

# 肥大及び、不全心筋におけるバソプレッシン V1a 受容体の役割

高瀬 徹 岩永善高 諸岡花子 宮崎俊一

近畿大学医学部内科学教室 (循環器内科部門)

## 抄 録

目的：心不全患者では血中バソプレッシン濃度は高く、それは有害な作用を引き起こす可能性が考えられている。バソプレッシン V1a 受容体は心筋においては血管平滑筋、心筋細胞に多く発現し、血管収縮や陽性変力作用、細胞増殖を起こす。しかし心不全における V1a 受容体の長期間抑制の効果は、まだ明らかにされていない。このため、V1a 受容体欠損マウスを用いて心肥大、心不全に対する V1a 受容体の作用を検討した。

方法と結果：V1a 受容体欠損マウス群と野生型マウス群にアンギオテンシン II (2 ug/kg/min) を2週間持続投与した。アンギオテンシン II 注入後、血圧は両群で同様に上昇したが、V1a 受容体欠損マウスにおいては心筋線維化は有意に抑制され、心筋重量増加も軽度であった。線維化因子発現も V1a 受容体欠損マウス群で抑制されていた。しかし心肥大マーカーは2群間で差はなかった。更に V1a 受容体欠損マウスと野生型マウスに大動脈縮窄術 (TAC) を施行した。野生型群では TAC 後8週で心機能の低下と心不全所見を認めた。一方、V1a 受容体欠損マウス群では、TAC 後2週で心筋線維化が有意に抑制され、更に TAC 後8週では、心不全の発症が抑制され、心筋肥大マーカーの ANP と線維化因子は有意に抑制された。

結論：本研究により V1a 受容体は、アンギオテンシン II あるいは急性圧負荷による心筋線維化に関与しており、V1a 受容体を慢性的に抑制する事は心筋の線維化を抑制し心不全発症を予防する可能性が示唆された。

**Key words:** バソプレッシン, V1a 受容体, 心肥大, 心不全, 心筋線維化

## 緒 言

心筋リモデリング進行や心不全の発症にはさまざまな病態生理機構が関与している。心筋リモデリングは、基本的には心臓への血行動態負荷により引き起こされる。最初に起こる心筋肥大は血行動態変化に適応するものであり、更に心臓へ負荷が加わり続けられれば左室内腔は拡大し、収縮性も障害され心不全が引き起こされる<sup>1</sup>。そのプロセスにおいて神経体液性因子の異常は病態を悪化させ、神経体液性因子であるレニン-アンギオテンシン系や交感神経系を薬物で抑制する事は、心不全患者の治療法として広く確立されている<sup>2</sup>。特に重症の心不全患者では血清バソプレッシン濃度が高いことが報告されており<sup>3,4</sup>、心不全の病態生理の面からは、有害な作用を起こしている可能性が高い<sup>5</sup>。しかしながら、バソプレッシンを抑制する事が心筋肥大や心不全の治療として有

効であるかどうかは現在もよく分かっていない。バソプレッシンには V1a, V1b, V2 の3つの受容体がある。V1a 受容体は特に血管平滑筋や心筋細胞、線維芽細胞等に高発現しており、Gq/11 family の Gタンパクを活性化させ、inositol triphosphate pathway を介し細胞内 Ca を増加させる。その結果血管収縮や、陽性変力作用を引き起こす<sup>6,7</sup>。また、V1a 受容体の刺激は細胞分裂を促進し血管平滑筋、心筋細胞や線維芽細胞の増殖と肥大を促す<sup>8</sup>。V1a 受容体の持続的な刺激は、後負荷の上昇や細胞増殖、陽性変力作用を増加させる事により心筋リモデリングを促進し、心不全を引き起こす可能性がある。しかしながら、長期間にわたる V1a 受容体の抑制効果とそのメカニズムは未だ不明である。特に、心筋のどのタイプの細胞に大きな影響を与えるか不明である。このため、野生型 (WT) と同じ表現型を示す V1a 受容体欠損マウス (V1aRKO) を使用し、アンギオテ

ンシンII (Ang II) 持続投与もしくは、大動脈縮窄による急性圧負荷による心筋リモデリングと心不全の発症に対して、V1a受容体の抑制が有用か否かを検討し、その作用機序の分子メカニズムも検討した。

## 方 法

### 1. 実験動物

生後3-5カ月の雄のC57BL/6Jマウスと、雄のV1aRKOマウスを使用し実験を行った。V1aRKOマウスにおいては、翻訳開始コドンを含むV1a受容体遺伝子のエクソンが相同組み換えによって除去され、C57BL/6Jマウスと交配が行われた。それらのマウスはC57BL/6Jマウスと7世代にわたり戻し交配を行った<sup>9</sup>。

### 2. 研究デザイン

#### 実験1

生後12週のV1aRKOマウス (n=8) とWTマウス (n=8) の皮下に浸透圧ミニポンプ (model 2002, Alzet) を埋め込み、Ang II (2 ug/kg/min) を2週間持続注入した。Sham群には生理食塩水を持続注入した。2週間後に体重、血圧、脈拍を測定し、経胸壁心臓超音波検査で左心室の構造と収縮性を測定した<sup>10</sup>。そしてマウスを屠殺し、心臓を摘出し、心臓の各種 mRNA の発現を定量評価し、更に組織学的解析を施行した。

#### 実験2

生後12週のV1aRKOマウス (n=36) とWTマウス (n=35) に大動脈縮窄術 (Transverse Aortic Constriction: TAC) を施行した。TACによる急性圧負荷のため、WTマウスの左室はope後2週間かけて求心性肥大をきたし、更に8週間後に至ると左

