

ラット高血圧性心不全モデルにおけるバソプレッシン V1a 受容体拮抗薬の慢性投与効果及びバソプレッシン V2 受容体拮抗薬との併用効果に関する検討

池田 智之 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

背景：バソプレッシン V1a 受容体は血管や心筋に豊富に存在し血管収縮や心筋肥大への関与が示唆されており、心不全治療において V1a 受容体遮断による有効性が期待されるが、これまでの報告では結論は出ていない。そこで今回我々は、ダールラット高血圧性心不全モデルを用いて、V1a 受容体拮抗薬 OPC21268 の長期投与による効果、さらには V2 受容体拮抗薬 Tolvaptan との併用効果についても検討を行った。

方法：心肥大が完成する11週齢の時点から、OPC21268 投与群、Tolvaptan 投与群、OPC21268+Tolvaptan 併用群、偽薬投与群 Control 群の4群に分け生命予後を比較した。心不全期にかけての血圧、心拍数、尿所見の経時的な変化を評価し、さらに心不全期における心臓エコー所見、腎機能所見、心臓・腎臓組織における遺伝子発現および組織学的所見の差異についても検討を加えた。

結果：経過中 OPC21268 投与による血圧への影響は認めず、また生命予後の有意な改善は認められなかった。しかし心不全期における左室内径短縮率の有意な改善が認められ、左室心筋における遺伝子発現には、V1aR, ANP, β MHC の発現亢進が抑制されていた。腎臓においてはクレアチニンクリアランスの改善に加えて、腎臓組織障害の進展が抑制され、レニンおよびコラーゲンの遺伝子発現が抑制されていた。また、Tolvaptan との併用により生命予後の改善、心腎障害軽減効果が認められたが、それは Tolvaptan 単独投与と同等であった。

結論：高血圧性心不全モデルラットにおいて、V1a 受容体拮抗薬 OPC21268 長期投与により予後改善効果は認められなかったが、心筋ならびに腎臓に対する保護効果が認められた。また Tolvaptan との併用は、Tolvaptan 単独投与に勝る効果は得られなかった。

Key words : 心不全, バソプレッシン受容体拮抗薬, V1aR 受容体, V1aR 受容体

緒 言

神経体液性因子は生体内における循環動態の維持に寄与しており、代表的なものにレニン・アンジオテンシン系 (RAS), 交感神経系 (SNS), エンドセリン系, バソプレッシン系などがあげられる。心不全患者においては神経体液性因子の活性化が生じている事が知られており¹, 慢性的な神経体液性因子の活性化状態が心臓リモデリング進行を引き起こす事で、心不全の病態進展・悪化に関与していると考えられている。現在のヒト心不全治療においては、神経体液性因子を標的とした薬物療法が標準的治療として確立されている²。代表的なものに RAS を標的

としたアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (アンジオテンシン受容体拮抗薬), SNS を標的とした β 遮断薬などがあげられるが、近年においては新たな治療薬として、エンドセリン受容体拮抗薬やバソプレッシン受容体拮抗薬が開発され注目を集めている。

バソプレッシンとは、視床下部にて産生され下垂体後葉より分泌される神経ペプチドであり、ストレス刺激をはじめ血漿浸透圧や血圧、循環血漿量などの変化により分泌が調節されている。生体内におけるバソプレッシンの受容体には V1a 受容体, V1b 受容体, V2 受容体の3種類があり、それぞれ発現部位や作用は異なっている。V1a 受容体は血管平滑筋や心筋細胞、線維芽細胞等に多く発現し、血管収縮や

心筋における陽性変力作用^{3,4}, 細胞増殖作用, 心筋線維化作用等を持つと報告されている⁵⁻⁷. また V1b 受容体は中枢神経に存在し, 下垂体前葉からの ACTH の分泌に関連しているとされている. 一方 V2 受容体は腎の集合管に多く発現しており, cAMP を介してアクアポリン受容体 AQP2 を増加させることで腎臓において自由水の再吸収を促進する.

V2 受容体拮抗薬は水利尿作用を有し, 我が国において2011年以降 Tolvaptan が臨床使用可能となり, 心不全患者において一定の効果が示されている⁸. 一方 V1a 受容体拮抗薬に関しては, 心不全において後負荷の軽減や心筋細胞肥大抑制作用を介したリモデリング軽減などの有効性が期待される. しかしながら動物実験における短期的な効果を示す報告は見られるが, その慢性効果に関してはその有効性は明らかでない. そこで今回我々はダール食塩感受性ラット高血圧性心不全モデル⁹を用いて V1a 受容体拮抗薬 OPC21268 長期投与による効果を検討し, さらには Tolvaptan との併用による効果についても検討を行った.

方 法

実験プロトコール 1 (OPC21268 の受容体遮断作用に対する検討)

ダール高食塩感受性ラットの雄 (n=6) に対して 6 週齢より OPC21268 投与群 + 8% 高食塩食 (n=3) と, 偽薬 + 8% 高食塩食を投与する Control 群 (n=3) に分け, 7 週齢となった時点で, 2.5% イソフルレン吸入麻酔下に頸動脈に圧カテーテルを挿入し血圧測定を行った. 0.05 µg/kg ならびに 0.10 µg/kg のバソプレッシンの急性静脈投与を行い, 投与後 10 分間の血圧, 心拍を記録した.

実験プロトコール 2 (OPC21268 の長期投与効果に対する検討)

実験開始間までは 0.3% 低食塩食 (Low Salt) を投与した. 6 週齢になった時点で 8% 高食塩食の投与を開始し, 左室肥大が完成する 11 週齢となった時点から薬剤の投与を開始し 0.5% 混餌 OPC21268 投与群 (n=18), 0.05% 混餌 Tolvaptan 投与群 (n=14), 0.5% OPC21268 + 0.05% Tolvaptan 併用群 (n=19), 偽薬投与群; Control 群 (n=16) の 4 群に分類した. また, 実験期間中 0.3% 低食塩食を継続投与していた群は, 高血圧および左室肥大を来すことなく, これを低塩食群; Low salt (LS) 群 (n=8) と定義した (図 1).

