

右心室疾患における補体系の役割の解明

伊藤 章吾

慶應義塾大学医学部循環器内科

The analysis for relationship between right ventricular originated diseases and complement system

Shogo Ito

Department of Cardiology, Keio University School of Medicine

[はじめに]

右室機能障害を呈する疾患は右心不全、肺高血圧症、致死性心室性不整脈などが存在し、右室機能障害自体は決して珍しくない。一方、左心不全に対しては、これまでに広く病態解明研究が行われ、新たな治療ターゲットを生み出そうと努力が重ねられている。右心室は単に肺へ血液を送ることが主要な役割と考えられているが、後述するように一度機能不全に陥ると予後が悪いことが明らかとなってきた。しかし、右室疾患は共通して基礎研究からのエビデンスが乏しく、特異的な治療法が存在しない。本稿では、主要な右心室疾患のまとめ、我々の研究の概要を記し、右心室疾患に特異的な治療法開発の必要性について考察したい。

[右心不全について]

右心不全は、左心不全に伴って受動的に生じる右心不全、右心室固有の機能障害に由来する右心不全がある。

左心不全に伴って生じる右心不全は厄介な存在である。左心不全に合併する腎不全の程度は左室の駆出量ではなく、右心機能の程度と正相関する事がわかってきた¹⁾。また、低左室機能患者に用いられる植込み型補助人工心臓留置後に、右心不全を生じ、

右室にも補助循環を要する症例は極めて予後が悪い²⁾。また、左室への補助循環のみであれば体内植込み型が適用されるが、両心室補助循環であれば体外式となり長期間の入院加療を強いられることになる。

右心室固有の機能障害の原因と治療法をまとめると、右室梗塞・右室心筋症に対しては低心拍出が解除されない場合は強心剤・機械的循環補助が選択され、先天性心疾患・収縮性心膜炎に対しては外科的手術が選択される。右室低心拍出によって右室容量が増加すると、左室を圧迫し左室容量を低下させ、左室低心拍出となるが³⁾、現状この悪循環を断つ薬物治療法は強心剤のみである。しかし、強心剤は心筋酸素消費量を低減しない治療法であり、予後改善効果は無い。左心不全に対しては β 受容体遮断薬、利尿剤、アンジオテンシン変換酵素阻害剤などの有用性が広く知られているが、右心不全においては有害に作用する場合がある⁴⁾。

つまり、「右心室の機能低下を防ぎつつ体循環に有害に作用せず患者の予後を改善する治療薬」は存在せず、右心不全に関連する諸問題は改善されないままとなっている。

[肺高血圧症]

肺動脈性肺高血圧症は、右心不全が必発する疾患

である。肺動脈のリモデリングの進行により、右室に圧負荷がかかり、右室の拡大、左室の圧迫を来す。肺動脈性肺高血圧症そのものも難治性で、エンドセリン受容体拮抗薬、シルデナフィル、エポプロステノール等の併用療法が選択される。しかしそれでも緩徐に肺動脈リモデリングが進行し、最終的に右心不全を合併した場合、強心剤と利尿剤の使用が主体となる⁵⁾。しかし、基礎疾患の病態が重症であるため長期予後を検討した研究は乏しく、効果の高い薬剤がどれかは分かっていない。このため個々の症例に応じて、後追いで薬剤の選択をせざるを得ない。

[致死性心室性不整脈について]

致死性心室性不整脈疾患は、Brugada 症候群、催不整脈性右室心筋症などが知られており、青壮年期の突然死の原因となる。本邦においてこれらの疾患で突然死する 35 歳以下の人数は少なくとも年間 2000 人と考えられている⁶⁾。これらの疾患は、共通して右室流出路(RVOT)で線維化・脂肪置換が起こることが知られており、同部位が不整脈に維持にとって重要な部位として機能する事がわかってきた⁷⁾。繊維脂肪変性を来した部位のカテーテルアブレーションが有用である一方、治療後再発した場合は手技的に再治療が困難である。現在、突然死予防効果が証明されている治療は植え込み型除細動器のみであり、除細動ショックの予期不安・誤作動により患者の生活の質の向上に寄与しない。よって病態を解明し、薬物療法を確立する必要性が高い疾患であると考えられる。

