

学位論文（博士）

Dantrolene improves left ventricular diastolic property in mineralcorticoid-salt-induced hypertensive rats

（ダントロレンはミネラルコルチコイドおよび塩分負荷による高血圧モデルラットにおいて左室拡張特性を改善する）

氏名 縄田 純也

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 器官病態内科学講座

令和6年 1月

目 次

第 1 章 要旨.....	4
第 2 章 序論.....	4
第 3 章 研究方法.....	5
3-1 試薬および抗体.....	5
3-2 動物モデル.....	5
3-3 血圧測定.....	6
3-4 心エコー図検査.....	6
3-5 心臓の組織学的評価.....	6
3-6 左室スティフネスの測定.....	6
3-7 心筋細胞の単離.....	7
3-8 免疫染色による内因性 RyR 結合 CaM の解析.....	7
3-9 Ca^{2+} スパークおよび筋小胞体 (SR) Ca^{2+} 貯蔵量の解析.....	7
3-10 心筋細胞における Ca^{2+} トランジェントのモニタリング.....	8
3-11 統計処理.....	8
第 4 章 結果.....	8

4-1	DANにより e' は増加し、血圧の変化を伴うことなく左室壁厚は縮小した。...	8
4-2	DAN は UNX+DOCA-salt モデルにおいて左室線維化およびスティフネス増大を抑制した。.....	10
4-3	DAN は UNX+DOCA-salt モデルの単離心筋細胞において弛緩能を改善した。...	10
4-4	DAN は UNX+DOCA-salt モデルにおいて異常 Ca^{2+} 漏出を抑制し、自発的 Ca^{2+} トランジェント (SCaT) を予防した。.....	12
4-5	RyR2 に結合した内因性 CaM は UNX+DOCA-salt 群の単離心筋細胞で低下していた。.....	12
第 5 章 考察.....		14
5-1	DAN は異常 Ca^{2+} 漏出を抑制し心筋弛緩能を改善した。.....	14
5-2	DAN は左室受動的スティフネスに影響を与える左室線維化を抑制した。.....	14
5-3	DAN は CaM の核内移行を妨げ、心筋肥大を抑制した。.....	14
第 7 章 結語.....		15
第 8 章 謝辞.....		15
第 9 章 参考文献.....		15

第1章 要旨

左室拡張機能障害は左室駆出率が保たれた心不全 (HFpEF) において頻度を増してきており、新たな薬物療法が望まれている。我々はダントロレン (DAN) が、2型リアノジン受容体 (RyR2) の四量体構造を安定化させ、圧負荷により惹起された心不全における心肥大シグナリングを抑制することを報告した。心肥大は左室拡張特性に強く影響を与える。そこで我々は HFpEF としての特徴をもった、塩分およびミネラルコルチコイドで惹起された高血圧モデルラットに対して DAN が及ぼす効果について検討することとした。

8週齢、オスの Sprague-Dawley (SD) ラットに対して右片腎摘出 (UNX) を行い、200 mg の酢酸デオキシコルチコステロン (DOCA) を含有したペレットを皮下に植え込み、0.9%食塩水を投与した (UNX+DOCA-salt)。UNX を行い、DOCA を含まないペレットを植え込み、0.9%食塩水負荷を行わない群を対照群として設定した (UNX control)。UNX control 群および UNX+DOCA-salt 群に 100 mg/kg/日の DAN を経口投与し、効果の検証を行った (UNX-DAN および UNX+DOCA-salt+DAN)。

UNX+DOCA-salt では軽度の高血圧が認められた。UNX+DOCA-salt ラットへの DAN 慢性投与 (UNX+DOCA-salt+DAN) は、血圧には影響を及ぼさなかった。DAN での治療は UNX+DOCA-salt 群において拡張早期僧帽弁輪弛緩速度の増加をもたらした。DOCA-salt 群では心筋細胞のサイズ増大が観察されたが、DAN 治療群では増大が抑制されていた。左室線維化面積は UNX+DOCA-salt 群と比較して、UNX+DOCA-salt+DAN 群で有意差をもって小さかった ($2.0 \pm 0.2\%$ vs $4.0 \pm 0.4\%$)。左室スティフネスは UNX+DOCA-salt 群で増大しており、DAN 治療群では増大が抑制されていた。DAN は心筋の弛緩能および左室スティフネスの両面から左室拡張特性を改善した。DAN は HFpEF における新たな治療の選択肢となる可能性がある。

第2章 序論

左室駆出率が保たれた心不全 (HFpEF) はますます増加しており、心不全患者の増加をもたらしている [1, 2]。近年、エンパグリフロジンが HFpEF に伴う心血管死および入院を抑制することが報告された [3]。しかしながら、しばしば心肥大によって引き起こされる、HFpEF 患者における拡張障害に対する至適薬物療法はまだ確立されていない [4]。

圧負荷による肥大シグナリングを引き起こす重要な機序として我々はこれまで 2型リアノジン受容体 (RyR2) からのカルモジュリン (CaM) の解離を報告した。そして、カルモジュリンの核内移行は圧負荷による肥大において中心的な役割を担っている [5]。さらに我々は RyR2 から解離した CaM が、異常な Ca^{2+} 漏出とともに 2つの Ca^{2+} 依存性肥大シグナリングである CaM 依存性キナーゼ II (CaMK II) -ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) および活性化

