

平成17年度 心臓病の先駆的研究助成事業

心臓老化の仕組みの解明と高齢者心不全治療への応用

所属研究機関 北里大学医学部内科学

研究者名 塩井 哲雄

## 【研究の概要】

背景：インスリン・シグナル伝達経路は線虫やショウジョウバエなどのモデル動物の寿命を調節する。Target of Rapamycin (TOR)はアミノ酸やATPによって活性化され、インスリン・シグナル伝達経路の活性を調節する。TORの活性制御もショウジョウバエの寿命を延長させ、またラパマイシンは培養細胞に加えると、培養細胞をカロリー制限したものと近似した遺伝子発現パターンをとることが知られている。一般的に寿命延長にはたらく操作は臓器保護的に働くことが多い。TORの心不全における役割を検討するため、ラット自己免疫性心筋炎モデルにラパマイシンを投与した。

方法と結果：自己免疫性心筋炎において mTOR の役割を調べるために、ラパマイシンを心筋ミオシンで免疫したラットに投与した。mTOR の標的分子である p70 ribosomal S6 kinase 1 (S6K1)のリン酸化はミオシン免疫ラットの心筋組織において対照の6.9倍に増加した。ラパマイシン(2 mg/kg/day) は S6K1 と S6 のリン酸化を完全に抑制した。心筋組織におけるインターロイキン-1 $\beta$ 、インターフェロン- $\gamma$ 、インターロイキン-2、腫瘍壊死因子- $\alpha$  の mRNA はミオシン免疫ラットで著明に増加し、ラパマイシンはこれらのサイトカインの発現を抑制した。ラパマイシンはラットの死亡率を改善させるとともに心機能を改善した。血漿脳性ナトリウム利尿ホルモンはミオシン免疫ラットでは4.7倍増加したが、ラパマイシンはこの上昇を抑制した。心重量/脛骨長比は溶媒投与ミオシン免疫ラットでは溶媒投与ミオシン非免疫ラットに比べ $1.81 \pm 0.06$ 倍に増加したが、ラパマイシンはこの心重量の増加を抑制した。ラパマイシンは心筋の細胞浸潤と線維化を減少させた。S6蛋白のリン酸化はミオシン免疫ラットの心筋組織において浸潤している単核球で亢進していた。

考察：申請者は、ラパマイシンが圧負荷による心肥大を予防し、圧負荷による心肥大を退縮し心機能を改善すると報告している。今回の検討で、ラパマイシンは自己免疫性心筋炎モデルラットの心筋傷害を著明に減少させ心機能を改善した。また、申請者は、ラパマイシンは甲状腺機能亢進症モデルの心肥大を予防し、拡張型心筋症モデルの心肥大を改善することも見いだしている。

結論：ラパマイシンは心不全治療薬としての可能性が示された。

塩井 哲雄      北里大学医学部内科学助手      研究全般の実施と総括

和泉 徹      北里大学医学部内科学教授      研究全般への助言

## 【研究報告】

### I 研究目的

心不全は高齢者に多くみられる加齢関連疾患であり、その管理は健康政策上の大きな問題である。心臓は老化に伴い、心筋組織の線維化や心筋細胞肥大などの病理学的変化を起こすことはよく知られているが、その機序は明らかでない。

あらゆる動物においてカロリー制限は動物の寿命を延長させる。また、インスリン・シグナル伝達経路は線虫やショウジョウバエなどのモデル動物の寿命を調節する (*Science* 299:1346;2003)。Target of Rapamycin (TOR)はアミノ酸やATPによって活性化され、インスリン・シグナル伝達経路の活性を調節する。TORの活性制御もショウジョウバエの寿命を延長させ、またラパマイシンは培養細胞に加えると、培養細胞をカロリー制限したものと近似した遺伝子発現パターンをとることが知られている (*Mol Cell Biol.* 22:5575;2002)。よって哺乳動物個体レベルでもラパマイシンはカロリー制限と近似した作用を持ち、老化予防に働く可能性がある。また、老化予防に働く遺伝学的操作は臓器保護に働くことから、老化予防の研究は疾患の治療に結びつく可能性がある (*Science* 305:1010;2004)。