それぞれの投与群における生命予後の差についての比較検討を行うとともに, 心肥大期 (11 週齢) と

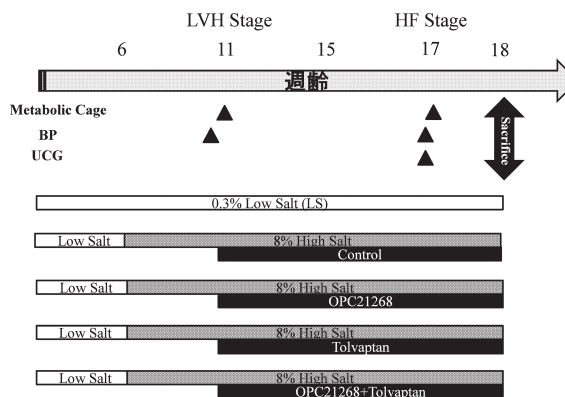


図 1 実験プロトコール概略

LVH stage, 左心肥大期; HF stage, 心不全期.

心不全期 (17 週齢) において, 血圧と心拍数の測定, ならびに代謝ケージを用いた尿解析を行った. さらに 17 週齢時には心臓超音波検査を用いた心臓機能評価を行った. その後 18 週齢の時点で, 断頭による採血に加えて心臓, 腎臓, 肺の摘出を行い各組織の重量の検討と病理学的所見, ならびに定量的リアルタイム PCR 法を用いた遺伝子発現の差異についても検討を加えた.

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 “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, 心拍数測定と心臓超音波法

心拍数と収縮期血圧は tail cuff 法により測定した. Morisaki らが用いた方法¹⁰を参考に, 超音波断層装置を使用し, 左心室短軸像における収縮内腔径 (LVDd), 拡張期内腔径 (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した; $(LVDd - LVDs) / LVDd \times 100 (\%)$.

血液および尿サンプルの測定

薬剤投与開始 3 日目および心不全期 (17 週齢期) に, 実験モデルを個別の代謝ケージに入れ 24 時間蓄尿を採取し, 体重および尿量を測定した. 採取した尿において, 浸透圧, ナトリウム, カリウム, 尿素窒素, クレアチニン, 蛋白, アルブミン排泄量を測定した. その後続けて, 断頭により血液サンプルを採取した. 血液サンプルは 10 分間, 4°C, 3000 rpm で遠心分離し, 上清を分離し市販キットを用いて血清浸透圧, ナトリウム, カリウム, 尿素窒素, クレアチニン, アルドステロン, レニン活性を測定した.

組織学的検討法

血液サンプルを回収した直後に心臓, 肺と腎臓を摘出し, 臓器の重量を測定した. 心臓に関しては標

本を左室と右室に分離した。左室ならびに腎臓組織はホルマリン固定を行い、パラフィン包埋後に厚さ 5 μm の切片を作製した。その後、左室はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、および線維化を評価する目的で Sirius Red 染色を行った。また腎臓に関しては HE 染色に加えて Masson Trichrome 染色を行った。各組織における評価方法を以下に示す。
 左室組織：HE 染色切片標本にて心筋肥大の様子を観察した(200倍)。続けて線維化に関しては、Sirius Red 染色を行った各群それぞれ 8 検体を対象に、心内膜側、心外膜側、中間層の代表的と思われる部位を100倍率にてそれぞれ観察・写真撮影し Image J Software を用いて線維化の割合を定量評価した。
 腎臓組織：1 検体20個の傍髄質領域の糸球体を対象に Glomerulosclerosis (GS) を評価した。また 1 検体において代表的と思われる部位 3 か所を対象に、腎臓間質における線維化 Tubulointerstitial fibrosis (TF) と、尿細管障害の指標である Tubular dilatation (TD) を評価した。各群 4 検体ずつ計測を行った。

定量的 RT-PCR 法による mRNA 発現解析

心臓；V1a 受容体，心房性ナトリウム利尿ペプチド，アンギオテンシン変換酵素，エンドセリン 1，I 型コラーゲン，β ミオシン重鎖，腎臓；バソプレッシン，V1a 受容体，V2 受容体，アクアポリン 2 受容体，レニン，エンドセリン 1，I 型コラーゲン

以上の遺伝子に関してリアルタイム PCR を行い，mRNA の発現を評価した。各種プライマーの遺伝子配列を表 1 に示す。PCR の方法は，50 mg の左室心筋ならびに腎臓組織からトリゾル® を使用した後に DNase I (Invitrogen) にて処理を行い，SuperScript first-strand synthesis system kit (Invitrogen) を用いて一本鎖 cDNA を合成した。続

けて cDNA に SYBR Green PCR Master Mix (ABI) と 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 を 35 サイクル行い，CT 値を測定した。得られた CT 値を GAPDH によって標準化した。

計算と統計

代謝ケージにより採取した尿所見と断頭にて採取した採血所見の結果から自由水クリアランス (E-CH₂O) と電解質クリアランス (E-C_{osm}) を測定した。計算式は以下に示す；E-CH₂O=UV-E-C_{osm}，E-C_{osm}=(U_{Na}+U_K) UV/P_{Na}
 UV：尿量，U_{Na}：尿中ナトリウム排泄量，U_K：尿中カリウム排泄量，P_{Na}：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 を用いた後に Fisher の PLSD 検定を行った。生存率は Kaplan-Meier 法を用いて分析し，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

OPC21268 の受容体遮断作用 (図 2)

