

# ダール食塩感受性ラット高血圧性心不全モデルを用いた 経口バソプレッシン V2 受容体拮抗薬 tolvaptan の 心筋保護効果

諸岡花子 岩永善高 高瀬 徹 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：心不全における利尿薬の投与は神経体液性因子の活性化，電解質異常，腎機能障害等を引き起こす問題がある。バソプレッシン V2 受容体のブロックにより，腎臓の集合管において自由水の排出が増加する。近年，臨床試験において経口バソプレッシン V2 受容体拮抗薬である tolvaptan の有効性が示されているが，高食塩食を摂取している患者に対する長期的な作用や有効性については明らかにされていない。そのため，ダール食塩感受性ラット心不全モデルを用いて tolvaptan 投与の長期的な効果を検討した。

方法：ダールラットに6週齢より8%高食塩食を投与し11週齢 (左室肥大期) になった時点で，tolvaptan を投与し (低用量群および高用量群)，その効果を偽薬群 (コントロール群) と比較した。

結果：tolvaptan 治療により持続的に尿量が増加し，尿浸透圧が減少した。また，血圧には影響を与えなかった。tolvaptan の高用量群では生存率が有意に改善され，心不全期において左室機能不全の進行と肺うっ血が抑制されていた。左室心筋においてはバソプレッシン，心房性ナトリウム利尿ペプチド，エンドセリン-1 および V1a 受容体などの mRNA 発現亢進が tolvaptan 高用量群で有意に抑制されていた。組織学的には tolvaptan 高用量群で線維化が抑制される傾向にあったが有意ではなかった。

結論：高食塩負荷高血圧モデル動物において，tolvaptan の長期投与は心筋局所における神経体液性因子の活性化を抑制し，左室機能不全の進展及び心不全の発症を抑制する可能性があると考えられた。

**Key words :** 心不全，バソプレッシン V2 受容体拮抗薬，神経体液性因子

## 緒 言

神経体液性因子の過剰な活性化は，心筋リモデリングを引き起こしさらには心不全に至る心血管病の連鎖に関与しており，心不全の進展を抑制するためには，レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (RAAS) や交感神経系 (SNS) といった神経体液性因子を不活化することが重要である<sup>1,2</sup>。一方，心不全患者では，バソプレッシン濃度が著明に上昇することが観察され，重要な臨床所見とされている<sup>3,4</sup>。そして，バソプレッシンは血管を収縮させることで後負荷を増大させ，また一方で体液貯留を生むことで循環血液量の増加や低ナトリウム血症を来し，左室肥大やリモデリングを引き起こすという意味において，心不全の病態形成，進展過程における悪化要

因であると推察されている<sup>5</sup>。しかしながら，心筋リモデリングや心不全に対するバソプレッシン系抑制の長期有効性は明らかにされていない。

バソプレッシン受容体の中で V1a, V1b, V2 受容体の3つのサブタイプが知られている。V2 受容体は腎臓の集合管に豊富に発現しておりアデニル酸シクラーゼ活性を上昇させる<sup>6</sup>。この受容体の活性化は，水チャネルファミリーの一員であるアクアポリン2 (AQP2) の増加を導き，集合管での水の透過性を高める。近年，V2 受容体拮抗薬は心不全患者において，自由水の排出と血清ナトリウム濃度を上昇させることが証明された<sup>7</sup>。経口バソプレッシン V2 受容体拮抗薬である tolvaptan は，大規模試験 (EVEREST 試験) において急性期の体重減少と血清ナトリウム濃度の改善効果を示した<sup>8,9</sup>。しかしな

がら、この試験では死亡率や再入院率といったアウトカムの改善が不明であり、また、V2 受容体を遮断したことによる長期的な有効性が発揮されるような対象が絞り込まれていなかった可能性が示唆された<sup>10</sup>。そのため、V2 受容体の活性や抑制に関連した心不全の病態生理学的機序に対する、さらなる研究が必要とされた。また、バソプレッシンは心不全増悪時に V2 受容体を介して体液貯留を助長し、低ナトリウム血症を引き起こすことが示唆されているが、心不全における心血管系および腎臓の機能不全にどのように関与しているかどうか、特に長期的な効果という点においてはほとんど解明されていない<sup>11</sup>。そのため、今回我々は食塩感受性高血圧ラットにおける心不全モデルを用いて tolvaptan の長期投与効果を検討するとともに、心筋に対する直接的影響も評価した。さらに、この高血圧性心不全における長期 V2 受容体遮断の分子機構を検討した。

## 方 法

モデル動物と実験プロトコル (図 1)

