

## 論文の内容の要旨

論文題目 エストロゲンの非遺伝子性経路を介した心保護作用について

氏名 福馬伸章

女性ホルモンの代表であるエストロゲンは、閉経前後で変化する様々な現象を作る因子の一つと考えられ、多くの臨床研究がなされてきた。心不全イベントについては、同年代では女性よりも男性で、女性では閉経前より閉経後で多くなる傾向が報告されており、女性ホルモンが心不全を抑制する効果を有する可能性が長年、指摘されてきたが、この機序については未だ、解明されていない。エストロゲンは様々な臓器に対して効果を有しており、性周期など女性特有の作用の他にも、循環器分野では心保護作用、催血栓作用など、様々な影響が現れていると考えられている。エストロゲンを心不全治療の選択肢として役立てるために、エストロゲンの心臓への作用を解明し、より詳細な機序を解明することが必要と考えられ、今回、エストロゲンの非遺伝子経路に着目し、心保護効果との関連について検証をおこなった。エストロゲンの非遺伝子経路は、**ER $\alpha$**  (estrogen receptor alpha)が細胞膜表面に局在し、エストロゲンの核内受容体を介さずに刺激が伝わる系として報告されている。この機序は、細胞膜表面の **ER $\alpha$**  が **eNOS** (endothelial NO synthase)を刺激し、ガスメディエーターである **NO** が産生され、**NO** を介してシグナル伝達されることが既報において報告されている。一方、**NO** と心保護効果の関連については、**cGMP** (cyclic GMP)経路を介する系が既報にて報告されている。**NO** は細胞内で可溶性グアニル酸シクラーゼ (soluble guanylate cyclase : **sGC**)に作用し、活性化させる。活性化した **sGC** はグアノシン三リン酸 (guanosine triphosphate : **GTP**)から **cGMP** を合成し、**cGMP** 依存性蛋白キナーゼ (**PKG**)を活性化し、心収縮力に関わる **Ca<sup>2+</sup> handling** の改善、病的な心肥大の抑制、線維化やアポトーシスの抑制など、様々な心保護作用がもたらされる。

これらの系を結びつける研究として、**Sasaki** らのエストロゲンと **cGMP** 経路の関連を研究した2014年の報告がある。この研究では、メスマウス心不全モデルにおいて卵巣摘除を行い、エストロゲンレベルを低下させたところ、**PDE5** 阻害薬であるシルデナフィルの抗心不全リモデリングの効果が認められなくなることが示されている。

この現象については、エストロゲンシグナルの減弱によって **NO** 産生も減少し、心筋内の **cGMP** も減少したため、**cGMP** の分解を抑制する **PDE5** 阻害薬の効果が得られなくなったためという機序が考えられ、エストロゲンの **NO** 産生作用を有する非遺伝子性経路 (nongenomic pathway)がエストロゲンと **cGMP** 経路を結びつける重要な役割を果たしている可能性が示唆される。今回、**ER $\alpha$**  の非遺伝子性経路が **cGMP** 経路を介して心保護効果をもたらしていることを示すため、**ER $\alpha$**  受容体の **231K**, **233R**, **234R** を a に遺伝子改変した

マウス(KRRKI マウス)を使用した。このマウスでは、ER $\alpha$  nongenomic pathway のみ機能が障害され、genomic pathway は保存されており、ER $\alpha$  と細胞膜の anchor protein である Striatin との結合ができなくなり、ER $\alpha$  の細胞膜への局在ができなくなるため、従来からのエストロゲンの遺伝子経路を障害することなく、nongenomic pathway の機能が消失している。

この KRRKI マウス (KR)および野生型 (WT)の littermate に対して、TAC (Transverse Aortic Constriction)手術を施行し、圧負荷による心不全を作成し、圧負荷後3週間で生理学的な評価、血行動態の評価、および心筋内の遺伝子発現の変化、cGMP 経路の活性について評価を行なった。

Estradiol が存在しない WT 群では、Estradiol がある群に比べ TAC 後に有意に FS(左室収縮率)が低下するほか、Dd(拡張期左室径)の拡大が認められた。一方、KR 群においては、Estradiol の有無に関わらず、心機能の低下と Dd の拡大が顕著であった。