バソプレッシン 0.05 μg/kg 投与によって，直後から 1 分後にかけての平均血圧上昇 (ΔmBP) は，Control 群では 24.5±6.3 mmHg であったが，OPC21268 投与群においては 8.8±7.5 mmHg と 64.1% 抑制されていた。また 0.10 μg/kg 投与においても Control 群の 43.0±7.4 mmHg に対して，OPC21268 投与群では 21.6±6.4 mmHg の増加にとどまり 49.8% の抑制効果が認められた。

生命予後に関する検討

薬剤投与を開始した 11 週齢から 18 週までの各群に

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
AQP2	TTGCCATGTCTCCTTCCTTCG	GGCGTTGTTGTGGAGAGCATT
βMHC	AAGTCCTCCCTCAAGCTCCTAAG	GAAAGGGATGAGCCTTTCTTTGC
Colla1	ACGCATGGCCAAGAAGACATC	TTTGCATAGCACGCCATCG
ET-1	CTTCTGCCACCTGGACATCAT	TCCCTTGGTCTGTGGTCTTTG
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGACTGTGCCGTTGAACTTGC
Renin	GGAGTCAAAGAGAAGAGAGCA	CTTGACAGCCAGTATGCACA
V1aR	GCGCCTTTCTTCATTGTCCA	GTTGCAGCAGCTGTTCAAGGA
V2R	ATGCTCCTGGTGTCTACCGTGT	AGCACTAGGCCATTGCTCAAGG

ACE, アンギオテンシン変換酵素；ANP, 心房性 Na 利尿ペプチド；AQP2, アクアポリン 2；βMHC, β ミオシン重鎖；Colla1, I 型コラーゲン；ET-1, エンドセリン 1；GAPDH, グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素；Renin, レニン；V1aR, V1a 受容体；V2R, V2 受容体。

における生命予後を比較検討した結果、OPC21268 単独投与群における平均生存日数は119.8±5.8日と、Control 群113.6±9.7日に比べて延長したが、Kaplan-Meier 解析では、Control 群と比較して OPC21268 投与による有意な予後改善効果は認められなかった(p=0.143)。Tolvaptan 単独群における平均生存日数は117.2±8.5日であり、Kaplan-

Meier 解析にて有意な予後の改善効果が得られた (p=0.020)。一方で、OPC21268 と Tolvaptan との併用群における平均生存日数は124.6±5.3日であり、Kaplan-Meier 解析にて有意な予後の改善効果が得られた (p=0.006)。

血圧、心拍数の経時的変化

11週齢ならびに17週齢における血圧、心拍数、体重の経時的な変化についての経過を図3 Aに示す。すべての治療群において11週から17週にかけての血圧上昇ならびに心拍数の増加傾向を認めていたが、各群間に差は認められず、control 群との比較において、OPC21268 ならびに Tolvaptan 投与による血圧、脈拍数への影響は認められなかった。また17週においては、OPC21268 投与群および併用群にて有意な体重増加が認められた。

代謝ケージを用いた尿所見の経時的変化

11週 (投与開始後2日) と17週における尿量、尿所見の経時的変化を図3 Bに示す。経過中に OPC21268 投与による尿量、尿浸透圧、尿蛋白への影響は認められなかった。一方で Tolvaptan 投与および併用群においては、17週における尿蛋白の増加が抑制されており、11週齢ならびに17週齢において尿

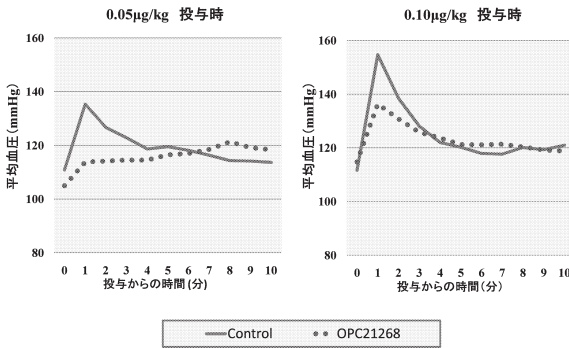


図2 パソプレッシン急性静脈投与による血圧変動
縦軸に平均血圧、横軸には投与後の時間経過 (分) を示す。
Control; 8%高食塩食+偽薬, OPC21268;
8%高食塩食+0.5% OPC21268

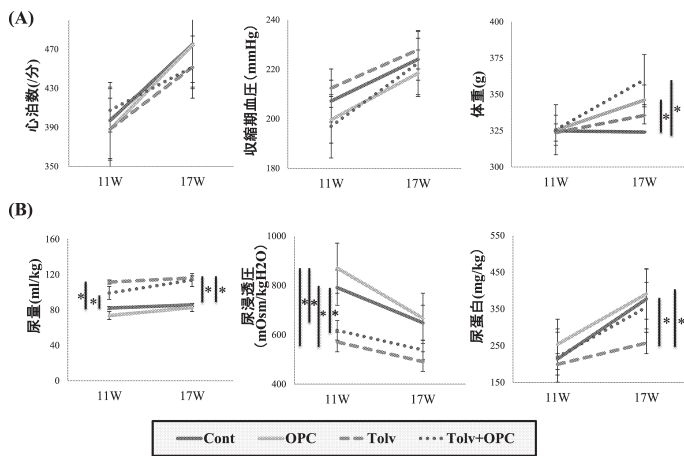


図3 各治療群における生存予後曲線
11週齢以降における各群における生存率の推移を示す。
Control; 8%高食塩食+偽薬, OPC21268;
8%高食塩食+0.5% OPC21268, Tolvaptan;
8%高食塩食+0.05% Tolvaptan, OPC21268+
Tolvaptan; 8%高食塩食+0.5% OPC21268+
0.05% Tolvaptan.