室は拡大及び収縮不全を来し心不全を示す。体重測定と経胸壁心臓超音波検査をTAC施行後3日目、2週目、8週目において施行した。そしてマウスをTAC施行3日目 (n=18)、2週目 (n=24)、8週目 (n=29) に屠殺し、心臓を摘出し左室心筋の各種 mRNA 発現を定量評価し、更に組織学的解析を行った。

実験は1984年に採択されたアメリカ心臓協会の実験動物の規約と近畿大学医学部動物実験の規約に準じて施行した。

### 3. 大動脈縮窄術

大動脈縮窄術 (TAC) は、ケタミン/キシラジンで麻酔を行い、気管内挿管を行い人工呼吸器管理下で、左第2肋間胸骨上縁を開胸した。大動脈弓を腕頭動脈と左総頸動脈の間で、26ゲージの針を使い7-0シルク糸にて結紮した。Sham群は同様の手術を結紮以外行った。

### 4. 心臓超音波検査

2-2トリプロモエタノールで軽麻酔を行い、自発呼吸下にて12-MHzトランスデューサーのついたAplio<sup>®</sup> (Toshiba) にて心臓超音波検査を施行した。左心室乳頭筋レベルでM-mode法による解析を施行した。検者には実験動物のジェノタイプはブラインドにし、3つの異なった記録を得た。

### 5. 定量的PCR法

全てのRNAは50mgの心筋からTrizol<sup>®</sup>を使用し抽出され、DNase I<sup>®</sup> (Invitrogen) にて処理された。SuperScript III first-strand synthesis system キット<sup>®</sup> (Invitrogen) を使用しSingle-strand cDNAを合成した。そして、SYBR Green PCR Master Mix<sup>®</sup> (Applied Biosystems) を使用しABI

表1 定量的PCRに用いた各種プライマー

遺伝子型	フォワードプライマー	リバースプライマー
ANP	TTGACAGGATTGGAGCCAGA	AAGCTGCGTGACACACCACA
Collagen 1a1	AAACCCGAGGTATGCTTGATCTGTA	GTCCCTCGACTCCTACATCTTCTGA
Collagen 3a1	TGAATGGTGGTTTTTCAGTTCAG	GATCCCATCAGCTTCAGAGACT
CTGF	CTTCTGCAGACTGGAGAAGC	CAGCCAGAAAGCTCAAACCTG
Fibronectin	TAGGATTGGAGACACGTGGA	TGCGGTTGGTAAATAGCTGT
GAPDH	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	CAATCTCCACTTTGCCACTGC
MMP-2	CACCTCCTACAACAGCTGTAC	AGGAAAGTGAAGGGGAAGACA
MMP-9	TCAGAAGGTGGATCCCCAGA	TTCACCTCATGGTCCACCTTG
Periostin	GCCAGATGGAGAGTACACCTT	TTGCTCCAATGGTTTCCAGT
SERCA2a	GATGCACCTGGAAGACTCTG	GTGATCATGATGACCCGGAT
skACT	AATGAGCGTTTCCGTTGCC	TTCTGATGTCGATGTCGCA
$\beta$ MHC	CTACAGGCTGGGCTTACCT	TCTCCTTCTCAGACTTCCGC

ANP; 心房性ナトリウム利尿ペプチド, Collagen 1a1: コラーゲン1a1, Collagen 3a1: コラーゲン3a1, CTGF; 結合組織成長因子, Fibronectin: フィブロネクチン, GAPDH; グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ, MMP2; マトリックスメタロプロテアーゼ2, MMP9; マトリックスメタロプロテアーゼ9, Periostin: ペリオスチン; SERCA2a; 筋小胞体カルシウムATPアーゼ, skACT; 骨格筋アクチン,  $\beta$ MHC;  $\beta$ -ミオシン重鎖

PRISM 7900HT Sequence Detection System®にて定量的PCRを行った。1サイクル3ステップのPCRを35サイクル行った。

下記mRNAは、定量的PCR法にて測定した。それぞれのmRNAは内因性コントロール：GAPDH mRNAによって補正した。本研究で使用したオリゴヌクレオチドプライマーは以下の通りである。

ANP；心房性ナトリウム利尿ペプチド, Collagen 1a1：コラーゲン 1a1, Collagen 3a1：コラーゲン 3a1, CTGF；結合組織成長因子, Fibronectin：フィブロネクチン, GAPDH；グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ, MMP2；マトリックスメタロプロテアーゼ 2, MMP9；マトリックスメタロプロテアーゼ 9, Periostin；ペリオスチン, SERCA2a；筋小胞体カルシウム ATP アーゼ, skACT；骨格筋アクチン,  $\beta$ MHC； $\beta$ -ミオシン重鎖

また、心筋肥大マーカーとして ANP, skACT,  $\beta$ MHC を評価し、線維化因子として collagen 1a1, collagen 3a1, CTGF, Fibronectin, MMP2, MMP9 を評価した。

定量的PCRのサンプル数は以下の通りである。

実験1 WT群 (n=8), V1aRKO群 (n=8)

実験2 TAC施行後3日目：WT群 (n=5), V1aRKO群 (n=5) TAC施行後2週目：WT群 (n=8), V1aRKO群 (n=8) TAC施行後8週目：

WT群 (n=8), V1aRKO群 (n=9)