ダール高食塩感受性ラット (Dahl-S ラット) の雄を用いて、6 週齢になった時点で 8% 高食塩食の投与を開始した。左室肥大期 (11 週齢) より、tolvaptan 投与群 (n=41) と偽薬投与群 (Cont 群) (n=22) にわけ 22 週まで治療を行った。tolvaptan 群は、さらに低用量群 (LD 群)：一日 0.01% tolvaptan 混餌投与 (n=20)、高用量群 (HD 群)：一日 0.05% tolvaptan 混餌投与 (n=20) の二群に分けた<sup>19</sup>。また、実験期間中 0.3% 低食塩食を投与していた群は、高血圧も左室肥大も発症しなかったがこれを低食塩食群 (LS 群) (n=6) とした。

第一シリーズ (n=31) では、心不全による死亡の

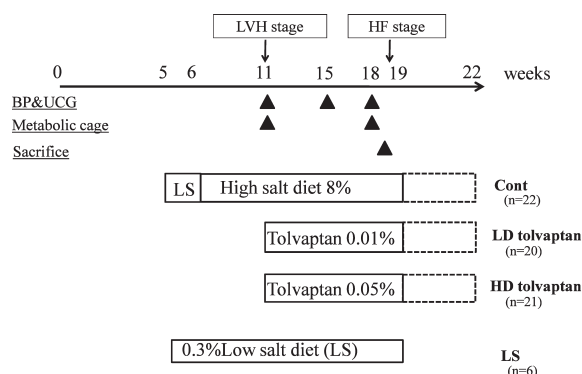


図 1 実験プロトコル

LVH stage, 左室肥大期; HF stage, 心不全期。Cont 群, 8% 高食塩食+偽薬; LD 群, 8% 高食塩食+0.01% tolvaptan; HD 群, 8% 高食塩食+0.05% tolvaptan; LS 群, 0.3% 低食塩食。

観察を行い 14 週齢以降の生存率を分析した。

第二シリーズ (n=32) では、経時的に血圧、心拍数測定、および心臓超音波検査を行うと同時に代謝ケージを用いて尿解析を行った。18-19 週齢時に断頭による採血を行い、その後開胸し心臓を摘出した。動物実験の施行

今回の実験については、1984 年 11 月に承認された the “Position of the American Heart Association on Research Animal Use” に準じて行い、近畿大学医学部動物実験委員会の承認を得て行った。

血圧、心拍数と心臓超音波検査の方法

左室形態と収縮力の測定は、すでに記述されている<sup>12</sup> ような方法で 11, 15, 18 週齢に超音波断層装置を使用し施行された。左心室内腔短軸像で左心室内腔径 (収縮期: LVDs, 拡張期: LVDd) を測定した。左室短縮率 (% FS) は以下の計算式を用いて計算された;  $(LVDd - LVDs) / LVDd \times 100 (\%)$ 。

また、同時期に、tail cuff 法を用いて心拍数と収縮期血圧を測定した。

血液および尿サンプルの測定方法

11 週齢と 18 週齢期に、実験モデルを個別に代謝ケージに入れ 24 時間蓄尿を採取し、尿量および体重を測定した。採取した尿を用いて以下のパラメーターを測定した; 浸透圧, ナトリウム, カリウム, 尿素窒素, クレアチニン, 蛋白, アルブミン排泄量。

18 週齢期に、断頭採血を行い回収した血液サンプルは 10 分間、4°C、3000 rpm で遠心分離し、上清を分離し以下のパラメーターを市販キットを用いて測定した; 血清浸透圧, ナトリウム, カリウム, 尿素窒素, クレアチニン, バソプレッシン, アルドステロン, レニン活性, 脳性ナトリウム利尿ペプチド。組織学的検討

血液サンプルを回収した後、開胸し心臓と肺を摘出した。臓器の重量を測定した後、摘出した心臓を左室と右室に分離しホルマリン固定した。そしてパラフィン包埋し厚さ 5 μm の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色、およびマッソントリクローム染色を行った。心筋の線維化を、Image J ソフトウェアを用いて、3 人の観測者が独立して測定し定量化した。

定量的 RT-PCR 法による mRNA 発現解析

全ての RNA は 50 mg の左室心筋からトリゾル® を使用し抽出され、DNase I (Invitrogen) にて処理された。SuperScript first-strand synthesis system kit (Invitrogen) を使用し一本鎖 cDNA を合成した。そして、SYBR Green PCR Master Mix (ABI) を使用し ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System を用いて PCR を行った。1 サイ

クル3ステップのPCRは35サイクル行った。なお、測定されたmRNAは以下の項目である：バソプレッシン、V1a受容体、V1b受容体、V2受容体、心房性ナトリウム利尿ペプチド、アンジオテンシン変換酵素、エンドセリン-1、コラーゲン1a1、フィブロネクチン、マトリックスメタロプロテイナーゼ-2。RNAサンプルは各々内因性コントロール、GAPDHによって標準化された(表1)。

