

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

低出力パルス波超音波治療（LIPUS）は肺高血圧症マウスの右心機能を改善する
-新たな非薬物治療法としての可能性-

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻
内科病態学講座循環器内科学分野
中田 貴史

	<u>ページ</u>
1 目次	
2 1. 要約	・・・ 3
3	
4 2. 研究背景	・・・ 7
5	
6 3. 研究目的	・・・ 11
7	
8 4. 研究方法	・・・ 12
9	
10 5. 研究結果	・・・ 23
11	
12 6. 考察	・・・ 32
13	
14 7. 結論	・・・ 38
15	
16 8. 謝辞	・・・ 39
17	
18 9. 文献	・・・ 40
19	
20 10. 図の説明	・・・ 48
21	
22 11. 図	・・・ 59
23	
24 12. 表	・・・ 83
25	

1. 要約

1
2
3 【背景】 右心不全は肺動脈性肺高血圧症 (PAH) 患者の重要な予後規定因子であるが、
4 有効な治療法は未だ確立されていない。我々はこれまでに、低出力パルス波超音波
5 (LIPUS) が、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の活性化を介した微小循環の改善
6 により、左心不全動物モデルの心機能を改善することを示してきた。

7 【目的】 本研究では、2 つの右心不全動物モデルを使用し、eNOS の機能不全が右心
8 不全に関与しているかどうか、また、LIPUS 治療が右心不全を改善するかどうかを検
9 討した。

10 【方法と結果】 右室圧負荷による右心不全モデルとして野生型および eNOS 遺伝子欠
11 損 (eNOS^{-/-}) マウスの肺動脈縮窄 (Pulmonary artery banding ; PAB) モデルを使用し、
12 PAH による右心不全モデルとして Sugén/hypoxia (SU/Hx) ラットを使用した。野生型
13 マウスに対して PAB を行ったところ、右室での eNOS 活性が有意に低下しており、
14 eNOS^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べて PAB 後の右心不全が有意に増悪していた。
15 プラセボ治療と比較して、LIPUS 治療は eNOS とその下流のシグナル (可溶性グアニ
16 ル酸シクラーゼ、プロテインキナーゼ G など) の活性化を介して、PAB マウスの右心
17 機能障害を有意に改善させたが、eNOS^{-/-}マウスでは LIPUS 治療の有効性は消失した。
18 SU/Hx ラットでも、LIPUS 治療はプラセボ治療と比較し右心機能障害を改善させた。
19 さらに、SU/Hx ラットの RV から採取した心筋組織 (trabeculae) を用いて電気刺激に

1 よる収縮下での発生張力と細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を測定した。LIPUS 治療群では、
2 プラセボ群と比較し最大収縮速度 ($dF/dt \text{ max}$)、最大弛緩速度 ($dF/dt \text{ min}$) の有意な増
3 加と、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の減衰時間の有意な短縮が認められ、LIPUS 治療は組織レベルでも心筋
4 の収縮/弛緩特性を改善させることが示唆された。右室における蛋白発現の解析では、
5 LIPUS 治療により SU/Hx ラットの右室における Ca^{2+} ハンドリング関連タンパク質
6 (SERCA2、ホスホランバン) の発現が亢進した。組織学的には、LIPUS 治療により
7 両モデルにおいて心筋細胞の肥大と心筋間質の線維化の改善が認められた。

8 **【結論】** 以上の結果から、eNOS が右心不全の病態生理において重要な役割を果たし
9 ていることが明らかになった。LIPUS 治療は eNOS-NO-cGMP-PKG 経路の活性化を介
10 して右心不全を改善させうることが示唆された。

11

12

略語リスト

- 1
- 2 BW : body weight 体重
- 3 CO : cardiac output 心拍出量
- 4 CSA : cross-sectional area 断面積
- 5 cGMP : cyclic guanosine monophosphate 環状グアノシンーリン酸
- 6 eNOS : endothelial nitric oxide synthase 内皮型一酸化窒素合成酵素
- 7 devF : developed force 発生張力
- 8 EDPVR : end-diastolic pressure-volume relation 右室拡張末期圧容量関係
- 9 GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase グリセルアルデヒド3リン酸脱水
- 10 素酵素
- 11 HE : hematoxylin-eosin ヘマトキシリン・エオジン
- 12 HFpEF : heart failure with preserved ejection fraction 左室駆出率の保たれた心不全
- 13 HR : heart rate 心拍数
- 14 HT : hypertension 高血圧
- 15 HW : heart weight 心重量
- 16 Ispta : spatial peak temporal average intensity 時間平均強度の空間的ピーク値
- 17 LIPUS : low-intensity pulsed ultrasound 低出力パルス波超音波
- 18 LVIDd : left ventricular internal dimension in diastole 左室拡張末期径
- 19 LVEDP : left ventricular end-diastolic pressure 左室拡張末期圧
- 20 LVEF : left ventricular ejection fraction 左室駆出率
- 21 LW : lung weight 肺重量
- 22 MRI : magnetic resonance imaging 磁気共鳴画像診断
- 23 MT : masson trichrome マッソン・トリクローム
- 24 NO : nitric oxide 一酸化窒素
- 25 PAB : pulmonary artery banding 肺動脈縮窄術