## 6. 組織学的分析

血液を採取した後に、心臓、肺、脛骨を摘出した。それぞれの臓器重量（長さ）を計測し、臓器重量と体重または脛骨の比を計算した。心臓は右室と左室に分離され、左室はホルマリン固定し、パラフィン包埋後に5 $\mu$ mで切片を作成した。心筋間質の線維化を評価するため、Masson's trichrome染色を行った。そしてそれを3人の検者が独立してImage Jソフトを使用し定量評価した。定量評価方法は、Masson's trichrome染色で青色に染色される部位を線維化領域と判断し、Image Jソフトで線維化領域を一定の数値化をし、左室全体からその割合を求めた。

## 7. 統計学的分析

全てのデータは平均値 $\pm$ SEMで表示した。群間の有意差は分散分析、更にFisher法によるpost-hoc解析を行い、有意差は $P < 0.05$ とした。統計ソフトはStat View-J 5.0を用いた。

## 結 果

### 実験1

#### 解剖所見

ベースラインでは、V1aRKO群はWT群に比べ、血圧、脈拍、体重に変化は認めなかった(表2)。また組織学的な異常所見も認めなかった(図1)。Ang IIを2週間投与した後は、両群間とも血圧は上昇し

表2 アンジオテンシンII 2週間投与後の血圧と脈拍、解剖所見

	Sham手術		アンジオテンシンII	
	WT	V1aRKO	WT	V1aRKO
体重 (g)	26.1 $\pm$ 1.5	26.3 $\pm$ 1.4	21.4 $\pm$ 0.9 <sup>#</sup>	22.3 $\pm$ 1.5 <sup>#</sup>
脈拍 (bpm)	646.0 $\pm$ 66	657.6 $\pm$ 58	633.0 $\pm$ 74 <sup>#</sup>	652.3 $\pm$ 69 <sup>#</sup>
収縮期血圧 (mmHg)	108.0 $\pm$ 5.8	107.6 $\pm$ 9.1	144.7 $\pm$ 9.2 <sup>#</sup>	152.8 $\pm$ 9.3 <sup>#</sup>
左室重量/脛骨長 (mg/mm)	5.5 $\pm$ 0.2	5.5 $\pm$ 0.1	7.4 $\pm$ 0.4 <sup>#</sup>	6.9 $\pm$ 0.3 <sup>#*</sup>
肺重量/脛骨長 (mg/mm)	11.1 $\pm$ 1.5	10.0 $\pm$ 0.8	10.7 $\pm$ 1.4	10.6 $\pm$ 1.3

データは平均値 $\pm$ SEで表示した。Sham手術は生理食塩水を浸透圧ポンプによって皮下に持続注入した。<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs WT-アンジオテンシンII群, <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs the 同項目のSham手術。

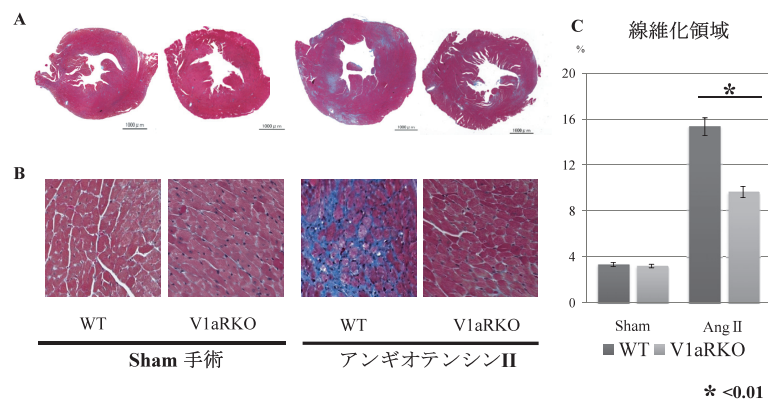


図1 アンジオテンシンII持続皮下投与2週後の組織学的検討 (A)摘出した左心室心筋をMasson's trichrome染色した。(B) Masson's trichrome染色した左心室心筋をSham手術とアンジオテンシンIIに分け40倍に拡大して評価した。(C)左心室心筋において間質の線維化領域を定量評価した。

\* <0.01

体重は減少したが WT 群と V1aRKO 群間に有意差は認めなかった。解剖後解析では、V1aRKO 群で左室重量/脛骨長比 (LVW/TL) が有意に低下していた (表 2)。

#### 心筋の組織学的解析

左室心筋の Masson's trichrome 染色による解析にて、Ang II 2 週間投与後では V1aRKO 群では心筋間質線維化が抑制されていた (図 1)。定量解析によるとその領域面積は WT 群 9.5% が V1aRKO 群 2.7% に有意に抑制されていた。V1aR を抑制 (遮断) する事で、Ang II 投与により誘発される心筋線維化が有意に抑制されることが明らかになった。

左室心筋 mRNA 発現の解析 (図 2)

両群間において、ベースラインの各種 mRNA 発現に有意な差は認めなかった。Ang II 投与 2 週間後では心筋肥大マーカーの ANP, skACT,  $\beta$ MHC に有意な差は認めなかった。対照的に、線維化因子である collagens, CTGF, Periostin は V1aRKO 群で増加が有意に抑制された。MMP 発現は両群間に差はなかった。

#### 実験 2

##### 解剖所見

TAC を施行した後、両群間で体重変化は認めなかった。TAC 施行後、2 週目、8 週目ともに、LVW/TL 比は有意に V1aRKO 群で低かった。また、8 週目の肺重量/脛骨長 (Lung/TL) 比は有意に