計算と統計

tolvaptanによる治療効果を明確にするために、自由水クリアランス(E-CH<sub>2</sub>O)と電解質クリアランス(E-C<sub>osm</sub>)を測定した。計算式は以下に示すとおりである。

$$E-CH_2O = UV - E-C_{osm}$$

$$E-C_{osm} = (U_{Na} + U_K) UV / P_{Na}$$

UV：尿量, U<sub>Na</sub>：尿中ナトリウム排泄量, U<sub>K</sub>：尿中カリウム排泄量, P<sub>Na</sub>：血清ナトリウム濃度

データは全て平均値±標準偏差で表し、統計解析はOne-way analysis of varianceを用いたあとFisherのPLSD検定を行った。生存率はKaplan-Meier法を用いて分析され、log-rank検定を用いて群間比較を行った。すべて統計上p<0.05をもって有意差ありとした。

結 果

左室肥大から心不全へ移行する過程におけるバソプレッシン系(図2)

Dahl-Sラットでは、左室肥大期に血中脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)濃度が上昇するが、心不全期に移行するにつれてさらに上昇を示した。血清ナトリウム濃度に有意な変化は認めなかったが、血清浸透圧やバソプレッシンは心不全期に移行するにつれて明らかに上昇した。腎臓においては、心不全期において初めてV1a受容体、V2受容体の

表1 各種プライマー

遺伝子	フォワードプライマー	リバースプライマー
ACE	AAAGCTGCGAAGGATCATCG	TTGCCGGTGGAGTAGATTCTG
ANP	GATCTGCCCTCTTGAAAAGCA	TGGCTGTTATCTTCGGTACCG
AVP	CTCGCCATGATGCTCAACACT	TGTCTCAGCTCCATGTCGGAT
Colla1	ACGCATGGCCAAGAAGACATC	TTTGCATAGCACGCCATCG
ET-1	CTTCTGCCACCTGGACATCAT	TCCCTTGGTCTGTGGTCTTTG
FN	GAAGAACGAGGAGGATGTGG	GGGAGTCCAGACCTGTTTTC
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGACTGTGCCGTTGAACTTGC
MMP2	CGTCGCCATCATCAAGTT	CCTTCAGCACAAAGAGGTTGC
V1aR	GGCCTTTCTTCATTGTCCA	GTTGCAGCAGCTGTTCAAGGA
V1bR	GGCACCTTTCTTCAGTGTCCA	TGAAGCCCATGTACATCCAGG
V2R	ATGCTCCTGGTGTCTACCGTGT	AGCACTAGGCCATTGCTCAAGG

ACE, アンジオテンシン変換酵素; ANP, 心房性 Na 利尿ペプチド; AVP, バソプレッシン; Colla1, コラーゲン 1a1; ET-1, エンドセリン-1; FN, フィブロネクチン; MMP2, マトリックスメタロプロテイナーゼ-2; V1aR, V1a 受容体; V1bR, V1b 受容体; V2R, V2 受容体。

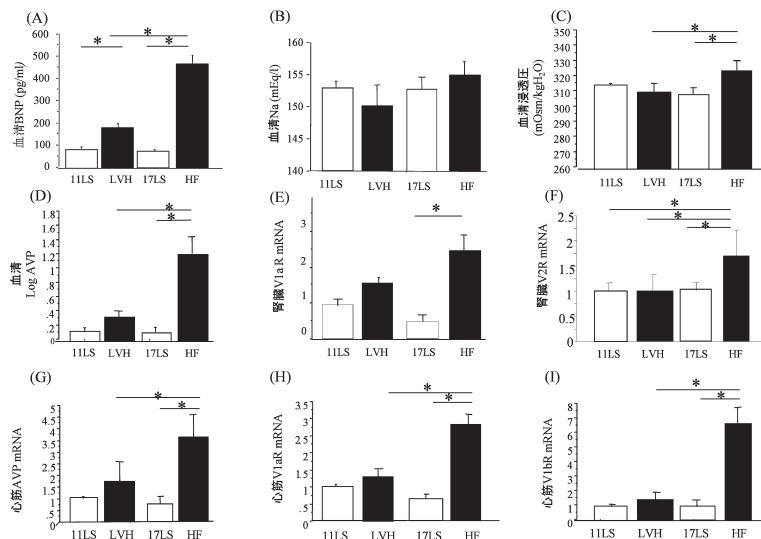


図2 左室肥大期から心不全期にかけてのDahl-Sラットにおけるバソプレッシン系

AVP, バソプレッシン; V1aR, V1a受容体; V1bR, V1b受容体; V2R, V2受容体。11LS, 11週齢0.3%低食塩食ラット; 17LS, 17週齢0.3%低食塩食ラット; LVH, 左室肥大期; HF, 心不全期。mRNAの値は、11週齢の低食塩食ラット群の値を1.0に設定し、残りの値はそれに応じて調整された値として表した。実験値は平均値±標準偏差で示した。\*p<0.05。

mRNA 発現が亢進していた。左室心筋においては、心肥大期には同週齢期の LS 群と比較してバソプレッシン、V1a 受容体、V1b 受容体の mRNA 発現に差はみられなかった。しかしながら、心不全期においては左室肥大期と比べて全て有意に増加していた。