- 1 PAH : pulmonary arterial hypertension 肺動脈性肺高血圧症
- 2 PH : pulmonary hypertension 肺高血圧症
- 3 PLN : phospholamban ホスホランバン
- 4 PKC : protein kinase C プロテインキナーゼ C
- 5 PKG : protein kinase G プロテインキナーゼ G
- 6 ROS : reactive oxygen species 活性酸素種
- 7 RVF : right ventricular failure 右心不全
- 8 RVDd : right ventricular dimension in diastole 右室拡張末期径
- 9 RVEDP : right ventricular end-diastolic pressure 右室拡張末期圧
- 10 RVEF : right ventricular ejection fraction 右室駆出率
- 11 RVWTd : right ventricular wall thickness in diastole 拡張末期左室後壁厚
- 12 SERCA2a : sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a 筋小胞体カルシウム ATP アー
13 ゼ 2a
- 14 sGC α : soluble guanylate cyclase α 可溶性グアニル酸シクラーゼ α
- 15 sGC β : soluble guanylate cyclase β 可溶性グアニル酸シクラーゼ β
- 16 SV : stroke volume 一回心拍出量
- 17 SW : stroke work 一回心仕事量
- 18 TL : tibial length 脛骨長
- 19 VEGF : vascular endothelial growth factor 血管内皮成長因子
- 20
- 21

2. 研究背景

1
2 右心不全は、主に肺高血圧症などによる右室後負荷の増大によって引き起こされる
3 臨床症候群であり、右室駆出率（RVEF）の低下と右室の拡大を特徴とする。¹ 右心
4 不全患者では、全身の静脈うっ血により臓器不全や末梢の浮腫を呈し、その病態は左
5 心不全とは大きく異なる（図1）。¹ また、肺動脈性肺高血圧症（PAH）は細い肺動
6 脈に異常があり肺動脈の血圧が上昇する疾患であるが右心不全は最も重要な予後因
7 子の一つであることが知られている。^{2,3} PAH患者においては、右心機能が低下した
8 患者（RVEFが25%未満）の5年生存率は47.1%であるのに対し、右心機能が保たれて
9 いる患者（RVEFが25%以上）の5年生存率は70.5%であると報告されている。⁴ さ
10 ら、PAH患者において右心機能は肺血管抵抗から独立した予後規定因子としても知ら
11 れており（図2）、右室に直接作用する治療がPAH患者の生命予後を改善する可能性が
12 あると考えられている。⁵ 近年では左室拡張障害患者や、左室補助装置を装着した患
13 者においても右心機能は予後規定因子となっていることが明らかとなり注目が高ま
14 っている。^{6,7} 右心不全のメカニズムは心筋虚血、炎症、代謝異常、間質の線維化など
15 の様々な要因が提唱されているが（図3）、詳細はまだ明らかとなっていない。⁸ その
16 ため、右心不全のメカニズム解明とその治療法の開発が求められている。

17 超音波はヒトの可聴域の 20 kHz を超える周波数をもつ音波であり、医療分野でも
18 診断や治療において数多く応用されている。診断用の超音波は、低出力であり（約 0.05
19 ~0.50 W / cm²）、生体へ与えるエネルギーが低いため、低侵襲の検査法として広く利

1 用されている。一方で、高出力の超音波（約 $0.2\sim 100\text{ W/cm}^2$ ）は、腫瘍細胞の焼灼療
2 法や血栓溶解療法などに応用されている。近年、診断用超音波レベルの低出力パルス
3 波超音波にも生体への治療効果があることが明らかにされてきている。超音波の生体
4 作用は、音響エネルギーの吸収による熱的作用と、放射圧や振動による機械的刺激に
5 よる非熱的作用である。低出力パルス波超音波（LIPUS）は、ある一定のパルス波形
6 を有する 3 W/cm^2 以下の低出力の超音波であり、⁹ 低侵襲治療法の 1 つとして注目さ
7 れている。LIPUS は低出力であることから、熱的作用はほぼ認められず、振動による
8 機械的刺激が主な作用機序と考えられている。これまでに LIPUS は生体に対し、抗炎
9 症作用、血管新生作用、および創傷治癒促進作用などを有することが報告されており、
10 整形外科領域や歯科領域で既に臨床応用されている。¹⁰ 一般的に用いられている低出
11 力超音波は、多くが 1.5 MHz 、 0.03 W/cm^2 、サイクル数 200 であると報告されているが、
12 ⁹ 我々は、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いた基礎的検討の結果、 1.875 MHz 、
13 0.25 W/cm^2 、サイクル数 32 という特定の条件の LIPUS が最も効率的に血管新生作用
14 を惹起することを報告している（図 4）。¹¹ 私達の研究室では、心筋梗塞モデルマウ
15 スにおいて、LIPUS がメカノトランスダクション機構を介して血管内皮成長因子
16 （VEGF）や内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）などの血管新生因子の活性化をもた
17 らすことを明らかにしている。^{12,13} さらに、LIPUS 治療が血管新生を誘導することで、
18 左室圧負荷による左心不全動物モデルの左心機能を改善すること、¹⁴ LIPUS 治療に
19 よる eNOS-NO-cGMP-PKG 経路の活性化が左室拡張機能障害を有する糖尿病マウスの