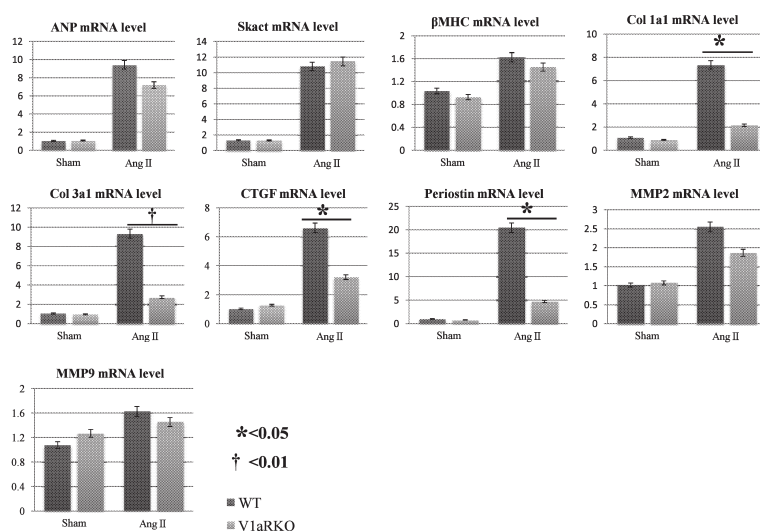


図 2 アンジオテンシン II 2 週間持続皮下投与後の左室心筋における mRNA 定量評価  
ANP: 心房性ナトリウム利尿ペプチド, Collagen 1a1: コラーゲン 1a1, Collagen 3a1: コラーゲン 3a1, CTGF: 結合組織成長因子, GAPDH: グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ, MMP2: マトリックスメタロプロテアーゼ 2, MMP9: マトリックスメタロプロテアーゼ 9, Periostin: ペリオスチン, skACT: 骨格筋アクチン,  $\beta$ MHC:  $\beta$ -ミオシン重鎖 mRNA は WT-Sham の値を 1.0 に設定し、残りの値がそれに応じて調節された値として表した。実験データは平均値  $\pm$  標準偏差で表した。

表 3 大動脈縮窄術後の解剖所見

	Sham 手術		大動脈縮窄術	
	WT	V1aRKO	WT	V1aRKO
体重 (g)	24.7 $\pm$ 0.7	24.9 $\pm$ 0.7	24.1 $\pm$ 0.5	25.1 $\pm$ 0.5
3 日 左室重量/脛骨長 (mg/mm)	5.2 $\pm$ 0.1	5.2 $\pm$ 0.1	5.8 $\pm$ 0.2 <sup>#</sup>	6.1 $\pm$ 0.2 <sup>#</sup>
肺重量/脛骨長 (mg/mm)	10.5 $\pm$ 0.6	9.8 $\pm$ 0.6	9.3 $\pm$ 0.3	10.1 $\pm$ 0.4
体重 (g)	26.4 $\pm$ 0.2	26.0 $\pm$ 0.1	27.7 $\pm$ 0.6	25.9 $\pm$ 0.5
2 週 左室重量/脛骨長 (mg/mm)	5.5 $\pm$ 0.1	5.8 $\pm$ 0.2	8.3 $\pm$ 0.3 <sup>#</sup>	7.2 $\pm$ 0.1 <sup>†</sup>
肺重量/脛骨長 (mg/mm)	10.9 $\pm$ 0.2	10.4 $\pm$ 0.4	10.9 $\pm$ 0.3	10.2 $\pm$ 0.1
体重 (g)	29.7 $\pm$ 0.4	29.2 $\pm$ 0.5	29.7 $\pm$ 0.3	29.1 $\pm$ 0.4
8 週 左室重量/脛骨長 (mg/mm)	5.7 $\pm$ 0.1	5.7 $\pm$ 0.1	9.5 $\pm$ 0.3 <sup>#</sup>	8.6 $\pm$ 0.24 <sup>#*</sup>
肺重量/脛骨長 (mg/mm)	10.9 $\pm$ 0.3	10.7 $\pm$ 0.4	14.4 $\pm$ 0.7 <sup>#</sup>	11.1 $\pm$ 0.4 <sup>†</sup>

データは平均値  $\pm$  SE で表示した。Sham 手術は大動脈縮窄以外の手術を行った。

\*P < 0.05 vs WT-大動脈縮窄術群, †P < 0.01 vs WT-大動脈縮窄術群, #P < 0.01 vs 同項目の Sham 手術

V1aRKO 群で低かった。V1aRKO 群ではどの時期でも左室肥大は抑制され、8 週目では肺うっ血が抑制されていた (表 3)。

経時的な心臓超音波検査

TAC 施行後、2 週目では、両群間で相対的左室壁厚 (RWT) と左室後壁厚 (PWT) の増加を認め、求心性左心肥大が生じている事がわかった。しかし左室内径短縮率 (FS)、左室拡張末期径 (LVDd) からは左室収縮機能は保たれていた。TAC 施行後、8 週目では、WT 群で FS の低下と左室内径の拡大をみとめ、V1aRKO 群ではそれは保持されていた。(FS; 2週47.2±1.7%-8週29.3±1.7%, LVDd; 2週3.4±0.1 mm-8週4.2±0.1 mm P<0.01) (図

3)。

左室心筋の組織学的解析

TAC 施行後、2 週目、8 週目共に、WT 群の心筋組織に心筋の線維化亢進が観察され、V1aRKO 群ではそれは有意に抑制されていた (図 4 A-D)。定量的な解析では線維化領域面積は、WT 群8.4%で V1aRKO 群3.1%であった (P<0.01)。

左室心筋の mRNA 発現の経時変化

ANP は、両群間で TAC 施行後 3 日目と 2 週目に有意な差はなかった。しかし 8 週目では V1aRKO 群で有意に ANP は低下しており、心不全の発症が抑制されている事が示唆された。TAC 施行後、3 日後では、V1aRKO 群ですでに線維化因子の CTGF、

