

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860564

研究課題名(和文) C型ナトリウム利尿ペプチドの多面的作用を活かした難治性心疾患治療法の開発

研究課題名(英文) The multifaceted effects of C-type natriuretic peptide on refractory cardiovascular disease

研究代表者

植松 悦子 (UEMATSU, Etsuko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教務補佐員

研究者番号：10352080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)が心筋虚血による心室性不整脈を抑制するか、あるいは拡張障害性心不全を改善するかを検証した。その結果、CNP投与は生理食塩水投与に比し心筋虚血再灌流に伴う心室性不整脈の出現を抑制し生存率を有意に改善した。その機序として、CNPによるアポトーシスの抑制並びに生存シグナルの活性化が考えられた。また、CNP投与は、HFPEFモデルにおいて血圧には有意な差はみられなかったが左室拡張機能を改善しており、その要因のひとつとして左室線維化の軽減が考えられた。これらの結果は、心室性不整脈や拡張障害性心不全など難治性心疾患に対するCNPの有用性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we studied whether C-type natriuretic peptide (CNP) administration would exert an antiarrhythmic effect in rats after acute myocardial ischemia/reperfusion (I/R) and increase left ventricular diastolic distensibility in rats with HFpEF.

Study 1;Ventricular tachyarrhythmias were less frequent in rats after myocardial I/R who received CNP in comparison to rats. Importantly, CNP administration improved the mortality rate associated with myocardial I/R injury-induced arrhythmias. CNP administration also accelerated Akt and NO phosphorylation in cardiac tissues.

Study 2;The diastolic LV dysfunction in HFpEF model was improved by CNP, although arterial pressure was not affected. Furthermore, CNP attenuated an increase collagen volume fraction in LV. In conclusion, short-term infusion of CNP attenuated ventricular arrhythmia and long-term CNP administration improved diastolic function. These data suggest the potential usefulness of CNP for myocardial I/R injury and HFpEF.

研究分野：循環器内科

キーワード：循環器 ペプチド 心筋虚血 心室性不整脈 拡張障害性心不全

1. 研究開始当初の背景

CNPは1990年に研究協力関係にある国立循環器病研究センターの寒川らにより発見されたペプチドホルモンであり、ANP、BNPと類似構造をもつ(Biochem Biophys Res Commun 1990;168:863-70)。ANPやBNPが主に心臓より分泌されるホルモンとして、血圧や体液量調節に関与するのに対し、CNPは血管内皮細胞、動脈硬化巣のマクロファージ、血管平滑筋細胞などから分泌されることが明らかにされ、内皮由来血管弛緩因子として注目されるようになった。すなわち、血管内皮細胞から分泌されるCNPはinterleukin-1、tumor necrosis factor- α などの炎症性サイトカインにより著明に増加し、これらサイトカインによる血管平滑筋細胞の増殖を強力に抑制することが報告されている。このように1990年代にはCNPは血管壁の局所因子として注目されていたが、心筋細胞におけるCNPの発現が少ないことなどから心臓での作用については不明であった。2000年代に入り、寒川、添木(現在申請者の所属する研究室に在籍)らは、CNPの心臓での作用をin vitro並びにin vivoの両面から検討した。すなわち、CNPが培養ラット心線維芽細胞から分泌され、その受容体(B型ナトリウム利尿ペプチド受容体;以下NPR-B)は心線維芽細胞だけでなく心筋細胞にも発現していること、心線維芽細胞の増殖並びにコラーゲン合成をANP、BNPよりも強く抑制し心筋細胞の肥大抑制作用を有することを報告した(Endocrinology 2003;144:2279-84)。さらに、CNPの投与が心筋梗塞ラットの残存心筋における間質の線維化と心筋肥大を著明に抑制し、心筋梗塞後の心臓リモデリングの進展を抑えることを明らかにした(J Am Coll Cardiol 2005;45:608-16)。また、心筋梗塞後、内因性のCNP発現は心臓線維芽細胞において著明に増加しており、内因性のCNPがオートクライン、パラクライン的に心臓リモデリングを抑制していることを示した。

一方、わが国では心臓突然死が年間約5万件発生しているとされ、その主な原因は頻脈性心室性不整脈である。自律神経系の活動が心室性不整脈の発生に関与することは、心臓突然死との関連において以前から注目されており、遮断薬が心筋梗塞後の頻脈性心室性不整脈の発生を抑え突然死発生を抑制することが報告されている。これに対し、CNPはcyclic guanosine monophosphate(cGMP)を介して迷走神経活性時におけるアセチルコリンの放出およびそれに伴う徐脈を促進させることが報告されており(Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001;281:H2318-27)。副交感神経を介した抗不整脈作用が期待できる。さらに、最近、交感神経活性化状態がベースにある場合、CNPはNPR-BではなくNPR-C(cGMPを介さずグリアランスやシグナル伝達に関与するとされている受容体)を