1 左室拡張能を改善することを報告している¹⁵。eNOSは、アルギニンと酸素を基質と
2 して一酸化窒素(NO)を合成する一酸化窒素合成酵素(NOS)の1つである。¹⁶ eNOS
3 は主に血管内皮に発現しており、血圧の調節や内皮機能の維持に極めて重要な役割を
4 果たしている他、¹⁷ NOシグナル伝達経路は心血管系に対する保護的な作用を持つ
5 ことも明らかとなっている。^{18,19} NOは、可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)を活性化
6 し、その下流で環状グアノシンーリン酸(cGMP)とプロテインキナーゼG(PKG)を刺激
7 することで、心血管機能を調節している。²⁰ このsGC-cGMP-PKG経路は、血管拡張
8 や心筋細胞のリモデリングを改善するセカンドメッセンジャーシステムであること
9 が知られており、²¹ 心不全の治療標的としても注目されている。²² これまでに、sGC-
10 cGMP-PKG経路を活性化することで、左心不全動物モデルにおいて心筋細胞の肥大、
11 間質の線維化、心筋細胞におけるカルシウムハンドリングが改善されることが報告さ
12 れているが、^{23,24} 右心不全の病態における同経路の役割についてはまだ十分に解明さ
13 れていない。

14 私達の研究室では、eNOS遺伝子欠損(eNOS^{-/-})マウスを低酸素環境下で飼育したと
15 ころ、野生型マウスに比べ右心機能と右室の線維化が有意に増悪することを示し、右
16 心不全の病態にeNOSが関与していることを報告している。²⁵ 現在、PAH患者に対す
17 る血管拡張薬や左心不全治療薬としてsGC-cGMP-PKG経路を刺激する薬剤が既に使
18 用されているが、^{26,27} これらの薬剤は全身の血管拡張作用もあり、低血圧などの副作
19 用が問題となる。一方、LIPUS治療では、心臓における局所的なeNOSの活性化が得ら

1 れるため、既存の薬剤に対する優位性があると考えられる。

2 本研究では、右心不全におけるeNOS-NO-sGC- cGMP-PKG経路の関与を検証し、右

3 心不全動物モデルの右室に対するLIPUS治療の有効性と安全性を検討した。

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

1
2
3
4
5

3. 研究目的

本研究では、右心不全における eNOS の役割の解明と、LIPUS 治療が右心不全モデルマウスの右心機能障害を改善するかどうかを調べることで、また、その機序を解明することを目的とした。

4. 研究方法

本研究における私の全ての動物実験は、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」に沿って立案し、国立大学法人東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会（承認番号：2018 医動-222、2018 医組換-152-01）の承認を受けた。研究で用いたすべての動物は、12 時間の明/暗サイクル（8:00/20:00）下で気温（ $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）および湿度（60%）に制御された室内において飼育し、使用した。また、餌と水は自由に摂取させた。餌はマウス・ラット・ハムスター用 CLEA Rodent Diet CE-2（日本クレア株式会社）を使用した。

LIPUS 治療

LIPUS 治療には、バイポーラ電源（BA4825; NF Corporation Yokohama, Japan）を備えたマルチファンクションジェネレーター（WF1974; NF Corporation Yokohama, Japan）と、円柱型の超音波素子（HONDA ELECTRONICS, Co., Aichi, Japan）を使用した。

²⁸ LIPUS 治療は、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いて周波数とサイクル数を可変させた条件検討において、eNOS および VEGF の mRNA 発現を有意に上昇させた治療用条件を参考にした。具体的には、以下の条件下で実施した；周波数=1.875 MHz、パルス繰り返し周波数=2.74 kHz、サイクル数=32、 $I_{\text{sp}}\text{ta}$ （空間ピーク時間平均強度）117~162 mW/cm^2 、LIPUS の強度 0.25 MPa。^{11,13-15} 本研究で用いた超音波素子は、発生直後のビームにより生成される音場が不安定であるため、血管内皮細胞を用いた条

