

心疾患モデル動物を用いた不全心筋治療へのアプローチ

渡辺 賢一・馬 梅薔・平林 賢一
曾我真也子・文 娟・Mir.I.I. Wahed

G. Narasimman・P.S. Suresh・Paras Prakash

Fadia K. Ali・水戸沙耶佳

白井 健・長井 悠輔

新潟薬科大学薬学部 臨床薬理学

太刀川 仁・小玉 誠・相澤 義房

新潟大学大学院医歯学総合研究科

循環器学分野 (医学部第一内科)

Researches of Heart Failure Using Animal Models

Kenichi WATANABE, Meilei MA,

Kenichi HIRABAYASHI, Mayako SOGA,

Juan WEN, Mir WAHED,

Narasimman GURUSAMY, Suresh PALANIYANDI,

Paras PRAKASH, Fadia A KAMAL, Sayaka MITO,

Ken SHIRAI and Yusuke NAGAI

Department of Clinical Pharmacology,

Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences

Hitoshi TACHIKAWA,

Makoto KODAMA and Yoshifusa AIZAWA

Division of Cardiology, Niigata University

Graduate School of Medicinal & Dental Sciences

要 旨

(1) 心不全においては過度の交感神経緊張が悪循環を形成し、それを断ち切るために β -遮断薬が使用される。更に、レニン・アンジオテンシン・アルデステロン系 (RAA) の係わりが最近注目されている。心不全モデルラットに β -遮断薬・RAA阻害薬等を投与し心機能の改善が見られた。更に、 β -遮断薬は心筋交感神経機能を改善し、RAA阻害薬は線維化と関連する

Reprint requests to: Kenichi WATANABE, MD & Ph.D
Clinical Pharmacology Niigata University of
Pharmacy and Applied Life Sciences
5-13-2 Kamisinei-cho,
Niigata 950-2081 Japan

別刷請求先: 〒951-2081 新潟市上新栄町 5-13-2
新潟薬科大学薬学部臨床薬理学 渡辺 賢一

TGF- β 1とコラーゲンⅢの mRNA 発現を抑制した。

(2) サイトカインのインターロイキン (IL)-10 は、炎症性サイトカインの産生を抑制する。心筋炎モデルラットに IL-10 を投与すると、心臓のマスト細胞やヒスタミンが減少した。更に、心機能の改善も見られた。

(3) アポトーシスは不全心筋とも密接に関係する。特に糖尿病を合併する心筋ではアポトーシスがおきやすい。14-3-3 蛋白はシグナルトランスダクションを調節し、心筋アポトーシスに関係する。Dominant Negative 14-3-3 (TG) マウスを用い、糖尿病と心筋アポトーシスを検討した。TG マウスでは MAPK の p38MAPK や JNK の活性化とアポトーシスが見られた。

キーワード：レニン・アンジオテンシン・アルデステロン，インターロイキン-10，14-3-3 蛋白，MAPK，アポトーシス

Abstract

(1) We studied the effects of β -blocker (carvedilol), ACE inhibitor (quinapril), angiotensin receptor blocker (candesartan) and aldosterone blocker (eplerenone), on the progression of left ventricular dysfunction and remodeling in rats with dilated cardiomyopathy after autoimmune myocarditis. Drugs administration significantly reduced mortality, cardiomyocyte hypertrophy, heart weight and heart weight to body weight ratio. Carvedilol improved myocardial sympathetic nerve function. Candesartan and eplerenone improved left ventricular function in a dose-dependent manner. Candesartan and eplerenone also attenuated myocardial fibrosis and reduced left ventricular mRNA expressions of TGF- β 1 and collagen-III.

(2) Progression of acute myocarditis involves a variety of inflammatory events. Mast cells have been implicated as the source of various cytokines, chemokines and histamine in acute inflammation and fibrosis. Interleukin (IL)-10 has well known immunomodulatory actions that are exerted during the recovery phase of myocarditis. A plasmid vector expressing mouse IL-10 cDNA (800 μ g per rat) was then transferred 3 times (7, 12 and 17 days after immunization) into the tibialis anterior muscles of the rats by electroporation. Mouse IL-10 gene transfer significantly reduced mast cell density, cardiac histamine concentration and mast cell growth, and prevented mast cell degranulation. Furthermore, improvement in both myocardial function and the overall condition of the rats was evident. These findings suggest that IL-10 gene transfer by electroporation protected against myocarditis via mast cell inhibition.