#### Kaplan-Meier 法による生存分析 (図 3 A)

Cont 群のラットは14-22週齢の間にすべて左室機能不全を伴った肺うっ血で死亡した (平均生存期間:  $18.4 \pm 2.6$  週齢)。Kaplan-Meier 法による生存分析の結果、LD 群の生存期間は改善傾向にあったものの、Cont 群と比較して有意差は示さなかった ( $19.2 \pm 3.9$  週齢,  $p=0.184$ )。しかしながら、HD 群では有意に生存期間の改善を示した ( $22.9 \pm 3.5$  週齢,  $p=0.01$ )。

心拍数, 収縮期血圧ならびに心臓超音波による経時的な変化

観察期間中, 各群間で心拍数および収縮期血圧に

差は認められなかった(表 2)。心臓超音波検査では、Cont 群では左室肥大から心不全期に移行する過程で LVDd の拡大と FS の低下を認めた。LD 群では明らかな変化を認めなかったが、HD 群では Cont 群に比べて LVDd は縮小傾向にあり、FS は有意な増加を認めた ( $40.2\%$  vs.  $27.5\%$ ;  $p<0.05$ ) (図 3 B)。

#### 心不全期の病理組織学的パラメーター

心不全期の時点で、体重は 3 群間で有意差を認めなかった。LD, HD 両群で左室重量/体重の有意な減少を認めた。HD 群でのみ肺重量/体重の有意な減少を認めた ( $p<0.01$ )。つまり、肺うっ血が抑制された。HD 群は Cont 群や LD 群と比べて心筋の線維化は抑制傾向にあったが、統計学的有意差を認めなかった (表 2, 図 4)。

血液, 尿生化学的およびホルモン等の変化 (表 3) 11週齢期では (治療を開始して 3 日目), tolvaptan 群では用量依存性に尿量が増加し (Cont 群:

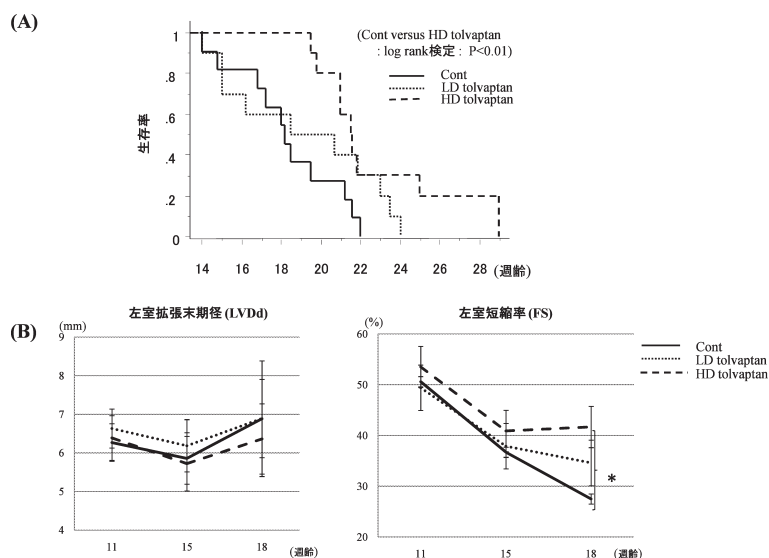


図 3 tolvaptan 投与による長期的な効果 A) 生存率および B) 心臓超音波検査による評価 LVDd, 左室拡張末期径; FS, 左室短縮率。実験値は平均値±標準偏差で示した。\* $p<0.05$ 。

