実験技術

カニクイザルを用いた、たこつぼ型心筋症モデル作製

泉 康雄

要約：たこつぼ型心筋症は、過度のストレスを受けることなどにより心尖部を中心に左室壁運動が低下する疾患だが、その発症機序は十分に解明されていない。我々は、雄性カニクイザルにエピネフリンの持続静脈内投与を2日 (Day 1, Day 2) 続けることで、Day 3 には、「たこつぼ型」心筋症モデルの作製に成功した。慢性心不全に対して有効である β 受容体遮断薬を単回投与 (Day 3) することで、心筋症後の左室駆出率をより早く改善させ、心尖部に認めたエピネフリンによる心筋障害を軽減させた。Day 4 の左心室心尖部では基部と比べて、エピネフリン投与で心不全関連遺伝子の増加、カルシウムシグナル関連遺伝子・ミトコンドリア機能関連遺伝子の減少傾向が見られ、 β 遮断薬による改善傾向を示す遺伝子を認めた。今回、サルのだこつぼ型心筋症モデルを確立した。このモデルは心不全に対する β 受容体遮断薬療法の薬理機序を明らかにする上で重要なツールとなると考えられる。

はじめに

1980年代に急性心筋梗塞に類似した胸部症状と心電図変化を有し、広範な可逆性の収縮能異常が存在し、急性期左室造影収縮末期像で「たこつぼ」に類似した形態を示した症例を「たこつぼ型心筋」と呼ぶようになった(1)。心電図上、虚血所見 (ST 上昇や陰性 T 波) を認め、左室壁運動が心尖部を中心に低下する疾患と定義される。成因については諸説がある。多枝冠動脈攣縮説 (多枝冠動脈攣縮の寛解後の気絶心筋)、微小循環障害説 (微小血管攣縮と冠予備能の低下)、カテコラミンによる心筋傷害説 (内因性カテコラミンの過剰分泌による心筋細胞内カルシウム過負荷) がある。実際、くも膜下出血時にたこつぼ型心筋障害を引き起こす症例をしばしば経験する。大災害時にもしばしば引き起

こされることから、ストレスが誘因でたこつぼ型心筋症が発症するとも言われている。しかしながら、急性期に血中カテコラミン値が高値を示さない症例や、内因性カテコラミンが上昇している重症疾患にたこつぼ型心筋症が頻発していないといったことから、詳細な発症機序は未だ解明されていない。

たこつぼ心筋症は、心尖部の壁運動異常を認める部位で分類される。心尖部領域は無収縮で心基部は正常～過収縮のものは「古典的」、心尖部領域は正常～過収縮で心基部は無収縮のものは「逆」、心尖部と心基部は正常～過収縮で心中部が無収縮のものは「スベード型」と呼ばれることがある。

これまで、げっ歯類を用いた同モデル作製が試みられており、Kvetnansky らは、ラットをストレス下 (拘束) にすることで同モデルを作製している(2)。たこつぼ型心筋症は閉経後の女性に多いことが知られており、女性ホルモンの関与も示唆されている。Kvetnansky らのモデルに対して、アドレナリン受容体拮抗薬の投与が有効であることがわかっているが、上山らはエストロゲンを補充することでも左室機能障害 (特に頻脈) を抑制することができ、交感神経ニューロンの活性を抑えることもできると報告した(3)。しかしながら、げっ歯類にエピネフリンを過剰投与しても「たこつぼ型心筋症」を呈しない (我々の検討でも、全例、急性心不全で死亡した)。「拘束」というかなり特殊な状況下以外でのモデル確立には至っていない。そこで、ヒトに近い霊長類 (カニクイザル) を用いて、たこつぼ型心筋症モデル作製を試みた。

1. エピネフリン反復投与によるたこつぼ型心筋症モデルの作製

本研究は、株式会社新日本科学安全性研究所 (鹿児島

キーワード：たこつぼ型心筋症、エピネフリン、 β 遮断薬

大阪市立大学 大学院 医学研究科 分子病態薬理学 (〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町 1-4-3)

E-mail: izumi@msic.med.osaka-cu.ac.jp 原稿受領日：2010 年 4 月 21 日、依頼原稿

Title: A new model of Takotsubo-like left ventricular dysfunction in cynomolgus monkey. Author: Yasukatsu Izumi