T細胞核内因子 (NFAT) を活性化させることを報告した [6]。これらのことから、CaM と RyR2 間の結合親和性の低下がこれら 2つの主要な肥大シグナリング経路の中心的なファクターであることが強く示唆された。そこから、我々はダントロレン (DAN) が心不全 [7] や肺高血圧症 [8]、カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 [9, 10] において RyR から CaM が解離することを予防することを示してきた。

こうした考えのもと、我々は HFpEF としての特徴を有した、ミネラルコルチコイドおよび食塩水負荷による高血圧ラットモデルにおいて、DAN が肥大によって生じる拡張障害を改善し、心不全への進展を予防することができるかどうかを検証することとした。

第3章 研究方法

3-1 試薬および抗体

DAN およびデオキシ酢酸コルチコステロン (DOCA) は富士フイルム和光ケミカル株式会社 (東京) から購入した。抗体は抗 CaM 抗体 (EP799Y、アブカム社)、抗 RyR 抗体 (C3-33、シグマアルドリッチ社) を用いた。DOCA ペレットは既報 [11] にしたがって、わずかに変化を加えて作成した。2.0 ml の Sylgard 184 Silicone A 液と DOCA 200mg を容器に量り取り、スパチュラを用いて混和した。その後、0.2 ml の硬化剤を追加し、さらに混和しアルミ箔で覆った。DOCA ペレットは室温のもとで 24 時間かけて硬化し、植え込みに使用するまで 4°C で保管した。

3-2 動物モデル

本研究は ARRIVE ガイドラインおよび米国 NIH の実験動物の管理と使用に関する指針 (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) に依拠して行った。すべての実験プロトコルは山口大学宇部地区動物使用委員会の承認を受けた。動物の取り扱いには山口大学宇部地区動物使用委員会のガイドラインにしたがっておこなった。

すべての実験は 8 週齢、体重 200-240 g の Sprague-Dawley ラットを用いて行った。Fig. 1A で示したように、UNX+DOCA-salt 群に対して、-19 日に右片腎摘出 (UNX) を行った。-7 日に 0.9% 食塩水に切り替えた。0 日に DOCA ペレットを植え込んだ。UNX control 群には薬剤を含まないペレットを植え込み、28 日まで水道水を与えた。UNX+DAN 群および UNX+DOCA-DAN 群には DAN (富士フイルム和光ケミカル株式会社、東京) を給餌器 (Roden CAFÉ、オリエンタル酵母工業株式会社、東京) を用い、-7 日より 100 mg/kg/日相当量を経口投与した。いずれの動物もダントロレンによる毒性の兆候は示さなかった。

3-3 血圧測定

ラットの血圧は非観血的血圧測定装置（BP-98A、株式会社ソフトロン、東京）を用い、Tail-cuff 法で毎週測定した。

3-4 心エコー図検査

心機能は 28 日に F37 超音波装置（日立メディカル社、蘭国）に周波数帯域 4-14 MHz のリニアプローブ（UST-5417）および周波数帯域 3.8-7.5 MHz のセクタプローブ（UST-5298）を装着して解析した。浅麻酔下に経胸壁心エコー図検査を行い、M モードで左室拡張末期径、左室収縮末期径、左室径短縮率、心室中隔壁厚および後壁壁厚を計測した。僧帽弁通過血流速度波形はパルスドプラ法を用い、リニアプローブで記録した。僧帽弁輪拡張早期弛緩速度（ e' ）は組織ドプラ法を用い、セクタプローブで記録した。

3-5 心臓の組織学的評価

28 日に解剖し、死亡直後に心臓を 10%ホルマリンで固定した。形態的評価には 4 腔像を用いた。線維化の領域の染色にはピクロシリウスレッド染色を用いた。同染色法で染まった領域を Image J を用いて定量評価した。

3-6 左室スティフネスの測定

左室スティフネスは以前報告した方法 [12] に修正を加えて測定した。塩化カリウムによって心停止とし、すばやく心臓を摘出した。そして右室自由壁に切開を加え右室内の圧を開放した。圧トランスデューサーとシリンジポンプに接続したカテーテルを左室に挿入した。愛護的に左室内に残存した血液を吸引し、0.7 ml/分の速度でシリンジポンプ（KD Scientific、ホリストーン社、米国）を用いて生理食塩液を左室内圧が 40 mmHg に達するまで注入した。本操作は心停止後、10 分以内に行った。

3-7 心筋細胞の単離

心筋細胞は28日に既報の方法 [8] に多少の変更を加えて行った。ラットに 100 mg/kg のペントバルビタールを腹腔内注射して麻酔を行い、気管内挿管を行って室内気での人工呼吸器管理とした。開胸を行い、すばやく心臓を摘出した。コラゲナーゼを含有しない必須培地 (シグマ社、米国) に 5% CO₂/95% O₂ を通気し、大動脈から持続的に逆行性還流した。そして上記培地に 50 μmol/L の Ca²⁺、0.5 mg/mL のコラゲナーゼ B、0.5 mg/mL のコラゲナーゼ D と 0.02 mg/mL の XIV 型プロテアーゼを加えた緩衝液で 120 分間還流した。左室心筋をコラゲナーゼを含んだ緩衝液中でハサミを用いて破碎し、桿状の心筋細胞が得られた。その後、培養液中の Ca²⁺濃度を段階的に 1 mmol/L まで上昇させた (50 μmol/L から順次 100 μmol/L、300 μmol/L、600 μmol/L、1 mmol/L へ)。単离心筋細胞を、ラミニンコーティングを施したガラスディッシュに移し、37°C、5% CO₂/95% O₂ の環境下で数時間培養した。

