

博士論文

マウス左室圧負荷モデルの左右心室筋に対して
phosphodiesterase 5 阻害薬 sildenafil が及ぼす影響の検討

今井 洋介

博士学位論文

論文題目 マウス左室圧負荷モデルの左右心室筋に対して
 phosphodiesterase 5 阻害薬 sildenafil が及ぼす影響の検討

所属 東京大学医学系研究科 外科学専攻（医学博士課程）
 生体管理医学講座 麻酔学

指導教官 山田 芳嗣 教授

申請者 今井 洋介

提出；平成 28 年（2016 年）11 月

最終提出；平成 30 年（2018 年）4 月

目次

1. 要旨	5
2. 略語一覧	6
3. 序文	9
3.1. はじめに	9
3.2. 心不全概説	9
3.2.1. 左室収縮能と左心不全	10
3.2.2. 左心不全に続発する右心機能低下	10
3.3. 心肥大—心不全につながる心病変	12
3.3.1. 生理的心肥大と病的な心肥大	12
3.3.2. 心肥大に関するシグナル伝達	13
3.3.3. 心肥大から心不全への進行	15
3.4. Sildenafil—心不全治療薬として期待される PDE5 阻害薬	17
3.4.1. PDE5 阻害薬の心血管系における分子的作用機序	17
3.4.2. Sildenafil の抗リモデリング効果	19
3.4.3. 心不全に対する sildenafil の臨床試験成績	19
4. 目的	21

5.	方法	22
5.1.	実験対象マウス	22
5.1.1.	大動脈縮窄 (TAC) と投薬方法	22
5.1.2.	経胸壁心エコー検査	23
5.1.3.	侵襲的血行動態検査	23
5.1.4.	左室・右室心筋分離	24
5.2.	全 RNA 単離とリアルタイム PCR による mRNA 定量	24
5.3.	タンパク抽出.....	26
5.3.1.	非分画抽出.....	26
5.3.2.	分画抽出	26
5.4.	Western blotting とその解析.....	27
5.5.	統計学的解析.....	28
6.	結果	30
6.1.	2 日間の TAC は心エコー検査上の左室の大きさや機能に影響を生じない	30
6.2.	2 日間の TAC は左室圧を上昇させるが右室圧の上昇を生じない.....	32
6.3.	2 日間の TAC は心臓重量を増加させるが、右室重量に影響しない	35
6.4.	左室後負荷の増大は後負荷が上昇していない右室にも分子リモデリング反 応を惹起し、sildenafil はその反応を抑制する	37

6.5. Sildenafil は左室後負荷が増大している状況の両心室において PKG-1 α の細胞膜移行を促す	41
7. 考察	48
7.1. 本研究で発見された事実と、それより導かれる結論	48
7.2. 本研究の独自性と関連領域へ及ぼしうる影響	49
7.3. 本研究の限界	54
7.4. 本研究の意義と今後の発展の方向性	55
8. 謝辞	57
9. 引用文献	58

1. 要旨

左心不全に続く右心機能低下は予後を悪化するが、その分子機序は検討されてこなかった。本研究ではマウス左室圧負荷モデルの病態早期に両心室の分子生物学的解析を行い、更に cGMP シグナル活性化による効果を評価した。2 日間の左室圧負荷により、軽度な心肥大が生じ、左室では収縮期圧上昇、拡張能低下が認められたが、右室では平均圧や機能に有意な変化はなかった。右室心筋では左室と同様に BNP 遺伝子および RCAN1 遺伝子の発現増加や ERK1/2 リン酸化の亢進を認め、血行動態的負荷によらない分子リモデリングの存在が示された。PDE5 阻害薬 sildenafil は cGMP エフェクターキナーゼ PKG の活性化を誘導し、両心室の分子リモデリングを抑制した。

2. 略語一覧

ACE: angiotensin-converting enzyme (アンギオテンシン変換酵素)

AMP: adenosine monophosphate

ANOVA: analysis of variance (分散分析)

ANP: atrial natriuretic peptide (心房性利尿ペプチド)

ARB: angiotensin II receptor blocker (アンギオテンシン 2 受容体拮抗薬)

BNP: brain natriuretic peptide (脳性利尿ペプチド)

CaMKII: calmodulin-dependent kinase II

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid (相補的 DNA)

cGMP: cyclic guanosine monophosphate

DNA: deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)

dp/dt_{\max} : peak rate of ventricular pressure rise

dp/dt_{\min} : peak rate of ventricular pressure decline

ERK: extracellular signal-regulated kinase

GC: guanylyl cyclase

GMP: guanosine monophosphate

GPCR: G-protein coupled receptor (G タンパク 共役型受容体)

HFpEF: heart failure with preserved ejection fraction (駆出率の保持された心不全)

HFrEF: heart failure with reduced ejection fraction (駆出率の減少した心不全)

IGF1: insulin-like growth factor 1

IVST: wall thickness of intraventricular septum (心室中隔壁厚)

LV: left ventricle (左室)

LVEDD: left ventricular end-diastolic diameter (左室拡張末期径)

LVEF: left ventricular ejection fraction (左室駆出率)

LVESD: left ventricular end-systolic diameter (左室収縮末期径)

LVFS: left ventricular fractional shortening (左室内径短縮率)

LVPWT: wall thickness of LV posterior wall (左室後壁壁厚)

MAPK: mitogen-activated protein kinase

mRNA: messenger ribonucleic acid (メッセンジャーRNA)

NFAT: nuclear factor of activated T cells

PCR: polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

PDE: phosphodiesterase

PKA: protein kinase A

PKG: cGMP-dependent protein kinase (protein kinase G)

p/t ratio: phospho/total ratio

P/S ratio: particulate/soluble ratio

RCAN1: regulator of calcineurin 1

RGS: regulator of G protein signaling

RV: right ventricle (右室)

RNA: ribonucleic acid (リボ核酸)

SERCA2: sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2

SPE buffer: Soluble Protein Extraction Buffer【薬品キット内容物】

T3: triiodothyronine

TAC: transverse aortic constriction (横行大動脈縮窄)

TRPC: transient receptor potential canonical

VEGFB: vascular endothelial growth factor B

3. 序文

3.1. はじめに

本研究では短期間の左室圧負荷が両心室に起こす応答と、その変化に PDE5 阻害薬 sildenafil が与える影響についてマウスを用いて検討する。

この序文では、心不全について概説した後、左心不全に続く右心機能低下について言及する。心不全に進行しうる心病変の一例である心肥大について、進行や抑制に関わるシグナル伝達を含めて概観した後、心不全治療薬として期待される PDE5 阻害薬 sildenafil について、心肥大抑制や心不全治療に関するこれまでの知見を概説する。

3.2. 心不全概説

心臓は静脈から灌流された血液を全身の動脈へ拍出することで体組織への酸素運搬を担う臓器である。しかし構造的あるいは機能的な心病変の進行により、心臓が正常な充満圧のもとでは体組織の代謝に必要な量の酸素化血を拍出できなくなった病態は心不全と称され、臨床的に特徴的な症状（息切れ・下腿浮腫・疲労感など）や兆候（頸静脈圧上昇・肺野断続性ラ音・心尖拍動の偏位など）が表れる [1]。心不全へ進行する中で、心臓に生じる構造的、機能的、分子的なあらゆる変化はリモデリングと総称される [2]。

先進国における調査では、心不全罹患率は成人全体の1~2%であるが、加齢に伴い増加し75歳以上ではおよそ10%程度に及ぶ [3]。本邦における調査では、心不全の推定総患者数は平成26年で302,000人であり [4]、心不全患者の1年死亡率（全死亡）はおよそ7~12%とされる [5] [6]。

3.2.1. 左室収縮能と左心不全

左心機能の評価には1回拍出量を左室拡張末期容積で除した値である左室駆出率（LVEF）が頻用されるが、左心不全はLVEFを指標とするとおおまかに2分され、収縮障害により左心室が正常な一回拍出量を駆出しきれない「駆出率の減少した心不全（HFrEF）」と、拡張障害により左心室が正常な静脈灌流量を受容しきれない「駆出率の保持された心不全（HFpEF）」に分かれる。HFrEFと比較しHFpEFは高齢、女性、肥満、高血圧・心房細動合併の割合が多い一方で冠疾患合併の割合が少ないなど患者背景が異なることやHFpEFの方が予後良好であることなどから [1]、HFpEFがHFrEFへ移行するというよりは両者が異なる疾患群であると考えられている。

3.2.2. 左心不全に続発する右心機能低下

左心不全が進行すると右心機能も低下する。合併率については、HFpEFと右心機能低下に関する調査が多いが [7]、HFpEFの診断基準や右心機能の評価指標（右室面積変化率、三尖弁輪収縮期移動距離）・基準値の別によって4% [8]から49% [9]ま

で様々である。一方 HFrEF と右心機能低下の合併率は HFpEF と同程度 [10]から約 2 倍程度 [11]と推測されている。左心不全に合併して右心機能の低下が生じた場合、入院頻度の上昇 [12]や死亡率の増加 [13] [14]により予後が悪化する。

左心不全に続いて右心機能が低下する機序としては以下の構造的な心室間相互作用が挙げられる [15]。(1) 左室収縮能低下も左室拡張能低下もともに左室拡張末期圧の上昇を招くため [16]、それに伴い肺静脈圧・肺動脈圧が上昇し、後負荷の増大により右心機能が低下する。(2) 左室と右室は心室中隔や筋線維を共有しており、右心拍出の約半分が左室収縮によりもたらされるため [17]、左心機能低下が右心拍出低下につながる。(3) 心嚢という限られた空間に両心室が収納されているため左心肥大は右室拡張障害を招く。(4) 左心拍出の低下が右室を栄養する冠灌流の低下を招き、右心機能を低下させる。(5) 上昇した右室圧は冠動脈を圧迫し灌流量を減少させる [18]。新たな治療標的の発見を含めた臨床成績改善のためには、心室間相互作用の分子生物学的な解析も重要と考えられるが、その研究はこれまでほとんど行われていない。

右室の分子リモデリングとしては、脂肪酸酸化から解糖系への移行 [19]、ミトコンドリア機能低下による活性酸素の増加 [20]、細胞外マトリックスにおけるコラーゲン合成の亢進 [21]、 β -adrenaline 受容体・dopamine 受容体密度の低下 [22]、renin-angiotensin-aldosterone 系シグナルの活性化 [23]などが知られている。しかしこれら

の分子リモデリングの研究はほぼ全て不全状態の右室を対象に行われており、肺高血圧を伴わない右室における変化については報告がない。

3.3. 心肥大—心不全につながる心病変

心筋細胞は生後すぐにごく一部を除き分化能・自己複製能を失うが [24]、周辺環境に応じてサイズを変化させる可塑性を持つ。心臓の萎縮は、長期臥床・左室補助装置装着・宇宙での無重力生活といった負荷が減少する状況や、低栄養・担癌状態のような異化亢進状態で引き起こされ、心重量は 25%程度減少する場合もある [25]。一方心臓の肥大は、運動や機械的負荷の増加、神経液性因子の影響によって引き起こされ、心重量の増加は 100%以上にいたることもある [25]。

3.3.1. 生理的心肥大と病的な心肥大

成長過程や妊娠中、また日々継続する運動に伴って心臓は肥大する。この場合の肥大は可逆的であり、細胞死や線維化が起こることは稀で収縮能や拡張能の低下は生じず、合併する背景疾患がない限り心不全に進行することはないことから、生理的肥大 (physiological hypertrophy) と称される [26]。心筋細胞は幅、長さともに大きくなるが、並行して栄養血管も新生するため酸素需給バランスは保たれる [27]。正常な心筋細胞のエネルギー産生経路である脂肪酸代謝の亢進に加え糖代謝も行われるようになる [28]。

一方、高血圧や心臓弁疾患、心筋梗塞後、糖尿病・肥満・慢性腎疾患の合併などもまた心肥大を引き起こす。慢性経過の中で心筋の細胞死や間質の線維化が進行し、収縮能・拡張能の低下からやがて心不全へと進行するため、病的肥大 (pathological hypertrophy) と呼ばれる [29]。心筋細胞のサイズ増大は生理的肥大と異なり幅もしくは長さのどちらかに偏る。収縮を生じる最小単位であるサルコメアが並列に増幅した場合、心臓の壁は厚く内腔は小さい求心性肥大 (concentric hypertrophy) を生じ、サルコメアが直列に増幅した場合、壁厚の変化はわずかで内腔が拡大する遠心性肥大 (eccentric hypertrophy) を生じる [16] [30]。エネルギー産生は正常の脂肪酸代謝から糖代謝へと移行し [28]、胎児型遺伝子と呼ばれる ANP、BNP、skeletal α -actin、 β -myosin heavy chain の発現が増加する [31]。

3.3.2. 心肥大に関与するシグナル伝達

心肥大は、心筋への機械的伸展刺激と神経体液性因子の影響によって促進される。

機械的伸展刺激は細胞外・細胞膜・サルコメア周辺に位置する機械受容器が感知する [26]。受容器の一種である TRPC チャンネルが刺激を受けると細胞外からの Ca^{2+} 流入が増加し、細胞内 Ca^{2+} 濃度依存的な calcineurin- NFAT 経路が活性化されタンパク発現が促される。心筋細胞膜に分布する integrin は細胞外マトリックスの伸展刺激を検知すると focal adhesion kinase (FAK) や integrin-linked kinase (ILK) といった

tyrosine kinase を活性化する。心筋細胞内にもサルコメアの接続部位（Z 線）に titin を始めとした伸展感知センサーが分布する。

生理的肥大に関わる神経体液性因子としては、甲状腺ホルモン（T3）の他 insulin、IGF1、VEGFB が挙げられる [26] [29]。T3 は核内に移行し遺伝子発現を促進し、insulin・IGF1・VEGFB は細胞膜上の受容体に結合して phosphoinositide 3-kinase（PI3K）を活性化し、下流で活性化された Akt が遺伝子発現やタンパク合成を促す。Akt シグナルは適正範囲内にあることが重要とされ、時間的・量的に過剰な Akt の活性化は病的な心肥大につながる [32]。

一方、病的な心肥大に関わる神経体液性因子である catecholamine や endothelin-1、angiotensin II は、GPCR を介して作用を発現する。GPCR により活性化される G タンパクは $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ の3つのサブユニットからなり、 α サブユニットの種類により分類される。 $\alpha 1$ -adrenaline 受容体、endothelin 受容体、angiotensin II 受容体は $G_{\alpha q/\beta \gamma}$ タンパクを活性化し、phospholipase C（PLC）の活性化、inositol 1,4,5-triphosphate（Ins(1,4,5)P₃）の合成を介して、細胞内への Ca²⁺流入を増加させる。細胞内 Ca²⁺濃度の上昇により活性化された calcineurin-NFAT 経路や CaMKII は胎児型遺伝子を含む遺伝子発現を促進し、心肥大を進行させる [33]。G_{αq} シグナルはまた protein kinase C（PKC）や MAPK を活性化し、その下流で活性化された p38MAPK・c-Jun N-terminal kinases（JNKs）、ERK1/2 などが心肥大に関連する遺伝子発現を促進する [29]。また