(3) 14-3-3 family members are dimeric, phosphoserine binding proteins that regulate signal transduction, apoptotic and checkpoint control pathways. Recently, cardiomyocyte apoptosis has been characterized in type I diabetes mellitus or swimming stress. In order to study the molecular mechanism underlying diabetes-induced cardiomyocyte apoptosis, we examined the role of 14-3-3 protein and MAPK pathways in transgenic mice with cardiac specific expression of dominant negative 14-3-3 η (DN-14-3-3). p38 MAPK and JNK were highly activated after diabetes induction by streptozotocin or swimming stress. p38 MAPK and JNK activation as well as cardiomyocyte apoptosis were greatly increased in DN-14-3-3 mice relative to non-transgenic mice. Moreover, we found a significant correlation between JNK activation and apoptosis in diabetic myocardium. These results indicate for the first time that 14-3-3 protein plays a critical anti-apoptotic role in diabetic myocardium by inhibiting the JNK pathway.

Key words: renin-angiotensin-aldosterone, interleukin-10, 14-3-3 protein, mitogen activated protein kinase (MAPK) pathways, apoptosis

(1) 心不全モデルラットと薬物治療

はじめに

虚血・心筋炎・薬物障害・心臓弁膜症など心不全の原因は様々であるが、心不全においては過度の交感神経緊張が悪循環形成に大きな役割をはたしていると考えられる。それに対して β 遮断薬を用いるというアイデアは Waagstein らによって試され、一部の心不全（拡張型心筋症など）には有効であることがわかってきた^{1)–6)}。ただし、 β 遮断作用による心機能抑制のため導入の段階で心不全が悪化し脱落してしまう症例があること、中止により心不全が悪化する症例があることなど臨床現場ではまだ解決されていない問題が多い。 β 遮断薬の投与方法や種類、適応となる基礎疾患などの問題は解決されていないが、カルベジロール、ベタキソロール、メトプロロールなどの有効報告が多い^{2)–6)}。

一方、心不全におけるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の関与は最近最も注目されている。アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬は心筋梗塞後の患者に用いるといわゆる remodeling つまり慢性期の左室の拡張を予防し心不全の発生を予防することが明らかとなった。さらに SOLVD II の prevention study の結果、無症候性の心不全患者に対しても入院などの事象を減少させることが明らかとなった。このような報告から無症状の心不全患者でも ACE 阻害薬は早期から用いるべきである。我々は、心不全モデルラットを用いて各薬物の効果を検討した。

ヒトとラットの差異

ヒトではチトクローム (CYP) や poor metabolizer など個人差が大きい、動物実験では同じ系列動物を用いることにより個々のばらつきを少なくできる利点がある。また、ヒトでは ACE だけでなくキマーゼなどがレニン・アンジオテンシン系に重要な働きをするが、ラットでは ACE が大部分を占める。心拍数はヒトで約 70/分、ラットで約 350/分と差があることや寿命年齢など、ヒトとモデル動物の差異を考慮しながら動物実験を施行することが大切である。

心不全モデルラット

ミオシン注射によりヒト巨細胞性心筋炎様の自己免疫性心筋炎が起きる⁷⁾。更に慢性期には左心室の拡張、左室拡張末期圧の上昇、線維化などが見られ、ヒト拡張型心筋症様の心不全モデルが出来上がる⁷⁾⁸⁾。このモデル動物を用いて、 β 遮断薬（ベタキソロール、カルベジロール）・ACE 阻害薬（キナプリル）・アンジオテンシン受容体拮抗薬（カンデサルタン）・アルドステロン拮抗薬（エプレレノン）の効果を検討した。