3-8 免疫染色による内因性 RyR 結合 CaM の解析

単离心筋の免疫染色はこれまで報告した方法 [8] を踏襲して行った。単离心筋細胞を 4% パラホルムアルデヒドで 5 分間固定した。その後、抗 CaM 抗体 (EP799Y、アブカム社) および抗 RyR2 抗体 (C3-33、シグマアルドリッチ社) を 1%ウシ血清アルブミン溶液および 0.5% Triton X-100 に加えた溶液で単离心筋細胞を浸し、4°C で一晩静置した。その後、Alexa 488-ヒツジ抗ウサギ蛍光標識二次抗体および Alexa 633-ヒツジ抗マウス蛍光標識二次抗体で標識した。サルコメアに沿った、Alexa 633 および 488 の蛍光強度のベースラインからの変化を、長軸方向に 25 μm 以内の距離で計測し、距離ごとに計測値として表示した。各サルコメアでの蛍光強度のベースラインからの増加の平均値を RyR2 (Alexa 633) および RyR2 結合 CaM (Alexa 488) として定量した。

3-9 Ca²⁺スパークおよび筋小胞体 (SR) Ca²⁺貯蔵量の解析

心筋細胞の Ca²⁺スパークは既報 [8] の方法を踏襲し、レーザー走査共焦点顕微鏡 (LSM-510、カールツァイス社、独国) を用いて計測した。単离心筋細胞を Fluo-4 AM (20 μM; Molecular Probes) を用いて 24°C で 20 分間静置し蛍光標識した。Line-scan モードを用い、単一の心筋細胞の長軸に対して平行な直線上を、核を避けて繰り返し走査した。Ca²⁺スパークを評価するため、Ca²⁺トランジェントが安定するまで 1 Hz で 30 秒間ペーシングした。その後ペーシングを停止し、安静下で 10 秒間 Ca²⁺スパークを記録した。データは迅速かつ確実にスパークを解析できる自動解析プログラムとして知られる SparkMaster [13] を用いて

解析した。変数として、観察されたスパーク数と頻度を解析した。SR Ca^{2+} 貯蔵量を評価するため、SR内の Ca^{2+} 放出を惹起する目的で10 mMのカフェインを素早く作用させた。

3-10 心筋細胞における Ca^{2+} トランジェントのモニタリング

単離心筋細胞における Ca^{2+} トランジェントは既報 [8] の方法を踏襲して行った。単離心筋細胞に20 μM のFluo-4 AMを加え、20分間静置し、タイロッド溶液で2回洗浄した。いずれの実験も24°Cで行った。電気刺激装置 (IonOptix、米国) を用いて細胞をペーシングし、細胞内 Ca^{2+} はレーザー走査共焦点 (LSM-510、カールツァイス社、独国) で記録した。1 Hz, 2 Hz, 3 Hz, 4 Hz, 5Hz でペーシングを一時停止した際の自発的 Ca^{2+} トランジェントの出現率を、デジタル蛍光顕微鏡 (BZ9000、キーエンス社、大阪) を用いて記録した。

3-11 統計処理

正規分布に従う4群間の比較には一元配置分散分析とTukey検定による事後検定を用いた。正規分布に従わない4群間の比較にはKruskal-WallisとDunnnett検定による事後検定を用いた。

第4章 結果

4-1 DANにより e' は増加し、血圧の変化を伴うことなく左室壁厚は縮小した。

Fig. 1Bに示したように、UNX+DOCA-salt群とUNX+OCA-salt+DAN群では血圧は同様に7日目には上昇した。しかし、左室重量および壁厚(中隔+後壁)はUNX+DOCA-salt+DAN群ではUNX+DOCA-salt群と比較していずれも有意差をもって小さかった (Fig. 1C, Fig. 1D)。Fig. 1Dに示すように、UNX+DOCA-salt群ではUNX control群と比較して e' が有意差をもって低下していた。DAN投与により、統計学的有意差をもって e' の改善が認められた。 E/e' および肺重量についてもDAN投与で改善が得られていた (Fig. 1C, Fig. 1D)。