表 2 18週齢期の偽薬あるいは tolvaptan を投与した Dahl-S ラットの血行動態および組織学的パラメーター

	Cont	LD Tolv	HD Tolv	LS
数 (匹)	11	10	11	6
血行動態				
体重 (g)	$305 \pm 39$	$325 \pm 27$	$326 \pm 37$	$412 \pm 21\ddagger$
収縮期血圧 (mmHg)	$217 \pm 12$	$220 \pm 15$	$216 \pm 16$	$131 \pm 2\ddagger$
心拍数 (beat/min)	$458 \pm 68$	$452 \pm 60$	$468 \pm 65$	$475 \pm 47$
組織				
左室重量/体重 (mg/g)	$4.5 \pm 0.4$	$3.9 \pm 0.5^*$	$3.9 \pm 0.5^*$	$2.2 \pm 0.01\ddagger$
肺重量/体重 (mg/g)	$10.1 \pm 0.4$	$7.3 \pm 0.6$	$5.7 \pm 0.5^*$	$5.0 \pm 0.01$
心筋線維化面積 (%)	$23.1 \pm 8.1$	$23.0 \pm 3.7$	$20.4 \pm 5.7$	$10.1 \pm 1.7\ddagger$

実験値は平均値±標準偏差で示す。

Cont 群, 8%高食塩食+偽薬; LD Tolv, 8%高食塩食+0.01% tolvaptan; HD Tolv, 8%高食塩食+0.05% tolvaptan; LS, 0.3%低食塩食。\* $p<0.05$ , † $p<0.01$  versus Cont, ‡ $p<0.05$  versus Cont, LD, or HD.

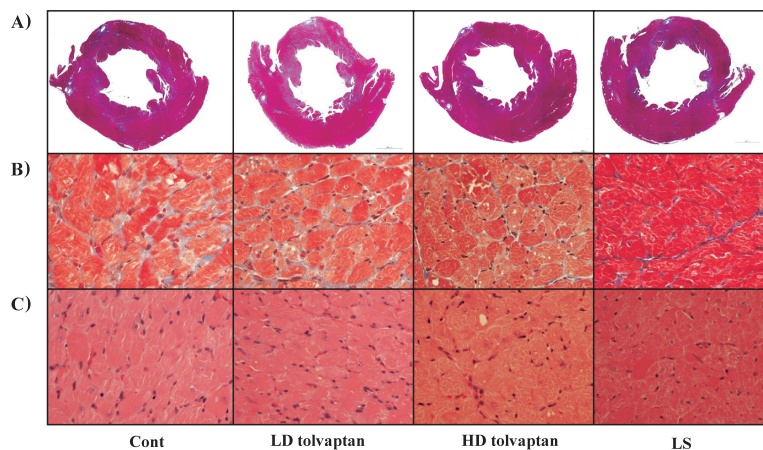


図4 左室心筋の組織学的所見  
左室全体(A), マッソントリクロームで染色した左室強拡大 (400倍) (B), およびヘマトキシリンエオジンで染色した左室強拡大 (400倍) (C)の代表写真。

表3 18週齢期の偽薬あるいは tolvaptan を投与した Dahl-S ラットの血液生化学, ホルモン, 尿パラメーター

	Cont	LD Tolv	HD Tolv	LS
血液生化学的パラメーター				
Na (mEq/l)	157.6±4.45	158.8±7.49	158.3±4.41	151.8±5.19
K (mEq/l)	6.48±0.34	6.28±0.36	6.03±0.38	7.12±0.39
BUN (mg/dl)	27.3±5.78	23.2±5.97	23.2±1.93	20.1±1.51‡
Cr (mg/dl)	0.42±0.09	0.42±0.07	0.39±0.09	0.26±0.01‡
浸透圧 (mOsm/kgH <sub>2</sub> O)	315.5±11.5	321.0±7.72	321.6±14.1	295.0±6.57‡
バソプレッシン (pg/ml)	4.03±2.42	3.43±1.96	4.45±2.94	1.50±1.47‡
アルドステロン (pg/ml)	78.7±67.4	127.6±79.8	96.0±58.7	152.7±83.7‡
レニン活性 (pg/ml/h)	4.77±1.56	3.87±2.00	3.80±0.92	2.08±0.69‡
尿生化学的パラメーター				
尿量 (ml/kg/day)	224.6±93.6	270.3±109.3	329.1±146.7*	40.7±11.5‡
浸透圧 (mOsm/kgH <sub>2</sub> O)	707.3±277.6	603.4±273.8	489.2±163.7*	1187.5±428.5‡
Na (mEq/kg/food)	2.55±1.34	3.35±0.78	3.59±0.91*	0.19±0.19‡
K (mEq/kg/food)	0.71±0.83	0.83±0.74	0.78±0.59	1.01±0.81‡
UN (mg/kg/day)	861.2±217.3	815.6±151.2	818.8±149.3	751.5±192.1‡
Cr (mg/kg/day)	34.3±6.06	32.8±7.02	35.2±6.97	32.8±2.31
総蛋白 (mg/kg/day)	942.7±463.6	917.2±432.0	798.5±406.7	73.7±13.2‡
アルブミン (mg/kg/day)	89.5±38.8	98.4±53.6	111.6±54.7	12.7±1.07‡
E-CH <sub>2</sub> O (ml/kg/day)	-134.6±82.5	-88.7±56.4	-27.3±93.2‡	-9.75±19.4‡
E-Cosm (ml/kg/day)	0.39±0.11	0.36±0.10	0.32±0.14	0.05±0.02‡
CCr (ml/min/100 gBW)	0.534±0.12	0.593±0.096	0.749±0.31*	0.868±0.087‡
Na 排泄率 (%)	3.91±1.96	3.46±1.20	3.24±1.83	0.05±0.01‡