申請者は、インスリン・シグナル伝達経路の心臓の大きさと機能を調節することを明らかにしてきた (Shioi et al. *EMBO J.* 19:2537;2000, Shioi et al. *Mol Cell Biol.* 22:2799;2002, Crackower et al. *Cell* 110:737;2002, McMullen, Shioi et al. *Proc Natl Acad Sci.* 100:12355;2003, McMullen, Shioi et al. *J Biol Chem.* 279:4782;2004, McMullen, Shioi et al. *Mol Cell Biol.* 24:6231;2004)。また、TORの働きを特異的に阻害するラパマイシンが大動脈縮窄による心肥大を予防し (Shioi et al. *Circulation* 107:1664;2003)、すでに完成された心肥大を退縮させ心機能を改善すると報告した (McMullen et al. *Circulation* 109:3050;2004)。本研究ではインスリン・シグナルを標的とし、高齢者の心不全に対する新しい予防、診断、治療法を開発する。

本年度は、主に、自己免疫性心筋炎による心不全モデルに対するラパマイシンの効果を検討した。

### II 研究計画および材料と方法

#### 1. 自己免疫性心筋炎ラットの作成

8週齢のメス Lewis ラットに対しブタ心臓より単離した心筋ミオシン 5 mg/mL を皮下注射し、実験的自己免疫性心筋炎 (Experimental Autoimmune Myocarditis, EAM) ラットを作製した。

#### 2. ラパマイシンの投与方法

実験 1: S6K1、S6 蛋白、Akt や extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化を調べるため、ミオシン免疫、ミオシン非免疫ラットを免疫後 5、9、14、19 日目に屠殺した。

実験 2: S6K1、S6 蛋白、Akt や ERK のリン酸化に対するラパマイシンの効果を検討するため、ラパマイシンあるいは溶媒をミオシン免疫ラット、非免疫ラットそれぞれに経口投与し、14 日目に屠殺した。ラパマイシン(2 mg/kg/day)はミオシン免疫より 3 日前からミオシン免疫 14 日目まで毎日投与した。

実験 3: ラパマイシンの EAM ラットの疾病過程に対する効果を確認するために、ラパマイシンをミオシン免疫、非免疫ラットに対し 19 日間投与した。ラパマイシンは免疫 3 日前からミオシン免疫後 19 日目まで経口投与した。生存率をモニターし、19 日目に心臓超音波検査を施行後、屠殺した。体重、心重量、肺重量、脛骨長を測定した。心臓組織はウェスタン・ブロット法、定量的 PCR 法、組織学的検索に用いた。

### 3. 血行動態測定

収縮期血圧(SBP)、心拍数(HR)はテイルカフ法(Softron BP-98A、Tokyo、Japan)によって測定した。

### 4. 心臓超音波検査

ミオシン免疫 19 日目に ProSound SSD-4000 (ALOKA、Tokyo、Japan) を使用し経胸壁心臓超音波検査を行った。ラットは 2-2-2 tribromoethanol (Aldrich、0.4-0.6 mg/kg) にて麻酔した。乳頭筋レベルの M モードエコーにて左室拡張末期径(left ventricular end-diastolic dimension、LVDd)、収縮末期径(left ventricular end systolic dimension、LVDs)、左室後壁厚(left ventricular posterior wall thickness、LVWT)、短縮率(fractional shortening、FS) の計測を行った 20,21。

### 5. ウェスタン・ブロット法

ラット心臓より心臓溶解液を抽出し、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行い、蛋白を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Immobilon-P、Millipore Corporation、Bedford、MA) に転写した 20。p70S6K のリン酸化を分析するため、抗リン酸化 p70S6K (Thr 389) 抗体 (1:200; Cell Signaling、Beverly、MA) と抗 p70S6K 抗体 (1:200、Santa Cruz、CA) を用いた。S6 のリン酸化を調べるため、抗リン酸化 S6 蛋白 (Ser 235/236) 抗体 (1:500、Cell Signaling) と抗 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 抗体 (GAPDH、1:5000、Research Diagnostics、Flanders、NJ) を用いた。Akt リン酸化を調べるために、抗リン酸化 Akt (Ser 473) 抗体 (1:500、Cell Signaling) と抗 Akt 抗体 (1:500、Cell Signaling) を用いた。ERK のリン酸化を調べるために 抗リン酸化 ERK 抗体 (1:200、Santa Cruz) と抗 ERK2 抗体 (1:200、Transduction Lab.、Lexington、KY) を用いた。