表2 心不全期 (17週齢期) における心臓エコー所見

	LS	Cont	OPC21268	Tolv	OPC+Tolv
数 (匹)	8	8	10	10	10
心拍数 (/min)	397±37	414±23	446±35	446±35	428±30
IVSTd (mm)	1.11±0.10†	1.61±0.10	1.67±0.12	1.77±0.16*	1.74±0.14*
LVDd (mm)	7.43±0.30†	8.03±0.21	7.68±0.45	7.36±0.40†	7.55±0.62†
LVPWTd (mm)	1.15±0.08†	1.61±0.12	1.76±0.18*	1.86±0.14†	1.79±0.14†
LVDs (mm)	3.06±0.35†	5.93±0.18	5.09±0.69†	4.63±0.45†	4.67±0.48†
FS (%)	58.8±3.99†	26.1±2.68	33.8±6.04†	37.2±3.79†	38.1±4.76†**

値は平均値±標準偏差で示す。LS, 0.3%低食塩食; Cont, 8%高食塩食+偽薬; OPC21268, 8%高食塩食+0.5% OPC21268; Tolv, 8%高食塩食+0.05% Tolvaptan; OPC+Tolv, 8%高食塩食+0.5% OPC21268+0.05% Tolvaptan. FS, 左室内径短縮率; IVSd, 心室中隔厚; LVDd, 左室拡張末期径; LVPWTd, 拡張期左室後壁厚; LVDs, 左室収縮末期径。*p<0.05, †p<0.01 vs. Cont. **p<0.05 vs. OPC21268

表3 心不全期 (17-18週齢) における血液, 尿および組織所見

	LS	Cont	OPC21268	Tolv	OPC+Tolv
血液生化学					
Na (mEq/l)	152±2.6†	161±8.8	152±4.2†	158±3.4	155±2.9†
K (mEq/l)	7.0±0.5	7.1±0.4	7.0±0.7	6.5±1.7	6.9±0.5
BUN (mg/dl)	19.9±1.9†	28.8±8.2	20.7±3.4†	21.8±5.3†	18.1±1.3†
Cr (mg/dl)	0.30±0.2†	0.48±0.08	0.36±0.02†	0.41±0.07*	0.39±0.06†
浸透圧 (mOsm/kgH ₂ O)	302±2.3†	322±16.6	304±4.3†	313±8.7	307±6.4†
アルドステロン (pg/ml)	263±73.8†	106±32.4	110±49.2	140±67.4	115±47.5
レニン活性 (pg/ml/h)	3.4±1.0	3.9±2.1	4.5±1.3	6.2±1.6†	5.3±1.2
尿生化学					
尿量 (ml/kg/day)	410±34†	325±35	350±33	339±35*	361±28*
浸透圧 (mOsm/kgH ₂ O)	1336±373†	648±320	667±111.0	491±167.4	538±122
E-CH ₂ O (ml/kg/day)	-22±12	-75±82	-182±72†	-41±93††	-118±55†††
E-Cosm (ml/kg/day)	0.06±0.01†	0.37±0.16	0.39±0.10	0.38±0.04	0.37±0.11
CCr (mg/min/100 g 体重)	0.70±0.10†	0.51±0.08	0.70±0.05†	0.67±0.14†	0.75±0.14†
Na 排泄率 (%)	0.11±0.04†	3.6±1.9	3.3±1.0	3.7±0.8	3.01±1.3
組織重量					
左室重量 (g)	1.04±0.07†	1.37±0.07	1.32±0.08	1.31±0.10	1.33±0.09
肺重量 (g)	1.64±0.11†	2.80±1.10	2.08±0.8*	1.72±0.89†	1.68±0.11†
腎臓重量 (g)	1.77±0.08†	1.96±0.23	1.84±0.21	1.73±0.10†	1.76±0.08*
左室重量/体重 (mg/g)	2.45±0.13†	4.32±0.75	3.77±0.51	3.72±0.53	3.52±0.35
肺重量/体重 (mg/g)	3.89±0.26†	8.98±4.46	6.04±2.84*	4.91±0.62†	4.43±0.40†
腎臓重量/体重 (mg/g)	3.68±0.13†	6.15±1.20	5.21±0.50†	4.92±0.66†	4.66±0.14†

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-CH₂O, 自由水クリアランス; E-Cosm, 電解質クリアランス; FE_{Na}, Na 排泄率。LS, 0.3%低食塩食; Cont, 8%高食塩食+偽薬; OPC21268, 8%高食塩食+0.5% OPC21268; Tolv, 8%高食塩食+0.05% Tolvaptan; OPC+Tolv, 8%高食塩食+0.5% OPC21268+0.05% Tolvaptan。*p<0.05, †p<0.01 vs. Cont, ††p<0.01 vs. OPC21268, †††p<0.05 vs. Tolvaptan。

量増加, 尿浸透圧低下を認めた。

心不全期における心臓エコー所見 (表2)

Control 群との比較において, OPC21268 投与により左室拡張末期径への影響は認められなかったが, 左室内径短縮率 (FS) は有意に改善していた。一方で Tolvaptan 投与群においては, 左室拡張末期径の拡大が抑制され, かつ FS の改善効果を認めた。OPC21268 と Tolvaptan を併用した群においては, 左室拡大が抑制され, FS のさらなる改善効果を認めた。

心不全期 (17-18 Week) における血液生化学ならびに腎機能所見 (表3)

OPC21268 慢性投与にてクレアチニンクリアランス (CCr) の低下が抑制されていた。自由水クリアランスの低下が認められたが, 電解質クリアランスへの影響は認められなかった。また血清 RAS 系への影響は認められなかった。OPC21268 と Tolvaptan の併用においてもクレアチニンクリアランスの低下は抑制されていた。また, 電解質クリアランスや RAS への影響は認められなかった。

心不全期における組織重量ならびに組織学的所見

左心室, 肺, 腎臓の組織重量を表3に示す。治療群間にて左心室重量は差を認めなかったが, 肺, 腎臓の重量はいずれの投薬群においても Control 群よりも低値を示していた。左室心筋組織においては, HE 染色にて Control と比較して OPC21268 投与群で心筋細胞肥大の抑制効果は明らかではなかったが, Sirius Red 染色による定量的評価にて心筋の線維化が抑制されていた (図4)。