介した徐脈作用や洞房結節の活動電位発火頻度減少作用を有することが明らかとなった(J Mol Cell Cardiol. 2012;53:715-24)。また、HFPEFは高齢化により患者数が増加しており、心不全患者の半数以上を占めると言われている。しかしながら、HFPEFの予後改善を目指して、幾つかの臨床試験が行われたなかで、エビデンスが得られた薬剤はまだない。HFPEF患者の心筋ではcGMP減少に伴いprotein kinase G(PKG)の活性が減少しており、PKGの補充により心筋細胞の拡張障害が改善することが報告されており(Circulation. 2012;126:830-9)。一方で間質の線維化が拡張障害に大きく寄与していることも報告されている。cGMPをsecond messengerとし、強力な線維化抑制作用を有するCNPの投与がHFPEFでも有効である可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、i) CNPは自律神経系を調節し心筋梗塞後の心室性不整脈を抑制する、ii) CNPはcGMP/PKG系の活性化により拡張障害性心不全を改善するという仮説を立て検証した。

3. 研究の方法

研究(1)

ラットの冠動脈を結紮し急性心筋虚血・再灌流モデルを作成した(30分虚血、2時間再灌流)(MI群)。開胸のみを行い冠動脈結紮を行わないものを対照群(Sham群)として作成した。そして、心筋虚血・再灌流の間にCNP(0.1 μ g/kg/min)または生理食塩水(Vehicle)の持続静注を行った。CNP、生理食塩水を投与中に心電図記録を行い心室性不整脈の発生をみた(AD Instruments社製PowerLab system)(図1)。そして、生理学的急性効果を心臓超音波検査(ラット・マウス用の12MHzプローブを使用)により評価した。次に、取り出した心臓において病理学的・生化学的評価を行った。心筋の生存シグナルであるPI3K-Akt経路やeNOSなどを測定し、TUNEL染色などのアポトーシスについても検討した。

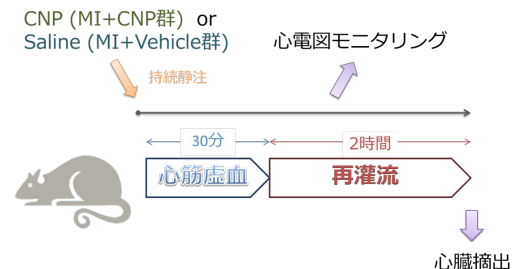


図1 心筋虚血・再灌流モデル作成方法

研究 (2)

Dahl salt-sensitive ラットに 8%NaCl を負荷し HFPEF モデルを作成した。そして、浸透圧ミニポンプを用いて CNP (0.1 μ g/kg/min) または Vehicle として 5%ブドウ糖液の持続静注を 4 週間行った。そして、心臓超音波検査により心機能を評価し、心臓カテーテル検査により血行動態を評価した後、心臓を摘出し、生化学的・病理学的評価を行った。

4 . 研究成果

研究 (1)

心筋虚血再灌流モデルラットにおいて、CNP 群は Vehicle 群に比べ心室頻拍の出現を有意に抑制し (図 2)、心室頻拍総時間においても減少傾向を示した (図 3)。

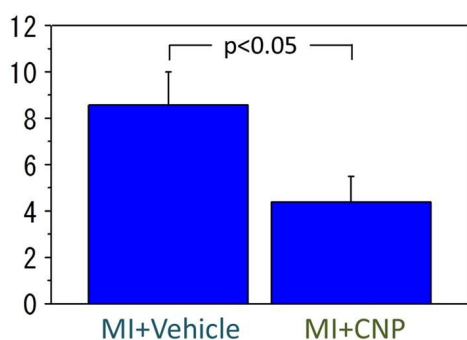


図 2 心筋虚血再灌流モデルにおける心室頻拍総数

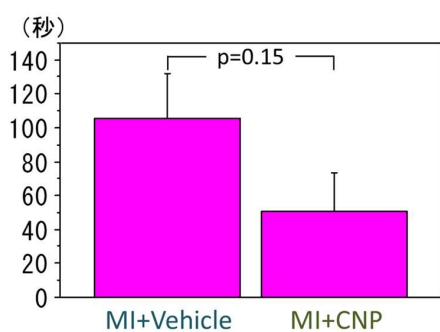


図 3 心筋虚血再灌流モデルにおける心室頻拍総時間

また、実験中の死亡数は CNP 群が 0/11 にであったのに対し、Vehicle 群では 4/12 であり、Kaplan-Meier 生存曲線では、CNP 群は Vehicle 群に比べて有意に生存率が高かった (図 4)。