[右心疾患に対する新たな治療標的の探索]

右心疾患に特異的に効果を発揮する治療法が創出される必要性が高いことを述べたが、我々は特に右

室流出路に注目した。右室流出路は催不整脈性の高い部位であり、発生源も神経堤由来と独特な部位であるが、成人期においてどのような特徴を有するかは分かっていない⁸⁾。しかし、RVOT は特有の性質を有しているということは、RVOT に高い生理活性物質が存在する可能性があるためであると考え、それを検出する目的で網羅的遺伝子発現解析を行った。

[方法]

1. 12 週齢の野生型オスマウスの心臓を右室流出路、右室、左室、心室中隔の 4 箇所に分け、網羅的 mRNA 発現解析 (Agilent® SurePrint Mouse GE 8x60k Ver.2.0) を行ない、発現変動遺伝子の抽出を Gene Spring (Agilent®)を用いて行った。得られた発現変動遺伝子のパスウェイ解析を、Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN®)で行った。
2. *in vitro*: 心筋細胞に対する補体副経路の作用を調べる目的で、胎仔ラット心筋細胞に対して C3a リコンビナントタンパク投与を行った。
3. *in vivo*: 左心不全モデルとして大動脈縮窄モデル (TAC)、右心不全モデルマウスとして肺動脈縮窄モデルマウス (PAC)をそれぞれ作製し、mRNA 発現変動を調べた。さらに、同様のモデルを C3 ノックアウト (KO)マウスにも作製し、表現型の差異を検討した。

[結果]

1. 網羅的 mRNA 発現解析

計 6 個体の野生型マウスを用いた。統計学的解析により約 950 種類の発現変動遺伝子を抽出できた。この発現変動遺伝子を、Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN®)を用いて解析し、RVOT では補体経路が

活性化していることが示唆された。ネットワーク解析をみると、特に補体副経路に含まれる遺伝子が多く存在し、中でも *Cfd* が他部位の 25 倍以上と、著明に高発現であった。

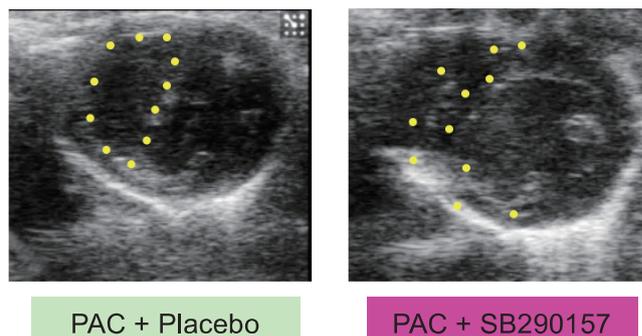
2. *in vitro* 解析

右室流出路で補体経路の活性化と、*Cfd* が高発現していた結果から、*C3a* が局所的に強く作用している可能性を考えた。ラット胎仔初代培養心室筋細胞 (NRVM) に対して、*C3a* リコンビナントタンパクを投与したところ、MAP キナーゼのリン酸化を認め、これは *C3aR* のノックダウンで減弱した。これより、心筋細胞に対して *C3a* は *C3aR* を介して特異的に細胞内シグナルカスケードのリン酸化を介し、不全心筋様に変化することがわかった。