### 6. 定量的 PCR 法

心臓組織より acid guanidinium-phenol-chloroform 法を用いて総 RNA を単離した。random hexamers (TaqMan Gold RT-PCR Kit; Applied Biosystems、Foster City、CA) を用い、RNA (1  $\mu$ g) を cDNA に逆転写した。ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用した real-time PCR 法にて interleukin (IL)-1 $\beta$ 、interferon (IFN)- $\gamma$ 、IL-2 そして tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  の mRNA 量を定量し

た。

## 7. 組織学的検査

ラットは 19 日目に屠殺し、取り出した心臓を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィンで包埋し切片を作成した。切片はヘマトキシリン・エオジン染色あるいはマロリー・アザン染色を行った。炎症細胞浸潤や心筋壊死はHE染色切片にて評価した。線維化の程度はアザン染色にて評価した。心臓組織全体に対する炎症または線維化の程度を MacSCOPE image processing software (Mitani Corp., Tokyo, Japan) を用い定量した。

## 8. 脳性ナトリウム利尿ペプチド

血中の脳性利尿ペプチド (BNP) 濃度は ELISA 法(BNP-32 Rat RIA Kit, Peninsula Laboratories, San Carlos, CA)を用いて測定した。

## 9. 免疫染色

凍結標本を 4~10  $\mu$  m の切片とした。組織は 4°C のアセトンで 10 分間固定した。抗リン酸化 S6(Ser 235/236)抗体(1 : 100)を一次抗体として使用した。4°C で一晩一次抗体と反応させた。二次抗体(抗ラビット抗体、1 : 300)は室温 30 分間反応させた。アビチン-ビオチン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体を反応させた後、3', 3' -ジアミノベンジチンにて可視化した。対比染色はヘマトキシリンで行った。

## III 研究成果

### 1. EAM ラットにおける S6K1 と S6 のリン酸化

はじめに mTOR のターゲットとなる S6K1 が実験的自己免疫性心筋炎において活性化されるかを調べた (実験 1)。ミオシン免疫あるいは非免疫ラットを 5、9、14、19 日目で屠殺した。ミオシン免疫ラットでは免疫後 14 日、19 日目において S6K1 のリン酸化が非免疫ラットに比べ増加していた。S6K1 のリン酸化は 14 日目において最も増加していた。心筋炎に対する反応において心臓組織での S6K1 の活性を確かめるため、S6 蛋白のリン酸化を測定した。免疫後 19 日目において S6 蛋白のリン酸化は増加した。Akt は PI3K 経路の主たる標的分子であるが、変化はほとんど認められなかった。ERK のリン酸化は PI3K 経路では調節されないが、これも有意な変化を認めなかった。

### 2. S6K1 と S6 蛋白のリン酸化に対するラパマイシンの効果

次に S6K1、S6 蛋白、Akt そして ERK のリン酸化に対するラパマイシンの効果を検討した(実験 2)。S6K1 リン酸化は免疫後 14 日目に最も上昇するので、この時点でのラパマイシンの S6K1 リン酸化への効果を検討した。ラパマイシン(2 mg/kg/day) は S6K1 のリン酸化を完全に抑制した。ラパマイシンは S6 蛋白のリン酸化も完全に阻害した。同時期における Akt リン酸化を測定したが、ラパマイシン治療は Akt のリン酸化に影響を与えなかった。ラパマイシンは ERK のリン酸化にも影響を与えなかった。

### 3. EAM ラットの生存率や心重量に対するラパマイシンの効果

ラパマイシンが自己免疫性心筋炎の発症を抑制するかを調べるため、ラパマイシンあるいは溶媒をミオシン免疫あるいは非免疫ラットに 19 日間投与した (実験 3)。ラパマイシンは心筋炎での死亡率を改善した。0/10 匹溶媒投与非免疫ラット、19/46 匹溶媒投与ミオシン免疫ラット、0/15 匹ラパマイシン投与非免疫ラット、0/19 匹ラパマイシン投与ミオシン免疫ラットが免疫後 19 日以内に死亡した。ラットはミオシン免疫後 19 日目に屠

殺した。溶媒投与ミオシン免疫ラットの重量/脛骨長比は非免疫群に比べ  $1.81 \pm 0.06$  倍増加していた (表 1)。対してラパマイシン投与ミオシン免疫ラットではラパマイシン投与非免疫ラットに比べ  $1.09 \pm 0.04$  倍の増加であった。

#### 4. 血行動態に与えるラパマイシンの効果

ラパマイシンが EAM の血行動態に与える効果を確認するためにテイルカフ法にて血圧を測定した。収縮期血圧は溶媒投与ミオシン免疫ラットではミオシン非免疫ラットに比べ低下していた。ラパマイシンは収縮期血圧の低下を防いだ。