実験値は平均値±標準偏差で示す。CCr, クレアチニンクリアランス; E-CH<sub>2</sub>O, 自由水クリアランス; E-Cosm, 電解質クリアランス。Cont, 8%高食塩食+偽薬; LD Tolv, 8%高食塩食+0.01% tolvaptan; HD Tolv, 8%高食塩食+0.05% tolvaptan; LS, 0.3%低食塩食。\*p<0.05, †p<0.01 versus Cont, ‡p<0.05 versus Cont, LD, or HD.

214.2±46.2, LD 群: 250.4±88.7, HD 群: 357.4±62.1 ml/kg), 尿浸透圧が減少した (Cont 群: 853.7±154.5, LD 群: 764.3±199.3, HD 群: 531.3±95.6 mOsm/kgH<sub>2</sub>O)。尿中のクレアチニン, ナトリウム, カリウム, 総蛋白, アルブミン排出量といった他のパラメーターには差を認めなかった。18週齢期では, 3群間で血中のナトリウム, カリウム, 尿素窒素, クレアチニン, バソプレッシン, アルドステロン, レニン活性に差を認めなかった。LD 群では, 尿量が増加し尿浸透圧が減少する傾向にあ

ったが, HD 群では有意差をもって尿量の増加を認め (94%の増加), 尿浸透圧の減少を認めた (43%の減少)。3群間で尿中の尿素窒素, クレアチニン, 総蛋白, アルブミン排泄量に差を認めなかった。尿中ナトリウム排泄量は HD 群で有意に増加した。Cont 群では, E-CH<sub>2</sub>O と E-C<sub>osm</sub> は LS 群に比べて減少していたが, E-CH<sub>2</sub>O のみ HD 群で改善を認めた。加えて, クレアチニンクリアランスは HD 群で有意に改善を認めた。

左室心筋での mRNA 発現の変化 (図5)

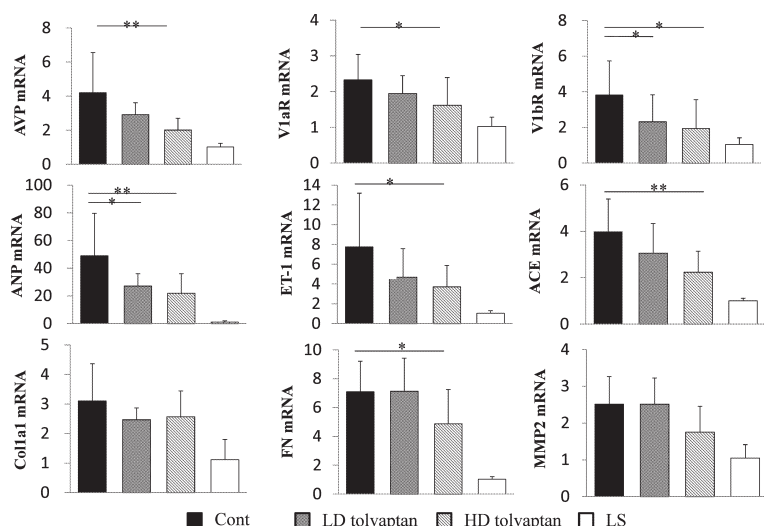


図5 左室心筋での mRNA 発現の変化  
 AVP, バソプレッシン; V1aR, V1a 受容体; V1bR, V1b 受容体; ANP, 心房性ナトリウム利尿ペプチド; ET-1, エンドセリン-1; ACE, アンジオテンシン変換酵素; Colla1, コラーゲン 1a1; FN, フィブロネクチン; MMP2, マトリックスメタロプロテナーゼ-2. mRNA の値は, 11週齢の低食塩食ラット群の値を1.0に設定し, 残りの値はそれに応じて調整された値として表した. 実験値は平均値±標準偏差で示した. \* $p < 0.05$ ; † $p < 0.01$ .