また腎臓組織では, OPC21268 投与群において GS, TF, TD の半定量的評価による改善が認められた (図5)。これらの線維化の抑制効果は OPC21268 と Tolvaptan の併用群においても認められていた。心不全期における左心室, 腎臓における mRNA 発現

左心室, 腎臓における mRNA 発現変化をそれぞれ図6, 図7に示す。左心室心筋においては OPC21268 投与群で心筋肥大マーカーである心房性 Na 利尿ペプチド, β ミオシン重鎖の発現が抑制され心筋肥大の抑制効果が示唆された。また V1a 受容体ならびにアンギオテンシン変換酵素発現亢進が抑制されており, 心臓局所における V1a 受容体発現の

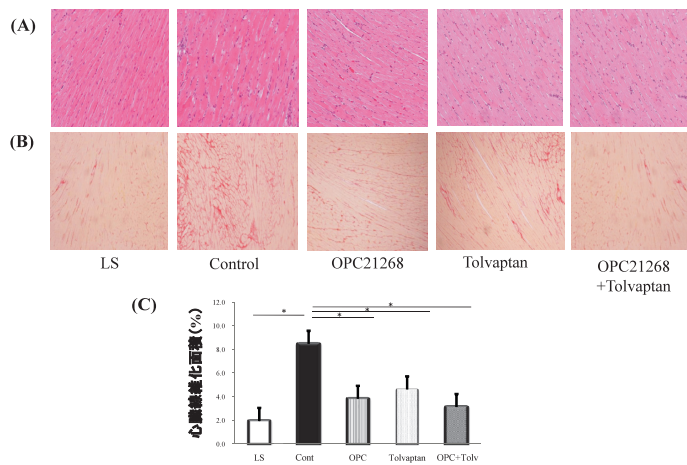


図4 心肥大期から心不全期に至る血圧，尿所見の推移

(A)各治療群における，心拍数，血圧，体重の推移，(B)各治療群における尿所見の推移

Control；8%高食塩食+偽薬，OPC21268；8%高食塩食+0.5% OPC21268, Tolvaptan；8%高食塩食+0.05% Tolvaptan, OPC21268+Tolvaptan；8%高食塩食+0.5% OPC21268+0.05% Tolvaptan. * $p < 0.05$

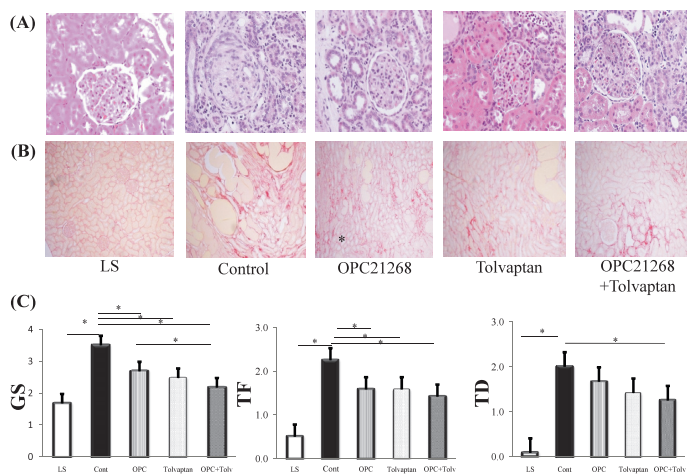


図5 左室心筋の組織所見

(A)ヘマトキシリン・エオジン染色による左室強拡大像(200倍)，(B)Sirius Red染色による左室強拡大像(100倍)，(C)各群における心臓線維化面積定量結果

LS；0.3%低食塩食，Control；8%高食塩食+偽薬，OPC21268；8%高食塩食+0.5% OPC21268, Tolvaptan；8%高食塩食+0.05% Tolvaptan, OPC21268+Tolvaptan；8%高食塩食+0.5% OPC21268+0.05% Tolvaptan. * $p < 0.05$

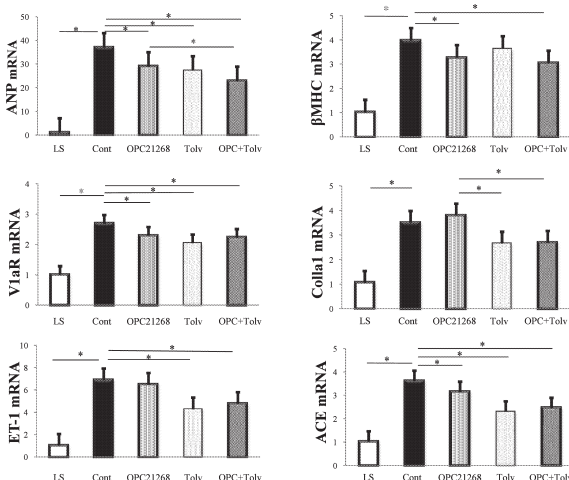


図6 腎臓の組織所見

(A) Masson Trichrome 染色による糸球体強拡大像(400倍)，(B) Sirius Red 染色による腎間質強拡大像(100倍)，(C)各群におけるGS, TF, TDの半定量結果

GS；Glomerulosclerosis, TF；Tubulointerstitial fibrosis, TD；Tubular dilatation, LS；0.3%低食塩食，Control；8%高食塩食+偽薬，OPC21268；8%高食塩食+0.5% OPC21268, Tolvaptan；8%高食塩食+0.05% Tolvaptan, OPC21268+Tolvaptan；8%高食塩食+0.5% OPC21268+0.05% Tolvaptan. * $p < 0.05$