β 1-adrenaline 受容体は $G_{\alpha s/\beta\gamma}$ タンパク、adenylyl cyclase、cAMP、PKA を順に活性化して、細胞内への Ca^{2+} 流入を増加させ、心肥大に寄与する [33]。

心肥大を抑制するシグナル伝達としては、cGMP・PKG を介した経路がある。

cGMP は、nitric oxide による細胞質内の可溶性 GC の活性化、もしくは natriuretic peptide による細胞膜結合型 GC の活性化により産生され、PKG を活性化する [34]。

PKG は L 型 Ca^{2+} チャンネルや TRPC チャンネルをリン酸化し Ca^{2+} の細胞内流入を妨げることで、calcineurin-NFAT 経路を介した心肥大を抑制する。また PKG による RGS のリン酸化を介した心肥大抑制効果も報告されている。RGS は GTPase activating protein の一種で、 G_{α} サブユニットに結合した GTP の加水分解を大幅に促進することで G タンパクを不活性化し、GPCR シグナルを減弱または停止する [35] [36]。20 の RGS タンパクが知られているが、心臓では RGS2、3、4、5 が発現しており、中でも RGS2 と RGS4 は心肥大抑制への関与が深い。RGS2 は PDE5 阻害薬 sildenafil の心肥大抑制効果に必要とされており [37]、RGS4 は ANP の心肥大抑制効果に必要とされている [38]。

3.3.3. 心肥大から心不全への進行

心肥大のエネルギー需要を考える際には以下の Laplace の法則が頻用される [39]。

$$\text{壁張力} = (\text{内圧} \times \text{半径}) / (2 \times \text{壁厚})$$

逆流性の弁疾患や心筋梗塞後などで起こる遠心性肥大では、心腔の拡大に比し壁厚の増加が少ないため、壁張力ひいてはエネルギー需要が増大する方向にあり、悪循環が形成される。有効な治療が行われない場合、酸素需給の不均衡、細胞死や線維化は収縮障害を生じ HFrEF へ陥る [16]。

一方、高血圧や大動脈弁狭窄症、肥満や糖尿病、慢性腎疾患などに伴い生じる求心性肥大では、心腔の拡大がなく壁厚が増加するため、壁張力ひいてはエネルギー需要の増大が代償される。短期的には理に適った順応であるが、長期的に拡張障害を生じると HFpEF へ陥る [16]。順応状態から不順能状態へ転換する契機は明確になっていないが、細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節障害は拡張障害を生じる変化の 1 つと考えられている。通常細胞内 Ca^{2+} は、L 型 Ca^{2+} チャンネルを経由した細胞外からの流入と ryanodine 受容体チャンネルを経由した小胞体からの放出により増加し、SERCA2 を介した小胞体への再取り込みと $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体を介した細胞外への排出により正常化する。しかし GPCR シグナルによる PKA や CaMKII の活性化は、SERCA2 の減少や機能低下、ryanodine 受容体チャンネルからの Ca^{2+} 漏出増加を招き、結果として生じる拡張期 Ca^{2+} 濃度の上昇は拡張障害を引き起こす [40]。また増大する心筋細胞に対する冠微小血管密度の不均衡 [32] [41]、GPCR シグナルにより惹起される心筋細胞のアポトーシス [42]、細胞外マトリックスにおける線維化の亢進 [43]なども、拡張障害の原因となりうる。

心肥大は心血管系合併症や死亡の独立した危険因子である他 [44]、心臓関連突然死の危険性も増加させる [45]。心肥大に対する臨床研究は降圧薬を中心に多数行われており、 β 遮断薬、Ca 拮抗薬、利尿薬、ACE 阻害薬、ARB、抗アルドステロン薬で心肥大の軽減が認められているものの [46] [47]、拡張能の改善が示された試験はごく限られており [48]、変化が見られなかった報告の方が多い [49] [50] [51] [52]。心肥大を伴う心不全に対する臨床試験は HFpEF を対象に β 遮断薬、ACE 阻害薬、ARB、PDE5 阻害薬を用いて実施されているが、大半の試験で予後の改善効果が示せていない [53] [54]。心肥大軽減効果のある薬剤が HFpEF の改善を示せない理由としては、HFpEF ひいては拡張障害が多因性の病態であること、病勢も多様であることなどが挙げられており [53] [55]、薬剤への反応性が高い患者群を選択する重要性が指摘されている [56]。

3.4. Sildenafil—心不全治療薬として期待される PDE5 阻害薬

心不全の薬物治療としては β 遮断薬、利尿薬、ACE 阻害薬、ARB、抗アルドステロン薬などが推奨されているが、cGMP シグナルを活性化する薬剤が近年心不全治療薬として期待されており [57]、PDE5 阻害薬はその 1 つである。Sildenafil は PDE5 阻害薬の中でも心機能への影響、抗リモデリング効果、心不全に対する治療効果が最も調べられてきた。

3.4.1. PDE5 阻害薬の心血管系における分子的作用機序

PDE は活性型の環状ヌクレオチド (cGMP、cAMP) を不活性型の線形 (5'-GMP、5'-AMP) へ加水分解する酵素である [58]。11 種類の PDE のうち心臓では PDE1、3、4、5、8、9 の 6 種類が発現しており、それぞれ cGMP と cAMP の分解効率が異なるが、PDE5 は cGMP だけを特異的に分解する [34]。Sildenafil などの PDE5 阻害薬は分解抑制により cGMP を増加し、PKG の活性化を介して効果を発揮する。PKG により各種 Ca²⁺チャネルがリン酸化を受けると、小胞体からの細胞内 Ca²⁺放出が低下し、細胞外への Ca²⁺排出が増加するため、細胞内 Ca²⁺濃度が減少し血管平滑筋が弛緩する [59]。この血管拡張効果から、現在 sildenafil は勃起不全や肺高血圧に対して臨床使用されている。

PDE5 阻害薬は、投与開始直後は β -adrenaline 受容体刺激による心収縮を抑制する [60]。これは PDE5 阻害により活性が上がった PKG がサルコメアの構成要素である troponin I をリン酸化し収縮力を低下させること、また PKG が L 型 Ca²⁺チャネルをリン酸化し Ca²⁺の細胞内取り込みが抑制されることが原因と考えられている [34]。一方、長期投与された場合には逆に肥大心において収縮能を改善する [61]。不全心で発現が減少している SERCA2 の発現が促進され、細胞内の Ca²⁺濃度調節能が改善するためと考えられている。Sildenafil はまた心筋の拡張能を亢進させるが、これはサルコメアを連結する titin をリン酸化する影響とされている [62]。Sildenafil の右室

へ対する影響としては、健常な右室では機能的な変化を生じないが [63]、機能の低下した右室では収縮能・拡張能改善をもたらすという報告がある [63] [64] [65]。

3.4.2. Sildenafil の抗リモデリング効果

Sildenafil は心肥大抑制効果が知られている。動物の心肥大モデルの 1 つに横行大動脈縮窄 (TAC) があるが、これは左室後負荷の増大によって急性期に求心性心肥大を生じ、慢性期には遠心性心肥大に転じるモデルである。Sildenafil は TAC マウスの心肥大を抑制するばかりでなく、TAC により 1 度生じた心肥大を改善するが、これには PKG-1 活性化を介した心肥大シグナル (calcineurin-NFAT、ERK1/2、Akt) の活性抑制が関与している [66]。PKG 活性化により L 型 Ca^{2+} チャンネルや TRPC チャンネルの機能が低下し、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の抑制を介して calcineurin-NFAT 経路が阻害される他、PKG による RGS2 活性化により GPCR シグナルが減弱されることによるとされる [37]。

Sildenafil の右室リモデリングに対する効果は明らかでない点が多い。リモデリング抑制効果は認めるが肺動脈拡張に伴う後負荷の軽減が主な作用とする研究 [67] や、反対に線維化を促進したとする研究 [64]、肺高血圧に長期間さらされた右室においては線維化を抑制したという研究 [65] など結果は多様であり、分子的变化の検討はこれまで行われていない。

3.4.3. 心不全に対する sildenafil の臨床試験成績

Sildenafil を用いた心不全治療に関する臨床試験は複数行われている。HFrEF 患者を対象とした試験では、運動耐容能の指標である最高酸素摂取量に改善が見られ [68] [69]、メタアナリシスでも血行動態の改善が示されている [70]。一方 HFpEF 患者を対象とした試験では、肺血圧が低下し、右心機能・左室拡張能が改善したとの単施設研究が 1 例あるのみで [71]、最高酸素摂取量に変化が見られなかったとする報告が多施設研究を含めて優勢である [72] [73]。他の薬剤と同様、sildenafil が HFpEF 治療に有効性を示せない原因の 1 つとして、HFpEF の原因・程度の多様性が考えられており、今後 sildenafil が効果的な患者群を検索することの必要性が指摘されている。なお sildenafil による心不全の予防を目的とした臨床試験は実施されていない。

4. 目的

以上で示したように、左心病変の進行から左心不全、右心機能低下へ至る流れは臨床的に見られ、かつ予後を悪化させる経過である。臨床予後改善のためには左心病変が右室心筋へ与える影響の解明は重要と考えられる。しかし心室間相互作用は構造的な関係からの検討が主体であり、右室心筋に生じる分子的な影響の解析はこれまでほとんど行われてこなかった。また右室リモデリングの研究は専ら不全状態の右室を対象に行われており、肺高血圧を伴わない右室におけるリモデリングはほとんど検討されていない。そこで本研究では、左心不全を生じうる左心病変の1つである左室肥大を対象とし、左室肥大を生じうる圧負荷が短期間で右室に生じる分子リモデリングについて動物モデル（TAC マウス）を用いて検討した（目的1）。

一方、心不全治療薬の研究では細胞内 cGMP シグナルを増強する薬剤が近年注目されている。その中でも PDE5 阻害薬 sildenafil は心機能への影響、抗リモデリング効果、心不全患者への効果について最も研究されてきた薬剤の1つであり、TAC マウスの左室に生じる分子的变化も明らかにされている。しかし sildenafil の右心臓に対する作用については肺動脈狭窄等による右室後負荷増大モデル等で検討されているのみであり、分子生物学的な検討も行われていない。本研究では sildenafil の心不全治療薬としての新たな作用を検索するため、sildenafil が左心病変早期の右室へ及ぼす影響に関して TAC マウスを用いて調査を行った（目的2）。

5. 方法

5.1. 実験対象マウス

全ての実験には7-8週齢、19-26gのオスC57 BL/6Jマウス（日本クレア）を用いた。食餌としてTransgenic Dough Diet（Bio-Serv、USA）100g/kg/dayを与え、12時間ごとの明暗環境下で飼育した。動物実験計画書は東京大学動物実験専門委員会で承認を受けた（医-H15-099）。

5.1.1. 大動脈縮窄（TAC）と投薬方法

まずマウスを以下の3群に分けた：（1）sham手術を受ける群（Sham群）、（2）TAC後sildenafilの投与を受けない群（TAC-Vehicle群）、（3）TAC後sildenafilの投与を受ける群（TAC-Sildenafil群）。1% isofluraneの吸入とetomidate 10mg/kgの腹腔内投与で麻酔を行い、挿管後は機械による人工呼吸を行った。胸部正中の皮膚を切開した後、第2・第3胸肋関節を脱臼して開胸し、胸腺の奥にある横行大動脈を露出した。腕頭動脈と左鎖骨下動脈の間の横行大動脈に27ゲージ金属針をあてがった状態で7-0 proleneにて結紮した後、金属針を抜去すると大動脈は外径0.4mmに縮窄された。Sham手術では横行大動脈の露出のみを行い、縮窄は行わなかった。6-0 proleneで閉胸後麻酔から覚醒させた。TAC-Sildenafil群の食餌にはsildenafil citrate（シルデナフィルくえん酸塩；和光純薬工業）を投与量が200mg/kg/dayとなるよう混合し、Sham群・TAC-Vehicle群の食餌には何も混合しなかった。

5.1.2. 経胸壁心エコー検査

手術前と術後 2 日目に、麻酔をかけていない状態のマウスに対して、30MHz リニアアレイ探触子を備えた Vevo 2100 (VisualSonics、Canada) を用いて経胸壁心エコー検査を実施した。左室短軸断面で 2D ガイド下の M モードにて、LVESD、LVEDD、IVST、LVPWT を測定した。描出と計測は一人の計測者が実施した。LVFS、LV mass を以下のように計算した。

$$\text{LVFS} = (\text{LVEDD} - \text{LVESD}) / \text{LVEDD}$$

$$\text{LV mass} = 1.055 \times ((\text{IVST} + \text{LVEDD} + \text{LVPWT})^3 - \text{LVEDD}^3) \quad [74]$$

5.1.3. 侵襲的血行動態検査

In vivo の両心室機能を 4 電極圧容積測定カテーテルにて評価した。0.5% isoflurane の吸入、urethane 1000mg/kg、etomidate 10mg/kg の腹腔内投与にて麻酔を行い、気管切開の後、1 分間あたり 120 回、一回換気量 6-7 μ l/g の人工呼吸を行った。左外頸静脈に挿入した 30 ゲージ金属針を通じ、3 分間で 10% ウシアルブミン 50-100 μ l の容量負荷を行った後、左肋骨弓と横隔膜を切開し心尖部を露出した。左室心尖部に 26 ゲージ金属針を穿刺した孔を通して、1.4Fr 圧容積測定カテーテル (SPR-839 ; Millar Instruments、USA) を長軸に平行になるよう左室内に挿入した。また右室心尖部に 27 ゲージ金属針を穿刺した孔を通して、1Fr 圧容積測定カテーテル (PVR-1035 ; Millar Instruments) を右室内に挿入した。測定・保存・解析には LabChart 7 ソフトウェア

(ADInstruments、Australia) を備えた MPVS Ultra Foundation System

(ADInstruments) を利用した。全測定値は血圧が安定している 9 心拍の平均値を採用した。

5.1.4. 左室・右室心筋分離

最後に、マウス心筋組織の摘出と分離を行った。マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、開胸して心臓を摘出し、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS ; 136.9mM NaCl、2.68mM KCl、8.1mM Na₂HPO₄、1.47mM KH₂PO₄、pH 7.4) で十分洗浄し重量を測定した。心房を除去した後、心室接合を離断して右室自由壁を分離した。右室自由壁は重量を測定し、心室接合部から 0.5mm 程度の組織を除去した後、液体窒素にて急速凍結した。残った左室は重量を測定してから心尖部と心室中隔を離断し、心室接合部から 0.5mm 程度の組織を除去した後、液体窒素にて急速凍結した。それぞれの組織は RNA 抽出・タンパク抽出まで -80°C で冷凍保存した。