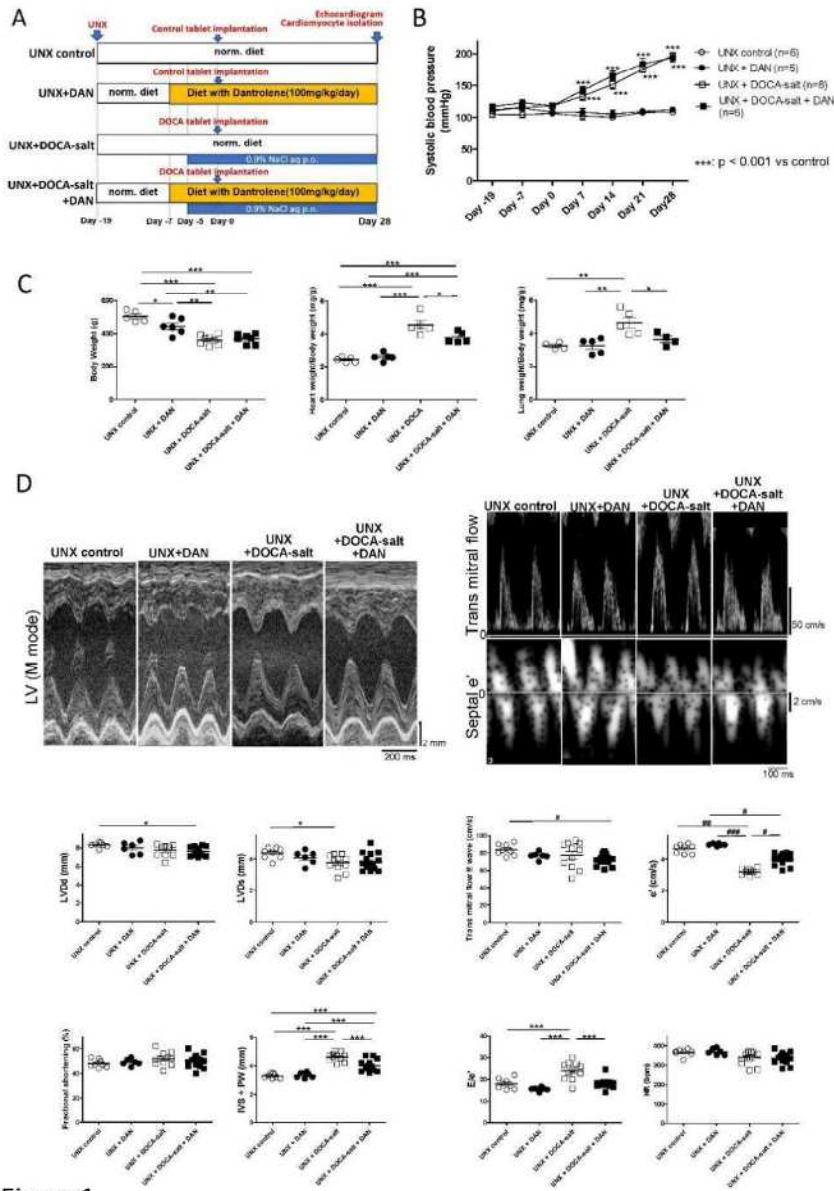


Figure 1

Fig 1. 研究デザイン、血圧、心および肺重量、心エコー図

(A) UNX+DOCA=salt 高血圧ラットの研究デザイン

(B) 各群ラットの血圧 (n = 5-6)

(C) 各群ラットの体重、心重量、肺重量 (n = 4-8).

(D) 心エコー図画像およびデータ (n = 6-15)

***P < 0.001 vs UNX control (two-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni test) for B.

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA with a post-hoc Tukey's test).

#P<0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001 (KW with a post-hoc Dunn's test).

LV, left ventricular; LVdd, left ventricular diastolic dimension; LVds, left ventricular systolic dimension;

IVS, intra-ventricular septum; PW, posterior wall

4-2 DANはUNX+DOCA-saltモデルにおいて左室線維化およびスティフネス増大を抑制した。

線維化面積はUNX+DOCA-salt群でUNX control群と比較して増大していた (Fig. 2A)。線維化面積の増大はUNX+DOCA-salt+DAN群では抑制されていた (Fig. 2A)。左室スティフネスはUNX+DOCA-salt群でUNX control群と比較して増大しており (Fig. 2B)、DAN投与によってこれは抑制されていた。

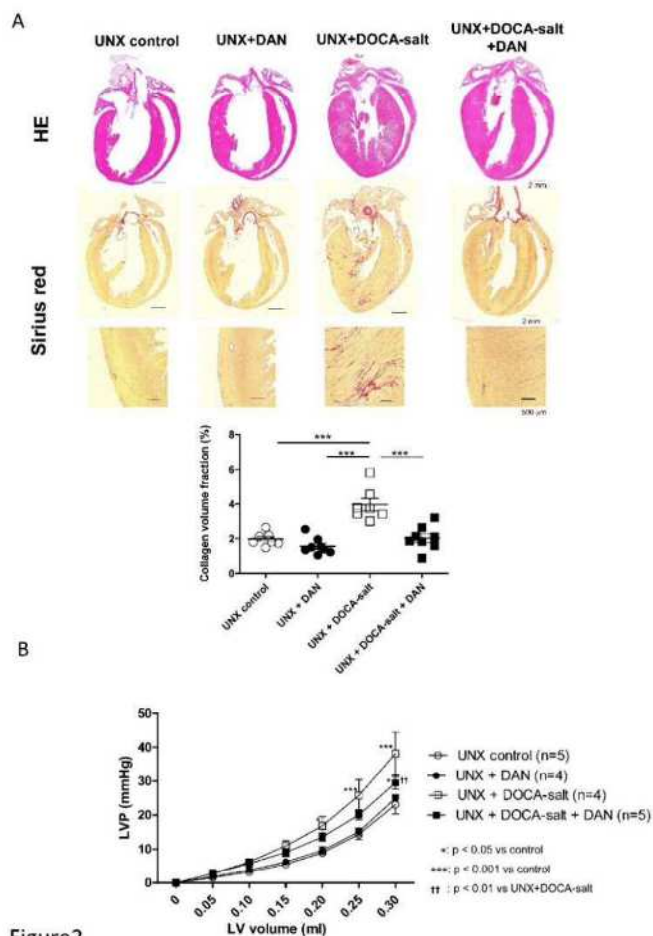


Fig 2. DANはUNX+DOCA-salt高血圧ラットモデルにおいて左室肥大の進行を抑制し、また左室スティフネスを低下させた。

(A)長軸断のHEおよびSirius red染色標本、心臓全体および左室。線維化領域はSirius redの画像より算出した。左室の組織画像は下段に示した (n = 7-8)。

(B)静的左室圧容量曲線。左室スティフネスのパラメータとして用いた (n = 4-5)。

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA with a post-hoc Tukey's test) for A.