1 件検討では超音波ビームが安定する深さ 6 cm に細胞が位置するように超音波素子と
2 細胞の間に寒天を用いて作成した円柱状の寒天製擬似生体組織（寒天ファントム）を
3 通して LIPUS 照射を行っている。¹¹ 本研究においても、細胞実験の条件と同様に、超
4 音波素子と動物の間に寒天ファントムを設置した状態で動物に LIPUS を照射した。
5 具体的な治療方法については図 9B（マウス）と図 16B（ラット）に示した。

6

7 肺動脈縮窄マウス（PAB マウス）

8 C57BL/6J マウス（10 週齢、体重 23±28g）は Charles River Laboratories 社（Wilmington、
9 MA、USA）から購入した。eNOS^{-/-}マウスは P. Huang（Harvard Medical School、Boston、
10 MA）から提供されたもので、C57BL/6J マウスと 10 世代以上に渡って戻し交配を行
11 った。eNOS^{-/-}マウスは野生型マウスに比べ、収縮期血圧、拡張期血圧共に上昇するこ
12 とが知られている。²⁹ 心拍数に関しては低下する報告と変化しないという報告があ
13 るが、^{29,30} 体重、生存率、食事摂取量は、野生型マウスと同等である。^{31,32} 肺動脈の
14 縮窄方法はクリップで縮窄を作成するものと、針と肺動脈を同時に結紮し、針を除去
15 することで作成する方法がある。本研究では 25 ゲージ針を用いて PAB モデルを作成
16 した。手術方法は、まずマウスに吸入イソフルラン（2.0%～3.0%）で導入を行い、気
17 管挿管を行った上で左第 2 肋間を切開し（図 5A）、開胸を行った。心膜を開いた後に
18 大動脈と肺動脈を分離した後に（図 5B）、主肺動脈の下にピンセットを通し、主肺動
19 脈周囲に縫合糸を留置した（図 5C-D）。その後血管と縫合糸の間に 25 ゲージの針を

1 挟んだ状態で縫合糸を結紮し、針をすぐに抜去することにより、肺動脈の縮窄を行っ
2 た (図 5E-F)。肺動脈の結紮後、6-0 シルク縫合糸で閉胸と表皮の閉創を行った (図
3 5G-H)。手術の 1 週間後に心臓超音波検査で肺動脈縮窄部位の最大血流速度が 3m/s(圧
4 較差 48mmHg)より上昇していることを確認し、マウスを LIPUS 治療群とプラセボ群
5 に無作為に割り付けた。Sham 群は肺動脈縮窄以外の手術を同様に行った。無作為化
6 後、治療群のマウスは吸入イソフルラン (0.5~1.0%) による全身麻酔下で、2 週間に
7 わたり週 3 回の LIPUS 治療を行い (図 9A)、プラセボ群に対しては、治療群と同様に
8 全身麻酔を行った上で、LIPUS 照射は行わないという条件で実験を行った。LIPUS 治
9 療の照射は 20 分×3 回 (5 分間の休止を挟む) で行った。¹¹⁻¹³ LIPUS 治療が終了した
10 2 週間後に心臓超音波検査と侵襲的血行動態の測定を行った。野生型マウスはモデル
11 作成実験において 39 匹 (PAB 群 34 匹、Sham 群 5 匹)、心臓超音波検査、侵襲的血行
12 動態評価、組織学的検討において 32 匹 (プラセボ群 16 匹、LIPUS 治療群 16 匹)、ウ
13 エスタンブロット分析に 20 匹 (プラセボ群 10 匹、LIPUS 治療群 10 匹)、eNOS^{-/-}マウ
14 スはモデル作成実験において 44 匹 (PAB 群 40 匹、Sham 群 4 匹)、心臓超音波検査、
15 侵襲的血行動態評価、組織学的検討において 32 匹 (プラセボ群 16 匹、LIPUS 治療群
16 16 匹)、ウエスタンブロット分析に 20 匹 (プラセボ群 10 匹、LIPUS 治療群 10 匹) 使
17 用した。

