

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	川 口 哲
-------	-----	-----	-------

学 位 論 文 題 目

β_3 -Adrenergic receptor blockade reduces mortality in endotoxin-induced heart failure by suppressing induced nitric oxide synthase and saving cardiac metabolism
 (β_3 アドレナリン受容体遮断は、エンドトキシン起因の敗血症性心不全における誘導型一酸化窒素合成酵素を抑制し、心筋代謝を改善する事で生存率を改善する)

共 著 者 名

岡田基、井尻えり子、甲賀大輔、渡部剛、林健太郎、
 柏木友太、藤田智、長谷部直幸

American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology
 2020;318:H283-H294
 doi: 10.1152/ajpheart.00108.2019.

研 究 目 的

重症敗血症での心機能障害は20-50%に合併し、重大な予後規定因子となっているが、有効な治療法はまだ確立されていない。敗血症での心機能障害は、過剰な誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現による一酸化窒素 (NO) 産生、心筋脂肪酸代謝障害と心筋ミトコンドリア機能障害のため、心筋ATPが枯渇すると考えられている [1]。一方、 β_3 アドレナリン受容体 (β_3 AR) は、脂質分解作用を有し脂肪細胞、消化管、肝臓、骨格筋など全身の臓器に分布しており、正常心筋にはほとんど発現していないが、心不全心筋で増加することが知られている [2]。近年の報告では、心筋 β_3 ARを刺激する事で、一酸化窒素合成酵素 (NOS) やNOを増加させ、慢性心不全を改善するとされている [3]。しかし、敗血症性心不全における β_3 ARの役割、 β_3 ARとNOの関係についての報告はほとんど存在しない。

本研究では、エンドトキシン誘発性敗血症モデルマウスを用いて、 β_3 AR刺激薬・遮断薬投与後の生存率、心筋エネルギー代謝への影響、NO産生への影響を明らかにした。

材 料 ・ 方 法

1. 敗血症モデルマウスの作成

8-10週令のC57Bl/6マウスにリボポリサッカライド(LPS) 10mg/kgを腹腔内注射し、敗血症モデルを作成した。その3時間後に、マウスを3群に分け、生理食塩水 250 μ L (NS群)、選択的 β_3 AR刺激薬のCL316243 1mg/kg (CL群)、選択的 β_3 AR遮断薬のSR59230A 1mg/kg (SR群) を腹腔内注射した。また、初回のLPS腹腔内注射を生理食塩水 250 μ Lとするコントロール群 (CT群)を作成し、合計4群間での比較を行った(各群10匹)。

2. 生存率及び心機能評価

LPS投与直後から24時間後までの死亡率を各群で評価した。また、LPS投与前、LPS投与6、12、24時間後について、各群での生存マウスを心エコー図法で評価した。心機能評価項目として、%left ventricular fractional shortening (%LVFS)、left ventricular ejection fraction (LVEF)、heart rate (HR) を経時的に観察した。

3. 心筋組織における分子生物学的学評価

LPS投与12時間後にマウスの心臓を摘出し、qPCR法およびウエスタンブロット法により、左室心筋の β_1 、 β_2 、 β_3 アドレナリン受容体、心筋ATP産生関連因子、iNOSおよび内皮型NOS (eNOS)、炎症性サイトカイン (NF- κ B、TNF- α 、IL-1、IL-6) の遺伝子・蛋白発現を評価した。また、心筋ATP量をルシフェラーゼ光学活性法により測定した。心筋NO量は測定キットを用いて比色法により測定した。

4. ミトコンドリア蛋白の評価

ミトコンドリア抽出キットを用い、心筋組織からミトコンドリア抽出を行った。その後、抽出ミトコンドリア蛋白より、Electron Transport Chain (ETC) complex I-V 蛋白の発現をウエスタンブロット法で評価した。

5. 組織学的評価

摘出心筋より組織標本を作成し、oil red O染色、Cytochrome c oxidase I (COX1) の免疫染色、さらに、電子顕微鏡を用いての組織学的評価を行い、各群間で比較検討した。

成 績

1. β_3 AR刺激・遮断薬の生存率と心機能への影響

LPS投与24時間後でのNS群の生存率60%に対して、SR群の生存率は100%だった。一方、CL群は20%と生存率は低下した。心機能は、LPS投与6時間後に最も低下

し、NS群は%LVFS, $24.5 \pm 3.6\%$ 、LVEF, $47.1 \pm 6.2\%$ であった。一方、SR群は有意に心機能が改善 (%LVFS, $32.5 \pm 6.4\%$ 、LVEF, $62.3 \pm 9.7\%$ 、 $p < 0.05$ vs. NS) し、CL群では有意に心機能が低下 (%LVFS, $19.4 \pm 5.9\%$ 、LVEF, $24.5 \pm 3.6\%$ 、 $p < 0.05$ vs. NS)した。その後は、各群とも時間経過で改善し、24時間で正常化した。一方、心拍数は各群ともLPS投与12時間後で最小となったが、3群間で有意差を認めなかった。