*P < 0.05, ***P < 0.001 vs UNX control (two-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni test) for B.

††P < 0.05 vs UNX+DOCA-salt (two-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni test) for B.

Figure2

4-3 DANはUNX+DOCA-saltモデルの単離心筋細胞において弛緩能を改善した。

*In vivo*でのデータと同様にUNX+DOCA-salt群で観察された心筋肥大はUNX+DOCA-salt+DAN群で抑制されていた (Fig 3A)。ピークのCa²⁺トランジェントおよびCa²⁺トランジェントのピークから80%減衰までの所要時間は4群間に有意差を認めなかった (Fig. 3B)。一方、ピークのサルコメア短縮から80%減衰するまでの所要時間はUNX+DOCA-salt群で延長しており、UNX+DOCA-salt+DAN群では延長していなかった (Fig. 3C)。これらの結果は肥大によって生じた弛緩能の悪化がDANによって改善することを示唆する。

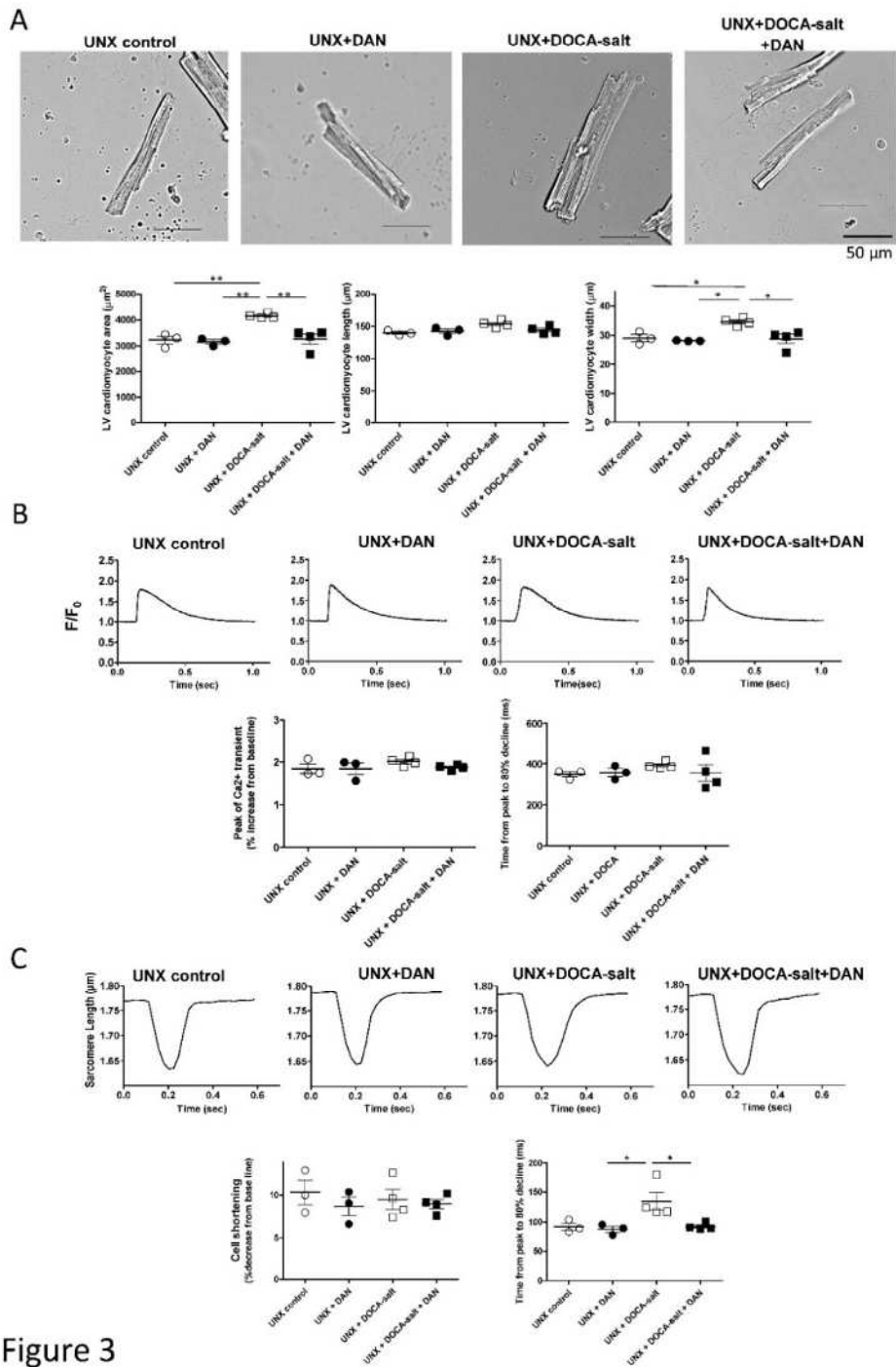


Figure 3

Fig3. 心筋細胞の形態、Ca²⁺トランジェントおよび細胞短縮

(A) 単離心筋細胞の画像および断面積、長さ、幅 (n = 89-159 cells).

(B) 1 Hz でのペーシングにより記録した Fluo-4 AM 蛍光シグナル (n = 4-15 cells).

(C) 2 Hz でのペーシングにより取得したサルコメア長 (n = 9-15 cells).

(A), (B), (C) は各群 3-4 個体の心臓からデータを取得した。

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (one-way ANOVA with a post-hoc Tukey's test).