5.2. 全 RNA 単離とリアルタイム PCR による mRNA 定量

全 RNA は凍結保存した心筋組織から TRI Reagent (Molecular Research Center, USA) を用いて製造者のプロトコルに従って抽出した。抽出した全 RNA を蒸留水に溶解した後、分光光度計 Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific、USA) を用いて溶液の吸光度を測定し、A260/A280 比から収量を推定して濃度を一定に調整した。

High Capacity RNA-to-cDNA kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて mRNA を cDNA

に逆転写した後、得られた cDNA ライブラリを SYBR Green 法もしくは Taqman プローブ法を用いて PCR にて増幅した。

SYBR Green 法では THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を使用し、LightCycler 480 (Roche Applied Science、Germany) にて PCR 反応の実施、記録、解析を行った。PCR 条件は、2 分間 50°C、2 分間 95°C の後、15 秒間 95°C、1 分間 60°C を 40 周期反復した。使用したプライマーは以下の通りである。

マウス BNP forward primer 5'-AAGTCCTAGCCAGTCTCCAGA-3'

reverse primer 5'-GAGCTGTCTCTGGGCCATTTC-3'

マウス GAPDH forward primer 5'-CATGGCCTTCCGTGTTTCCTA-3'

reverse primer 5'-CCTGCTTCACCCACCTTCTTGAT-3'

Taqman プローブ法では THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (東洋紡) を使用し、QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific) にて PCR 反応の実施、記録、解析を行った。PCR 条件は、2 分間 50°C、10 分間 95°C の後、15 秒間 95°C、1 分間 60°C を 40 周期反復した。以下の TaqMan プライマー&プローブセット (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

マウス RCAN1 Mm01213407_m1

マウス GAPDH Mm99999915_g1

PCR サンプルは 2 つ組で測定し、データはそれぞれ対応する標本で測定した GAPDH で標準化して示した。

5.3. タンパク抽出

心筋組織からのタンパク抽出には、全タンパクを得る非分画抽出と、可溶性タンパク（細胞質画分）・非可溶性タンパク（細胞膜・核・ミトコンドリア画分）に分離する分画抽出を行った。

5.3.1. 非分画抽出

凍結保存した心筋組織からのタンパク抽出は、Cell Lysis Buffer（Cell Signaling Technology、USA）を用いて行った。1mM phenylmethylsulfonyl fluoride（PMSF）を添加した Cell Lysis Buffer にプロテアーゼ阻害剤カクテル（cOmplete Mini EDTA-Free；Roche Applied Science）とフォスファターゼ阻害剤カクテル（PhosSTOP；Roche Applied Science）を 10ml 当たり各 1 錠ずつ溶解し作成した溶液内で、組織をホモジェナイズした。4℃、17,800 g で 10 分間遠心し、上清としてタンパク溶液を得た。タンパク溶液は、BCA Protein Assay Reagent（Thermo Fisher Scientific）を用いて濃度を定量し、至適濃度に調整した。NuPAGE LDS Sample Buffer（Thermo Fisher Scientific）、0.1M dithiothreitol を添加し、95℃10 分間で変性処理を行った後、-20℃で冷凍保管した。

5.3.2. 分画抽出

凍結保存した心筋組織からの可溶性タンパクの抽出は、FOCUS Global Fractionation (Geno Technology、USA) のキット内容である Soluble Protein Extraction Buffer (SPE buffer) を用いて行った。1mM PMSF を添加した SPE buffer に、前項のプロテアーゼ阻害剤カクテル・フォスファターゼ阻害剤カクテルを 10ml 当たり各 1 錠ずつ溶解し作成した溶液内で、組織をホモジェナイズした。4℃、20,000 g で 30 分間遠心して上清を回収した後、沈殿に上述の SPE buffer 溶液を加え超音波破碎した。再度 4℃、20,000 g で 30 分間遠心して上清を回収し、初回に回収した上清とあわせて、可溶性タンパク溶液とした。続けて非可溶性タンパクの抽出は、前項の Cell Lysis Buffer を用いて行った。1mM PMSF 添加 Cell Lysis Buffer に前項のプロテアーゼ阻害剤カクテル・フォスファターゼ阻害剤カクテルを 10ml 当たり各 1 錠ずつ溶解し作成した溶液を、先ほど上清を回収した残渣に加え超音波破碎し、4℃、17,800 g で 10 分間遠心した。上清を回収し非可溶性タンパク溶液とした。タンパク溶液は前項と同様に、濃度調整と変性処理を行った後、-20℃で冷凍保管した。

5.4. Western blotting とその解析

タンパク溶液は 12.5% ポリアクリルアミドゲル (SuperSep Ace ; 和光純薬工業) で分離を行い、セミウェット方式でポリフッ化ビニリデン (Polyvinylidene difluoride : PVDF) メンブレンに転写した。メンブレンは 5% 脱脂粉乳、0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich、USA) を含むトリス緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline : TBS ; 20 mM Tris,

500 mM NaCl, pH 7.4) 中で 1 時間ブロッキングした後、4°C で 1 晩 1 次抗体溶液とインキュベートした。使用した 1 次抗体は以下の通りである。

anti-RGS2 1:1,000 (ab36561 ; Abcam, USA)

anti-RGS4 1:1,000 (#15129 ; Cell Signaling Technology)

anti-PKG-1 α 1:200 (cGKI α ; sc10335 ; Santa Cruz, USA)

anti-Erk1/2 1:1,000 (p44/42 MAPK ; #9102 ; Cell Signaling Technology)

anti-phospho-Erk1/2 1:1,000 (phospho-p44/42 MAPK ; #9101 ; Cell Signaling Technology)

対応する horseradish peroxidase 共役二次抗体でインキュベートした後、化学発光基質として SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) を添加し、LAS-4000 mini (富士フイルム) を用いて化学発光像を撮影した。バンド強度の定量は、画像処理ソフト ImageJ (NIH Image, USA) を用いて行った。

5.5. 統計学的解析

数値は平均値 \pm 標準誤差で示した。多群間の平均値の比較は一元配置分散分析 (one-way ANOVA) にて行った後に、post hoc として Tukey の多重比較を用いて検定した。多群間の平均値の経時的変化の比較には二元配置反復測定分散分析 (two-way repeated measures ANOVA) を用いた。P<0.05 を有意とみなした。One-way ANOVA・多重比較・two-way repeated measures ANOVA は R (The R Foundation for Statistical Computing, Austria, version 3.3.1) のパッケージである EZR (自治医科大学附属さいたま医療セン

ター)で行い [75]、それ以外の統計解析は全て Excel 2013 (Microsoft Corporation、USA) で行った。

6. 結果

6.1. 2日間の TAC は心エコー検査上の左室の大きさや機能に影響を生じない

TAC が左室の大きさと機能に及ぼす変化と、その変化に sildenafil が与える影響を調べるために、術前と術後 2 日目に M モード経胸壁心エコー検査を実施した

(Fig.1)。LVEDD や LVFS の時間経過に、3 群間で差は認められなかった (Fig. 1A)。また心エコー検査から推定した左室重量の時間経過にも、3 群間で違いは見られなかった (Fig. 1B)。

以上から、2 日間の TAC および sildenafil は、心エコー検査で測定される左室の大きさや機能に影響を与えないことが示された。

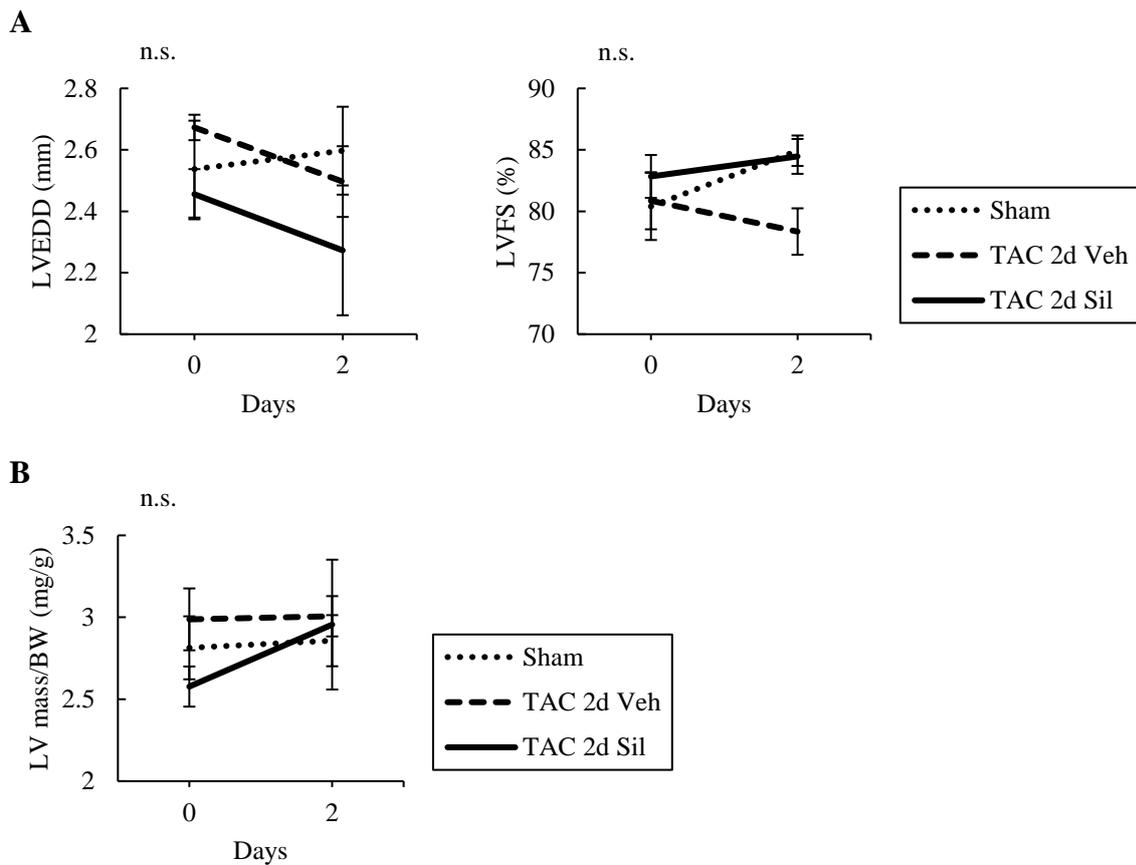


Fig.1. 経胸壁心エコーで測定したデータ

A: 左室拡張末期径 (LVEDD) と左室内径短縮率 (LVFS)。TAC および sildenafil による心機能への影響は見られない。

B: 心エコーデータから推定した体重あたりの左室重量 (LV mass/BW)。TAC および sildenafil による左室重量への影響は見られない。

平均値±標準誤差で示してある (各群 n=5)。n.s.; two-way repeated measures ANOVA にて交互作用なし。

6.2. 2日間のTACは左室圧を上昇させるが右室圧の上昇を生じない

より詳細な心機能の検討のために、圧容量測定カテーテルを用いた侵襲的血行動態検査を行った。TACによる左室後負荷の増加を反映して、左室収縮期圧はSham群(89mmHg)と比較しTAC-Vehicle群(139mmHg)・TAC-Sildenafil群(150mmHg)で上昇が見られた一方で、平均右室圧はSham群(16mmHg)・TAC-Vehicle群(13mmHg)・TAC-Sildenafil群(15mmHg)の間で差が見られず(Fig.2)、TAC後も右室後負荷が増加していないことがうかがわれた。またTAC-Vehicle群とTAC-Sildenafil群の間で左室収縮期圧・右室平均圧に有意差は見られず、sildenafil内服による左室圧・右室圧への影響は認められなかった。両心室の収縮能の指標(dp/dt_{max})と拡張能の指標(dp/dt_{min} 、relaxation time constant τ)の変化をFig.3に示す。TAC-Vehicle群はSham群と比較し、両心室における dp/dt_{max} ・ dp/dt_{min} は同等であったが、左室 τ が高い傾向にあり、TACの影響で拡張障害が生じた可能性がある。またTAC-Sildenafil群はTAC-Vehicle群と比較し左室 τ が低い傾向が見られ、TACによる拡張能低下をsildenafilが改善させた可能性が示唆される。

なお、TACによる右室圧への長期的な影響を調べるため、本研究と同様の方法でTAC-Vehicleマウスを作成・飼育し、術後3週間後に右室圧を測定した。3週間後のTAC-Vehicle群右室平均圧(18mmHg、n=6)は、2日後のTAC-Vehicle群(13mmHg、n=3)に比べ上昇が見られた(p=0.02、対応のないt検定)。C57B6Jマ

ウスを用いた先行研究で、右室の収縮期圧・拡張期圧（21.3mmHg・1.25mmHg）が TAC 後 8 週間で上昇する（EF > 50% の群で 38.7mmHg・3.15mmHg、EF < 50% の群で 55.1mmHg・8.37mmHg）との報告があり [76]、これと矛盾しない。

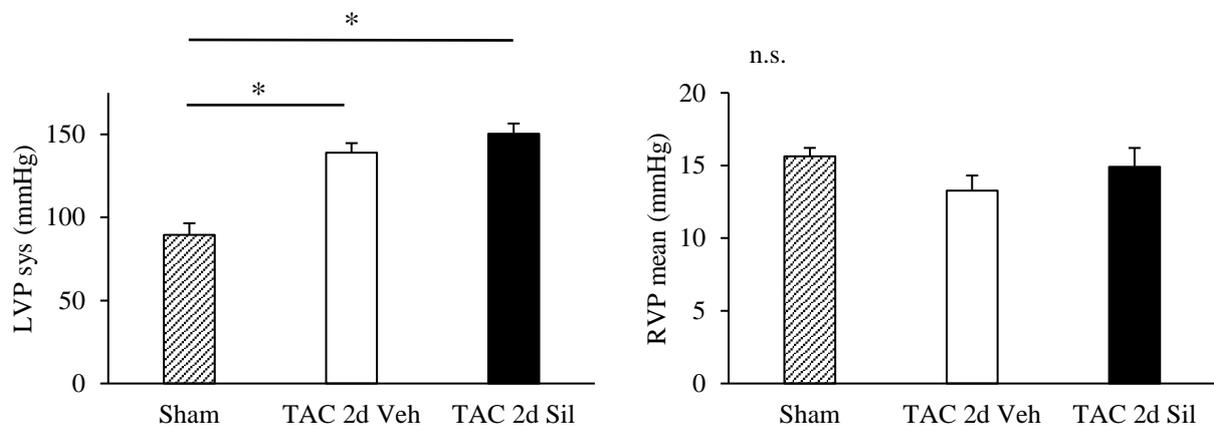


Fig.2. 侵襲的血行動態検査の結果

左室収縮期圧（LVP sys）と平均右室圧（RVP mean）。TAC により左室圧は上昇するが、右室圧には変化がなく、sildenafil は両者に影響しない。