心不全モデルラットにおける β 遮断薬の効果

β 遮断薬の投与により死亡率、左室拡張末期圧と心筋線維化面積の低下が見られた⁹⁾¹⁰⁾。興味あることに高用量よりも低用量のほうが、それらの改善がより著明であった。この結果から心不全患者に β 遮断薬を用いるに際して闇雲に用量を増加すべきでないと思われる。臨床では心筋の交感神経機能を検討するために I-123 Metaiodobenzylguanidine (MIBG) が多用されている。I-125 MIBG を用い心不全モデルラットでの心臓集積と β 遮断薬投薬後の変化を検討した。MIBG の心臓への取り込みは早期像と後期像共に心不全ラットで低下し、更に早期像と後期像の集積差 (Washout) は高値を示した。これらは β 遮断薬投与により改善した¹¹⁾。 β 遮断薬は心房性 (A 型) ナトリウム利尿ホルモン (ANP) や脳性 (B 型) ナトリウム利尿ホルモン (BNP) の産生に影響する¹²⁾。 β 遮断薬を心不全モデルラットに投与後、心臓の ANP と BNP の mRNA 発現と血中濃度の低下が見られた¹³⁾。

心不全モデルラットにおける ACE 阻害薬・アンジオテンシン受容体拮抗薬・アルドステロン拮抗薬の効果

ACE 阻害薬・アンジオテンシン受容体拮抗薬・アルドステロン拮抗薬を心不全モデルラットに投与すると用量依存的に、死亡率、心臓重量、LVEDP、線維化面積の低下が見られた¹⁴⁾。血中と心筋内アンジオテンシン II 濃度は心不全群で増加し、キナプリル投与で低下した^{15)–18)}。Transforming Growth Factor (TGF)- β とコラーゲン-III の mRNA 発現は心不全群で増加したが、治療群で用量依存的に減少した。

まとめ

ヒト拡張型心筋症様心不全モデルラットに β 遮断薬及びレニン・アンジオテンシン・アルドステロン阻害薬を投与後、死亡率と心機能の改善が見られた。

(2) 心筋炎モデルラットと薬物治療

サイトカインのインターロイキン(IL)-10は、単球やマクロファージの主要組織適合抗原(MHC)クラスII分子の発現と炎症性サイトカイン(IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α など)の産生を抑制する。さらに, Th1のT細胞機能やメタロプロテアーゼ発現を抑制する。心筋炎モデルラットにIL-10を遺伝子導入し効果を検討した。Enhancer サイトメガロウイルス, Promoter チッキン β アクチン, XhoI ラビット β グロビンポリAサイトにマウスIL-10cDNAを組み込んだプラスミドを使用した。プラスミド800 μ g/ラットを3回(ミオシン注射5日前, 4日後, 13日後)Electroporation法にて自己免疫性心筋炎モデルラットに遺伝子導入した。ミオシン注射21日目には組織学的に心筋の炎症が抑制され, 心血行動態の改善が見られた。心筋内マスト細胞degranulationが心筋炎群で見られたが, IL-10治療にて消失した⁸⁾¹⁹⁾。

(3) 14-3-3蛋白・MAPK・アポトーシス

はじめに

14-3-3蛋白は, 1967年に脳内蛋白の機能を分類する際のクロマトグラフィーと電気泳動によって発見された蛋白で, その分画番号が14-3-3という名称の由来となっている。14-3-3蛋白は全ての真核細胞中に存在し, 7つのアイソフォーム(β , γ , ϵ , η , σ , τ , ζ)を持ち, 2量体を形成するホスホセリン結合性アダプター分子形状を有し, その機能として, Mitogen-activated protein kinase (MAPK)を含んだ様々なプロテインキナーゼ, 受容体蛋白質, 酵素, 細胞骨格蛋白, 細胞周期や転写制御をする蛋白との相互作用, アポトーシス関与蛋白の挙動変化などを引き起こし, 細胞