4-4 DANはUNX+DOCA-saltモデルにおいて異常Ca²⁺漏出を抑制し、自発的Ca²⁺トランジェント(SCaT)を予防した。

Ca²⁺スパークの頻度はUNX+DOCA-salt群で増大を認め、UNX+DOCA-salt+DAN群では認めなかった (Fig. 4A)。筋小胞体のCa²⁺貯蔵量はUNX+DOCA-salt群とUNX+DOCA-salt+DAN群で有意差を認めなかった (Fig. 4A)。SCaTの頻度はUNX+DOCA-salt群で増大を認めたが、UNX+DOCA-salt+DAN群では認めなかった (Fig. 4B)。

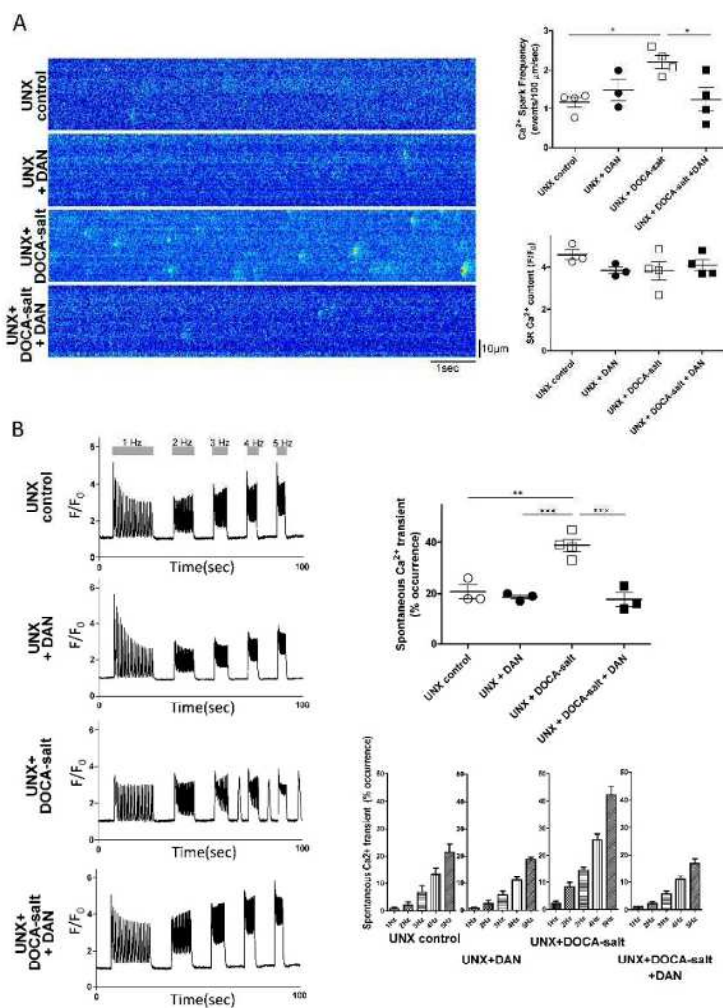


Figure 4

Fig 4. 単離心筋細胞におけるCa²⁺スパーク、筋小胞体 (SR) Ca²⁺貯蔵量、自発的Ca²⁺トランジェント (SCaT)

(A) 自発的Ca²⁺スパーク。左は単離心筋細胞における fluo-4 AM 蛍光の line-scan 画像、右は得られたデータ (n = 10-15 cells)。SR Ca²⁺貯蔵量は以下のようにして得られた: 2 Hz でペーシングを行い、その後すばやく 20 mM カフェイン溶液を加え、カフェイン誘発性Ca²⁺トランジェントとして5-6秒間観察した。データは右下段。(n = 41-114 cells)。

(B) 左は自発的Ca²⁺トランジェント (SCaT) 波形。右はSCaT出現率のデータ (n = 45-84 cells)。矢印はSCaTを示す。SCaTは1、2、3、4、5 Hzでのペーシング停止後に発生した。(A) (B)ともに3-4個体の心臓から細胞を得た。各ラットから得られたデータは平均±標準誤差で示した。

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (ANOVA with a post-hoc Tukey's test) for A.

*P < 0.05, ***P < 0.001 vs UNX control (two-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni test) for B.

††P < 0.05 vs UNX+DOCA-salt (two-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni test) for B.

4-5 RyR2に結合した内因性CaMはUNX+DOCA-salt群の単離心筋細胞で低下していた。

RyR2に結合した内因性CaMを、免疫蛍光染色を用いて定量した。RyR2に結合したCaMは

UNX+DOCA-salt 群の単離心筋細胞で低下していたが、UNX+DOCA-DAN 群では低下していなかった (Fig 5A)。UNX+DOCA-salt 群で核内の CaM は増加していたが、統計学的有意差は認められなかった (Fig 5B)。