Sildenafil 投与を行なったところ、既報の通り、Estradiol 存在下の WT 群において、心重量の増加が抑制されていることが認められたが、KR 群においては Estradiol 存在下であっても、心機能の改善、および心重量の増加抑制は限定的であった。これらより、ER $\alpha$  nongenomic pathway が、estrogen、および Sildenafil の心保護効果に対して重要な役割を持っていることが示唆された。PV loop による血行動態解析においても、同様の傾向があることが示された。

心臓検体における rt-qPCR による遺伝子発現の解析では、TAC 後では、既報の通り、Estradiol および Sildenafil 投与によって、BNP の低下、CTGF の低下が確認された。しかし、KRRKI マウスにおいては、estradiol 投与でも BNP の改善は認めず、また Sildenafil の投与でも BNP 低下を認めなかった。 $\beta$  MHC については、Estradiol 投与下では有意な上昇を認めたが、Estradiol 投与のない群では TAC を行なっても上昇を認めず、また KRRKI マウスの群でも、Estradiol を与えても  $\beta$  MHC 上昇は限定的であった。また、Sildenafil は、E2 存在下で野生型の  $\beta$  MHC を下げていることが確認された。

さらに、cGMP 経路の活性化の評価のため、その経路の key となっている PKG 活性の心臓検体での検討をおこなった。Western blotting において PKG 活性と関連したリン酸化を起こすタンパク質である VASP を評価したところ、WT マウスでは、Estradiol によって VASP 活性が上がるのに対し、KR マウスでは estradiol 存在下でも卵巣摘出された WT マウスとリン酸化の量が変わらなかった。また、WT マウスでは、estradiol の存在下で Sildenafil の投与にて VASP 活性が上昇するのに対し、KRRKI マウスでは estradiol の存在下であっても、Sildenafil 投与で VASP リン酸化の量は上昇しなかった。

さらに、ELISA によって、PKG の主要な subtype である PKG1 の活性を検討した。卵巣摘出されたマウスでは、TAC 後も PKG1 活性が上昇しなかったのに対し、Estradiol 存在下では TAC 後に PKG1 活性は上昇し、Sildenafil の投与によってさらに PKG1 活性が上昇

することが確認された。また、KRRKI マウスでは estradiol の存在が PKG1 活性を変化させることはなかった。また、Sildenafil の投与をおこなっても、活性化の反応に乏しい結果となった。これらの結果から、KRRKI マウスで障害されている ER $\alpha$  nongenomic pathway は、estrogen を介する PKG1 活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

一方、nongenomic pathway を介して産生される NO が、エストロゲンが存在しない系においても cGMP 経路を介する心保護効果をもたらすことを示すため、sGC stimulator である Riociguat を卵巣摘出マウスに投与する実験を行なった。心エコーによる生理学的な解析では、卵巣摘出マウスにおいても、Riociguat 投与群において有意に左室短縮率の改善をみとめた。また、PV loop による血行動態の解析においても、同様の傾向が認められた。mRNA 発現量の解析において、Riociguat 投与下の卵巣摘出マウスでは有意に  $\beta$  MHC の上昇、CTGF の低下、BNP の低下を認めた。Riociguat 投与下では、estrogen シグナル非存在下でも心肥大シグナルの増加、心臓組織の線維化の抑制、心不全の改善が起こることが示唆された。

引き続き、心臓内での cGMP 経路の活性を評価するため、VASP のリン酸化、および ELISA による PKG1 活性を評価した。Riociguat 投与マウスでは、estradiol 非存在下であっても VASP 活性の上昇、および PKG 1 活性が上昇することが認められた。これらから、sGC の刺激はエストロゲンシグナル非存在化においても、cGMP 経路を活性化させ、心保護効果をもたらすことが示された。

これらの研究結果から、従来では慢性心不全に対して予後改善効果を認めなかったエストロゲンおよび PDE5 阻害薬に関連した、新たな治療戦略が見出された。心不全患者の約半数を占めると考えられる、閉経後女性における新規の心不全治療として、エストロゲンの非遺伝子性経路を用いた治療、および sGC stimulator による治療が、奏功する可能性がある。