平均値±標準誤差で示してある（各群 n=3）。n.s.; one-way ANOVA にて有意差なし。

*; $p < 0.05$ 。

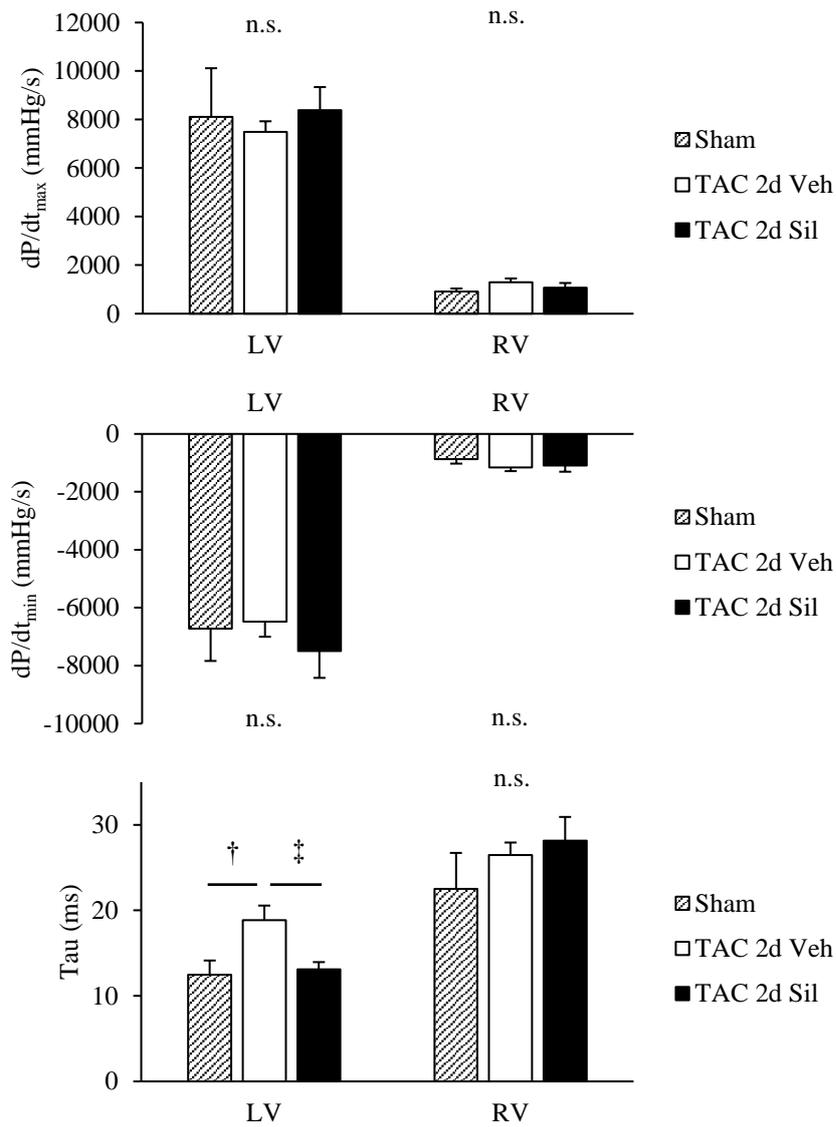


Fig.3. 侵襲的血行動態検査の結果

収縮能の指標である dP/dt_{max} 、および拡張能の指標である dP/dt_{min} と relaxation time constant (tau)。Tau により表される左室拡張能が TAC により低下し、sildenafil がそれを抑制する傾向が見られた。

平均値±標準誤差で示してある (各群 n=3)。n.s.; one-way ANOVA にて有意差なし。

†; p = 0.05、‡; p=0.07。

6.3. 2日間のTACは心臓重量を増加させるが、右室重量に影響しない

最後にマウスを安楽死させた後、心臓を摘出し重量測定を行った。TAC後の心臓は重量が増加しており（+13%）、sildenafilはその増加を抑制した（Fig. 4A）。左右の心室に分離し重量を測定したところ、左室ではTACによる重量増加をsildenafilが抑制する傾向が見られたが、右室自由壁の重量にはTACやsildenafilの影響は見られなかった（Fig.4B）。

なお、TACによる両心室重量への長期的な影響を調べるため、本研究で解析に用いたマウスとは別に、同様の方法でShamマウス（n=6）とTAC-Vehicleマウス（n=8）を作成・飼育し、術後2週間後に心臓を摘出し重量を測定した。Shamマウスと比べTAC-Vehicleマウスの脛骨長当たりの心重量（+48%、 $p<0.01$ ）・左室重量（+64%、 $p<0.01$ ）・右室自由壁重量（+15%、 $p=0.04$ ）は全て増加が見られた（ p 値は対応のない t 検定による）。先行研究では3週間で+100%の心重量増加が報告されている [66]。

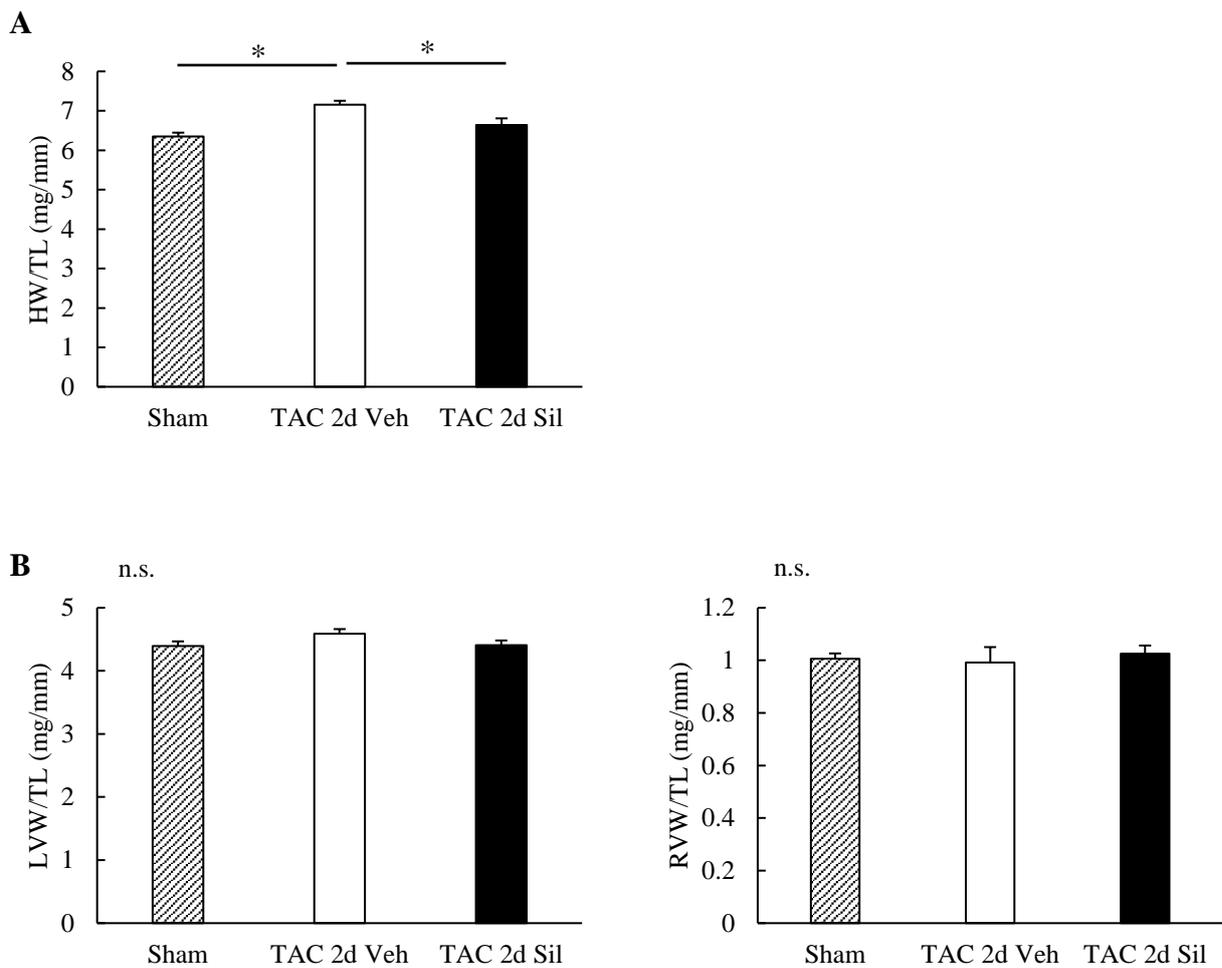


Fig.4. 摘出した心筋重量

A: 脛骨長当たりの心臓重量 (HW/TL)。TAC により心重量は増加し、sildenafil は増加を抑制する。

B: 脛骨長当たりの左室重量 (LV weight/TL) および右室重量 (RV weight/TL)。左室では TAC による重量増加を sildenafil が抑制する傾向が見られるが、右室では TAC や sildenafil の重量への影響は見られない。

平均値±標準誤差で示してある (各群 n=5)。n.s.; one-way ANOVA にて有意差なし。

*; $p < 0.05$ 。

6.4. 左室後負荷の増大は後負荷が上昇していない右室にも分子リモデリング反応を惹起し、sildenafil はその反応を抑制する

続いて、両心室の心筋における分子的なリモデリング反応を検証するため、BNP mRNA および RCAN1 mRNA の発現と ERK1/2 の活性化割合（リン酸化 ERK1/2 と全 ERK1/2 の比）について調査した。BNP は胎児型遺伝子の一種で、心筋の伸展を伴う心機能低下により分泌が増え [77]、心筋リモデリングに相関する [78]。RCAN1 は心肥大メディエータの 1 つである calcineurin の活性化により発現が増加する [79]。また ERK1/2 は心肥大を促進する $G_{\alpha q}$ -receptor-coupled-signaling [80] や calcineurin の活性化 [81] によって誘導され心肥大に寄与する。

TAC-Vehicle 群では Sham 群と比較し、両心室において BNP mRNA の発現増加が見られ、TAC による左室圧負荷が左室のみならず、後負荷に変化が見られなかった右室においてもリモデリング反応を惹起していることがうかがえた (Fig.5A)。また TAC-Sildenafil 群は TAC-Vehicle 群と比べ、両心室において BNP mRNA 発現の上昇が少なく、TAC により両心室で引き起こされるリモデリング反応を sildenafil が抑制したと考えられた。RCAN1 mRNA も BNP mRNA と同様、TAC により両心室において発現が増加し、sildenafil は両心室における発現増加を抑制した (Fig. 5B)。

ERK1/2 の活性化割合も、TAC-Vehicle 群で Sham 群と比較して、両心室において上昇が見られた (Fig. 6、Fig.7)。BNP mRNA や RCAN1 mRNA 発現と同様、左室の

みならず右室においても TAC によってリモデリング反応が誘発されたことを示唆する。また sildenafil は右室において TAC による ERK1/2 の活性化を抑制した (Fig.7)。

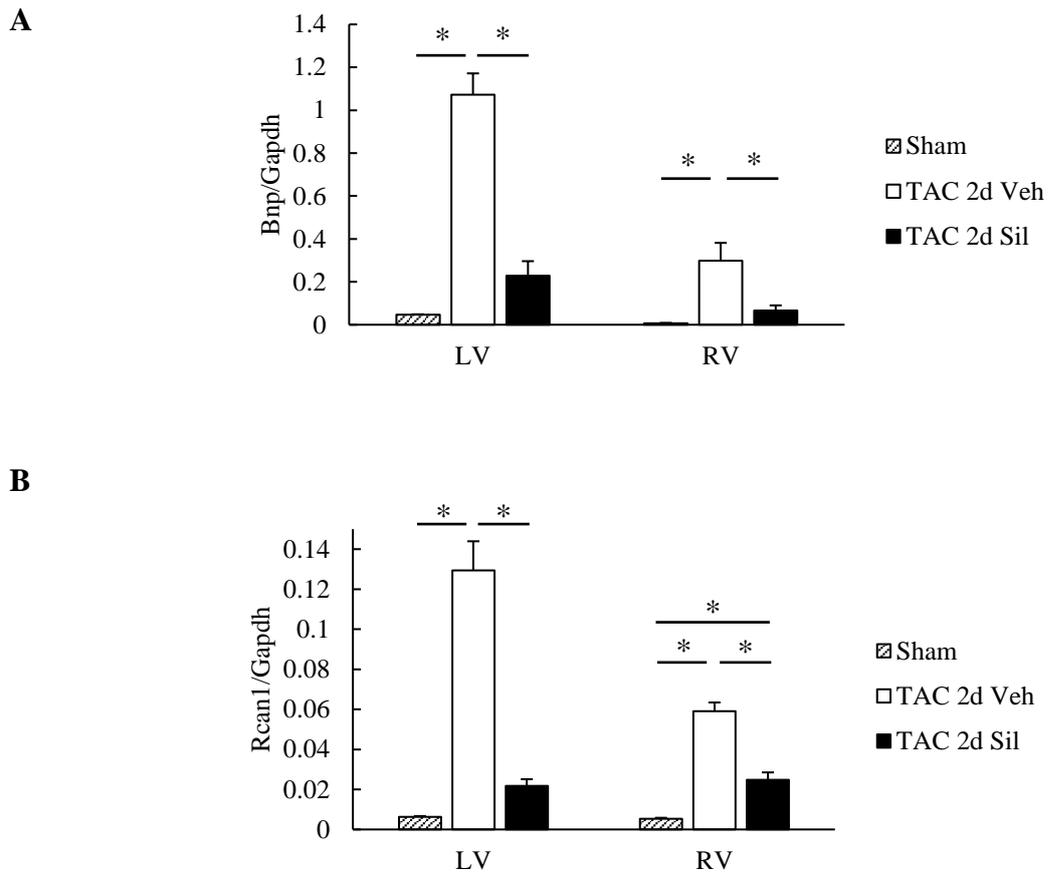


Fig.5. BNP mRNA および RCAN1 mRNA の発現

GAPDH の値で標準化してある。両心室において、TAC により発現が増加し、sildenafil はその増加を抑制した。

平均値±標準誤差で示してある (各群 n=5)。*; p < 0.05。

LV

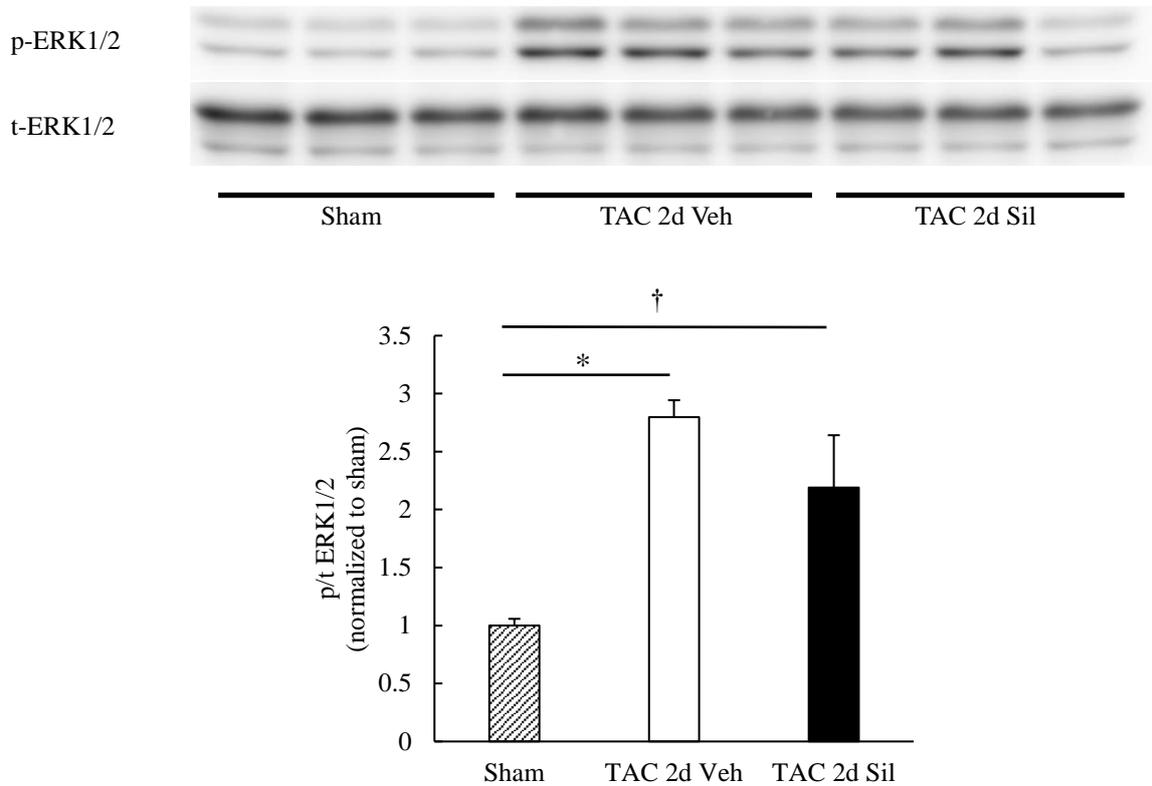


Fig.6. 左室の phospho- (p-)と total- (t-) ERK1/2 の western blot

下側には phospho/total ratio (p/t ratio)を、Sham 群の平均値で標準化した結果を示している。TAC は左室において ERK1/2 のリン酸化を促した。