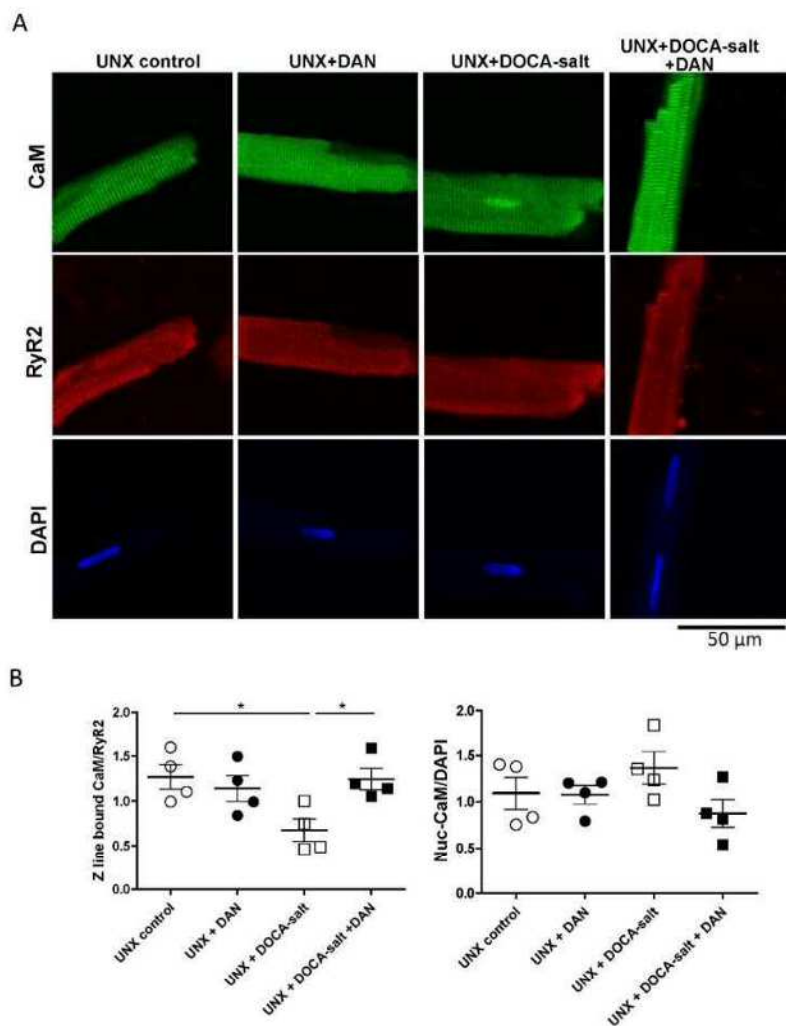


Fig 5. 心筋細胞内における RyR2 および内因性 CaM の局在、共局在

(A) RyR2 と共局在した内因性 CaM の免疫染色。CaM は緑、RyR2 は赤で示した。

(B) Z 帯に結合した CaM および核内移行した CaM。Z 帯に結合した CaM の蛍光強度は対照群の Z 帯に結合した RyR2 の蛍光強度で除し、比で表示している。核内移行した CaM の蛍光強度は対照群より得られた DAPI による核の蛍光強度で除し、比で表示している。データは 3-4 個体の心像から得られたデータを平均 \pm 標準誤差で示した (各々の点は 4-5 細胞の平均から成る)。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA with a post-hoc Tukey's multiple comparison procedure).

第5章 考察

第5章 考察

本研究で最も重要な点は DAN が CaM-RyR2 連関を正常化することにより異常な Ca²⁺漏出を抑制し、DOCA salt による高血圧モデルラットにおいて左室肥大および線維化を抑制し、左室弛緩能とスティフネスを改善したことである。

5-1 DAN は異常 Ca²⁺漏出を抑制し心筋弛緩能を改善した。

RyR2 からの Ca²⁺スパークとして認められる、異常 Ca²⁺漏出がこの高血圧ラットモデルで生じていた。100 mg/kg/日の DAN 投与によって Ca²⁺スパークは抑制されており、これにより左室弛緩能が改善した可能性がある。単離心筋細胞においてサルコメア短縮がピークから 80%減衰する時間が短縮していたことがこの考えを支持している。RyR2 からの異常 Ca²⁺漏出阻害は、Ca²⁺誘発性肥大シグナルの抑制や、不整脈をも予防するかもしれない (5-3 参照)。

5-2 DAN は左室受動的スティフネスに影響を与える左室線維化を抑制した。

線維化面積は DAN の慢性投与で減少した。圧負荷による左室肥大では成長因子 β や血小板由来成長因子が心臓線維化の中心的な役割を果たしていると考えられている [14]。近年の報告では TAC モデルにおいてマクロファージ特異的に miR-21 遺伝子を消去したところ、心肥大が抑制された [15]。NFAT 脱リン酸化 [16] や CaMK II シグナリング [17] などの Ca²⁺-CaM 依存性シグナリングによって単球や心筋細胞が活性化され、これによって成長因子や miR-21 が分泌される可能性がある。Ca²⁺-CaM 依存性シグナリングの抑制が、DAN によって肥大が抑制されるメカニズムとして考慮される。UNX+DOCA-salt 群における肺重量の増大や E/e' の上昇は左房圧の上昇を示唆し、左室スティフネスの増大はおそらく左房圧上昇に寄与している。DAN の経口投与は左室スティフネスを改善しており、このことが E/e' や肺重量の低下をもたらしていると考えられる。

5-3 DAN は CaM の核内移行を妨げ、心筋肥大を抑制した。

過去に我々は単離心筋において、アンギオテンシン II 刺激により RyR2 結合 CaM の減少および核内 CaM の増大が惹起され、同時に HDAC5 の核/細胞質比低下が起こることを示した。HDAC5 は転写因子である筋細胞増強進因子 2 (MEF-2) を抑制的に制御することが知られている [18]。これにより、HDAC5 の核内移行は MEF-2 依存性の遺伝子転写を活性化すると考えられる。興味深いことに、CaM の核内移行は DAN によって抑制されることが知られている