の生存に有利な結果をもたらす。各種の負荷や障害で心肥大が起きるが, 心肥大のメカニズムは一樣ではなく不明点が多い。14-3-3蛋白の機能と心肥大やアポトーシスとの関連は不明点が多い。一方, 糖尿病では酸化ストレスやアチドーシス等のいわゆるメタボリックストレスが加わる。14-3-3蛋白作用を障害したマウスを用いて, 糖尿病や長期間運動負荷による心肥大及びアポトーシスと14-3-3蛋白機能との関係についてMAPKカスケードを中心とした細胞内シグナル伝達を検討した²⁰⁾。

使用動物

9週齢雄のC57BL/6マウス(Wild type)をNon-transgenic (NTG)群とした。同一週齢の雄のC57BL/6マウスDominant Negative (DN)14-3-3 η マウスをtransgenic (TG)群とした。DN14-3-3のスクリーニングは, マウス尾部から抽出されたDNAのPCR・1%アガロースゲル電気泳動により行い, トランスイルミネーターを用いてDN14-3-3バンドを示す800bp付近に現れたバンドの有無によって判別した。次に, NTG群とTG群の両群に, 運動負荷(スイミングストレス)を1, 3, 5, 7, 14, 21日間行なった。ストレプトゾトシン投与で血糖値が300mg/dl以上のI型糖尿病モデルを作成した。

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)とアポトーシス

MAPKに属する3種類の蛋白[p38MAPK, c-Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2]及びそれぞれのリン酸化型の一次抗体(1:1000)によるインキュベーションでウエスタンブロッティング法により, 各々の蛋白の発現について検討した。蛋白のリン酸化を評価する際, リン酸化蛋白・総蛋白のカウント比を求め, ストレス0日目のNTG群における上記の数値を1とした相対的な値で示した。更に, TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)染色を施し, アポトーシスを起こした心筋細胞を光学顕微鏡(400倍)検鏡下で数え, 総数に占める割合を求め, ストレス0日目のNTG群における上記の数値を1とした相対的な

値で示した。

結果

心筋細胞横径は NTG 群が TG 群よりも、3・7・14・21 日目 ($13.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$ v.s. $16.7 \pm 0.4 \mu\text{m}$: $p < 0.01$) で有意に小さかった。p38MAPK と JNK の活性化は TG 群で NTG 群よりも顕著な活性化が見られた。アポトーシスを起こした細胞は、TG 群が NTG 群よりも多く見られた。

考察

細胞内シグナル伝達として重要なものに MAPK カスケードがある。MAPK のスーパーファミリーとして、p38MAPK, JNK, ERK1/2 の 3 種類が現在確認されている。一般に、MAPK カスケードに属する蛋白のうち、p38 MAPK 及び JNK は、ストレスや炎症性サイトカインによって活性化され、結果として殺細胞的な作用である心肥大、アポトーシス、炎症、細胞の成長異化を引き起こすが、14-3-3 蛋白はそれらのキナーゼの上流に位置する Apoptosis signal-regulating kinase (Ask) 1 や Mixed lineage kinase (MLK) 2 を阻害する事でこれらの細胞傷害的な作用を抑制する。我々は、p38MAPK 活性を阻害する物質を用いて更なる検討を行っている。一方、ERK1/2 は増殖因子存在下で活性化され、結果として細胞保護的な作用である細胞分化、発達を引き起こす。14-3-3 蛋白はそれらのキナーゼの上流に位置する Raf-1 を活性化することで細胞に有益なこれらの作用を引き起こす。また、アポトーシスは、上記の MAPK カスケード以外にも、カスパーゼや B cell lymphoma (Bcl) -2 ファミリーによっても支配されている事が知られており、Bcl-2 ファミリー内の Bcl-2-antagonist of cell death (Bad) はリン酸化を受けると 14-3-3 蛋白と結合してミトコンドリアから細胞質基質に移動することでアポトーシスを抑制する。本研究では、MAPK に所属する 2 種類の蛋白 (p38MAPK, JNK) の活性化やアポトーシスの誘発が TG 群に於いてより高く、更に心肥大に先立って起こっていた。しかし、ERK1/2 の活性化は見られずむしろ低下していた。その理由として、ERK1/2 は、増殖因子が存在しないと活性化しない事に加え、

p38MAPK が ERK1/2 の活性を阻害すること等が考えられる。TG 群では 14-3-3 蛋白の機能不全の為に心肥大やアポトーシスを起こしているものと考えられた。