18

19 **Sugen/低酸素暴露による PAH ラット (SU/Hx ラット)**

1 SU/Hx ラットは VEGF 阻害薬と低酸素負荷を組み合わせた肺動脈性肺高血圧症
2 (PAH)動物モデルである。進行性の肺動脈のリモデリングを認め、経時的に右室後負
3 荷の上昇、右心機能の低下が認められることが知られており、重症の PAH 患者で認
4 められる plexiform lesion(叢状病変)も認められることが特徴である。³³ 雄の Sprague-
5 Dawley ラット (体重 180~220g) を Charles River Laboratories 社 (Wilmington, MA、
6 USA.) から購入し、VEGF 阻害剤である SU5416(Sigma)を 20 mg/kg 皮下注射した後 3
7 週間低酸素で飼育し、その後通常酸素で飼育する。このモデルは通常酸素に戻した後
8 も肺血管のリモデリングが進行し、肺高血圧症・右心不全が進行するが、通常酸素に
9 戻した 2 週間後に右室圧が最大となることが報告されている。³⁴ 実臨床でも肺高血圧
10 症患者は症状が進行し右室拡大の所見が出現してから診断されることが多いため、本
11 研究では通常酸素に戻して 2 週間後にラットを LIPUS 治療群とプラセボ群に無作為
12 に割り付け、治療介入を行うプロトコルとした。無作為化後、治療群のラットは吸入
13 イソフルラン (1.0-1.5%) による全身麻酔下で、3 週間にわたり週 2 回の LIPUS 治療
14 を行い (図 16A)、プラセボ群に対しては麻酔を含む LIPUS 照射以外の同様の処置を
15 施した。LIPUS 治療の照射は 20 分×3 回(5 分間の休止を挟む)で行った。^{11,13-15} LIPUS
16 治療が終了した 3 週間後に、心臓磁気共鳴画像診断 (MRI)、トレッドミル運動負荷試
17 験、心臓超音波検査、侵襲的血行動態測定を行った。ラットは、心臓超音波検査、侵
18 襲的血行動態評価、組織学的検討に 37 匹 (野生型 5 匹、プラセボ群 16 匹、LIPUS 治
19 療群 16 匹)、心臓 MRI 検査に 19 匹 (野生型 3 匹、プラセボ群 8 匹、LIPUS 治療群 8

1 匹)、単離心筋組織 (trabeculae) における張力と細胞内 Ca^{2+} の測定に 12 匹 (プラセボ
2 群 6 匹、LIPUS 治療群 6 匹) 使用した。

3

4 経胸壁心臓超音波検査

5 経胸壁心臓超音波検査は、マウスでは PAB 後 1、3、5 週目に、ラットでは 11 週目
6 に、Vevo 2100 (Visual Sonics, Ontario, Canada) を用いて、吸入イソフルラン (0.4-1.5%)
7 による麻酔下で、先行研究と同様に、M モード、乳頭筋レベルにて左室の内径および
8 収縮能の計測を、三尖弁輪部にて右室の収縮能の指標である三尖弁輪収縮期移動距離
9 (TAPSE) を計測、B モードで右室径、右室壁厚を測定した。^{35,36} さらに、先行研究
10 と同様に、パルスドップラーモードで右室流出路にて計測した心拍出量と、PAB マウ
11 スにおける縮窄部分の流速を計測した。^{35,36} 検査中の心拍数は、500~600 bpm の範
12 囲で保持した。

13

14 侵襲的血行動態測定

15 カテーテル処置の前に、生理食塩水と MPVS Ultra ソフトウェア (Millar Instruments、
16 Houston, TX, USA) を用いてカテーテル先端圧のゼロ点を定義した。すべてのデー
17 タは連続する 10 心拍の平均値を採用し、PowerLab データ収集システム (AD
18 Instruments, Dunedin, New Zealand) を使用して分析した。

19

1 PAB マウスに対する侵襲的血行動態測定

2 イソフルランによる吸入麻酔（1.5～2.5%）を行い、LIPUS 治療後 2 週間時点での
3 侵襲的血行動態測定を行った。³⁷ 右外頸静脈から右心室に圧コンダクタンスカテー
4 テル（1.4F、SPR-853、Millar Instruments、Houston、TX、USA）を挿入し、右室圧と容
5 積を同時に測定し（PowerLab /4SP、AD Instruments、Dunedin、New Zealand）、手技終
6 了後にデータ解析を行った（Lab Chart 8、AD Instruments、Dunedin、New Zealand）。

7

8 SU/Hx ラットにおける侵襲的圧力-体積分析

9 機械的換気補助下にイソフルランによる吸入麻酔（1.5～2.5%）を行い、LIPUS 治療
10 3 週後の時点での侵襲的血行動態を測定した。^{38,39} 開胸後、4 極の圧コンダクタンス
11 カテーテル（1.4F、SPR-847、Millar Instruments、Houston、TX、USA）を心尖部から右
12 室、左室に挿入し、波形の安定後、定常状態の測定値を記録した。その後、5～10 秒
13 間、下大静脈をナイロン糸にて結紮し右室前負荷を減少させることで、右室 stiffness
14 の指標である右室拡張末期圧容量関係（EDPV_R）を測定し（PowerLab /4SP、AD
15 Instruments、Dunedin、New Zealand）、手技終了後にデータ解析を行った（Lab Chart 8、
16 AD Instruments、Dunedin、New Zealand）。