島)にて行った。検疫済みの雄性カニクイザル(3～8才, 中国産)を使用し, 実験動物安全指針に従った。飼育はケージ(63×76×76 cm)で行い, 室温26度, 湿度50%, 照明時間は午前6時から午後6時とした。カニクイザルの心機能は, イソフルラン吸入麻酔下にてreal-time (RT) 3D心エコー (SONOS 7500, Philips Med. Sys., USA)を用いて評価した。同時に循環動態をモニターしながら, エピネフリン(10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)を24時間間隔で3時間持続静脈内投与を2回行う (Day 1 および Day 2) ことで作製した(4)。

モデルの成否は, エピネフリンの2回目投与24時間後 (Day 3) の左室駆出率をRT3D心エコーで測定し, 40%以下の動物を心不全モデル成功とした。左心室の機能測定には, RT3D心エコーで左心室の容積変化を求めた。イメージデータは, 専用に解析ソフトを用いて, 左心室の拡張末期容積, 収縮末期容積, 1回拍出量および駆出率を求め, さらに心拍出量を算出した。エピネフリン投与中あるいは直後に心室細動などの致死性不整脈を呈して死亡するサルも認めたが, 図

1に示すように, 左心室で基部(矢印部)は正常壁運動を認めた一方で心尖部の壁運動がほとんど認められない「たこつぼ型心筋症」を呈した。その後, 1ヶ月 (Day 33) まで経時的に測定したが, ヒトと同様, 非投薬でも徐々に心機能が回復し, Day 33での駆出率は約50%まで改善した (図2)。

正常状態のカニクイザルにエピネフリンを反復投与 (Day 1 および Day 2) することにより (E群), 2回目投与24時間後 (Day 3) の心エコーでは「たこつぼ型」の心尖部領域の壁運動低下を呈し, 左室駆出率は約30%にまで低下した。この「たこつぼ型」心不全モデルに対してDay 3にメトプロロール (0.3 mg/kg/10 min 静脈内) を投与 (M群) することで駆出率は有意に改善した。1ヵ月の経過観察において, 非投薬群も徐々に心機能が回復するが, メトプロロール投与群では, 心機能の改善が早かった (図2)。

また, エピネフリン投与群 (E群) ではコントロール群 (C群) の心筋逸脱酵素 (AST, CPK など) の上昇が見られた。

図1 エピネフリン反復投与による「たこつぼ型心筋症」モデル

左心室基部(矢印)では正常壁運動を認めるが, 心尖部(*)ではほとんど壁運動が認められない。

図2 「たこつぼ型心筋症」モデル作製後の心機能(左室駆出率)の経時的変化

メトプロロール (Met) あるいは生食 (saline) は Day 3 にのみの単回投与。

2. β 遮断薬の効果

アドレナリン受容体遮断薬はヒトたこつば型心筋症に用いられることから、 β 受容体遮断薬の効果について検討した。Day 3で「たこつば型」心不全を呈したサルに対して、メトプロロール (0.3 mg/kg) を 0.1 ml/kg/min の割合で静脈内に 20 分間投与した (単回投与; E+M 群)。投与後 30 分後, 2 時間後, 24 時間後, および 10 日後, 30 日後に RT3D 心エコーにより心機能を評価した。E 群と比べて, 駆出率は有意に改善し, 1 ヶ月の駆出率は約 56% にまで改善した (図 3)。

Day 4 において, エピネフリン投与群で上昇した心筋逸脱酵素は, メトプロロール投与による明らかな変化は認められなかった。

3. 網羅的遺伝子発現解析

メトプロロール投与で駆出率に改善を認めた Day 4 において, 心臓を左右の心房, 右心室, 心室中隔, 左心室自由壁に分けた。心尖部の壁運動が他の部位に比べて著しく動きが弱いことから, 心室中隔と左心室自由壁は心尖部, 中間部, 基部の 3 部位に分けた。それぞれの部位間で遺伝子発現解析と受容体の解析と組織学的解析を行い, 比較検討を行った。

cDNA マイクロアレイ解析用に心臓を摘出後, 速やかに各部位の組織を液体窒素で瞬間凍結する。QIAGEN RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出後アフィメトリックス社製の Rhesus Macaque Genome Array を使用して遺伝子発現を網羅的に解析した。

