有意な上昇を認めた。また免疫染色において Formoteol 投与後 1 時間で腎臓の皮髄境界部に一致して HIF1 の発現の増加を認めた。以上から Formoteol 投与後マウス腎臓において HIF1 の発現亢進が起こり、EPO の産生が増加することが確認された。続いてマウス心臓において Formoteol 投与後心筋保護シグナルである STAT3, AKT, ERK のリン酸化を検証した。マウス心臓において投与後これらシグナルのリン酸化は明らかに亢進していた。マウスへの Formoteol 投与における心筋梗塞後梗塞縮小効果を検証するために、Formoteol 投与後にマウス心筋梗塞を作成し、梗塞範囲が縮小することを Evans-blue TTC 染色を用いて確認した。以上より、Formoteol 投与後腎臓における HIF1 -EPO 経路の活性化が、心筋梗塞後の梗塞層の縮小をもたらす可能性を見いだした。

#### 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 4 件)

1: Cardiac-Specific SOCS3 Deletion Prevents In Vivo Myocardial Ischemia Reperfusion Injury through Sustained Activation of Cardioprotective Signaling Molecules.

Nagata T, Yasukawa H, Kyogoku S, Oba T, Takahashi J, Nohara S, Minami T, Mawatari K, Sugi Y, Shimozono K, Pradervand S, Hoshijima M, Aoki H, Fukumoto Y, Imaizumi T.

PLoS One. 2015 May 26;10(5):e0127942. in press 査読有

2: Renal Nerve-Mediated Erythropoietin Release Confers Cardioprotection During Remote Ischemic Preconditioning.

Oba T, Yasukawa H, Nagata T, Kyogoku S, Minami T, Nishihara M, Ohshima H, Mawatari K, Nohara S, Takahashi J, Sugi Y, Igata S, Iwamoto Y, Kai H, Matsuoka H, Takano M, Aoki H, Fukumoto Y, Imaizumi T.

Circ J. 2015 Mar 31. in press 査読有

3: Omentin prevents myocardial ischemic injury through AMP-activated protein kinase- and Akt-dependent mechanisms.

Kataoka Y, Shibata R, Ohashi K, Kambara T,

Enomoto T, Uemura Y, Ogura Y, Yuasa D, Matsuo K, Nagata T, Oba T, Yasukawa H, Numaguchi Y, Sone T, Murohara T, Ouchi N. J Am Coll Cardiol. 2014 Jun 24;63(24):2722-33. 査読有

4: Alterations in coxsackievirus and adenovirus receptor confer susceptibility to ventricular arrhythmia with an ischemic event.

Yasukawa H, Oba T, Fukumoto Y.

J Am Coll Cardiol. 2014 Feb 18;63(6):560-2. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

1: Screening for Fabry disease in patients with left ventricular hypertrophy.

Mawatari K, Yasukawa H, Oba T, Nagata T, Togawa T, Tsukimura T, Kyogoku S, Ohshima H, Sugi Y, Imaizumi T.

第 17 回日本心不全学会学術集会

2014 年 11 月 28 日～11 月 30 日 さいたま

〔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

大場 豊治 (OBA TOYOHARU)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 10389257

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：