#### 5. ラパマイシンが心筋の炎症や線維化に与える影響

ミオシン免疫あるいは非免疫ラットに対し、ラパマイシンあるいは溶媒を投与した (図 4)。免疫後 19 日目にラットを屠殺した。心臓切片はヘマトキシリン・エオジン染色あるいはマロリー・アザン染色を施した。ヘマトキシリン・エオジン染色を用いて、炎症細胞浸潤の広がりを検討した。マロリー・アザン染色にて線維化の程度を検討した。溶媒投与ミオシン免疫ラットにおける細胞浸潤面積は  $27.7 \pm 4.0$  % であった。ラパマイシン投与を受けたラットの細胞浸潤面積は  $9.4 \pm 1.6$  % であった。溶媒投与ミオシン免疫ラットの線維化面積は  $32.8 \pm 2.1$  % であり、ラパマイシン投与により  $12.6 \pm 1.4$  % であった。よって、ラパマイシンは EAM ラットの心筋における炎症と線維化を減少させた。

#### 6. EAM ラットの心機能に対するラパマイシンの効果

免疫後 19 日目においてラパマイシンが心機能に与える効果を心臓超音波検査によって調べた。溶媒投与ミオシン免疫ラットでは溶媒投与ミオシン非免疫ラットに比べて左室拡張末期径 (LVDd) は 1.4 倍、左室壁厚 (LVWT) は 1.6 倍増加した。ラパマイシンはミオシン免疫ラットにおいて LVDd と LVWT を著明に減少させた。心収縮性は短縮率 (FS) にて評価した。溶媒投与ミオシン免疫ラットではミオシン非免疫ラットに比べ FS は 79% に減少したが、ラパマイシン投与により FS の減少は防がれた。FS は非免疫ラットにおいては溶媒投与、ラパマイシン投与とも変化を認めなかった。よって、ラパマイシンは心室拡大を抑制し、心機能を保護した。

#### 7. EAM ラットの炎症性サイトカイン発現に対するラパマイシンの効果

サイトカインは EAM の病因において重要な役割を担う 22,23。EAM において、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2、そして TNF- $\alpha$  の mRNA 発現は疾病発生時から上昇すると報告されている。我々は免疫後 14 日目のサイトカイン発現を量的 RT-PCR を用いて調べた。溶媒投与ミオシン免疫ラットにおいて IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2、そして TNF- $\alpha$  の mRNA 発現は著明に増加した。ラパマイシンはこれら炎症性サイトカインの mRNA 発現を有意に低下させた。

#### 8. EAM ラットにおける脳性利尿ペプチドに対するラパマイシンの効果

BNP は心臓神経ホルモンで、心室の用量性拡大や圧負荷に対する反応として心室から分泌される 25,26。BNP 値は左室機能不全の患者において上昇することが示されており、心不全患者の予後と重症度に相関する 27。我々は血漿脳性ナトリウム利尿ホルモン (BNP) 値を ELISA 法により測定した。BNP 値は溶媒投与ミオシン免疫ラットではミオシン非免疫ラットに比べ 4.7 倍増加した。ラパマイシンは 2.1 倍の上昇に減少させた。このようにラパマイシンは心筋炎による心不全を抑制した。

#### 9. 血液生化学検査

血清クレアチニン (Cr)、血液尿素窒素(BUN)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、総コレステロール (T-Cho)、中性脂肪 (TG) そして血糖値を測定した。ラパマイシン投与ミオシン免疫ラットの血清クレアチニンは溶媒投与ミオシン免疫ラットと比べて軽度かつ有意に上昇した ( $0.303 \pm 0.017$  vs.  $0.253 \pm 0.012$  mg/dL)。総コレステロール値はミオシン免疫ラットでは減少したがラパマイシンラットでは総コレステロール値は保たれた。ラパマイシンは非免疫ラットにおいて血糖値を上昇させた。AST は溶媒投与ミオシン免疫ラットでは非免疫ラットに比べて増加した。これはおそらく肝臓うっ血によるものと思われる。ラパマイシン治療は AST の増加を抑制した。

#### 10. S6 蛋白リン酸化の免疫染色

活性化されている細胞の種類を確認するため、抗リン酸化 S6 蛋白抗体を用いて免疫染色を行った。溶媒投与ラパマイシン免疫ラットでは浸潤している単核球において S6 蛋白のリン酸化が認められた。

