

主論文の要旨

**Corticotropin releasing hormone receptor 2  
exacerbates chronic cardiac dysfunction**

〔コルチコトロピン放出ホルモン受容体2と慢性的心不全〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態内科学講座 循環器内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

津田 卓眞

## 【緒言】

Gタンパク質共役受容体 (G-protein-coupled receptor: GPCR) は、細胞外シグナルを細胞内へ伝達し、生体の生理機能維持に深く関わっている。過剰な GPCR シグナルは疾患発症に関与し、GPCR は治療薬の主な標的分子である。循環器分野では、アンギオテンシン受容体拮抗薬、アドレナリン受容体拮抗薬が高血圧や心不全の治療に用いられ、これら 2 つの GPCR については、様々な研究報告がなされてきた。しかしながら、慢性心不全の死亡率、罹患率は非常に高く、また、GPCR は哺乳類では 800 種以上存在することが知られており、その機能が不明なものも多い。

## 【対象及び方法】

### 1. 網羅的 GPCR スクリーニング

心不全に関わる GPCR を同定するため、8 週齢の野生型マウスに大動脈弓狭窄を作製し (Transverse Aortic Constriction: TAC)、この心不全モデルを用いて、GPCR (600 種) の心筋細胞における発現量を定量性 PCR 法により網羅的に解析した。

### 2. 薬剤誘導性心筋特異的 Crhr2 遺伝子欠損マウス作製

タモキシフェン投与依存的に心筋細胞特異的に標的遺伝子を欠損させるタモキシフェン誘導性心筋特異的 Cre マウスを用いて、心筋特異的 Crhr2 遺伝子欠損マウス (Crhr2-KO マウス) を作製した。

### 3. 動物実験

8 週齢マウスを用いて浸透圧ポンプを植え込み、Crhr2 の作動薬であるウロコルチン (Ucn2) を持続投与し、心臓における Ucn2 の役割について検討した。また TAC による心不全モデルにおいて、左室重量/脛骨長比、心臓超音波検査による心機能、picrosirius red 染色による心臓線維化、生命予後に関して評価を行い、Crhr2 遺伝子欠損や Crhr2 阻害薬の心不全に対する影響について検討した。

### 4. ヒトサンプルにおける Ucn2 の測定

疾患群は左室駆出率が 55%以下に低下し、2006 年 8 月～2012 年 1 月までの期間に当院で入院し、侵襲的カテーテル検査により非虚血性心不全と診断された患者とした。健常者群は共同研究により自治医科大学より提供された健常者とした。当大学と自治医科大学の倫理委員会の審議、承認を得た。血中 Ucn2 濃度はサンドイッチ法により測定し、疾患群 52 名と健常者群 260 名とで比較した。

## 【結果】

### (網羅的 GPCR スクリーニング)

網羅的 GPCR のスクリーニングにより、心不全により心筋細胞に高発現する Crhr2 (corticotropin-releasing hormone receptor 2) を同定した (Figure 1A)。Crhr1 は副腎皮

質ホルモン分泌を促進する受容体であるが、Crhr2 による分泌促進は非常に弱い。また、Crhr1 は脳に強発現することが知られているが、Crhr2 は心臓に特異的に発現していた (Figure 1B)。

#### (動物実験)

Ucn2 持続投与モデルでは、用量依存的に有意な心肥大、心機能低下と血中 BNP 濃度上昇を認め心不全が惹起された (Figure 1C、D、E)。Ucn2 の持続投与による血圧への影響は認めず、また特異的 Crhr2 欠損マウスでは Ucn2 投与による心不全が生じないことから、心筋の Crhr2 が心不全発症に関与していることが考えられた。

次に TAC による心不全モデルでは、Crhr2 の遺伝子欠損により心肥大や心臓線維化が有意に抑制された (Figure 2A、B)。心機能改善と生存率の改善が見られ、長期にわたる心不全病態の改善を認めた (Figure 2C、D)。

さらに TAC による心不全モデルに Crhr2 阻害薬を投与したところ、心肥大と線維化の有意な改善を認めた (Figure 3A、B)。

#### (細胞内シグナル伝達)

HEK293 細胞に Crhr2 を強発現させ、その後に Ucn2 を投与すると、Gs のみが用量依存的に活性化された (Figure 3C)。また、野生型マウスより単離した心筋細胞においても、Ucn2 投与により、Gs の下流に存在する Protein kinase A (PKA) - cAMP response element binding protein (CREB) / Calcium calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) - Ryanodine receptor 2 (RyR2) / Protein kinase B (AKT) のリン酸化がそれぞれ見られた (Figure 3D)。さらに、心不全モデルにおいては、Crhr2 阻害薬投与により PKA-CREB/ CaMKII - RyR2/ AKT のリン酸化が抑制された (Figure 3E)。

次に、RNA sequence による網羅的遺伝子解析を施行し、CREB/MEF2 が関与する心不全関連遺伝子を候補遺伝子として特定し、定量性 PCR 法により発現量を評価した。心不全モデルに Crhr2 阻害薬投与することで、心不全関連遺伝子である Angiotensinogen (Agt)、C-C chemokine receptor type 5 (Ccr5)、Protein-tyrosine kinase 2-beta (Ptk2b)、Salt Inducible Kinase 1 (Sik1)、Nuclear receptor subfamily 4- group A- member 1 (Nr4a1) の 5 遺伝子の発現が抑制されていた (Figure 3F)。これらの結果より、Crhr2 阻害薬は CREB/MEF2 の下流に存在するこれらの遺伝子発現を直接的に抑制することで、心不全病態を改善することが示唆された。

#### (ヒトサンプルにおける Ucn2 の測定)

患者背景は平均年齢 (健常者群 57.6 歳、心不全群 57.4 歳)、男性 (54%、54%)、BMI (22.3、22.7 kg/m<sup>2</sup>)、血圧 (133/80、119/73 mmHg)、総コレステロール (203、195 mg/dl)、血糖値 (96、99 mg/dl)、血清クレアチニン (0.73、0.86 mg/dl) であった。心不全患者群では健常者群と比較して、約 8 倍の血中 Ucn2 濃度の上昇を認めた (健常者群 235 pg/ml vs 心不全群 1755 pg/ml) (Table 1)。

#### **【考察】**

我々の検討では、Ucn2 の長期投与は Gs 以下の PKA-CREB/ CaMKII- RyR2/ AKT の

持続的リン酸化と CREB/ MEF2 関連の心不全遺伝子の発現上昇を介して心不全を悪化させ、また、Crhr2 阻害薬は心不全を改善させることが示唆された。しかし、Ucn2 の分泌臓器に関して定量性 PCR 法や in situ hybridization 法を用いて検討したが、特定できなかった。今後の臨床応用のためにはさらなる研究が必要であろうと考えられる。

#### **【結語】**

Ucn2 は心不全発症に関わる因子であり、血中濃度測定は心不全の新規診断に有用である可能性が示唆され、また Crhr2 拮抗薬は心不全の新規治療薬に繋がることが期待される。