17

18 心臓磁気共鳴画像診断（MRI）

19 SU/Hx ラットに対する LIPUS 治療の 3 週後に、7-T BioSpec スキャナー（Bruker

1 BioSpin、Billerica、MA、USA) と、専用の小動物心電図および呼吸トリガーシステム
2 (SAII、Stony Brook、NY、USA) を接続して、心臓 MRI を実施した。イソフルラン
3 による吸入麻酔 (1.5~2.5%) を用いて導入、維持を行った。右室及び左室の機能は、
4 シネ画像を作成し (IntraGate、Bruker BioSpin、Billerica、MA、USA)、評価した。心基
5 部から心尖部まで 12 枚の短軸像の撮影を行った (スライス厚 1 mm、エコー時間 (TE)
6 / 繰り返し時間 (TR) 2.30/93.26 ms、フリップアングル 40°、視野 40×40 mm、マ
7 トリックサイズ 256×256、空間分解能 0.156 mm/pixel)。撮影後、右室および左室の
8 拡張末期容積、収縮末期容積、駆出率および心室重量の定量化を行った (Vitrea、Cannon
9 Medical Systems、Tochigi、Japan)。

10

11 血圧測定

12 血圧測定は、無麻酔科下にテールカフシステム (Muromachi Kikai、MK-2000ST NP-
13 NIBP Monitor、Tokyo、Japan) を用いて、マウスでは PAB 後 1、3、5 週目に、ラット
14 では LIPUS 治療の 3 週後に測定した。

15

16 トレッドミル運動試験

17 SU/Hx ラットに対する LIPUS 治療の 3 週後に、齧歯類用トレッドミルシステム (MK-
18 680C、Muromachi Kikai、Japan) を使用して、ラットの運動耐容能を評価した。5 m /
19 min で開始し、5 分ごとに 5 m/min ずつ徐々に速度を上げ、最大 30m/min まで上昇さ

1 せた。ラットが走行レーンを離れ、10秒以内にショックパッドに3回触れた時点でテ
2 スト終了とし、それまでの走行距離を算出した。すべてのラットには、運動前・後に
3 水と標準飼料を自由に与えた。⁴⁰

4

5 単離心筋組織 (trabeculae) における張力と細胞内 Ca^{2+} の測定

6 酒石酸ブトルファノール (2.5 mg/kg)、ミダゾラム (2 mg/kg)、および塩化メデ
7 トミジン (0.15 mg/kg) の腹腔内注射によりラットを十分に麻酔した後、⁴¹ ラットの
8 心臓を切離した。切離した心臓の処置として、15 mmol/l KCl の HEPES 緩衝液を使用
9 し大動脈から逆行性に冠動脈の灌流を行った。右室を切開し、右心室の心内膜領域か
10 ら trabeculae を切離し、倒立顕微鏡上に設置した。trabeculae は張力トランスデューサ
11 ーとマイクロマニピュレーターの間に取り付け、5 mM KCl を含む HEPES 溶液で満た
12 した水槽につかるように設置した。張力は、シリコンストレインゲージ (model AE-
13 801、SenSoNor、Horten、Norway) を使用して測定した。^{42,43} 細胞内 Ca^{2+} レベルは、
14 マイクロインジェクションされた fura-2 と光電子増倍管 (PMT; E1341 with a C1556
15 socket、Hamamatsu、Japan) を使用して測定した。⁴²⁻⁴⁴ trabeculae には、平行白金電極
16 により 0.5 Hz の電気刺激を与えた (24°C、細胞外 Ca^{2+} = 0.7 mM)。^{43,44}

17

18 組織学的分析

19 切離した心臓を、4%ホルマリンで固定し、組織学および免疫組織学的分析に使

1 用した。組織標本をパラフィンに包埋し、厚さ 3 μm でスライスした。切片はヘマト
2 キシリン・エオジン (HE) およびマッソントリクローム (MT)、エラスチカ・マッソ
3 ン (EM) で染色した。それぞれの染色は心筋の形態学的評価、心筋の線維化、肺動脈
4 のリモデリングの評価に使用した。心筋断面積 (CSA) の計測は、コンピューターイ
5 メージングシステム (BX51、Olympus、Tokyo、Japan) によって得た HE 染色切片の
6 画像を、Image J ソフトウェアを使用し心筋細胞の輪郭をトレースすることにより分
7 析した。線維化領域と毛細血管密度の定量化に関しては、BZ-9000 シリーズオールイ
8 ンワン蛍光顕微鏡 (KEYENCE、Osaka、Japan) を使用して画像を取得し、BZ-X 分析
9 アプリケーション (KEYENCE) の Hybrid Cell Count プログラムを使用して分析した。
10 肺血管のリモデリングの評価はコンピューターイメージングシステム (BX51、
11 Olympus、Tokyo、Japan) によって得た肺の EM 染色切片の画像において、70-100 個
12 の小肺動脈 (血管外径 $< 200 \mu\text{m}$) を用いて評価した。肺血管のリモデリングの評価は
13 先行研究の手法と同様に、以下のスケールを用いて分析した³⁴; =内膜増殖の所見な
14 し (Grade0)、50%未満の血管内腔の閉塞 (Grade1)、50%以上の血管内腔の閉塞 (Grade2)。
15 CD31 免疫染色により、心筋の毛細血管密度を評価した。