[5]。こうしたことから、我々はこれまで RyR2 からの CaM の解離が肥大シグナルの重要な役割をもっていると考えてきた。この仮説を証明するため、我々は RyR2 の CaM 結合ドメインに点変異 (V3599K) を有するノックインマウスモデル [19] を使用した。このノックインマウスモデルでは、大動脈弓部の縮窄によって心肥大が惹起されなかった [6]。これらのデータと同様に、本研究では DAN を用いて薬理的に RyR2 からの CaM 解離を予防することで、左室肥大の進行を抑制することができたと考えられる。

第 7 章 結語

ミネラルコルチコイドおよび食塩水負荷による高血圧モデルラットに対して経口 DAN 投与を行うことで、心筋細胞の肥大および心筋線維化が抑制され左室弛緩能およびステイフネスが改善した。その結果として、肺うっ血も改善した。これらのことから DAN は HFpEF に対する新たな治療薬となりうることが示された。

第 8 章 謝辞

本研究を行うために多大なご指導・ご支援をいただいた山口大学大学院医学系研究科器
官病態内科学 矢野雅文前教授をはじめとする器官病態内科学の先生方、指導教官として
ご指導いただいた山口大学大学院医学系研究科保健学専攻病態検査学講座 山本健教授、
実験を手助けしてくださった山口大学大学院医学系研究科器
官病態内科学 技術補佐員の
岡本陽子さま、楯田聡美さまへ心から感謝申し上げます。

第 9 章 参考文献

- [1] Chang PP, Wruck LM, Shahar E, et al. Trends in Hospitalizations and Survival of Acute Decompensated Heart Failure in Four US Communities (2005–2014): ARIC Study Community Surveillance. *Circulation*. 2018; 138: 12–24.
- [2] Shiba N, Nochioka K, Miura M, Kohno H, et al. CHART-2 Investigators. Trend of westernization of etiology and clinical characteristics of heart failure patients in Japan—first report from the CHART-2 study. *Circ J*. 2011; 75: 823–33.
- [3] Anker SD, Butler J, Filippatos G, et al. EMPEROR-Preserved Trial Investigators. Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med*. 2021; 385: 1451–1461.

- [4] Bhatia RS, Tu JV, Lee DS, et al. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N Engl J Med.* 2006; 355: 260-9.
- [5] Oda T, Yamamoto T, Kato T, et al. Nuclear translocation of calmodulin in pathological cardiac hypertrophy originates from ryanodine receptor bound calmodulin. *J Mol Cell Cardiol.* 2018; 125: 87-97.
- [6] Kohno M, Kobayashi S, Yamamoto T, et al. Enhancing calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor completely inhibits pressure-overload induced hypertrophic signaling. *Commun Biol.* 2020; 3: 714.
- [7] Ono M, Yano M, Hino A, et al. Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca(2+) release in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2010; 87: 609-17.
- [8] Tanaka S, Yamamoto T, Mikawa M, et al. Stabilization of RyR2 maintains right ventricular function, reduces the development of ventricular arrhythmias, and improves prognosis in pulmonary hypertension. *Heart Rhythm.* 2022; 19: 986-997.
- [9] Uchinoumi H, Yano M, Suetomi T, et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor. *Circ Res.* 2010; 106: 1413-24.
- [10] Kobayashi S, Yano M, Uchinoumi H, et al. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, inhibits catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in a RyR2(R2474S/+) knock-in mouse model. *Circ J.* 2010; 74: 2579-84.
- [11] Pestana-Oliveira N, Nahey DB, Johnson T, et al. Development of the Deoxycorticosterone Acetate (DOCA)-salt Hypertensive Rat Model. *Bio Protoc.* 2020; 10: e3708.
- [12] Kobayashi S, Yano M, Kohno M, et al. Influence of aortic impedance on the development of pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circulation.* 1996; 94: 3362-8.
- [13] Picht E, Zima AV, Blatter LA, et al. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293: C1073-81.
- [14] Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71: 549-74.
- [15] Ramanujam D, Schön AP, Beck C, et al. MicroRNA-21-Dependent Macrophage-to-Fibroblast Signaling Determines the Cardiac Response to Pressure Overload. *Circulation.* 2021; 143: 1513-1525.
- [16] Marunouchi T, Nakashima M, Ebitani S, et al. Hsp90 Inhibitor Attenuates the Development of Pathophysiological Cardiac Fibrosis in Mouse Hypertrophy via Suppression of the Calcineurin-NFAT and c-Raf-Erk Pathways. *J Cardiovasc Pharmacol.*

2021; 77: 822–829.

[17] Suetomi T, Miyamoto S, Brown JH. Inflammation in nonischemic heart disease: initiation by cardiomyocyte CaMKII and NLRP3 inflammasome signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019; 317: H877–H890.

[18] Ginnan R, Sun LY, Schwarz JJ, et al. MEF2 is regulated by CaMKII δ 2 and a HDAC4–HDAC5 heterodimer in vascular smooth muscle cells. *Biochem J*. 2012; 444: 105–14.

[19] Nakamura Y, Yamamoto T, Kobayashi S, et al. Ryanodine receptor-bound calmodulin is essential to protect against catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *JCI Insight*. 2019; 4: e126112.

この学位論文は、Nawata J, Yamamoto T, Tanaka S, Yano Y, Uchida T, Fujii S, Nakamura Y, Suetomi T, Uchinoumi H, Oda T, Kobayashi S, Yano M. Dantrolene improves left ventricular diastolic property in mineralcorticoid–salt–induced hypertensive rats. *Biochemistry and Biophysics Reports* 2023 Mar 1;34:101449.

に原著論文として発表したものからデータを引用して作成しました。