抑制効果や，RASの抑制効果が示唆された。その一方で線維化の指標であるI型コラーゲンやエンドセリンに関して抑制効果は認められなかった。

腎臓においては線維化の指標であるI型コラーゲンの発現抑制に加えて，レニンが抑制されRASの抑制効果が示唆された。しかしながら，腎臓にお

るV1a受容体，V2受容体発現に関してはControlと差を認めず，腎臓におけるOPC21268の直接的な作用を示す所見は得られなかった。一方でOPC21268とTolvaptanを併用した群においては，単独使用群と加えて左室におけるエンドセリン，腎臓におけるアクアポリン2，V2R，エンドセリンの

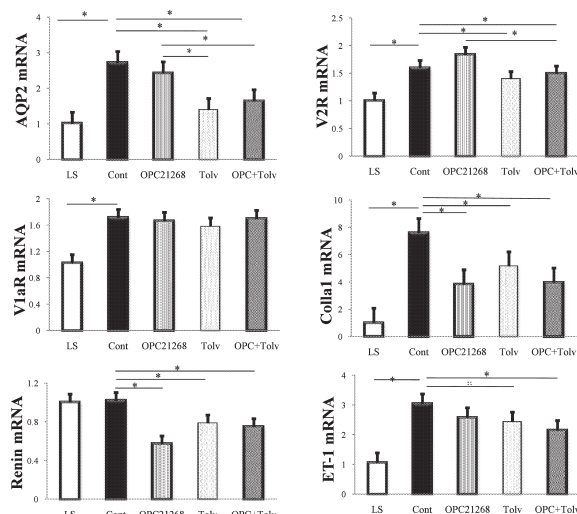


図7 左室心筋における mRNA 発現 ANP；心房性 Na 利尿ペプチド, β MHC； β ミオシン重鎖, V1aR；V1a 受容体, Colla1；I 型コラーゲン, ET-1；エンドセリン 1, ACE；アンジオテンシン変換酵素。* $p < 0.05$

発現亢進が抑制されていた。

考 察

ダールラット心不全モデルにおいて、V1aR 受容体拮抗薬 OPC21268 の長期投与により心不全予後改善効果は得られなかった。しかしながら、心不全期における心臓エコー所見での FS の改善および腎臓におけるクレアチニンクリアランスの改善効果を認めており、また遺伝子発現および組織所見からは、心肥大の抑制効果ならびに心筋、腎臓における線維化抑制効果を認めた。これらの結果は OPC21268 の心臓、腎臓への慢性保護効果を示唆するものであった。また V2 受容体拮抗薬 Tolvaptan との併用にて予後改善効果、心腎保護効果が認められた。心不全モデル動物における V1a 受容体拮抗薬の慢性効果について

これまでも心不全動物モデルを用いた V1a 受容体拮抗薬ならびに V2 受容体拮抗薬の効果に関して、いくつかの報告がある。V2 受容体拮抗薬に関しては心不全、腎不全どちらにおいても有効性が認められる報告が多かった。その一方で、V1a 受容体拮抗薬に関しては短期的な血行動態を改善させるという報告¹¹ や腎臓に対する保護効果^{12,13} を示唆する報告を認めるが、これまでに長期投与による有効性を示す報告は少なかった^{14,15}。例えば、Chandrasekharらは心筋梗塞後の心不全ラットに OPC21268 を 4 週間投与したが、慢性期における心筋リモデリング抑制作用は認められなかった。加えて、Nishikimiraらは動静脈シャントを作成したラットに対して V2

受容体拮抗薬ならびに V1a 受容体拮抗薬の 4 週間投与の効果の評価した。結果、V2 受容体拮抗薬にて心不全の抑制効果を認めるものの、V1a 受容体拮抗薬においては有効性が認められなかったと報告している¹⁶。しかしながら本研究においては、OPC21268 の長期投与により心筋、腎臓共に保護効果が認められた。この差異にはいくつかの理由が考えられるが、その中でも最大の要因は動物モデルの違いであったと思われる。これまでの動物モデルは、心筋梗塞による収縮障害や、動静脈シャント作成による容量負荷など、心臓のみに対して負荷を与えるモデルであった。一方、今回我々が用いたダールラットは高血圧性心疾患モデルであるが、塩分負荷により高血圧を呈する事で全身性に動脈硬化が進展するモデルであり、心臓のみではなく腎臓においても直接的な負荷があるモデルである。すなわち腎不全を併発するモデルであった事が、今回の OPC21268 投与にて良好な結果をもたらした可能性が考えられる。また、その他の要因としては薬物投与期間や投与用量の違いが考えられる。これまでの報告における薬物投与期間は、数時間もしくは数日と短期間であった事に対して、本研究においては 6 週間と長期間であった。この為に慢性的な変化として生じる、心筋リモデリングや組織線維化が抑制された事で、心臓・腎臓における臓器保護効果もたらされたと考えられる。また、本研究においては、すでに心肥大が完成した時点（11週齢）からの投与開始である為に生命予後改善に至る様な十分効果が発揮できなかった可能性も考えられる。より早期に投与を開始する事（予防的投与）で更なる効果を得ることができないかもしれない。一方、薬物投与量に関しては従来の検討において 200 mg/kg/day 程度であったのに対しわれわれの実験では 300-400 mg/kg/day と多かった。OPC21268 は用量依存性に効果を発揮するという報告もある事から¹⁷、用量の違いが良い影響を与えた可能性も考えられる。

OPC21268 の心筋への効果について

心不全においては全身のみではなく心臓局所においてもバソプレッシン系が活性化する事が報告されているが¹⁸、その際心臓局所における V1a 受容体は発現が亢進する。一方、心筋組織には V2 受容体は発現していない^{19,20}。したがって心不全時における心臓局所への作用は、V1a 受容体を介して生じていると考えられる。V1a 受容体は心筋や平滑筋細胞に豊富に存在しており、主に血管収縮や心筋収縮に関与しているとされるが、その他にも、心筋肥大を促進する作用を持つことが報告されている^{7,21}。更に、我々は V1a 受容体欠損マウスを用いた研究を以前