平均値±標準誤差で示してある (各群 n=3)。*; $p < 0.05$ 、†; $p = 0.05$ 。

RV

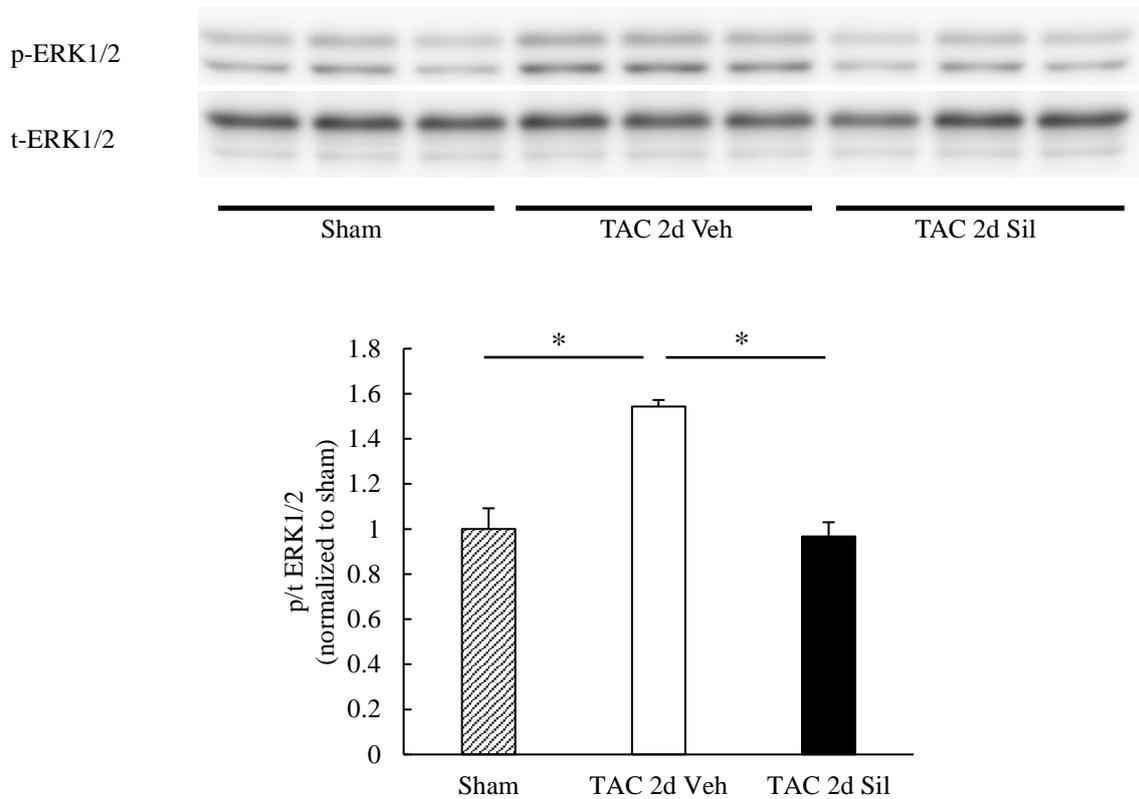


Fig.7. 右室の phospho- (p-)と total- (t-) ERK1/2 の Western blot

下側には phospho/total ratio (p/t ratio)を、Sham 群の平均値で標準化した結果を示している。TAC は右室において ERK1/2 のリン酸化を促し、sildenafil はリン酸化を抑制した。

平均値±標準誤差で示してある (各群 n=3)。*; $p < 0.05$ 。

6.5. Sildenafil は左室後負荷が増大している状況の両心室において PKG-1 α の細胞膜移行を促す

TAC や sildenafil がリモデリング抑制シグナルへ与える影響を詳細に検討するため、PKG のうち心臓で発現している PKG-1 α 、RGS2 および RGS4 の細胞内局在の変化を particulate/soluble ratio (P/S 比) を用いて調査した。Sildenafil による心肥大抑制には、PKG-1 α と RGS2 が細胞質から細胞膜に移行することが必要であることが示されている [37]。

PKG-1 α は Sham 群では両心室において細胞質（可溶性画分）に濃密な分布が見られた (Fig.8、Fig.9)。TAC-Vehicle 群は両心室ともに Sham 群と P/S 比に有意差が見られなかった。TAC-Sildenafil 群は両心室ともに TAC-Vehicle 群と比較して P/S 比が増加し、細胞膜（非可溶性画分）における分布が sildenafil により増したことがうかがえた。

RGS2 は Sham 群では両心室において、細胞膜に分布が偏って見られた (Fig. 10、Fig.11)。TAC-Vehicle 群は両心室ともに Sham 群と P/S 比に有意差が見られなかった。TAC-Sildenafil 群は右室においてのみ Sham 群と比較して P/S 比の上昇が見られたが、TAC-Vehicle 群との間には両心室において有意差が見られなかった。

RGS4 は Sham 群では両心室において、細胞質で分布密度が高く、RGS2 との細胞内局在の差異が認められた (Fig. 12、Fig.13)。TAC-Vehicle 群は両心室ともに Sham

群と P/S 比に有意差は見られなかった。TAC-Sildenafil 群は両心室ともに Sham 群と比較して P/S 比の増加が見られたが、TAC-Vehicle 群との間には両心室において有意差が見られなかった。

LV PKG-1 α

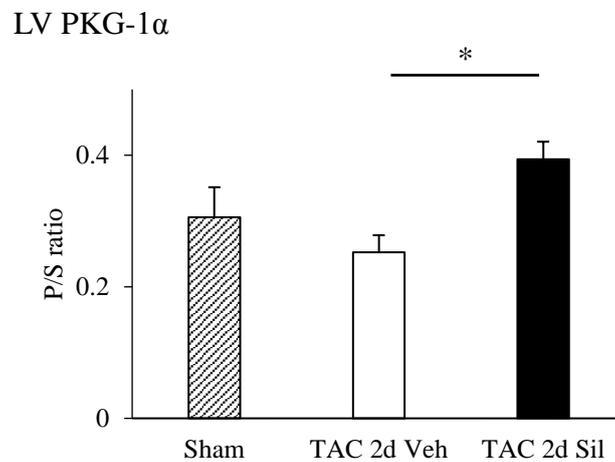
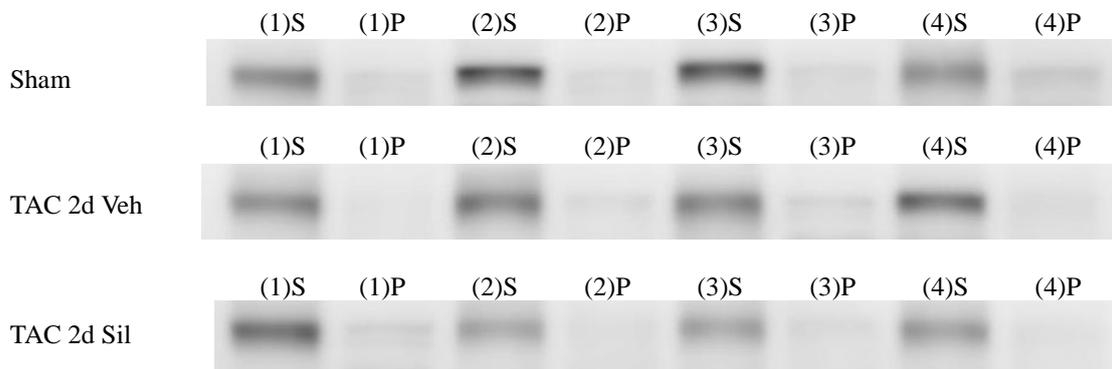


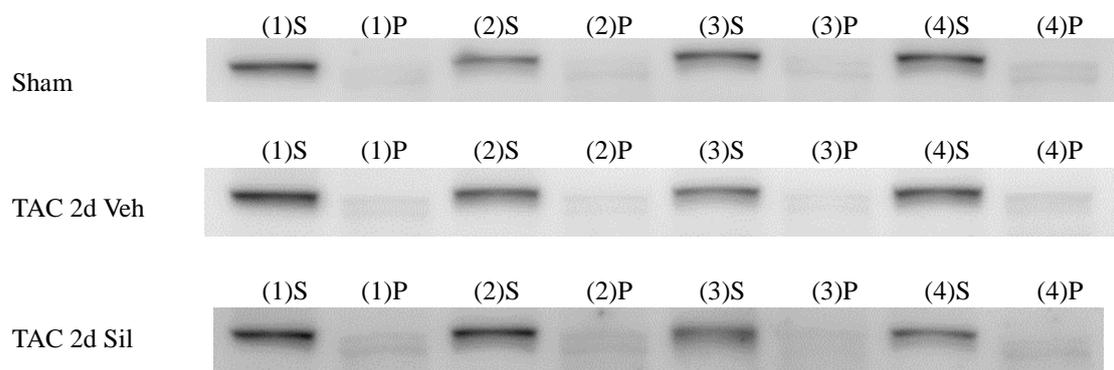
Fig.8. 左室 PKG-1 α の western blot 結果。

細胞質分画 (soluble [S]) と細胞膜分画 (particulate [P]) が並べてあり、各々のグループにおいて番号が同じレーンは同一のサンプルから得ている。下側には particulate/soluble ratio (P/S ratio) を定量化した結果を示してある。

TAC による局在の変化はなし。Sildenafil により細胞膜へ移行。

平均値±標準誤差で示してある (各群 n=4)。*; p < 0.05。

RV PKG-1 α



RV PKG-1 α

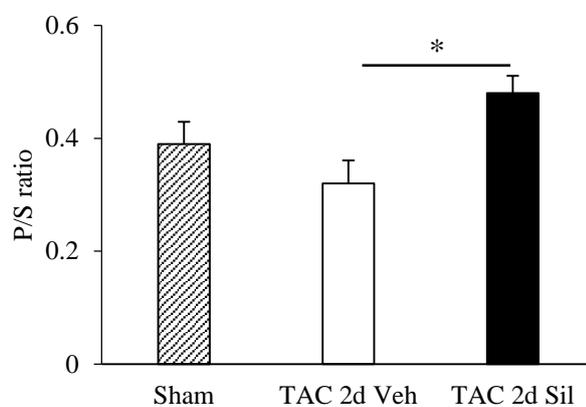


Fig.9. 右室 PKG-1 α の western blot 結果。

細胞質分画 (soluble [S]) と細胞膜分画 (particulate [P]) が並べてあり、各々のグループにおいて番号が同じレーンは同一のサンプルから得ている。下側には particulate/soluble ratio (P/S ratio) を定量化した結果を示してある。

TAC による局在の変化はなし。Sildenafil により細胞膜へ移行。

平均値±標準誤差で示してある (各群 n=4)。*; p < 0.05。

LV RGS2

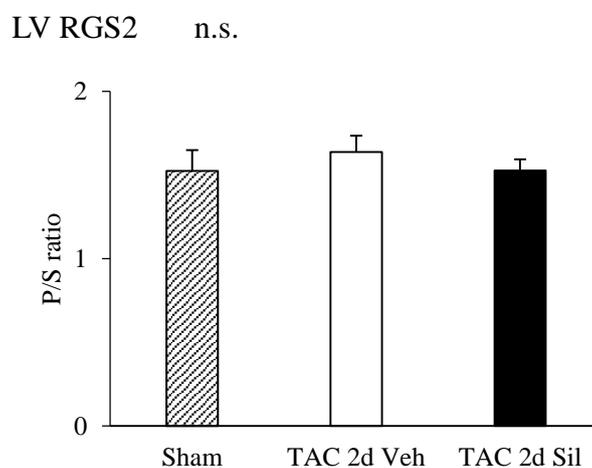
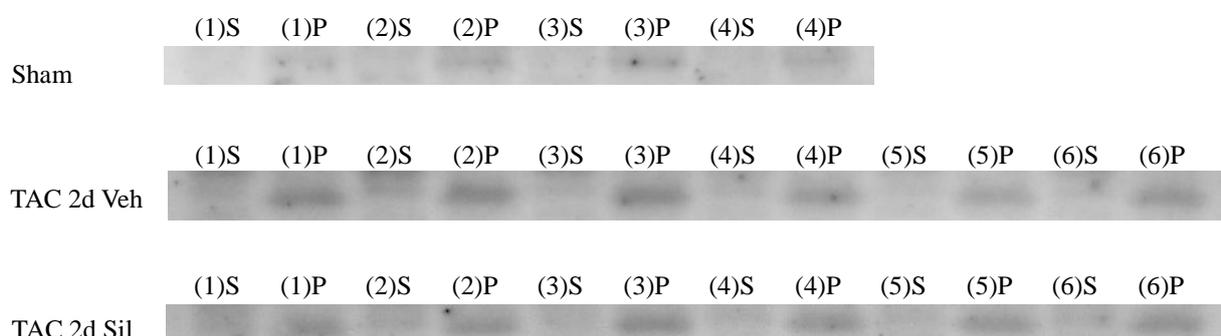