まとめ

14-3-3 蛋白の NTG 群及び TG 群に糖尿病によるメタボリック負荷とスイミングによる運動負荷を行ない、心筋の MAPK 活性とアポトーシスを検討した。TG 群では NTG 群より顕著な MAPK 活性化とアポトーシスが起き、心筋細胞の肥大も見られた。14-3-3 蛋白は各種負荷によって起きる心肥大及び心筋アポトーシスと密接に関係する事が推定された。

総 括

長寿社会の到来とともに心不全患者は増加し、不全心筋のメカニズム解明とその治療法が注目されている。再生医学や遺伝子治療等も含めて、基礎研究は動物たちの犠牲の上で行われている。アンジオテンシン受容体拮抗薬や MAPK 等の本研究が医学の進歩に寄与することを望む。

謝 辞

本研究は、第 16 回 (平成 14 年度) 医学研究助成金 (有壬基金)、科学研究費補助金・基盤研究 (B) 課題番号 15390364・基盤研究 (C) 課題番号 70175090、学術研究推進特別フロンティアの補助を受けて行った。

文 献

- 1) Waagstein F, Hjalmarson A, Varnauskas E and Wallentin I: Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. *Br Heart J* 37: 1022-1036, 1975.
- 2) Bohler S, Saubadu S, Scheldewaert R and Figulla HR: Betaxolol versus carvedilol in chronic heart failure (BETACAR Study). *Arzneim-Forsch Drug Res* 49: 311-317, 1999.
- 3) Muinck ED, Buchner-Moell D and Ven LLM: Comparison of the safety and efficacy of bisoprolol versus atenolol in stable exercise-induced