2. β_3 ARの心筋代謝へ与える影響

β_3 ARの発現は、CT群と比較しLPS投与で有意に増加したが、各群間で有意差を認めなかった。心筋ATP量は、NS群、CL群で有意に低下し、SR群はCT群と同等レベルで維持されていた。心筋ATP産生は主にミトコンドリア機能と脂肪酸代謝に依存するが、その転写調節因子であるPGC1- α 、ERR- α 、PPAR- α の遺伝子発現は、NS群およびCL群と比較し、SR群において発現が高く維持されていた。また、血中遊離脂肪酸の細胞内輸送蛋白であるCD36は各群間で有意差を認めなかったが、ミトコンドリア内への脂肪酸輸送に重要なCPT-1は、SR群で有意に発現増加を認めた。心筋ミトコンドリア内膜電子伝達系の中心的役割を果たすETC complex I - V 蛋白は、SR群でCT群と同等の発現を認め、NS群、CL群で有意に低下した。病理組織において、Oil red O染色にて、NS群の心筋細胞に多くの脂肪滴の沈着が観察され、CL群ではさらに多量の脂肪沈着が観察された。一方、SR群はほとんど脂肪滴を認めなかった。同様に、電子顕微鏡検査でもNS群、CL群で多量の脂肪滴が観察されたが、ミトコンドリアの形態異常は観察されなかった。ミトコンドリアの酸化的リン酸化の電子伝達系の重要な酵素であるCOX1の免疫染色では、NS群、CL群での活性は有意に低下し、SR群では高く維持されていた。

3. β_3 ARとNOについて

iNOSの発現は、NS群、CL群で増加しSR群で有意に低下した。一方、eNOSの発現は、各群間で有意差を認めなかった。NO産生量は、NS群で増加しCL群ではさらに増加した。一方、NO産生はSR群で有意に減少した。また、炎症性転写因子のNF- κ B、およびNF- κ B依存性のサイトカインであるTNF- α 、IL-1、IL-6の遺伝子発現は、LPS投与により有意に増加したが、各群間で有意差を認めなかった。

考 案

β_3 ARは敗血症マウス心筋で増加し、この遮断が心機能障害および予後を改善させることが明らかになった。これは、 β_3 ARが敗血症心筋のATP産生と密接に関わっており、心筋内の脂肪酸輸送を改善することで、心筋脂肪酸代謝およびミトコンドリア機能を改善したものと考えられた。また、敗血症ではNF- κ Bを介した過剰なiNOSおよびNOが心抑制をもたらし、ペルオキシニトロライドなどのフリーラジカルによって細胞

障害をもたらすことが報告されているが、本研究の結果から、 β_3 AR を遮断することでNOの産生が抑制されたこと、 β_3 ARはNF- κ Bを介さない独自のiNOS産生調節機構を有している事が示唆された。

したがって、 β_3 ARを遮断することで敗血症性心不全の発症や進展を抑制し、予後の改善に寄与するものと考えられる。

結 論

β_3 AR遮断は、敗血症性心不全での心筋iNOSの発現を抑制することで、心筋ダメージを抑制し、さらに心筋脂肪酸代謝を改善させることで、心機能の保持および死亡率の改善をもたらした。 β_3 ARは敗血症性心不全の治療ターゲットになる可能性が示された。

引 用 文 献

1. Drosatos K, Khan RS, Trent CM, Jiang H, Son NH, Blaner WS, Homma S, Schulze PC, Goldberg IJ. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation prevents sepsis-related cardiac dysfunction and mortality in mice. *Circ Heart Fail* 6: 550-562, 2013.
2. Cannavo A, Koch WJ. Targeting β_3 -Adrenergic Receptors in the Heart: Selective Agonism and β -Blockade. *J Cardiovasc Pharmacol* 69:71-78, 2017.
3. Niu X, Watts VL, Cingolani OH, Sivakumaran V, Leyton-Mange JS, Ellis CL, Miller KL, Vandegaer K, Bedja D, Gabrielson KL, Paolocci N, Kass DA, Barouch LA. Cardioprotective effect of beta-3 adrenergic receptor agonism: role of neuronal nitric oxide synthase. *J Am Coll Cardiol* 59: 1979-1987, 2012.

参 考 文 献

1. Kawaguchi S, Takeuchi T, Hasebe N. Pulmonary artery compression by a localized epicardial hematoma in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura after percutaneous coronary intervention: a case report. *BMC Cardiovasc Disord* 16:206-10, 2016.