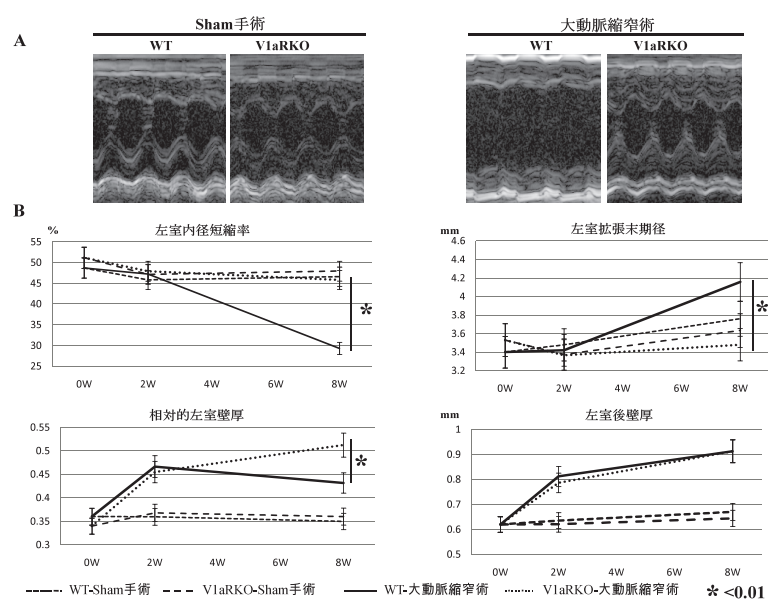


図 3 大動脈縮窄術後の経時的な心臓超音波検査の経過 (A)各群における大動脈縮窄術 8 週間後の心臓超音波検査の M-mode 所見の代表例 (B)大動脈縮窄術後の心臓超音波検査所見の経時変化

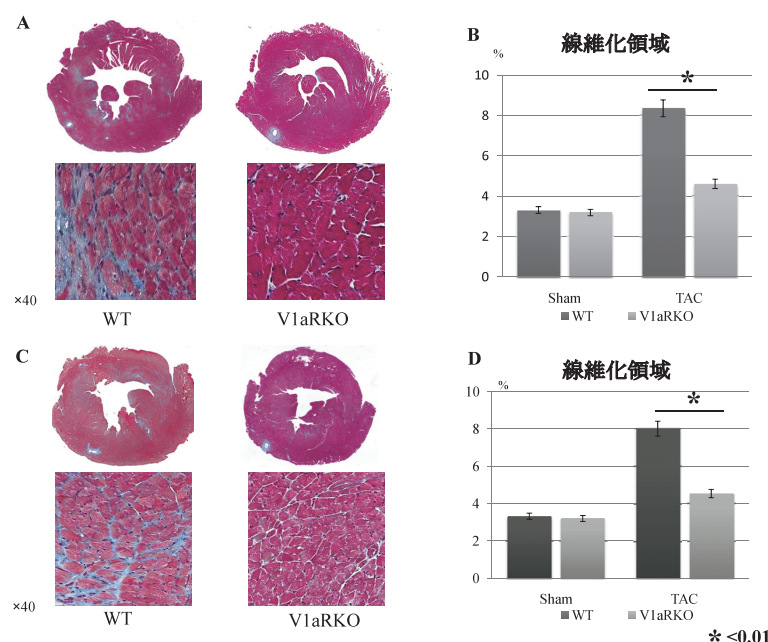


図 4 大動脈縮窄術施行 2 週間後と 8 週間後における心筋組織学的検討 (A) TAC 2 週間後の左室心筋の Masson's trichrome 染色 (B) TAC 2 週間後の線維化領域の定量評価 (C) TAC 8 週間後の左室心筋の Masson's trichrome 染色 (D) TAC 8 週間後の線維化領域の定量評価

collagens, fibronectin, periostin の発現亢進は抑制されていた。それらは2週目では有意な差はなかったが、8週目では再び抑制されていた。観察期間を通して MMP 発現には有意な差はなかった。一方、

心筋肥大マーカーは、skACT のみ 2 週目に V1aRKO 群で有意に抑制されたが、8週目では  $\beta$ MHC や skACT に有意な差は認めなかった (図 5)。