16

17 ウェスタンブロット分析

18 心臓から右室自由壁を切り出し、ウェスタンブロット分析に使用した。組織は、プ
19 ロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma-Aldrich、MO、USA) を含む Tissue Protein Extraction

1 Reagent (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用してホモジェナイズし
2 た。次に、サンプルを 4°C で 20 分間、15,000g で遠心分離し、上清を回収し、BCA タ
3 ンパク質アッセイキット (Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) を使用して蛋白質
4 量を標準化した。蛋白濃度が 1 μ g/ μ l となるように上清を Tissue Protein Extraction
5 Reagent (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で希釈したものをサンプルバ
6 ッファー (0.3029M Tris-HCL、10% SDS、30% 2-メルカプトエタノール、20% グリ
7 セロール、01.% BPB) と 4:1 で混合後、95°C で 5 分間の還元処理を行った。SDS-
8 PAGE ゲルの各レーンに 10 μ g の蛋白をアプライし、PVDF 膜 (GE Healthcare、
9 Buckinghamshire, UK) に転写し、室温で 1 時間、TBS-T で希釈した 5%BSA または
10 5%スキムミルクによるブロッキングを行った。使用した一次抗体は次のとおりであ
11 る。
12 phosphorylated-eNOS at Ser1177 (1:1000、BD Biosciences、#612393)
13 phosphorylated eNOS at Thr 495 (1:1000、BD Biosciences、#612706)
14 total-eNOS (1:1000、BD Biosciences、#610296)
15 PKC (1:1000、abcam、ab184746)
16 soluble guanylate cyclase α (sGC α) (1:1000、Santa Cruz Biotechnology、sc-514183) soluble
17 guanylate cyclase β (sGC β) (1:1000)、Santa Cruz Biotechnology、sc-376502) PKGI α (1:1000、
18 Cell signaling、13511S)
19 phosphorylated Akt (1:1000、Cell Signaling、9271)

- 1 total Akt (1:1000、Cell Signaling 9272)
- 2 phosphorylated AMPK (1:1000、Cell Signaling、2535S)
- 3 total AMPK (1:1000、Cell Signaling、2532S)
- 4 CaMKII (1:1000、Cell Signaling、4436S)
- 5 phosphorylated phospholamban at Ser16 (1:1000、Santa Cruz Biotechnology、sc-12963-R)
- 6 phosphorylated phospholamban at Thr17 (1:1000、Santa Cruz Biotechnology、sc-17024-R)
- 7 total phospholamban (PLN (1:5000)、Thermo Fisher Scientific、MA3-922) sarco/endoplasmic
- 8 reticulum Ca²⁺-ATPase 2a (SERCA2a (1:1000)、Thermo Fisher Scientific、MA3-919)
- 9 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH (1:5000)、Cell Signaling Technology、
- 10 2118S)

11 タンパク質は、enhanced chemiluminescence システム (ECL Prime Western Blotting
12 Detection Regent、GE Healthcare、Japan) によって可視化し、タンパク質の濃度測定は
13 Image J (NIH、USA) を用いて解析した。

14

15 統計学的解析

16 すべてのデータは、平均±標準偏差 (SD) で標記した。2 群間の差は、Mann Whitney
17 test を使用して分析した。複数群のデータは、ANOVA followed by Tukey's multiple
18 comparison により分析した (GraphPad Prism Software Inc.、San Diego、CA)。全ての解
19 析は P 値< 0.05 を統計学的に有意とした。

20

5. 研究結果

2 右室機能障害における eNOS-NO-sGC-cGMP-PKG シグナル伝達経路の重要性

3 右心不全の病態における eNOS-NO-sGC-cGMP-PKG シグナル伝達経路の関与を確
4 認するために、まず野生型 (WT) マウスに PAB を行い、1 週間後に心臓超音波検査
5 による右心機能と右室における蛋白発現を評価した (図 6A)。PAB 1 週間後、Sham 群
6 と比較して、PAB 群では肺動脈縮窄部の流速 (PA velocity) は有意に増加し、右室収
7 縮能の指標である三尖弁輪収縮期移動距離 (TAPSE) と心係数 (CI) は有意に低下し、
8 右室拡張末期径 (RVDd)・右室壁厚 (RVWT) の有意な増加を認め、右心機能の低下
9 が認められた (図 6B-C)。PAB マウスでは、eNOS の抑制的なリン酸化部位である Thr
10 495 のリン酸化が有意に増加していたが、eNOS の活性化リン酸化部位である Ser 1177
11 のリン酸化は、Sham 群に比べて有意に減少しており (図 6D、E)、eNOS の活性が右
12 室圧負荷で有意に抑制されていることが示された。さらに、PAB マウスでは、eNOS
13 の Thr495 をリン酸化する酵素である PKC の発現が有意に増加し、eNOS-NO-sGC-
14 cGMP-PKG 経路の下流シグナルも Sham 群に比べて有意に抑制されていた (図 6D、
15 E)。また、PKC 発現と eNOS の Thr 495 のリン酸化の割合、および eNOS の Ser 1177
16 のリン酸化の割合と eNOS-NO-sGC-cGMP-PKG 経路の下流シグナルとの間に有意な
17 相関関係を認めた (図 6F)。