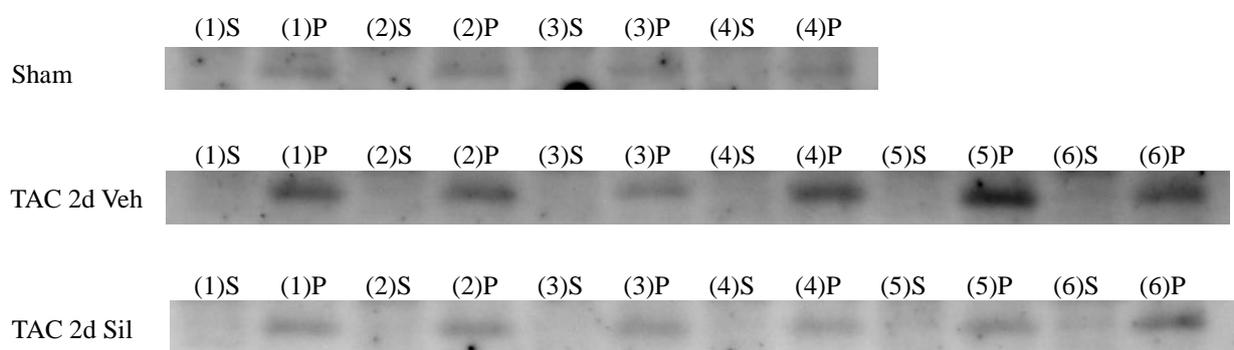
Fig.10. 左室 RGS2 の western blot 結果。

細胞質分画 (soluble [S]) と細胞膜分画 (particulate [P]) が並べてあり、各々のグループにおいて番号が同じレーンは同一のサンプルから得ている。下側には particulate/soluble ratio (P/S ratio) を定量化した結果を示してある。

TAC や sildenafil による局在の変化はなし。

平均値±標準誤差で示してある (Sham 群 n=4、TAC-Vehicle 群 n=6、TAC-Sildenafil 群 n=6)。n.s.; one-way ANOVA で有意差なし。

RV RGS2



RV RGS2

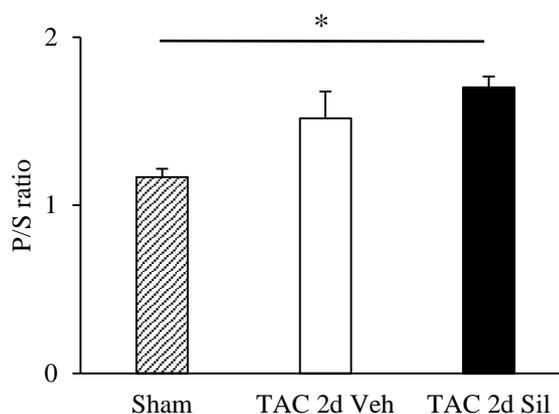


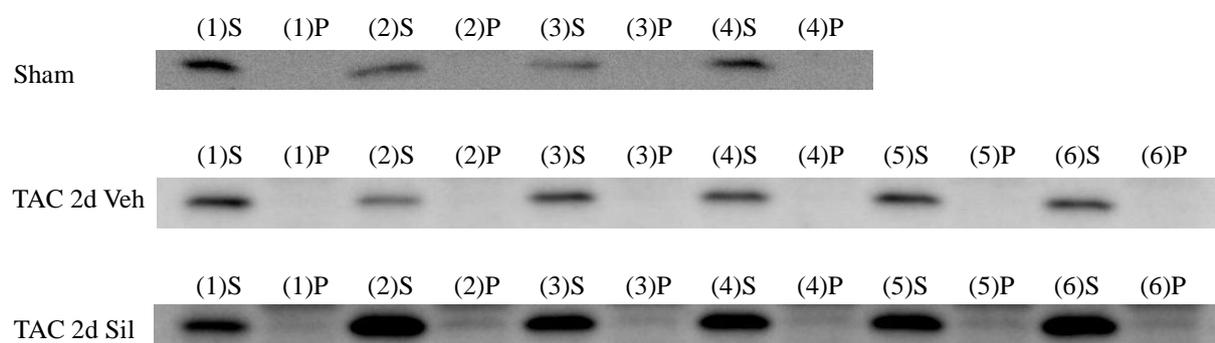
Fig.11. 右室 RGS2 の western blot 結果。

細胞質分画 (soluble [S]) と細胞膜分画 (particulate [P]) が並べてあり、各々のグループにおいて番号が同じレーンは同一のサンプルから得ている。下側には particulate/soluble ratio (P/S ratio) を定量化した結果を示してある。

TAC や sildenafil 単独からは局在の影響を受けず、併用により細胞膜へ移行。

平均値±標準誤差で示してある (Sham 群 n=4、TAC-Vehicle 群 n=6、TAC-Sildenafil 群 n=6)。*; p < 0.05。

LV RGS4



LV RGS4

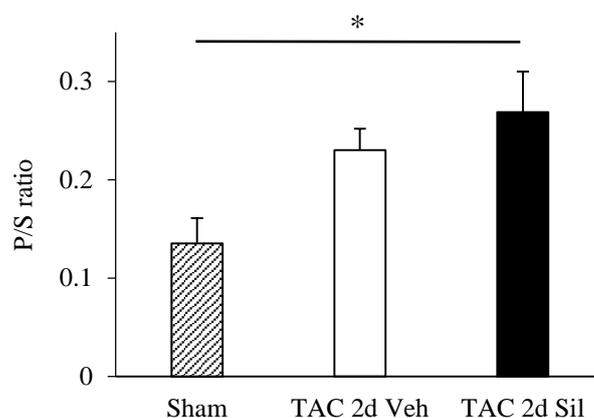


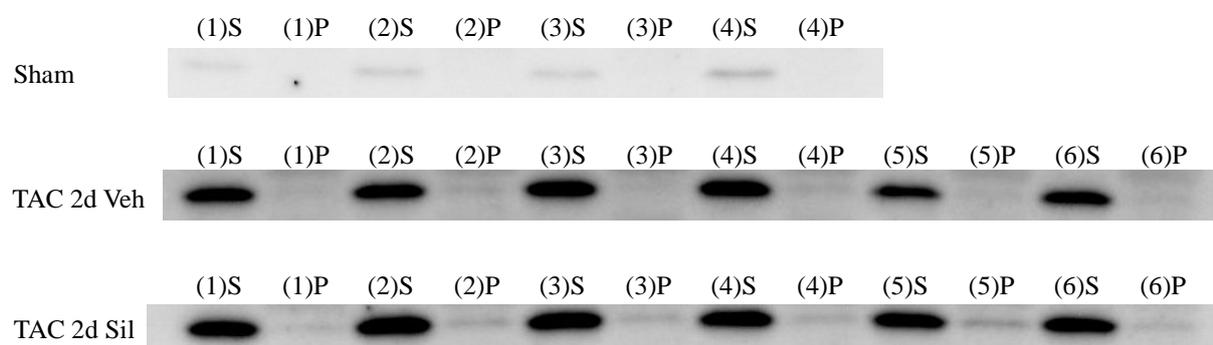
Fig.12. 左室 RGS4 の western blot 結果。

細胞質分画 (soluble [S]) と細胞膜分画 (particulate [P]) が並べてあり、各々のグループにおいて番号が同じレーンは同一のサンプルから得ている。下側には particulate/soluble ratio (P/S ratio) を定量化した結果を示してある。

TAC や sildenafil 単独からは局在の影響を受けず、併用により細胞膜へ移行。

平均値±標準誤差で示してある (Sham 群 n=4、TAC-Vehicle 群 n=6、TAC-Sildenafil 群 n=6)。*; p < 0.05。

RV RGS4



RV RGS4

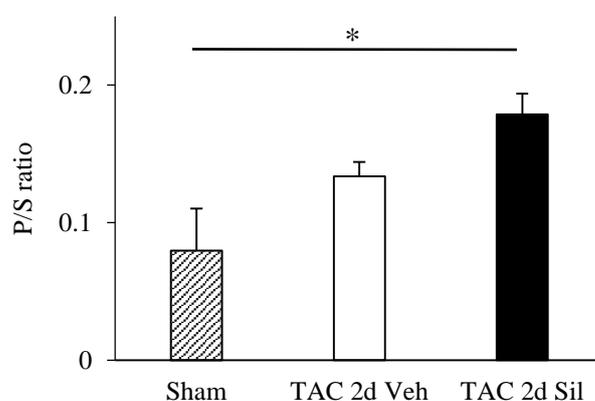


Fig.13. 右室 RGS4 の western blot 結果。

細胞質分画 (soluble [S]) と細胞膜分画 (particulate [P]) が並べてあり、各々のグループにおいて番号が同じレーンは同一のサンプルから得ている。下側には particulate/soluble ratio (P/S ratio) を定量化した結果を示してある。

TAC や sildenafil 単独からは局在の影響を受けず、併用により細胞膜へ移行。

平均値±標準誤差で示してある (Sham 群 n=4、TAC-Vehicle 群 n=6、TAC-Sildenafil 群 n=6)。*; p < 0.05。

7. 考察

7.1. 本研究で発見された事実と、それより導かれる結論

本研究ではまず 27G の太さで横行大動脈を縮窄する TAC が術後 2 日間で左室と右室に引き起こす形態的变化と血行力学的変化を検討した。摘出心重量の測定からは、2 日間の TAC は、軽度の心肥大を招くものの右室重量には影響を生じないことがわかった。侵襲的血行動態検査の結果からは、左室圧の上昇が見られ TAC による左室後負荷の上昇が認められた一方で、右室平均圧に変化は見られず肺高血圧や右室後負荷の増大は生じていないことが示された。心エコー検査・侵襲的血行動態検査の結果から、左室の明らかな拡大や収縮能低下は見られなかったが、拡張能が低下する傾向が認められた。

本研究では TAC の影響で両心室に引き起こされる分子的变化を検証した。TAC 2 日後の左室では胎児型遺伝子 BNP や calcineurin 調節因子 RCAN1 の mRNA 発現増加、 $G_{\alpha q}$ シグナルカスケードの一部である ERK1/2 のリン酸化促進が見られ、また右室でも同様に BNP・RCAN1 発現増加や ERK1/2 活性化促進が見られた。これらの結果から、短期間の左室圧負荷が後負荷の増大に伴い左室に分子的なリモデリング反応を生じるばかりでなく、後負荷が増大していない右室にも分子的なリモデリング反応を生じていることが明らかになった。また本研究では心肥大抑制に関わる主要なタンパクである PKG-1 α 、RGS2、RGS4 の細胞内局在に対して TAC が与える影響

を観察した。Sham マウスでは、両心室ともに PKG-1 α ・RGS4 は細胞質に、RGS2 は細胞膜に分布が多く偏っていたが、TAC-Vehicle マウスでもそれらの局在に変化は認められず、2 日間の左室圧負荷が心肥大抑制タンパクの細胞内局在に与える影響は検出されなかった。

本研究ではまた、2 日間の TAC によって両心室に生じる変化に PDE5 阻害薬 sildenafil が及ぼす影響を調べた。2 日間の TAC によって生じる心肥大を sildenafil は抑制した。侵襲的血行動態検査では、左室圧・右室圧に対する sildenafil の影響は見られなかった。心エコー検査・侵襲的結構動態検査の結果から、左室の大きさや収縮能への影響は見られなかったが、TAC による左室拡張能低下を sildenafil が抑制する傾向が見られた。また両心室において、2 日間の TAC で誘導された分子リモデリング反応（BNP および RCAN1 mRNA 発現）が、sildenafil により抑制された。また TAC 後の両心室において sildenafil が PKG-1 α の細胞質から細胞膜への移動を促したが、RGS2・RGS4 の細胞内局在に与える影響は検出されなかった。これらの結果から、sildenafil が両心室においてリモデリングを抑制に関与するタンパク（PKG-1 α ）の細胞膜への移行を促し、TAC により誘導された分子リモデリングを抑制したことが示された。

7.2. 本研究の独自性と関連領域へ及ぼしうる影響

左室機能低下に伴い肺高血圧が進行し、後負荷増大により機能が低下した右室では、形態的・分子的なリモデリングが生じていることが知られている [82] [83] [84]。しかし左心病変発症早期の右室リモデリングは詳しく検証されてこなかった。本研究は左心病変早期の右室に着目した点に独自性があり、また短期間の左室圧負荷が後負荷非依存的に右室に分子リモデリングを惹起するという本研究の知見は新規性がある。本研究で用いた TAC モデルは C57BL/6 マウスにおいて 3 週間で左室求心性肥大を生じ、9 週間で収縮能の低下した左室遠心性肥大を生じる左室肥大モデルである [66] と同時に、8 週間後には右室重量の増加や右室収縮期圧・拡張期圧の上昇などの右室リモデリングが生じることが先行研究にて示されており [76]、本研究の追加研究でも TAC の 3 週間後には右室平均圧の上昇が見られた。TAC モデルの時間経過は、左心病変の進行から左心不全、右心機能低下へいたる臨床的に見られる経過と類似するものであり、本研究の知見を外挿するとすれば、左室肥大患者の右室では二次性肺高血圧発症前であっても分子リモデリングが生じている可能性が示唆される。

左心機能の低下が右心機能の低下を招く要因の 1 つである構造的な心室間相互作用はこれまでも検証されてきたが [15]、分子的な影響に関してはあまり解析されてこなかった。右心病変が左室心筋に及ぼす分子的变化は、肺高血圧を作成する右室肥大モデルを用いた研究で報告されている [85] [86] [87]。Monocrotaline [85] や低酸

素血症 [86]によって肺高血圧と右室肥大を誘導したラットでは、後負荷が増加していないにも関わらず左室でミオシン重鎖アイソフォームの転換が起こる。また同様の monocrotaline 肺高血圧ラットモデルで、左室において肥大化や線維化は認めないものの収縮能の低下が見られるとする報告がある [87]。この研究では左室で endothelin-1 mRNA 発現の増加が見られ、endothelin 受容体拮抗薬が左室収縮能低下を抑制したため、endothelin-1 の関与が指摘されている。しかし肺高血圧を誘導する手段である monocrotaline や低酸素血症はそれ自体が炎症を引き起こすうえ [88] [89]、monocrotaline を使用した研究では収縮期左室圧や体血圧の有意な減少が見られており、左室の分子的变化が肺高血圧以外の要因で誘発されている可能性も否定できない。その点、本研究では左室肥大誘発のために薬剤を使用しておらず、片側の心室の後負荷の増大自体が対側の心室の心筋に分子リモデリングを生じたことを確認したという点は本研究の特徴と言える。