- angina pectoris: a multicenter international randomized study of angina pectoris (MIRSA). *J Cardiovasc Pharmacol* 19: 870 - 875, 1992.
- 4) The Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy (MDC) Trial Study Group. 3 - year follow - up of patients randomized in the Metoprolol in Dilated Cardiomyopathy Trial. *Lancet* 351: 1180 - 1181, 1998.
 - 5) Australian and New Zealand Heart Failure Research Collaborative Group. Randomised, placebo - controlled trial of carvedilol in patients with congestive heart failure due to ischaemic heart disease. *Lancet* 349: 375 - 380, 1997.
 - 6) Doughty RN, Rodgers A, Sharpe N and MacMahon S: Effects of beta - blocker therapy on mortality in patients with heart failure: a systemic overview of randomized controlled trials. *Eur Heart J* 8: 560 - 565, 1997.
 - 7) Kodama M, Hanawa H, Saeki M, Saeki M, Hosono H, Inomata T, Suzuki K and Shibata A: Rat dilated cardiomyopathy after autoimmune giant cell myocarditis. *Circ Res* 75: 278 - 284, 1994.
 - 8) Watanabe K, Nakazawa M, Fuse K, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y, Ohnuki T, Gejyo F, Maruyama H and Miyazaki J: Protection Against Autoimmune Myocarditis by Gene Transfer of Interleukin - 10 by Electroporation. *Circulation* 104: 1098 - 1100, 2001.
 - 9) Watanabe K, Ohta Y, Nakazawa M, Higuchi H, Hasegawa G, Naito M, Fuse K, Ito M, Hirono S, Tanabe N, Hanawa H, Kato K, Kodama M and Aizawa Y: Low dose carvedilol inhibits progression of heart failure in rats with dilated cardiomyopathy. *Br J Pharmacol* 130: 1489 - 1495, 2000.
 - 10) Watanabe K, Takahashi T, Nakazawa M, Wahed M, Fuse K, Tanabe N, Kodama M, Aizawa Y, Ashino H and Tazawa S: Effects of Carvedilol on Cardiac Function and Cardiac Adrenergic Neuronal Damage in Rats with Dilated Cardiomyopathy. *J Nucl Med* 43: 531 - 535, 2002.
 - 11) Abe Y, Watanabe K, Sato S, Nagai Y, Kamal FA, Wahed MI, Wen J, Narasimman G, Ma M, Suresh P, Takahashi T, Tachikawa H, Kashimura T, Tanabe N, Kodama M, Aizawa Y, Yamaguchi K, Miyazaki M and Kakemi M: Hemodynamic effects of carvedilol infusion and the contribution of the sympathetic nervous system in rats with heart failure. *Pharmacology* 72: 213 - 219, 2004.
 - 12) Ohta Y, Watanabe K, Nakazawa M, Yamamoto T, Ma M, Fuse K, Ito M, Hirono S, Tanabe N, Hanawa H, Kato K, Kodama M and Aizawa Y: Carvedilol enhances atrial and brain natriuretic peptide mRNA expression and release in rat heart. *J Cardiovascul Pharmacol* 36: S19 - S23, 2000.
 - 13) Watanabe K, Juan W, Narasimman G, Ma M, Inoue M, Saito Y, Wahed M, Nakazawa M, Hasegawa G, Naito M, Tachikawa H, Tanabe N, Kodama M, Aizawa Y, Yamamoto T, Yamaguchi K and Takahashi T: Betaxolol Improves Survival Rate and Changes Natriuretic Peptide Expression in Rats with Heart Failure. *J Cardiovascul Pharmacol* 41: S99 - S103, 2003.
 - 14) Juan W, Nakazawa M, Watanabe K, Ma M, Wahed M, Hasegawa G, Naito M, Yamamoto T, Fuse K, Kato K, Kodama M and Aizawa Y: Quinapril inhibits progression of heart failure and fibrosis in rats with dilated cardiomyopathy after myocarditis. Quinapril inhibits progression of heart failure and fibrosis in rats with dilated cardiomyopathy after myocarditis. *Mol Cell Biochem* 251: 77 - 82, 2002.
 - 15) Watanabe K, Juan W, Narasimman G, Ma M, Inoue M, Saito Y, Wahed M, Nakazawa M, Hasegawa G, Naito M, Tachikawa H, Tanabe N, Kodama M, Aizawa Y, Yamamoto T, Yamaguchi K and Takahashi T: Comparative Effects of Angiotensin II Receptor Blockade (Candesartan) with ACE Inhibitor (Quinapril) in Rats with Dilated Cardiomyopathy. *J Cardiovascul Pharmacol* 41: S93 - S97, 2003.
 - 16) Shirai K, Watanabe K, Ma M, Wahed IM, Inoue M, Saito Y, Kashimura T, Tachikawa H, Kodama M and Aizawa Y: Effects of angiotensin - II receptor blocker candesartan cilexetil in rats with

- dilated cardiomyopath. *Mol Cell Biochem* 269: 137 - 142, 2005.
 - 17) Watanabe K, Ma M, Wen J, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y, Yamaguchi K and Takahashi T: Comparative effects of quinapril with enalapril in rats with heart failure. *Pharmacology* 71: 157 - 161, 2004.
 - 18) Wahed M, Watanabe K, Ma M, Yamaguchi K, Takahashi T, Tachikawa H, Kodama M and Aizawa Y: Effects of Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker on the Progression of Left Ventricular Dysfunction and Remodeling in Rats with Dilated Cardiomyopathy. *Pharmacology* 73: 81 - 88, 2004.
 - 19) Palaniyandi SS, Watanabe K, Ma M, Tachikawa H, Kodama M and Aizawa Y: Inhibition of mast cells by interleukin - 10 gene transfer contributes to protection against acute myocarditis in rats. *Eur J Immunol* 34: 3508 - 3515, 2004.
 - 20) Narasimman G, Watanabe K, Ma M, Zhang S, Muslin JA, Kodama M and Aizawa Y: Dominant negative 14-3-3 promotes cardiomyocyte apoptosis in early stage of type I diabetes mellitus through activation of JNK. *Biochem Bioph Res Co* 320: 733 - 740, 2004.
-