左室心筋におけるバソプレッシンや V1a, V1b 受容体の mRNA の発現は HD 群で有意に抑制されていた。また, 心房性ナトリウム利尿ペプチド, エンドセリン-1, アンジオテンシン変換酵素の mRNA 発現も HD 群で有意に低下した。一方, コラーゲン 1a1, フィブロネクチン, マトリックスメタロプロテナーゼ-2 の mRNA の発現は群間で差を認めなかった。

## 考 察

高血圧性心不全モデルにおいて, バソプレッシンシステムは心不全に移行する過程で, 全身においてだけでなく左室心筋局所でも活性化されることが明らかとなった。そして, 長期にわたり高用量の tolvasptan を投与することで電解質, 神経体液性因子のバランスを崩すことなく水利尿を生じ, 生存率を上昇させることがわかった。それには, 左室機能不全の抑制, および左室心筋におけるバソプレッシンシステムや心房性ナトリウム利尿ペプチド, エンドセリン-1, アンジオテンシン変換酵素等の発現抑制が関連していた。

### 心不全におけるバソプレッシンの役割

心不全の病態生理には, SNS, RAAS, バソプレッシンシステムの活性化を含む神経体液性因子の活性化が大きく関与する<sup>2,13</sup>。Dahl-S ラットにおいて, 高食塩食の負荷は11週齢期になると高血圧を引き起こし, 左室肥大を招く。心不全への移行後, 重度の左室収縮機能不全を発症し肺うっ血を併発し死亡する。全身, 局所での SNS, RAAS, エンドセリンシステムを長期に遮断することで左室心筋リモデリングや心不全に有益な効果が示されている<sup>12,14</sup>。本研究において, 我々はバソプレッシンシステムは全身だけでなく心筋局所でも活性化されることを明らか

にした。左室心筋内でのバソプレッシンの mRNA 発現は3.5倍に増加し, それとともに V1a, V1b 受容体の mRNA 発現も増加していた。このことは, Hupf らの報告でも述べられている<sup>15</sup>。彼らはラットを用いた実験で, 負荷のかかった心臓では局所のみならず全身的な効果をもたらす程度にもバソプレッシンが発現増強されていると述べている。人間の心臓でも, バソプレッシンの産生と排出は容量負荷を伴う患者で観察された<sup>16</sup>。近年, Li らは心筋細胞で特異的に V1a 受容体の過剰発現を起こすトランスジェニックマウスを用いて, 心筋細胞での長期にわたる V1a 受容体の活性化は心筋肥大と心不全の進行を引き起こすことを証明した<sup>17</sup>。同様に, 我々の研究でも血中バソプレッシン濃度の上昇のみならず, 心筋内でのバソプレッシンシステムの活性化は心不全への移行過程において極めて重要な役割を果たしていると思われる。

### 心不全における V2 受容体遮断の全身性または心臓局所への効果

tolvasptan は選択的非ペプチド性 V2 受容体拮抗薬であり, 腎臓の集合管にある V2 受容体にバソプレッシンが結合することを妨げることで, 結果として電解質異常を起こすことなく水利尿を生む。すでに発表された臨床試験(SALT-1, SALT-2, ACTIV in CHF)では, 低ナトリウム血症を伴った心不全患者に対し, 水分制限なしという条件のもとでナトリウム濃度を上昇あるいは正常化に導いたことで tolvasptan の有用性を証明した<sup>7,18</sup>。しかしながらその有効性は正常あるいは高ナトリウム血症の心不全患者に対しては不明である。加えて, EVEREST 試験では死亡率や改善した患者の再入院率改善などのアウトカムが不明であった<sup>8,9</sup>。本研究では, Dahl-S ラットに 8%高食塩食を投与していたため, 低ナト

リウム血症をきたすことなく体液貯留を認めた。しかしながら、治療を開始することで HD 群では血行動態や尿中ナトリウム、カリウム排泄量、血液中の電解質、神経体液性因子に悪影響を及ぼすことなく、持続的な水利尿を生み、また生存率も改善した。我々の研究では、左室心筋内での V2 受容体の mRNA 発現を認めなかったため、心臓への有効性は、局所での血行動態の変化や神経体液性因子の変化を通じて間接的に起こった可能性がある<sup>5</sup>。V2 受容体拮抗薬の長期的な作用は、心筋ミオシン投与自己免疫性心筋炎<sup>19</sup> や冠動脈結紮<sup>20</sup>、下大静脈-大動脈シャント<sup>21</sup> による心不全モデルを用いた実験でも証明されている。しかしながら、それらの報告では心臓のリモデリングや機能に対する V2 受容体拮抗薬の有効性や明確な生存率の改善を示していない。体液貯留あるいは腎機能障害といった心不全の病態生理の違いが、相反する結果を生んでいるのかもしれない。近年、Costello らは動物のペースング心不全モデルを用いて、tolvaptan と脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の併用は腎臓、神経体液系、血行動態の改善に有効であることを証明した<sup>22</sup>。BNP を投与することで、tolvaptan 単独投与で見られたような血行動態、および神経体液系の悪影響は減弱された。ダールラット心不全モデルでは、血中の BNP 濃度は左室肥大期にはすでに 2 倍に上昇しており、心不全期へ移行する間に約 5 倍に上昇していた。このことは、本研究の tolvaptan 治療の有効性に関連するかもしれない。