本研究では TAC や sildenafil がリモデリング抑制シグナルへ与える影響を詳細に調べるため、PKG-1 α ・RGS2・RGS4 の細胞内局在の変化を観察した。左室と右室の各々において RGS2 と RGS4 の両者を検討した点は本研究の独自性として挙げられる。RGS2 と RGS4 は共に G タンパク G α サブユニットを不活性化することで GPCR シグナルを減弱する点で共通している。しかし G α サブユニットの選択性が異なり、RGS2 は G α_q との反応性が非常に高い一方、RGS4 は G α_i との選択性が高いものの G α_q

とも反応する [90]。細胞内における局在も異なり共焦点蛍光顕微鏡での観察では、RGS2 は細胞膜・細胞質・核と細胞種によっても分布が様々である一方、RGS4 は細胞質への分布が主体であると報告されており [90] [91] [92] [93]、負荷がかけられていない状態の両心室心筋では RGS2 は細胞膜に、RGS4 は細胞質に多く分布したという本研究の結果はそれらと一致する。PKG-1 α は活性化されると細胞質から細胞膜に移行し [37]、RGS2 [94] と RGS4 [95] も PKG により活性化されると細胞膜上の分布が増えることが報告されている。本研究では TAC 2 日後の両心室において、PKG-1 α ・RGS2・RGS4 の細胞膜への移行が認められなかった。PKG 活性化に始まる抗リモデリング反応が誘導されなかったことがうかがわれ、心肥大が生じた結果と矛盾しない。一方、TAC 後の sildenafil 内服は、両心室において PKG-1 α の細胞質から細胞膜への移動を促進したが、RGS2・RGS4 の細胞内局在へ与える影響は本研究では検出されなかった。TAC 後の心筋において PKG-1 より下流のシグナルが sildenafil の増強効果を受けるには十分な心肥大刺激が必要と結論づける論文があり [96]、本研究でも刺激強度が不足していた可能性は考えられる。また左室の RGS4 は群間で有意差が見られたのに対し RGS2 は見られなかったことから、同じ PKG-1 α 活性のもとでも RGS2 と RGS4 は活性閾値が異なる可能性や、PKG-1 α 以外の経路で RGS4 が刺激された可能性が示唆され、今後研究の余地が残る。

本研究では、右室に生じる分子リモデリングを sildenafil が抑制することが確認された。これまでも sildenafil が右室のリモデリングに与える影響については様々な報告がある。Monocrotaline による肺高血圧モデルでは sildenafil が右室圧を低下させるとともにリモデリング反応を抑制した一方で、肺動脈絞扼による右室負荷モデルでは右室圧に変化を生じずリモデリング反応をむしろ促進する傾向にあったとする研究がある [67]。著者らは sildenafil の右室におけるリモデリング抑制作用は肺動脈弛緩による後負荷軽減が主体であるとし、右室心筋に対する直接的作用ではないと結論づけている。また肺動脈絞扼を実施直後から sildenafil を投与した場合、右室の線維化を有意に促進したという報告がある一方で [64]、肺動脈絞扼から時間が経過し右室機能低下が顕在化してから sildenafil を投与すると右室肥大は抑制されなかったものの線維化の進行が抑制されたという報告もある [65]。著者らは sildenafil が右室心筋に対し直接的なリモデリング抑制作用を持つと結論づけ、右室機能低下が発症した後の治療効果に対して期待を述べている。本研究は、後負荷の増大がない右室においても sildenafil が分子リモデリング抑制効果を生じたことを示した点で新規性を持つ。また健常な心筋では sildenafil は PKG-1 活性を増加せず [66]、健常な右室ではそもそも PDE5 の発現量が少ないため PDE5 阻害の影響も少ないとされる [63]。しかし本研究では sildenafil が右室において PKG-1 α を活性化したことからも、右室

は後負荷の増大がないにも関わらず PDE5 が増加するに足る刺激を受けていたことがうかがえる。

7.3. 本研究の限界

本研究は少なくとも3つの **limitation** を有している。1点目は術後2日目の **sildenafil** 血中濃度を測定していないことである。2日間食餌に混ぜて投与という形式で血中濃度が平衡状態に達するか定かではないが、TAC 48時間後に **sildenafil** の有意な影響が見られた先行研究の投与方法に従った [37]。2点目は TAC 動物モデルにおける心肥大とヒトにおける心肥大の時間経過の乖離である。TAC モデルは後負荷の増大により拡張障害を伴う求心性心肥大を生じるが、さらに時間が経過すると心腔が拡大し収縮障害を伴う遠心性肥大に転じる [66]。同様の求心性肥大から遠心性肥大への転化はヒトでは大動脈弁狭窄や肥大型心筋症などで見られるものの、HFpEFで見られる求心性心肥大が収縮障害を主体とする HFrEF へ進行することは稀である [55]。そのため TAC 動物モデルにおける心肥大とヒトの病的な心肥大では異なる機序が働いている可能性は考慮に入れておかなければならない。3点目もモデルの問題であるが、TAC モデルの呈する病態は上述のように進行性であり肺動脈圧を上昇しなのまま維持し続けることができないため、本研究で確認された右室の分子リモデリング反応の長期的な影響や、**sildenafil** がそのリモデリング反応を抑制することによる長期的な影響を検討することが困難な点である。

7.4. 本研究の意義と今後の発展の方向性

これまでの右室リモデリング研究はほぼ全てが、後負荷の増加に伴い既に右室機能が低下している段階におけるものであり、肺動脈圧が上昇する前の段階はほとんど検討されてこなかった。本研究で用いた左室肥大モデルである TAC モデルにおいても、早期の右室リモデリングに言及した論文は見当たらない。本研究は、左心病変初期の右室において後負荷非依存的な分子リモデリングが生じていることを示し、左心臓から右心臓への心室間相互作用を分子的变化として確認した初の研究である。しかし介在する機序は明らかになっておらず、心筋細胞の自己分泌や傍分泌、交感神経系メディエータ、炎症反応、酸化ストレスなどの関与が可能性として挙げられる。今後各種メディエータ mRNA の発現、抗炎症薬・抗酸化薬の投与による影響などを調査する予定である。右室リモデリングの長期的な役割については今後明らかにする必要があるが、それはこれまで着目されていなかった「左心病変初期段階の右室」に研究の余地が残されていることも意味する。本研究で用いた短期間の TAC は心肥大を呈するものの右室圧は上昇していない点から、二次性肺高血圧を生じていない左室肥大初期のモデルとして用い得る。

内科領域における sildenafil は肺高血圧治療薬としての役割を果たしてきたが、近年さらに心不全治療薬としての位置づけが期待されている。本研究では左心病変初期の二次性肺高血圧がない状態の右室に、sildenafil が抗リモデリング作用を持つこ

とが初めて示された。ただしその機序は明らかではなく、(1) 左室リモデリングの抑制による右室への影響の縮小化、(2) 心室間相互作用を介在する分子的变化の抑制、(3) 右室心筋に対する直接的なりモデリング抑制作用、などのいずれが主体的な要因であるかは今後研究を重ねる必要がある。例えば単離した右室心筋細胞において、cGMP 刺激薬に対する PKG や RGS の反応を観察すれば、右室心筋に対する sildenafil の直接作用を検証する一助になると考えられる。長期的効果については今後明らかにする必要があるものの、今回 sildenafil に右室リモデリングの進行を抑制する作用が認められたことから、sildenafil が左心不全における右室機能低下の発症を遅延させる可能性も示された。近年実施されている HFpEF に対する sildenafil の大規模臨床試験の中で予後改善効果を示したものはいまだなく、HFpEF の多因性・多様性を考慮し、sildenafil の効果が感受性の高い集団や投与時期を探索することの重要性が唱えられている。これまでの臨床研究は二次性肺高血圧が発症している HFpEF を対象に行われているが、今後二次性肺高血圧発症以前からの sildenafil 内服の効果を検討する臨床研究を行う意義もあるかもしれない。

本研究は、左心病変発症初期の右室という新たな研究テーマを開拓し、その段階における sildenafil の心不全治療薬としての新たな可能性を示した点で意義があると考えられる。

8. 謝辞

本論文の記述内容の一部および Fig.1~7 は以下の自著論文に用いられたものである。

Imai Y, Kariya T, Iwakiri M, Yamada Y, Takimoto E. Sildenafil ameliorates right ventricular early molecular derangement during left ventricular pressure overload. PLoS ONE.

2018;13:e0195528. doi: 10.1371/journal.pone.0195528.

本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を戴いた本学医学部附属病院肺高血圧先進医療研究学講座特任准教授（2017年当時。現本学医学系研究科内科学専攻循環器内科学教室講師） 瀧本英樹先生、本学医学系研究科外科学専攻生体管理医学講座麻酔学教室助教 假屋太郎先生に深謝の意を表す。また指導教官として本研究の実施の機会を戴いた本学医学系研究科外科学専攻生体管理医学講座麻酔学教室教授 山田芳嗣教授に感謝の意を表す。最後に本研究の遂行にあたり日頃よりご協力を戴いた本学医学系研究科内科学専攻循環器内科学教室の各位、同外科学専攻麻酔学教室の各位に謝意を表す。

9. 引用文献

1. **McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A; ESC Committee for Practice Guidelines.** ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 33: 1787-1847, 2012.
2. **Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N.** Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 35: 569-582, 2000.
3. **Mosterd A, Hoes AW.** Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 93: 1137-1146, 2007.
4. 厚生労働省大臣官房統計情報部. 平成 26 年 患者調査(傷病分類編). (オンライン)
(引用日: 2016 年 2 月 12 日.)
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/10syoubu/10syoubu/dl/h26syoubu.pdf>.
5. **Tsuchihashi-Makaya M, Hamaguchi S, Kinugawa S, Yokota T, Goto D, Yokoshiki H, Kato N, Takeshita A, Tsutsui H; JCARE-CARD Investigators.** Characteristics and

outcomes of hospitalized patients with heart failure and reduced vs preserved ejection fraction. Report from the Japanese Cardiac Registry of Heart Failure in Cardiology (JCARE-CARD). Circ J 73: 1893-1900, 2009.

6. **Shiba N, Watanabe J, Shinozaki T, Koseki Y, Sakuma M, Kagaya Y, Shirato K; CHART Investigators.** Analysis of chronic heart failure registry in the Tohoku district: third year follow-up. Circ J 68: 427-434, 2004.

7. **Zakeri R, Mohammed SF.** Epidemiology of right ventricular dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. Curr Heart Fail Rep 12: 295-301, 2015.

8. **Shah AM, Shah SJ, Anand IS, Sweitzer NK, O'Meara E, Heitner JF, Sopko G, Li G, Assmann SF, McKinlay SM, Pitt B, Pfeffer MA, Solomon SD.** Cardiac structure and function in heart failure with preserved ejection fraction: baseline findings from the echocardiographic study of the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure with an Aldosterone Antagonist trial. Circ Heart Fail 7: 104-115, 2014.

9. **Morris DA, Gailani M, Vaz Pérez A, Blaschke F, Dietz R, Haverkamp W, Özcelik C.** Right ventricular myocardial systolic and diastolic dysfunction in heart failure with normal left ventricular ejection fraction. J Am Soc Echocardiogr 24: 886-897, 2011.

10. **Guazzi M, Bandera F, Pelissero G, Castelvechio S, Menicanti L, Ghio S, Temporelli PL, Arena R.** Tricuspid annular plane systolic excursion and pulmonary arterial systolic

pressure relationship in heart failure: an index of right ventricular contractile function and prognosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305: H1373-H1381, 2013.

11. **Puwanant S, Priester TC, Mookadam F, Bruce CJ, Redfield MM, Chandrasekaran K.**

Right ventricular function in patients with preserved and reduced ejection fraction heart failure.

Eur J Echocardiogr 10: 733-737, 2009.

12. **Mohammed SF, Hussain I, AbouEzzedine OF, Takahama H, Kwon SH, Forfia P,**

Roger VL, Redfield MM. Right ventricular function in heart failure with preserved ejection

fraction: a community-based study. *Circulation* 130: 2310-2320, 2014.

13. **Iglesias-Garriz I, Olalla-Gómez C, Garrote C, López-Benito M, Martín J, Alonso D,**

Rodríguez MA. Contribution of right ventricular dysfunction to heart failure mortality: a meta-

analysis. *Rev Cardiovasc Med* 13: e62-e69.

14. **Melenovsky V, Hwang SJ, Lin G, Redfield MM, Borlaug BA.** Right heart dysfunction in

heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J* 35: 3452-3462, 2014.

15. **Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR, Dupuis**

J, Long CS, Rubin LJ, Smart FW, Suzuki YJ, Gladwin M, Denholm EM, Gail DB. Right

ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working

group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation* 114: 1883-1891,

2006.

16. **Katz AM, Rolett EL.** Heart failure: when form fails to follow function. *Eur Heart J* 37: 449-454, 2016.
17. **Santamore WP, Lynch PR, Heckman JL, Bove AA, Meier GD.** Left ventricular effects on right ventricular developed pressure. *J Appl Physiol* 41: 925-930, 1976.
18. **Dyke CM, Brunsting LA, Salter DR, Murphy CE, Abd-Elfattah A, Wechsler AS.** Preload dependence of right ventricular blood flow: I. The normal right ventricle. *Ann Thorac Surg* 43: 478-483, 1987.
19. **Do E, Baudet S, Verdys M, Touzeau C, Bailly F, Lucas-Héron B, Sagniez M, Rossi A, Noireaud J.** Energy metabolism in normal and hypertrophied right ventricle of the ferret heart. *J Mol Cell Cardiol* 29: 1903-1913, 1997.
20. **Gomez-Arroyo J, Mizuno S, Szczepanek K, Van Tassell B, Natarajan R, dos Remedios CG, Drake JI, Farkas L, Kraskauskas D, Wijesinghe DS, Chalfant CE, Bigbee J, Abbate A, Lesnefsky EJ, Bogaard HJ, Voelkel NF.** Metabolic gene remodeling and mitochondrial dysfunction in failing right ventricular hypertrophy secondary to pulmonary arterial hypertension. *Circ Heart Fail* 6: 136-144, 2013.
21. **Bishop JE, Rhodes S, Laurent GJ, Low RB, Stirewalt WS.** Increased collagen synthesis and decreased collagen degradation in right ventricular hypertrophy induced by pressure overload. *Cardiovasc Res* 28: 1581-1585, 1994.

22. **Piao L, Fang YH, Parikh KS, Ryan JJ, D'Souza KM, Theccanat T, Toth PT, Pogoriler J, Paul J, Blaxall BC, Akhter SA, Archer SL.** GRK2-mediated inhibition of adrenergic and dopaminergic signaling in right ventricular hypertrophy: therapeutic implications in pulmonary hypertension. *Circulation* 126: 2859-2869, 2012.
23. **Maron BA, Leopold JA.** The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathobiology of pulmonary arterial hypertension (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ* 4: 200-210, 2014.
24. **Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisén J.** Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324: 98-102, 2009.
25. **Hill JA, Olson EN.** Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 358: 1370-1380, 2008.
26. **Maillet M, van Berlo JH, Molkenin JD.** Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 38-48, 2013.
27. **Laughlin MH, Bowles DK, Duncker DJ.** The coronary circulation in exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H10-H23, 2012.
28. **Abel ED, Doenst T.** Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 90: 234-242, 2011.
29. **Shimizu I, Minamino T.** Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell*

Cardiol 97: 245-262, 2016.