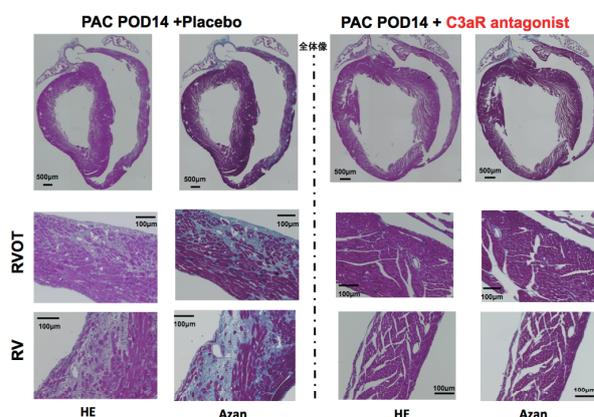
現在まで、*C3a* が心筋細胞に対してどの経路を介して特異的作用をもたらすか分かっていなかった。我々は次に、*C3a* リコンビナントタンパクを投与した NRVM を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。統計学的解析を行い、ストレス応答性 MAP キナーゼパスウェイの *JNK* が活性化している可能性が分かった。

3. *in vivo* 解析

in vitro 解析結果より、心筋であれば部位に関わらず不全心に補体の活性化は関連すると考え、左心不全モデルとして TAC モデルを作製し、*C3KO* と野生型の TAC モデルを比較したところ、28 日目の左心機能の低下度に差が無かった。しかし予想外なことに、*C3KO* では *RV*・*RVOT* の線維化マーカー、心不全マーカーの遺伝子発現が特異的に抑制された。次に、右心不全(PAC)モデルを作製したところ、*C3KO* では右心機能の低下が有意に抑制されていた。



【図 1】肺動脈縮窄モデル(PAC)に対する薬剤投与実験 SB290157(*C3a* 受容体アンタゴニスト)投与によって、右室拡大、右室収縮能低下が抑制された。



【図 2】薬剤投与実験における組織像。PAC 後、右室広範囲に認められる線維化が SB290157 投与によって抑制されている。

更に、野生型 PAC モデルに対し *C3aR* アンタゴニストの SB290157 を 14 日間投与したところ、右心不全は発症せず、*RVOT*・右室線維化が著明に抑制された。右心不全時に、*RVOT* に発現する *Cfd* によって *C3a* が産生され、右心不全を増悪させる効果をもたらしていると考えられた。

[考察]

本研究で、①右室流出路に *Cfd* が多く存在していた、②*C3a* タンパク投与によって心筋細胞は不全心筋の特性を獲得した、③*C3*-*C3a* を阻害することで右心不全の進行が抑制された、といった知見が得られた。

RV と LV の心筋細胞の性質の違いについての報告は限られている。Ikeda⁸⁾らは RV の方が急性の圧負荷に対して ROCK2 発現上昇が急峻であるため、RV 心筋の負荷脆弱性がより強いと述べている。このように特定の分子の働きによって左右の心室筋がそれぞれ特有の性質を有している可能性は大いにありと考えられる。本研究では左心不全モデル・右心不全モデルで共通して、C3 を阻害すると RV での心不全の表現型が減弱した。特に PAC モデルにおいて RV のリモデリングを強力に抑制したモデルは数少なく、このメカニズムの解明を進める必要がある。

本研究は未だ preliminary な段階であり、まだ細胞生物学的メカニズムは解明できていない。しかも、本研究の出発点が、健常な野生型マウスの RVOT で Cfd が高発現であったという点であり、健常な状態に対する Cfd の役割もまた明らかにすべきである。本研究の最初のゴールは、「右心不全に対して C3-C3a の抑制が有効である」という点であるため、健常な状態での Cfd の役割が明らかとならなければ、実臨床への応用ができない。更に、RVOT を起源とする致死性不整脈が Cfd や C3-C3a の阻害によって抑制できるかについても、マウス心臓の電気生理学的検討によって明らかにしたい。

Limitation として、TAC モデル・PAC モデルが理想的な心不全のモデルとして良いかについては現在でも議論が分かれている。以前に比べて虚血性心疾患による死亡者が減少傾向であるため、冠動脈結紮ではなく TAC・PAC モデルを用いた研究が世界的に好まれるようになってきた。しかし、大血管を結紮し、心室に非常に強い圧負荷を与え、短期間で末期心不全になるようなモデルであり、当然ヒトではこのような状態になることはあり得ない。一方で他の心不全モデルとして高頻度ペーシングモデル、