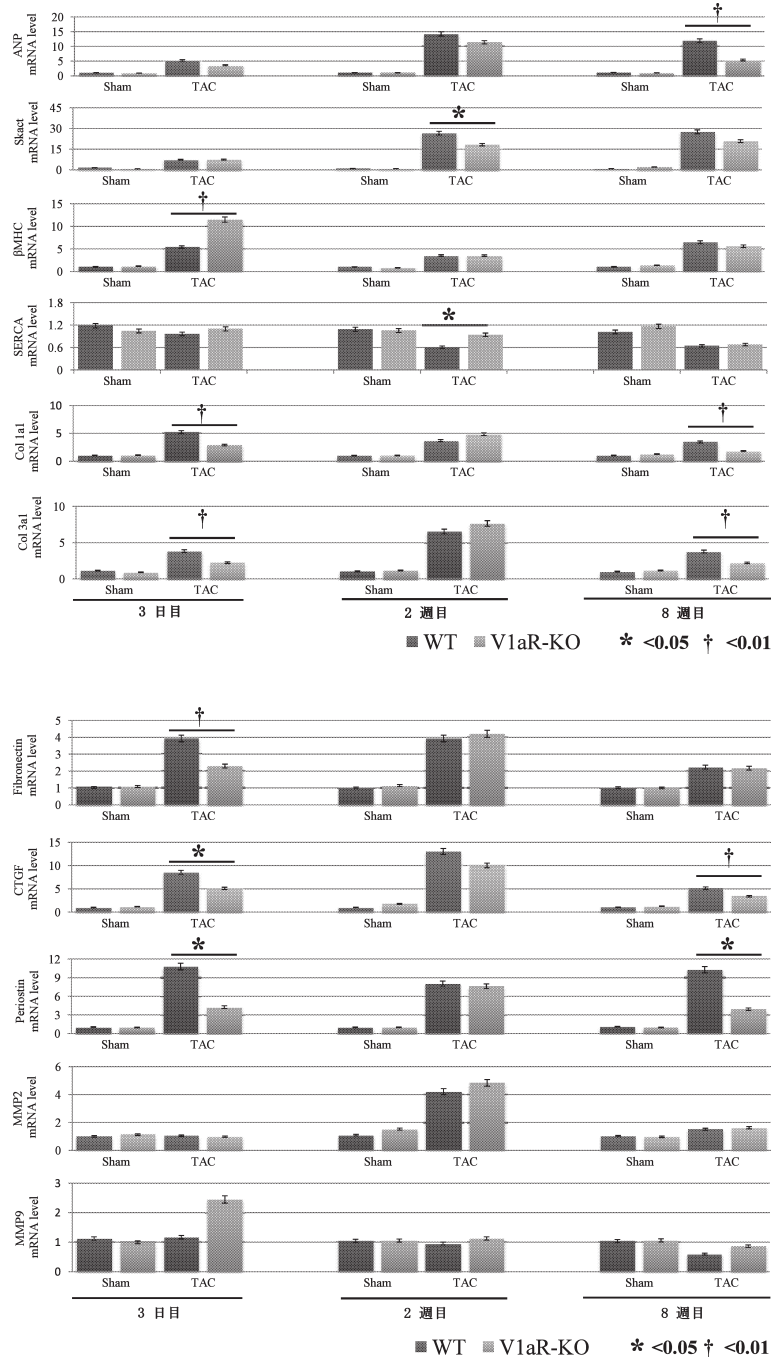


図 5 大動脈狭窄術後の左室心筋における経時的 mRNA 発現変化の定量評価。  
 ANP：心房性ナトリウム利尿ペプチド，Collagen 1a1：コラーゲン 1a1，Collagen 3a1：コラーゲン 3a1，CTGF：結合組織成長因子，Fibronectin：フィブロネクチン，GAPDH：グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ，MMP2：マトリックスメタロプロテアーゼ 2，MMP9：マトリックスメタロプロテアーゼ 9，Periostin：ペリオスチン，SERCA2a：筋小胞体カルシウム ATP アーゼ，skACT：骨格筋アクチン， $\beta$ MHC： $\beta$ -ミオシン重鎖  
 mRNA は WT-Sham の値を 1.0 に設定し、残りの値がそれに応じて調節された値として表した。実験データは平均値  $\pm$  標準偏差で表した。

## 考 察

V1aRKO マウスはベースラインの状態では WT マウスと比較して血圧、脈拍、体重、また心機能、組織所見に有意な差はなかった。Ang II 持続投与の 2 週間後では、V1aRKO 群は WT 群と同程度の血圧上昇にもかかわらず、心肥大と心筋線維化が有意に抑制され、心筋線維化因子である mRNA (CTGF, periostin 等) は有意に抑制されていた。一方で心筋肥大マーカー (ANP,  $\beta$ MHC, skACT) の発現は抑制されていなかった。TAC 施行後 2 週目にて、V1aRKO 群では心筋線維化は WT 群と比較し有意に抑制されていた。これは TAC 施行後、3 日目で左室心筋における collagen と線維化因子 (CTGF, periostin 等) の mRNA 発現が V1aRKO 群で抑制されていた事と関連していた。結果として、V1aRKO 群で 8 週目における心筋リモデリングの進行と心不全の発症は抑制されていた。これらの結果は、V1aR は肥大及び不全心筋において心筋線維化を促進する重要な因子である事が示唆された。

### V1aR と心筋線維化

多くの研究により心筋線維芽細胞の増殖や線維組織の増加は血行動態の影響より、内因性ホルモンによる影響が大きいと報告されている<sup>11,12</sup>。本研究では、V1aRKO マウスでは心負荷後の心筋線維化が有意に抑制された。Yang らは、バソプレッシンは心筋線維芽細胞の [<sup>3</sup>H] thymidine 取り込みを増加させ、細胞周期の S 期の細胞を増加させると報告している<sup>13</sup>。また、バソプレッシンは心筋線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進するとも報告されている<sup>14</sup>。Ang II を投与した後の V1aRKO マウスでは、有意に collagen と線維化因子 (CTGF, periostin) の mRNA 発現が抑制され、心筋線維化が抑制された。このことは、少なくともバソプレッシン-V1aR を薬理的に抑制・遮断する事で、Ang II による心筋線維化を抑制する可能性や、V1aR を長期間にわたり刺激する事は、最終的に心不全を引き起こすような心筋線維化を促進する可能性が示唆された。

### V1aR と心筋肥大

心筋肥大は、血行動態とさまざまな神経体液性因子の負荷によって発生し、それは心臓リモデリングと心不全を起こすような心筋線維化と密接に関係している<sup>15</sup>。V1aR は血管収縮作用や陽性変力作用のような急性作用のみではなく、細胞増殖や心筋肥大のような慢性的作用も持っている。Nakamura らは、バソプレッシンをラットの培養心筋細胞に投与し V1aR を介して心筋肥大が起こる事を示した<sup>16</sup>。Hiroyama らは、マウス生体内で同様の結果を示し、