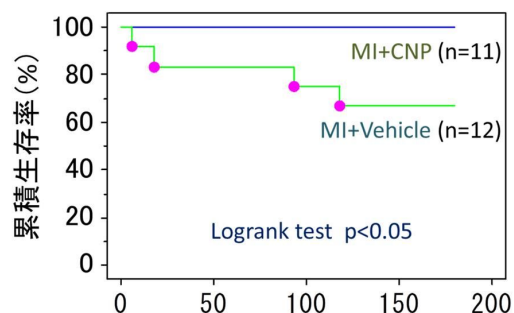


図 4 心筋虚血再灌流モデルの生存曲線

TUNEL 染色において、CNP は心筋虚血再灌流に伴う TUNEL 陽性 apoptosis 細胞の増加を抑制した (図 5)。

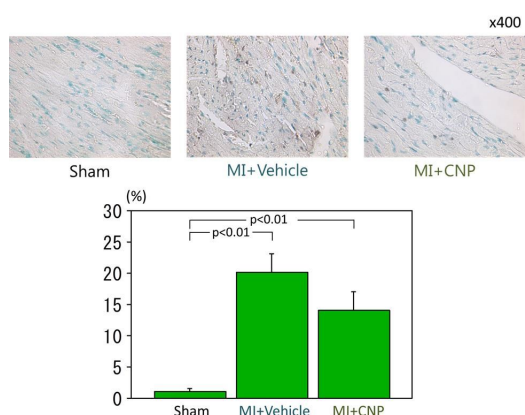


図 5 TUNEL 染色によるアポトーシス細胞の発現

Western blot 法においては、CNP が虚血再灌流後の Akt および eNOS のリン酸化を促進した (図 6)。

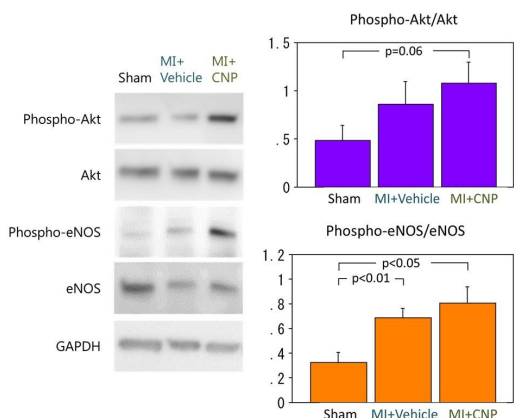


図 6 Western Blot 法によるリン酸化 Akt/eNOS の発現

以上より、CNP は心筋虚血再灌流に伴う心室性不整脈の出現を抑制した。その機序として、

CNP によるアポトーシスの抑制並びに生存シグナルの活性化が考えられた。

研究 (2)

心臓超音波検査において、左室収縮能に関しては CNP 投与群と Vehicle 群の間に有意差はみられなかった。心臓カテーテル検査においては、両群とも高血圧を示しており、CNP 投与により収縮期血圧は低下傾向を示したが有意差はみられなかった。左室拡張末期圧 (LVEDP) に関しては、CNP 投与群において有意に Vehicle 群より低値であった (図 7)。

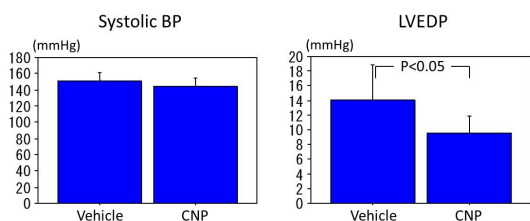


図 7 HFPEF モデルラットにおける血行動態 (1)

また、CNP 投与群は左室最小 dP/dt が Vehicle 群よりも改善していたが、最大 dP/dt に関しては両群で有意差はみられなかった (図 8)。

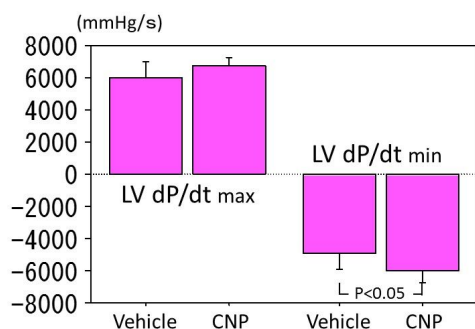


図 8 HFPEF モデルラットにおける血行動態 (2)

また、CNP 投与群では左室の形態学的コラーゲン密度が Vehicle 群よりも有意に低下していた。

以上より、CNP 投与は、HFPEF モデルにおける左室拡張障害を改善しており、その要因のひとつとして左室線維化の軽減が考えられた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連帯研究者には下線)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

植松 悦子 (UEMATSU, Etsuko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教務補佐員

研究者番号 : 10352080