カテコラミン負荷モデル、アンジオテンシン持続投与モデルなどが用いられるが、再現性を持って必ず同程度の心不全を作製できるモデルは少なく、どの方法も limitation は存在する。よって TAC・PAC モデルに頼らざるを得ない⁹⁾。

現在、補体経路に対する分子標的療法の開発が進み、Cfd を阻害する小分子化合物まで登場している¹⁰⁾。本研究を通じ、Cfd 阻害が、右心不全から RVOT 起源の致死性不整脈疾患まで幅広く効果のある治療法に応用される事が我々の目標である。先に述べた通り、右心不全に有効な治療法も無ければ、単一の分子を標的とした心不全そのものに有効な治療法も存在しない¹¹⁻¹³⁾。双方の課題を克服する第一歩となるよう、更に研究を遂行させたい。

[結論]

RVOT で高発現する Cfd により局所的に産生される C3a により右室特異的な線維化が起こる可能性が示唆された。この知見により致死性不整脈の基質を直接標的とする新規治療法を創出できる可能性がある。

[謝辞]

第 55 回日本補体学会学術集会にて、日本補体学会より奨励賞を賜り、また本受賞寄稿を賜り心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行において日本補体学会より委託研究として多大なるご支援・ご指導を頂いておりますことに対し、この場をお借りし深く感謝申し上げます。

[利益相反]

本論文内容に関連した開示すべき COI はありません。

[文献]

- 1) Damman K, van Deursen VM, Navis G, et al. Increased central venous pressure is associated with impaired renal function and mortality in a broad spectrum of patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 53: 582-588 (2009)
- 2) Meyer P, Filipatos GS, Ahmed MI, et al. Effects of right ventricular ejection fraction on outcomes in chronic systolic heart failure. *Circulation* 121: 252-258 (2010)
- 3) Carroll JD, Lang RM, Neumann AL, et al. The differential effects of positive inotropic and vasodilator therapy on diastolic properties in patients with congestive cardiomyopathy. *Circulation* 74: 815-825 (1986)
- 4) Leier CV, Bambach D, Nelson S, Hermiller JB, Huss P, Magorien RD, Unverferth DV, et al. Captopril in primary pulmonary hypertension. *Circulation* 67: 155-161 (1983)
- 5) Westerhof BE, Saouti N, van der Laarse WJ, et al. Treatment strategies for the right heart in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res.* 113: 1465-1473 (2016)
- 6) Bagnall R.D, Weintraub RG, Ingles J, et al. A prospective study of sudden cardiac death among children and young adults. *N Engl J Med.* 374:2441-52 (2016)
- 7) Nademanee K, Raju H, de Noronha SV, et al. Fibrosis, Connexin-43, and Conduction Abnormalities in the Brugada Syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 66: 1976-1986 (2015)
- 8) Ikeda S, Satoh K, Kikuchi N, et al. Crucial role of rho-kinase in pressure overload-induced right ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34: 1260-1271 (2014)
- 9) Mohamed BA, Hartmann N, Tirilomis P, et al. *Sci Transl Med.* 10: eaan0724 (2018)
- 10) Crowley AC, Delgado, O, Will-Orrago A, et al. Induction of Ocular Complement Activation by Inflammatory Stimuli and Intraocular Inhibition of Complement Factor D in Animal Models. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 59:940-951 (2018)
- 11) Packer M, O'Conner C, McMurray JJV, et al. Effect of ularitide on cardiovascular mortality in acute heart failure. *N Engl J Med* 376: 1956-1964 (2017).
- 12) Meyer S, Teerling JR, Metra M, et al. Sex differences in early dyspnea relief between men and women hospitalized for acute heart failure: insights from the RELAX-AHF study. *Clin Res Cardiol.* 106: 280-292 (2017)
- 13) Nanasi P, Komaromi I, Gaburjakova M, et al. Omecamtiv mecarbil: A myosin motor activator agent with promising clinical performance and new *in vitro* results. *Curr Med Chem* 15: 1720-1728 (2018)