に行ったが、このマウスにおいては大動脈縮窄術施行後の心筋線維化が抑制されており、心不全発症が予防されていた。その主な原因は心臓線維芽細胞のV1aR抑制による効果と推定されている。本研究においても左室におけるmRNA発現解析の結果からは、心筋局所におけるバソプレッシンならびにV1a受容体の発現亢進を認めており、これまでの報告に合致する結果であった。その事に加えて、OPC21268投与によりV1a受容体の発現が抑制されており、OPC21268が心筋局所に直接的に作用している事が示唆された。心肥大に関しては心エコーにおける左室壁厚や左室重量からは心肥大の抑制効果を証明することはできなかったが、左室におけるmRNA発現においては心筋肥大マーカーであるANPや β MHC発現亢進が抑制されており、OPC21268の心肥大抑制効果を示唆する所見であると考えられた。一方で心筋での抗線維化効果に関しては、OPC21268投与群にて左室におけるコラーゲン等の遺伝子発現の抑制は認められなかったものの、組織所見においては心筋線維化面積が有意に抑制されており、今回の実験においてもV1a受容体遮断による心筋線維化抑制効果を示された。

なお心臓における心筋細胞肥大と線維化の関連およびその機序は複雑であり、血圧、炎症、SNS、RAASなど様々な要因が関与していると考えられているが²²、本研究においては薬物投与による血圧の降下作用は認めなかった。この事からは、今回の心肥大ならびに線維化の抑制効果は心筋への直接作用であり、バソプレッシン系だけではなく、同時にRAASなど他の神経体液性因子を抑制した事による結果であった可能性も考えられる。

OPC21268の腎臓への作用について

これまでの報告から、V2受容体拮抗薬Tolvaptanは、腎血流量を減らすことなく水利尿作用を生じる事から、腎臓に対して保護的な利尿薬であると考えられている^{12,24}。また、我々のグループは同じ動物モデルにおいて、Tolvaptanの長期投与により腎臓の線維化抑制効果を認める事を報告している²⁰。腎不全状態においては、腎臓局所においてもバソプレッシン系が亢進し、病態進展と関与する可能性が示唆されており、V2受容体だけではなくV1a受容体を抑制する事で更なる腎臓保護効果を得ることができる可能性がある。これまでのV1a受容体拮抗薬の直接的な腎保護効果を検討した報告としては、Okada等が行った腎硬化症モデル²³やアドリアマイシンを投与した腎不全モデル¹³を用いた研究があり、尿蛋白の減少効果や腎線維化の予防効果が示されている。また腎臓におけるV1a受容体ならびに

V2受容体の分布は異なっており、主としてV1a受容体は血管および糸球体に多く発現し、V2受容体は集合管を中心とした尿細管上皮細胞に多く存在しているとされている。したがって、バソプレッシン系の活性化に伴う腎臓障害のメカニズムは部位により異なっていると推定され、V1a受容体に関してはメサンギウム細胞障害への関与が^{25,26}、V2受容体に関しては尿細管障害への関与が推測されている^{27,28}。本研究においても、心不全期の腎臓においてV1a受容体ならびにV2受容体の発現は亢進しており、腎臓局所におけるバソプレッシン系の亢進も認められた。その一方で、OPC21268投与により腎におけるコラーゲンの発現は抑制され、組織所見においても糸球体硬化、間質の線維化は抑制されていた。ただし、このような改善は、OPC21268の直接的な腎臓への作用だけではなく、心不全の改善（心拍出量の増加、うっ血の改善）や腎臓局所におけるRASなどの他の神経体液性因子の抑制効果などが関与した可能性も考えられる。

OPC21268とTolvaptanとの併用療法について

V2受容体拮抗薬であるTolvaptan投与を行った際に、血中バソプレッシン濃度が上昇する事が報告されており、結果として遮断されていないV1a受容体を介した効果が増強し、心不全に対して増悪因子として作用するという懸念がある²⁹。同様の現象は、OPC21268の投与に際しても推定される。この事から、理論的にはOPC21268とTolvaptanを併用する方が、心不全治療においてより効果的であると推測される。実際にV1aR受容体拮抗薬とV2受容体拮抗薬を併用する事で良好な結果を示したという実験結果が報告されており、心臓においては急性期心不全の改善効果や降圧効果^{11,30}、腎臓においては腎臓線維化の抑制、尿蛋白の減少効果が得られたとする報告がなされている^{23,31}。前述のごとく、心不全期における心臓においてはV1a受容体が主な治療のターゲットとなるが、腎臓においてはV1a受容体、V2受容体の両方が治療のターゲットとなっており、しかもそれぞれの作用と発現細胞は異なっている。この意味でもV1a受容体とV2受容体の両方の遮断により心腎保護作用は増強される可能性は高いものと考えられる。本研究においては、V1a受容体拮抗薬とV2受容体拮抗薬の相乗効果を示すことはできなかった。しかしながら、併用群において生命予後、心機能、心腎mRNA発現および組織障害の中のいくつかの所見は改善傾向を示している。またOPC21268投与群にて自由水クリアランスの低下、および腎臓におけるV2受容体発現の増加傾向等を認め、OPC21268投与によりV2受容体を介する効

果が増強されていた可能性がある。このことは Tolvaptan の併用により OPC21268 の腎臓に対する保護効果を増強していたことを示唆すると考えられる。今後、この併用療法の利点・機序を解明するために、薬剤投与期間の延長、用量調整や他の心不全モデルによる検討が必要であると考えられる。

結 語

高血圧性心不全モデルラットにおいて、V1a 受容体拮抗 OPC21268 の長期投与により、降圧とは関係なく心筋ならびに腎臓への保護効果が認められた。しかしながら、OPC21268 単独投与では予後改善効果を得るまでには至らなかった。さらに OPC21268 投与により得られた心臓と腎臓に対する保護効果および生命予後に対する効果は Tolvaptan との併用で増強されたが Tolvaptan 単独投与に勝る効果は得られなかった。OPC21268 は心臓および腎臓に直接作用し、一方 Tolvaptan は腎臓保護効果を介して間接的に心臓保護に働いたと推定される。