### IV 考察

本研究において、S6K1 や S6 蛋白のリン酸化はミオシン免疫ラットの心臓組織において増加し、ラパマイシンはこのリン酸化を完全に抑制した。ラパマイシンは EAM ラットのサイトカイン遺伝子発現を有意に抑制した。ラパマイシンは生存率を改善させ、心機能を保持し、血漿 BNP 濃度の増加を抑制した。ラパマイシンは心筋の炎症と線維化を改善させ、ほぼ完全に心重量の増加を防いだ。ラパマイシンが自己免疫性心筋炎の治療薬となる可能性が示唆された。

ラパマイシンは免疫抑制剤であり、サイトカイン発現とリンパ球の増殖を抑制する 5。ラパマイシンは自己免疫性疾患の動物モデルにおいて疾患の進行を抑制することが知られている。本研究でリンパ球から産生される IL-2 や IFN- $\gamma$  の発現はラパマイシンにより減弱した。S6 蛋白リン酸化は主に浸潤単核細胞で亢進していたが、ラパマイシンはこの S6 蛋白リン酸化を減少させた。よって、ラパマイシンの効果の少なくとも一部はリンパ球の増殖とサイトカインの産生を阻害するにあるものと思われる。

ラパマイシンは強力な免疫抑制剤として知られている。この実験においては、ラパマイシンは心筋の炎症を有効に抑制した。しかし、ラパマイシン治療動物において有意な細胞浸潤が認められた(溶媒投与ミオシン免疫ラット  $27.7 \pm 4.0$  %、ラパマイシン投与ミオシン免疫ラット  $9.4 \pm 1.6$  %)。ラパマイシンはほかの免疫抑制剤との相乗作用により、より効果的に免疫反応を抑制する。自己免疫性心筋炎に対してラパマイシンもほかの免疫抑制剤との併用が有効となる可能性がある。

ヒトの心筋炎において免疫抑制剤が効果的であるかについての結論は得られていない 35。いくつかの免疫抑制剤は自己免疫性心筋炎において効果的に心筋傷害を軽減させる。一方、ウイルス性心筋炎ではサイクロスポリンやプレドニゾロンなどの免疫抑制剤投与は心筋傷害を増悪させる。また、EAM モデルにおいて、心筋炎が発症した後にもラパマイシンが心不全を改善するかも検討される必要がある。

申請者らは他の心不全モデルに対するラパマイシンの効果をさらに検討している。甲状腺機能亢進症は心肥大や心不全の原因となる。マウスに甲状腺ホルモンを 2 週間投与する

と心重量は 27%増加した。PI3K の活性を阻害する **dominant-negative PI3K** を心筋特異的に発現したトランスジェニックマウスに甲状腺ホルモンを投与した場合の心重量の増加は、9%であった。また、野生型マウスに甲状腺ホルモンを投与すると心重量は 27%増加したが、ラパマイシンを同時に投与することにより心重量の増加は 9%に抑えられた（投稿準備中）。また拡張型心筋症モデル動物である心筋症ハムスターにラパマイシンを投与したところ、心筋症ハムスターにみられる心肥大の退縮がみられた（投稿準備中）。

これまでの申請者による研究から、ラパマイシンによる **mTOR** の活性の抑制により、圧負荷、心筋炎、甲状腺ホルモンによる心肥大と心拡大を有意に軽減することが明らかとなった。ラパマイシンは心臓リモデリングを修飾し心不全治療薬となる可能性があると考えられる。

#### V 研究成果の発表

1. Kosugi R, Shioi T, Watanabe-Maeda K, Yoshida Y, Takahashi K, Machida Y, Izumi T. Angiotensin II receptor antagonist attenuates expression of aging markers in diabetic mouse heart. *Circ J.* 2006; 70: 482-8.
2. Ha T, Li Y, Gao X, McMullen JR, Shioi T, Izumo S, Kelley JL, Zhao A, Haddad GE, Williams DL, Browder IW, Kao RL, Li C. Attenuation of cardiac hypertrophy by inhibiting both mTOR and NFkappaB activation in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2005; 39:1570-80.
3. Maeda K, Shioi T, Kosugi R, Yoshida Y, Takahashi K, Machida Y, Izumi T. Rapamycin ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *Int Heart J.* 2005; 46:513-530.
4. 塩井哲雄, 吉田友紀. mTOR と心筋障害. *分子心血管病* 2005; 6: 261-265.