WT 群を TAC した後に増加した心筋重量/脛骨長比が V1aRKO マウスでは抑制される事を示した<sup>7</sup>。最近、Li らは、心筋細胞に V1aR を特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成し、生体内心筋細胞の V1aR の持続的な刺激は心筋肥大と心不全を発症させる事を明らかにした<sup>17</sup>。これらの研究は、心不全を引き起こす機序としての心筋細胞での V1aR の役割を示したが、心筋内での血管平滑筋、心筋細胞、線維芽細胞などのさまざまな細胞との V1aR の相互関係はまだよく知られていない。本研究では、Ang II を持続投与した実験と TAC を施行した実験で、V1aRKO 群では WT 群より LVW/TL は有意に抑制されていたが、心筋肥大マーカー (ANP,  $\beta$ MHC, skACT) 上昇は有意には抑制されなかった。このことは心筋細胞への直接作用は、心筋の線維化への影響と比較し、わずかな変化であったと考えられ、V1aR の抑制による総合的効果は心筋線維化の抑制により、心不全の発症が抑制される事であると考えられた。

### V1aR の心臓外作用

心臓以外においては、V1aR は主に脳、動脈、副腎髄質、そして腎臓に分布している。V1aRKO マウスでは循環血漿量は有意に減少しており、それは圧反射機構の中枢では V1aR が欠如しており、圧受容体反射が抑制されているためである事を報告した<sup>9</sup>。塩分負荷を WT マウスに行うと、側脳室から分泌されたバソプレッシンは昇圧と頻脈を引き起こしたが、この変化は V1aRKO マウスでは認められなかった<sup>10</sup>。一方で、本研究では、ベースラインでは WT 群と V1aRKO 群の間に血圧、脈拍、ANP の発現に有意な差は認めなかった。また、Ang II を投与した後に TAC を施行した後で、両群間に血圧、脈拍の変化の差は認めなかった。その違いは使用したマウスのバックグラウンドの影響が考えられ、Koshimizu や Aoyagi らの実験では、129sv と C57B/6J の混合の遺伝子背景をもつマウスを使用していたが<sup>9,10</sup>、今回の実験は C57BL/6J マウスと 7 回戻し交配をしたマウスを使用した。しかしながら、圧受容体反射の欠如による脈拍変化の欠乏・低下が、心不全発症の悪化因子として作用している可能性もあり、この点において更なる検討が必要と考えられる。

### V1aR と心不全治療

人間でも低心拍出性あるいは高心拍出性の心不全では慢性的にバソプレッシンの血中濃度が高い事が認められている<sup>18,19</sup>。それゆえ、心不全モデル動物を用いて、V1aR 拮抗薬による急性及び慢性の投与実験が試みられている。急性の治療効果として、V1aR 拮抗薬は血管拡張を促し、局所の血流を改善させ心

拍出量を向上させた<sup>20</sup>。しかし、V1aR拮抗薬の慢性効果は、心筋梗塞後の心不全モデルを使用した実験で、心筋リモデリングや心機能に対して有効性を証明できなかった<sup>21</sup>。なぜ本研究では相反する結果となったかは不明であるが、薬理的な抑制を行う実験では、薬剤投与量、受容体に対する選択性、薬剤の組織浸透性、投薬開始時期などさまざまな問題が存在する。一方でノックアウトモデルを用いた実験では、ノックアウトした遺伝子に対する代償機構が惹起される可能性があり、実験結果に影響を与えるかもしれない。

EVEREST試験では、経口バソプレシンV2受容体拮抗薬のトルバプタンが、持続した体重減少効果と血清ナトリウム値の保持をもたらす事が示された<sup>22,23</sup>。しかしながら、生命予後と心不全による再入院率を改善させる効果は認められなかった。一つの可能性として、V2受容体のみを抑制する事でV1a受容体の相対的な活性化が生じ、そのことが慢性的には有害に作用した可能性が示唆されている<sup>24</sup>。V1aRとV2Rの拮抗薬を併用して使用する事でV2受容体拮抗薬を単独で使用するより、さらに強力な抗心不全効果を得られるかもしれない<sup>25</sup>。本研究結果から、心不全患者にとって、V1aR拮抗薬はV2R拮抗薬投与の際の有効な補助手段となる可能性が示唆された。

## 結 語

本研究により、生体内心筋においてV1a受容体は、アンジオテンシンIIあるいは急性圧負荷による心筋線維化に関与しており、V1a受容体を慢性的に抑制する事は心筋線維化を抑制し心不全発症を阻止する可能性が示唆された。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に御協力、御指導をいただきました近畿大学医学部内科学教室循環器内科部門の各先生方、同教室の村田敦子実験助手、近畿大学医学部ライフサイエンス研究科・赤星保光先生、京都大学大学院医学研究科循環器内科・田巻庸道先生、尾野亘先生、大塚製薬・藤木浩之先生、自治医科大学医学部薬理学講座分子薬理学部門・興水嵩鏡先生、京都大学大学院薬学研究所・辻本豪三先生の皆様に深甚な謝意を捧げます。

本研究の要旨は平成22年の米国心臓協会学術集会にて発表を行った。

## 文 献

1. Konstam MA, Kramer DG, Patel AR, Maron MS, Udelson JE (2011) Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment. *JACC Cardiovasc Imaging* 4: 98-108