30. **Gerdes AM, Kellerman SE, Moore JA, Muffly KE, Clark LC, Reaves PY, Malec KB, McKeown PP, Schocken DD.** Structural remodeling of cardiac myocytes in patients with ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 86: 426-430, 1992.

31. **Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR.** Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther* 128: 191-227, 2010.

32. **Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, Colucci WS, Walsh K.** Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest* 115: 2108-2118, 2005.

33. **Kang M, Chung KY, Walker JW.** G-protein coupled receptor signaling in myocardium: not for the faint of heart. *Physiology* 22: 174-184, 2007.

34. **Takimoto E.** Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ J* 76: 1819-1825, 2012.

35. **Riddle EL, Schwartzman RA, Bond M, Insel PA.** Multi-tasking RGS proteins in the heart: the next therapeutic target? *Circ Res* 96: 401-411, 2005.

36. **Zhang P, Mende U.** Regulators of G-protein signaling in the heart and their potential as therapeutic targets. *Circ Res* 109: 320-333, 2011.

37. **Takimoto E, Koitabashi N, Hsu S, Ketner EA, Zhang M, Nagayama T, Bedja D, Gabrielson KL, Blanton R, Siderovski DP, Mendelsohn ME, Kass DA.** Regulator of G protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and antihypertrophic effects of PDE5 inhibition in mice. *J Clin Invest* 119: 408-420, 2009.
38. **Tokudome T, Kishimoto I, Horio T, Arai Y, Schwenke DO, Hino J, Okano I, Kawano Y, Kohno M, Miyazato M, Nakao K, Kangawa K.** Regulator of G-protein signaling subtype 4 mediates antihypertrophic effect of locally secreted natriuretic peptides in the heart. *Circulation* 117: 2329-2339, 2008.
39. **Grossman W, Jones D, McLaurin LP.** Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56: 56-64, 1975.
40. **Shah AM, Mann DL.** In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. *Lancet* 378: 704-712, 2011.
41. **Mohammed SF, Hussain S, Mirzoyev SA, Edwards WD, Maleszewski JJ, Redfield MM.** Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 131: 550-559, 2015.
42. **Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN.** Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 72: 19-44, 2010.
43. **Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OH.** Myocardial

fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 91: 161-170, 1995.

44. **Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP.** Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 322: 1561-1566, 1990.

45. **Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D.** Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J Am Coll Cardiol* 32: 1454-1459, 1998.

46. **Klingbeil AU, Schneider M, Martus P, Messerli FH, Schmieder RE.** A meta-analysis of the effects of treatment on left ventricular mass in essential hypertension. *Am J Med* 115: 41-46, 2003.

47. **Pitt B, Reichek N, Willenbrock R, Zannad F, Phillips RA, Roniker B, Kleiman J, Krause S, Burns D, Williams GH.** Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study. *Circulation* 108: 1831-1838, 2003.

48. **Wachtell K, Bella JN, Rokkedal J, Palmieri V, Papademetriou V, Dahlöf B, Aalto T, Gerds E, Devereux RB.** Change in diastolic left ventricular filling after one year of antihypertensive treatment: The Losartan Intervention For Endpoint Reduction in Hypertension

(LIFE) Study. *Circulation* 105: 1071-1076, 2002.

49. **Devereux RB, Palmieri V, Sharpe N, De Quattro V, Bella JN, de Simone G, Walker JF, Hahn RT, Dahlöf B.** Effects of once-daily angiotensin-converting enzyme inhibition and calcium channel blockade-based antihypertensive treatment regimens on left ventricular hypertrophy and diastolic filling in hypertension: the prospective randomized enalapril study evaluating regression of ventricular enlargement (preserve) trial. *Circulation* 104: 1248-1254, 2001.

50. **Solomon SD, Janardhanan R, Verma A, Bourgoun M, Daley WL, Purkayastha D, Lacourcière Y, Hippler SE, Fields H, Naqvi TZ, Mulvagh SL, Arnold JM, Thomas JD, Zile MR, Aurigemma GP.** Effect of angiotensin receptor blockade and antihypertensive drugs on diastolic function in patients with hypertension and diastolic dysfunction: a randomised trial. *Lancet* 369: 2079-2087, 2007.

51. **Barron AJ, Hughes AD, Sharp A, Baksi AJ, Surendran P, Jabbour RJ, Stanton A, Poulter N, Fitzgerald D, Sever P, O'Brien E, Thom S, Mayet J.** Long-term antihypertensive treatment fails to improve E/e' despite regression of left ventricular mass: an Anglo-Scandinavian cardiac outcomes trial substudy. *Hypertension* 63: 252-258, 2014.

52. **Gupta A, Schiros CG, Gaddam KK, Aban I, Denney TS, Lloyd SG, Oparil S, Dell'Italia LJ, Calhoun DA, Gupta H.** Effect of spironolactone on diastolic function in

hypertensive left ventricular hypertrophy. *J Hum Hypertens* 29: 241-246, 2015.

53. **Sharma K, Kass DA.** Heart failure with preserved ejection fraction: mechanisms, clinical features, and therapies. *Circ Res* 115: 79-96, 2014.

54. **Rodrigues PG, Leite-Moreira AF, Falcão-Pires I.** Myocardial reverse remodeling: how far can we rewind? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310: H1402-H1422, 2016.

55. **Heinzel FR, Hohendanner F, Jin G, Sedej S, Edelmann F.** Myocardial hypertrophy and its role in heart failure with preserved ejection fraction. *J Appl Physiol* 119: 1233-1242, 2015.

56. **Shah SJ.** Matchmaking for the optimization of clinical trials of heart failure with preserved ejection fraction: no laughing matter. *J Am Coll Cardiol* 62: 1339-1342, 2013.

57. **Lim SL, Lam CS, Segers VF, Brutsaert DL, De Keulenaer GW.** Cardiac endothelium-myocyte interaction: clinical opportunities for new heart failure therapies regardless of ejection fraction. *Eur Heart J* 36: 2050-2060, 2015.

58. **Francis SH, Blount MA, Corbin JD.** Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev* 91: 651-690, 2011.

59. **Tsai EJ, Kass DA.** Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacol Ther* 122: 216-238, 2009.

60. **Borlaug BA, Melenovsky V, Marhin T, Fitzgerald P, Kass DA.** Sildenafil inhibits beta-adrenergic-stimulated cardiac contractility in humans. *Circulation* 112: 2642-2649, 2005.

61. **Nagayama T, Hsu S, Zhang M, Koitabashi N, Bedja D, Gabrielson KL, Takimoto E, Kass DA.** Sildenafil stops progressive chamber, cellular, and molecular remodeling and improves calcium handling and function in hearts with pre-existing advanced hypertrophy caused by pressure overload. *J Am Coll Cardiol* 53: 207-215, 2009.
62. **Bishu K, Hamdani N, Mohammed SF, Kruger M, Ohtani T, Ogut O, Brozovich FV, Burnett JC Jr, Linke WA, Redfield MM.** Sildenafil and B-type natriuretic peptide acutely phosphorylate titin and improve diastolic distensibility in vivo. *Circulation* 124: 2882-2891, 2011.
63. **Nagendran J, Archer SL, Soliman D, Gurtu V, Moudgil R, Haromy A, St Aubin C, Webster L, Rebeyka IM, Ross DB, Light PE, Dyck JR, Michelakis ED.** Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation* 116: 238-248, 2007.
64. **Borgdorff MA, Bartelds B, Dickinson MG, Boersma B, Weij M, Zandvoort A, Silljé HH, Steendijk P, de Vroomen M, Berger RM.** Sildenafil enhances systolic adaptation, but does not prevent diastolic dysfunction, in the pressure-loaded right ventricle. *Eur J Heart Fail* 14: 1067-1074, 2012.
65. **Borgdorff MA, Bartelds B, Dickinson MG, van Wiechen MP, Steendijk P, de Vroomen M, Berger RM.** Sildenafil treatment in established right ventricular dysfunction improves

diastolic function and attenuates interstitial fibrosis independent from afterload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307: H361-H369, 2014.

66. **Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA.** Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med* 11: 214-222, 2005.

67. **Schäfer S, Ellinghaus P, Janssen W, Kramer F, Lustig K, Milting H, Kast R, Klein M.** Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 does not prevent pressure-overload-induced right-ventricular remodelling. *Cardiovasc Res* 82: 30-39, 2009.

68. **Lewis GD, Shah R, Shahzad K, Camuso JM, Pappagianopoulos PP, Hung J, Tawakol A, Gerszten RE, Systrom DM, Bloch KD, Semigran MJ.** Sildenafil improves exercise capacity and quality of life in patients with systolic heart failure and secondary pulmonary hypertension. *Circulation* 116: 1555-1562, 2007.

69. **Guazzi M, Samaja M, Arena R, Vicenzi M, Guazzi MD.** Long-term use of sildenafil in the therapeutic management of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 50: 2136-2144, 2007.

70. **Zhuang XD, Long M, Li F, Hu X, Liao XX, Du ZM.** PDE5 inhibitor sildenafil in the treatment of heart failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cardiol* 172: 581-587, 2014.

71. **Guazzi M, Vicenzi M, Arena R, Guazzi MD.** Pulmonary hypertension in heart failure

with preserved ejection fraction: a target of phosphodiesterase-5 inhibition in a 1-year study. *Circulation* 124: 164-174, 2011.

72. **Redfield MM, Chen HH, Borlaug BA, Semigran MJ, Lee KL, Lewis G, LeWinter MM, Rouleau JL, Bull DA, Mann DL, Deswal A, Stevenson LW, Givertz MM, Ofili EO, O'Connor CM, Felker GM, Goldsmith SR, Bart BA, McNulty SE, Ibarra JC, Lin G, Oh JK, Patel MR, Kim RJ, Tracy RP, Velazquez EJ, Anstrom KJ, Hernandez AF, Mascette AM, Braunwald E; RELAX Trial.** Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial. *JAMA* 309: 1268-1277, 2013.

73. **Hoendermis ES, Liu LC, Hummel YM, van der Meer P, de Boer RA, Berger RM, van Veldhuisen DJ, Voors AA.** Effects of sildenafil on invasive haemodynamics and exercise capacity in heart failure patients with preserved ejection fraction and pulmonary hypertension: a randomized controlled trial. *Eur Heart J* 36: 2565-2573, 2015.

74. **Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, Hunter JJ, Chien KR, Ross J Jr.** Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation* 94: 1109-1117, 1996.

75. **Kanda Y.** Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48: 452-458, 2013.

76. **Chen Y, Guo H, Xu D, Xu X, Wang H, Hu X, Lu Z, Kwak D, Xu Y, Gunther R, Huo Y, Weir EK.** Left ventricular failure produces profound lung remodeling and pulmonary hypertension in mice heart failure causes severe lung disease. *Hypertension* 59: 1170-1178, 2012.
77. **Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K.** Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* 90: 195-203, 1994.
78. **Crilley JG, Farrer M.** Left ventricular remodelling and brain natriuretic peptide after first myocardial infarction. *Heart* 86: 638-642, 2001.
79. **Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, Olson EN, Bassel-Duby R, Williams RS.** Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res* 87: E61-E68, 2000.
80. **Bueno OF, Molkenin JD.** Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res* 91: 776-781, 2002.
81. **Zou Y, Yao A, Zhu W, Kudoh S, Hiroi Y, Shimoyama M, Uozumi H, Kohmoto O, Takahashi T, Shibasaki F, Nagai R, Yazaki Y, Komuro I.** Isoproterenol activates extracellular signal-regulated protein kinases in cardiomyocytes through calcineurin. *Circulation* 104: 102-

108, 2001.

82. **Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A, Voelkel NE.** The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* 135: 794-804, 2009.

83. **Guihaire J, Noly PE, Schrepfer S, Mercier O.** Advancing knowledge of right ventricular pathophysiology in chronic pressure overload: Insights from experimental studies. *Arch Cardiovasc Dis* 108: 519-529, 2015.

84. **Reddy S, Bernstein D.** Molecular Mechanisms of Right Ventricular Failure. *Circulation* 132: 1734-1742, 2015.

85. **Ishikawa S, Honda M, Yamada S, Goto Y, Morioka S, Ishinaga Y, Murakami Y, Masumura S, Moriyama K.** Different biventricular remodelling of myosin and collagen in pulmonary hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 19: 723-732, 1992.

86. **Sharma S, Taegtmeier H, Adroque J, Razeghi P, Sen S, Ngumbela K, Essop MF.** Dynamic changes of gene expression in hypoxia-induced right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1185-H1192, 2004.

87. **Lourenço AP, Roncon-Albuquerque R Jr, Brás-Silva C, Faria B, Wieland J, Henriques-Coelho T, Correia-Pinto J, Leite-Moreira AF.** Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling in left ventricle of monocrotaline-induced

pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1587-H1594, 2006.

88. **Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Dunston SK.** Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res* 38: 57-80, 1989.

89. **Eltzschig HK, Carmeliet P.** Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 364: 656-665, 2011.

90. **Cho H, Harrison K, Schwartz O, Kehrl JH.** The aorta and heart differentially express RGS (regulators of G-protein signalling) proteins that selectively regulate sphingosine 1-phosphate, angiotensin II and endothelin-1 signalling. *Biochem J* 371: 973-980, 2003.

91. **Chatterjee TK, Fisher RA.** Cytoplasmic, nuclear, and golgi localization of RGS proteins. Evidence for N-terminal and RGS domain sequences as intracellular targeting motifs. *J Biol Chem* 275: 24013-24021, 2000.

92. **Heximer SP, Lim H, Bernard JL, Blumer KJ.** Mechanisms governing subcellular localization and function of human RGS2. *J Biol Chem* 276: 14195-14203, 2001.

93. **Roy AA, Lemberg KE, Chidiac P.** Recruitment of RGS2 and RGS4 to the plasma membrane by G proteins and receptors reflects functional interactions. *Mol Pharmacol* 64: 587-593, 2003.

94. **Tang KM, Wang GR, Lu P, Karas RH, Aronovitz M, Heximer SP, Kaltenbronn KM, Blumer KJ, Siderovski DP, Zhu Y, Mendelsohn ME.** Regulator of G-protein signaling-2

mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med* 9: 1506-1512, 2003.

95. **Pedram A, Razandi M, Kehrl J, Levin ER.** Natriuretic peptides inhibit G protein activation. Mediation through cross-talk between cyclic GMP-dependent protein kinase and regulators of G protein-signaling proteins. *J Biol Chem* 275: 7365-7372, 2000.

96. **Nagayama T, Hsu S, Zhang M, Koitabashi N, Bedja D, Gabrielson KL, Takimoto E, Kass DA.** Pressure-overload magnitude-dependence of the anti-hypertrophic efficacy of PDE5A inhibition. *J Mol Cell Cardiol* 46: 560-567, 2009.