以上のことより、高血圧性心不全モデル動物における長期的な tolvaptan の投与は左室機能不全の進行を抑制することで有効に作用すると考えられる。その根本となるメカニズムは、血行動態の改善と局所すなわち心筋内での神経体液性因子の活性化を抑制することに関連するかもしれない。長期にわたり V2 受容体を遮断することは心不全患者、特に高血圧性心不全患者に対する治療に新たな希望をもたらす可能性がある。

#### 謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導御協力いただきました教室員各位に深謝いたします。また、本研究を行うにあたり御協力いただきました村田敦子氏、ライフサイエンス研究所赤星保光氏、京都大学大学院医学研究科循環器内科田巻庸道先生、大塚製薬株式会社藤木浩之氏に深謝いたします。

本論文の要旨は、2011年5月に Gothenburg で開催された Heart Failure Association of the ESC、および2011年8月に横浜で開催された第75回日本循環器学会学術集会において発表された。

#### 文 献

1. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N (2000) Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am CollCardiol* 35: 569-582
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 CollCardiol* 1: 1385-1390
4. Francis GS, et al. (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. Nielsen S, et al. (1995) Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1013-1017
7. Schrier RW, et al.; SALT Investigators (2006) Tolvaptan, a selective oral vasopressin V2-receptor antagonist, for hyponatremia. *N Engl J Med* 355: 2099-2112
8. Konstam MA, et al. (2007) Efficacy of Vasopressin Antagonism in Heart Failure Outcome Study With Tolvaptan (EVEREST) Investigators. Effects of oral tolvaptan in patients hospitalized for worsening heart failure: the EVEREST Outcome Trial. *JAMA* 297: 1319-1331
9. Gheorghide M, et al. (2007) Efficacy of Vasopressin Antagonism in Heart Failure Outcome Study With Tolvaptan (EVEREST) Investigators. Short-term clinical effects of tolvaptan, an oral vasopressin antagonist, in patients hospitalized for heart failure: the EVEREST Clinical Status Trials. *JAMA* 297: 1332-1343
10. Konstam MA, Udelson JE (2011) Hyponatremia and vasopressin in heart failure: markers or mediators? *Eur J Heart Fail* 13: 242-244
11. Bishara B, et al. (2008) Effects of novel vasopressin receptor antagonists on renal function and cardiac hypertrophy in rats with experimental congestive heart failure. *J Pharmacol Exp Ther* 326: 414-422
12. Moriaki I, Yasuki K, Isao M, Hisayoshi F, Shigetake S (1994) Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol* 267: H2471-2482
13. Schrier RW (2006) Role of diminished renal function in cardiovascular mortality: marker or pathogenetic factor? *J Am Coll Cardiol* 47: 1-8

14. Iwanaga Y, et al. (2001) Differential effects of angiotensin II versus endothelin-1 inhibitions in hypertrophic left ventricular myocardium during transition to heart failure. *Circulation* 104 : 606-612
15. Hupf H, Grimm D, Riegger GA.J., Schunkert H (1999) Evidence for a vasopressin system in the rat heart. *Circ Res* 84 : 365-370
16. Watanabe I, et al. (2005) Regulation of arginine vasopressin in the human heart. *Circ J* 69 : 1401-1404
17. Li X, et al. (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. Gheorghiade M, et al. (2004) Acute and Chronic Therapeutic Impact of a Vasopressin Antagonist in Congestive Heart Failure (ACTIV in CHF) Investigators. Effects of tolvaptan, a vasopressin antagonist, in patients hospitalized with worsening heart failure: a randomized controlled trial. *JAMA* 291 : 1963-1971
19. Veeraveedu PT, et al. (2007) Effect of nonpeptide vasopressin V2 antagonist tolvaptan in rats with heart failure. *Biochem Pharmacol* 74 : 1466-1475
20. Burrell LM, et al. (1998) Long-term effects of nonpeptide vasopressin V2 antagonist OPC-31260 in heart failure in the rat. *Am J Physiol* 275 : H176-182
21. Nshikimi T, et al. (1996) Effect of long-term with selective vasopressin V1 and V2 receptor antagonist on the development of heart failure in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 27 : 275-282
22. Lisa C. C-B, Guido B, Alessandro C, Gail JH, John CB Jr (2010) Renal and anti-aldosterone actions of vasopressin-2 receptor antagonism and B-type natriuretic peptide in experimental heart failure. *Circ Heart Fail* 3 : 412-419