2. Schrier RW, Abraham WT (1999) Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med* 341: 577-585
3. Goldsmith SR, Francis GS, Cowley AW Jr, Levine TB, Cohn JN (1983) Increased plasma arginine vasopressin levels in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1: 1385-1390
4. Francis GS, Benedict C, Johnstone DE, Kiriln PC, Nicklas J, Liang CS, Kubo SH, Rudin-Toretzky E, Yusuf S (1990) Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation* 82: 1724-1729
5. Goldsmith SR (2006) The role of vasopressin in congestive heart failure. *Cleve Clin J Med* 73 (Suppl 3): S19-23
6. Serradeil-Le Gal C, Herbert JM, Delisee C, Schaeffer P, Raufaste D, Garcia C, Dol F, Marty E, Maffrand JP, Le Fur G (1995) Effect of SR-49059, a vasopressin V1a antagonist, on human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 268: H404-410
7. Hiroyama M, Wang S, Aoyagi T, Oikawa R, Sanbe A, Takeo S, Tanoue A (2007) Vasopressin promotes cardiomyocyte hypertrophy via the vasopressin V1A receptor in neonatal mice. *Eur J Pharmacol* 559: 89-97
8. Yan-ping H, Lian-you Z, Qiang-sun Z, Shao-wei L, Xiao-yan Z, Xiao-long L, Xiao-lin N, Xia L (2008) Mitogenic effect of arginine vasopressin on adult rat cardiac fibroblast: involvement of PKC-erk1/2 pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 52: 72-81
9. Koshimizu TA, Nasa Y, Tanoue A, Oikawa R, Kawahara Y, Kiyono Y, Adachi T, Tanaka T, Kuwaki T, Mori T, Takeo S, Okamura H, Tsujimoto G (2006) V1a vasopressin receptors maintain normal blood pressure by regulating circulating blood volume and baroreflex sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7807-7812
10. Aoyagi T, Koshimizu TA, Tanoue A (2009) Vasopressin regulation of blood pressure and volume: findings from V1a receptor-deficient mice. *Kidney Int* 76: 1035-1039
11. Weber KT, Brilla CG (1991) Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 83: 1849-1865
12. Chapman D, Weber KT, Eghabali M (1990) Regulation of fibrillar collagen type I, III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ Res* 67: 784-789
13. Xue-Dong Yang, Lian-You Zhao, Qiang-Sun Zheng, and Xue Li (2003) Effects of Arginine Vasopressin on Growth of Rat Cardiac Fibroblasts: Role of V1 Receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 42: 132-135
14. Yan-Hong F, Hui D, Qing P, Lei S, Hai-Chang W, Wei Z, Yan-Jie C (2010) Effects of arginine vasopressin on differentiation of cardiac fibroblasts into myofibro-



- lasts. *J Cardiovasc Pharmacol* 55 : 489-495
15. Morgan HE, Baker KM (1991) Cardiac hypertrophy, mechanical, neural, and endocrine dependence. *Circulation* 83 : 13-25
16. Nakamura Y, Haneda T, Osaki J, Miyata S, Kikuchi K (2000) Hypertrophic growth of cultured neonatal rat heart cells mediated by vasopressin V(1A) receptor. *Eur J Pharmacol* 391 : 39-48
17. Li X, Chan TO, Myers V, Chowdhury I, Zhang XQ, Song J, Zhang J, Andrej J, Funakoshi H, Robbins J, Koch WJ, Hyslop T, Cheung JY, Feldman AM (2011) Controlled and Cardiac-Restricted Overexpression of the Arginine Vasopressin V1A Receptor Causes Reversible Left Ventricular Dysfunction Through G $\alpha$ q-Mediated Cell Signaling. *Circulation* 124 : 572-581
18. Szatalowicz VL, Arnold PE, Chaimovitz C, Bichet D, Berl T, Schrier RW (1981) Radioimmunoassay of plasma arginine vasopressin in hyponatremic patients with congestive heart failure. *N Engl J Med* 305 : 263-266
19. Xu DL, Martin PY, Ohara M, St John J, Pattison T, Meng X, Morris K, Kim JK, Schrier RW (1997) Upregulation of aquaporin-2 water channel expression in chronic heart failure rat. *J Clin Invest* 99 : 1500-1505
20. Ullman J, Eriksson S, Rundgren M (2001) Effects of losartan, prazosin and a vasopressin V1-receptor antagonist on renal and femoral blood flow in conscious sheep. *Acta Physiol Scand* 171 : 99-104
21. Nishikimi T, Kawano Y, Saito Y, Matsuoka H (1996) Effect of long-term treatment with selective vasopressin V1 and V2 receptor antagonist on the development of heart failure in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 27 : 275-282
22. Konstam MA, Gheorghiade M, Burnett JC Jr, Grinfeld L, Maggioni AP, Swedberg K, Udelson JE, Zannad F, Cook T, Ouyang J, Zimmer C, Orlandi C (2007) Effects of oral tolvaptan in patients hospitalized for worsening heart failure: the EVEREST Outcome Trial. *JAMA* 297 : 1319-1331
23. Gheorghiade M, Konstam MA, Burnett JC Jr, Grinfeld L, Maggioni AP, Swedberg K, Udelson JE, Zannad F, Cook T, Ouyang J, Zimmer C, Orlandi C (2007) Short-term clinical effects of tolvaptan, an oral vasopressin antagonist, in patients hospitalized for heart failure. *JAMA* 297 : 1332-1343
24. Konstam MA, Udelson JE (2011) Hyponatraemia and vasopressin in heart failure: markers or mediators?. *Eur J Heart Failure* 13 : 242-244
25. Mondritzki T, Kolkhof P, Sabbah HN, Gheorghiade M, Fürstner C, Schmeck C, Siedentop H, Schaefer S, Truebel H (2011) Differentiation of Arginine Vasopressin Antagonistic Effects by Selective V2 versus Dual V2/V1a Receptor Blockade in a Preclinical Heart Failure Model. *Am J Ther* (in press)