謝 辞

本研究施行にあたり、御指導・御協力をいただきました教室員各位に深謝いたします。また、村田敦子氏、近畿大学ライフサイエンス研究所 山中重明氏、水口信行氏、赤星保光氏、および大塚製薬株式会社 藤木浩之氏には格別の御指導・御協力をいただきましたことを、ここに深謝いたします。

文 献

- 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
- Schrier RW, Abraham WT (1999) Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med* 19: 577-585
- Matsui H, Kohmoto O, Hirata Y, Serizawa T (1992) Effects of a nonpeptide vasopressin antagonist (OPC-21268) on cytosolic Ca²⁺ concentration in vascular and cardiac myocytes. *Hypertension* 19: 730-733
- Hiroshima M, et al. (2007) Vasopressin promotes cardiomyocyte hypertrophy via the vasopressin V1A receptor in neonatal mice. *Eur J Pharmacol* 559: 89-97
- Fan YH, et al. (2007) Arginine vasopressin increases iNOS-NO system activity in cardiac fibroblasts through NF- κ B activation and its relation with myocardial fibrosis. *Life Sci* 81: 327-335
- Yan-ping H, et al. (2008) Mitogenic effect of arginine vasopressin on adult rat cardiac fibroblast: involvement of PKC-erk1/2 pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 52: 72-81
- Yan-Hong F, et al. (2010) Effects of arginine vasopressin on differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol* 55: 489-495
- Vaduganathan M, et al. (2012) Efficacy of oral tolvaptan in acute heart failure patients with hypotension and renal impairment. *J Cardiovasc Med* 13: 415-422
- 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
- Inoko M, Kihara Y, Morii I, Fujiwara H, Sasayama S (1994) Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol* 267: 2471-2482
- Naitoh M, et al. (1994) Effects of oral AVP receptor antagonists OPC-21268 and OPC-31260 on congestive heart failure in conscious dogs. *Am J Physiol* 267: 2245-2254
- Okada H, Suzuki H, Kanno Y, Saruta T (1995) Effects of novel, nonpeptide vasopressin antagonists on progressive nephrosclerosis in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 25: 847-852
- Okada H, Suzuki H, Kanno Y, Yamamura Y, Saruta T (1994) Effects of vasopressin V1 and V2 receptor antagonists on progressive renal failure in rats. *Clin Sci* 86: 399-404
- 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: 176-182
- Chandrasekhar Y, et al. (2003) The role of arginine vasopressin and its receptors in the normal and failing rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 35: 495-504
- 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
- L M Burrell, et al. (1993) Characterization of a novel non-peptide vasopressin V1 receptor antagonist (OPC-21268) in the Rat. *Journal of Endocrinology* 138: 259-266
- Hupf H, Grimm D, Riegger GA, Schunkert H. (1999) Evidence for a vasopressin system in the rat heart. *Circ Res* 84: 365-370
- Gózdź A, Szczepańska-Sadowska E, Szczepańska K, Maśliński W, Luszczuk B (2002) Vasopressin V1a, V1b and V2 receptors mRNA in the kidney and heart of the renin transgenic TGR(mRen2)²⁷ and Sprague Dawley rats. *J Physiol Pharmacol* 53: 349-357
- Morooka H, et al. (2012) Chronic administration of oral vasopressin type 2 receptor antagonist tolvaptan exerts both myocardial and renal protective effects in rats with hypertensive heart failure. *Circ Heart Fail* 5: 484-492
- Li X, et al. (2011) Controlled and cardiac-restricted overexpression of the arginine vasopressin V1A receptor causes reversible left ventricular dysfunction through G α q-mediated cell signaling. *Circulation* 124: 572-581

22. Morgan HE, Baker KM (1991) Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence. *Circulation* 83: 13-25
23. Goldsmith SR, Gilbertson DT, Mackedanz SA, Swan SK. (2011) Renal effects of conivaptan, furosemide, and the combination in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 17: 982-989
24. Bardoux P, Bruneval P, Heudes D, Bouby N, Bankir L (2003) Diabetes-induced albuminuria: role of antidiuretic hormone as revealed by chronic V2 receptor antagonism in rats. *Nephrol Dial Transplant* 18: 1755-1763
25. Jard S, Lombard C, Marie J, Devilliers G (1987) Vasopressin receptors from cultured mesangial cells resemble V1a type. *Am J Physiol* 253: 41-49
26. Okuda T, Yamashita N, Kurokawa K (1986) Angiotensin II and vasopressin stimulate calcium-activated chloride conductance in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 78: 1443-1448
27. Okada T, et al. (2009) Tolvaptan, a selective oral vasopressin V2 receptor antagonist, ameliorates podocyte injury in puromycin aminonucleoside nephrotic rats. *Clin Exp Nephrol* 13: 438-446
28. Bankir L, et al. (1993) Is the process of urinary urea concentration responsible for a high glomerular filtration rate? *J Am Soc Nephrol* 4: 1091-1103
29. Goldsmith SR (2006) Is there a cardiovascular rationale for the use of combined vasopressin V1a/V2 receptor antagonists? *Am J Med* 119: 93-96
30. Okada H, Suzuki H, Kanno Y, Saruta T (1995) Effect of nonpeptide vasopressin receptor antagonists on developing, and established DOCA-salt hypertension in rats. *Clin Exp Hypertens* 17: 469-483
31. Perico N, et al. (2009) V1/V2 Vasopressin receptor antagonism potentiates the renoprotection of renin-angiotensin system inhibition in rats with renal mass reduction. *Kidney Int* 76: 960-967