マイクロアレイ法 (各群 $n=3$ を一纏め) の結果, C 群心尖部に比べて E 群心尖部における遺伝子発現が 2 倍以上のものは約 2500 遺伝子, 0.5 倍以下のものは約 600 遺伝子であった。その中で, 基部で同様に変動

している遺伝子を除くと, それぞれ約 2000 遺伝子, 約 550 遺伝子となった。基部に比べて心尖部では, エピネフリン投与による発現が変動する遺伝子が多いこともわかった。

心不全時には脳性利尿ペプチド (BNP) 発現が増加することがすでに知られている。そこで, BNP の増加度を基準にして他の収縮関連遺伝子, カルシウムチャネルタンパク質遺伝子の発現量を測定した。細胞内カルシウム調節に関与するタンパク質は, 細胞外膜の L 型電位依存性カルシウムチャネル, 筋小胞体のリアノジン受容体 (RyR2), sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA2) などの遺伝子発現を検討した。また, レニン・アンジオテンシン系の関与を調べるため, angiotensinogen (AGT) や angiotensin II receptor (AGTR1 および AGTR2) などの遺伝子発現を検討した。心臓の代謝機能に関与する superoxide dismutase 2 や cytochrome c (CYCS), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) などの遺伝子発現について検討した。上述の遺伝子については定量リアルタイム PCR 法により, 各個体 ($n=4-5$) における発現を調べた。

C 群に比べて E 群では, BNP は心尖部・基部ともに発現亢進が見られたが, 心尖部の方がより強かった。心不全時の発現亢進が知られている CTGF やオステオポンチン (OPN) は, 心尖部においてのみ E 群での発現亢進を認めた。E+M 群では OPN の発現亢進が E 群に比べて有意に抑制していた。

細胞内カルシウム調節に関与する RyR2 や SERCA2 発現は E 群心尖部で有意に減少しており, E+M 群では改善傾向を認めた。E 群基部での SERCA2 発現は心尖部と反対に増加しており, E+M 群ではその増加が抑制された。

レニン・アンジオテンシン系関連遺伝子の AGT, AGTR2 は E 群心尖部で発現亢進し, AGTR1 発現は減弱していた。一方, 基部においては C 群と比して E 群で有意な変化は認めなかった。

代謝関連遺伝子の PGC-1 やアポトーシスに関連する CYCS 発現は E 群心尖部で有意に抑制され, E+M 群では改善傾向を示した。

4. 組織化学的解析

Day 4 の心臓各部位の一部を凍結切片用ブロックとし, luxol fast blue 染色を行った。この染色では, 正常心筋は桃色に染まり, 心不全による障害心筋は青染することが知られている。同染色により, E 群心尖部では, 障害心筋を示唆する青染する箇所がまばらに見ら

図 3 Day 4 における左室駆出率
 $n=4-5$

図4 luxol fast blue 染色像

C：コントロール群，E：エピネフリン投与群，E+M：エピネフリン+メトプロロール投与群。（矢印が青染部）

れた。E+M 群心尖部では E 群で認めた青染は殆ど見られなかった。また，基部では E 群を含め，全く青染されなかった（図 4）。

おわりに

ヒトたこつぼ型心筋症に類似したモデルを初めてサルで作製することに成功した。この病態はエピネフリンを反復投与することにより確立できたと考える。今回作成したカニクイザル心不全モデルは，たこつぼ型

心筋症モデルの機序や β 遮断薬療法を含めた治療応用の可能性を探る上で重要なツールの一つとなると考えられる。

文 献

- 1) 佐藤 光, 他. 多枝spasmにより特異な左心室造影像「ツボ型」を示したstunned myocardium. 科学評論社; 1990. p. 56-64.
- 2) Kvetnansky R, et al. Endocrinology. 1970;87(4):744-749.
- 3) Ueyama T, et al. Circ J. 2007;71(4):565-573.
- 4) Izumi Y, et al. Hypertens Res. 2009;32(5):339-346.