18 右心不全における eNOS の重要性をさらに解明するために、eNOS^{-/-}マウスに対して
19 PAB を行い、術後 1、3、5 週の心臓超音波検査による心機能評価と、PAB 後 5 週時点

1 での組織学的な評価を行った (図 7A)。eNOS^{-/-}-PAB マウスは、WT-PAB マウスと比較
2 し生存率の有意な低下を認めた (図 7B)。組織学的な評価では、WT-PAB マウスは WT-
3 Sham マウスに比べて心筋肥大の有意な増加とともに、間質の線維化が有意に増加し、
4 一方で毛細血管の密度は有意に減少していた (図 7C、D)。eNOS^{-/-}-PAB マウスでは、
5 WT-PAB マウスと比較して心筋肥大の有意な増加と、毛細血管密度の有意な低下を認
6 めた。一方間質の線維化は 2 群間で同等であった (図 7C、D)。eNOS^{-/-}-PAB マウスで
7 は肉眼的な肝うっ血が認められ、PAB 後 5 週時点での肝臓重量は WT-PAB マウスに
8 比べて eNOS^{-/-}-PAB マウスで有意に増加していた (図 7C、D)。心臓超音波検査では
9 eNOS^{-/-}-PAB マウスでは、WT-PAB マウスに比べ PAB 後 1 週から 5 週にかけて明らか
10 な右室拡大の増悪と心嚢液の増加を認め、三尖弁輪収縮期移動距離 (TAPSE) と心係
11 数 (CI) の有意な低下を認めた (図 7E、F)。右室壁厚は eNOS^{-/-}-PAB マウスと WT-
12 PAB マウスで有意差は認められず、左心機能は 4 群間で差を認めなかった (図 7F)。
13 eNOS^{-/-}マウスでは、既出報告と同様に軽度の血圧上昇を認めたが、⁴⁵ PAB 後には血
14 圧の有意な低下を認めた (図 8A)。右室および肺の重量は、WT-PAB マウスと eNOS^{-/-}-
15 PAB マウスの間で同等であった (図 8B)。本研究では、eNOS^{-/-}マウスに PAB を行わ
16 なかった群においては心筋肥大、線維化、毛細血管密度、両心室の心機能は正常で、
17 体重や右室、肺、肝臓の重量も野生型マウスと同等であった (図 7C、D、F、図 8A、
18 B)。

1 LIPUS 治療は eNOS の活性化を介して PAB マウスの右心機能障害を改善する

2 PAB マウスの右室において eNOS 活性が抑制されており、eNOS^{-/-}マウスでは PAB
3 後に WT に比べ右心不全が増悪したことから、右心不全における eNOS の重要性が示
4 された。続いて LIPUS 治療が右心不全に有効かどうかを検討した (図 9A、B)。PAB
5 マウスに対する LIPUS 治療の 2 週間後の心臓超音波検査では、PAB-LIPUS マウスに
6 対して PAB-placebo マウスに比し三尖弁輪収縮期移動距離 (TAPSE) と心係数 (CI)
7 の有意な増加と、RVDD の有意な低下を認め、PAB-LIPUS マウスにおいて右心機能が
8 改善していることが示された (図 9C、D)。右心カテーテルによる血行動態の評価で
9 は、右室拡張末期圧 (RVEDP) は PAB-LIPUS マウスで PAB-placebo マウスに比べ有
10 意に低下し、一回仕事量 (SW)、一回拍出量 (SV)、心拍出量 (CO)、+dP/dT は PAB-
11 LIPUS マウスにおいて PAB-placebo マウスよりも有意に上昇しており、心エコー検査
12 の結果と一致して LIPUS 治療により右心機能が改善することが示された (図 9E、F、
13 図 10B)。その他の右心機能の指標である右室面積変化率 (RVFAC)、RVWT、三尖弁
14 輪収縮期運動速度 (S')、右室拡張末期容積 (RVEDV)、右室収縮末期容積 (RVESV)、
15 -dP/dT min は 2 群間で同等であった (図 10A、B)。右室収縮期圧は 2 群間で有意差は
16 認められず、右室圧負荷の程度は同等であると考えられた (図 9F)。また、左心機能
17 の指標である左室駆出率(LVEF)は、両群において治療前後で変化は認められなかった
18 (図 9D)。体重、血圧、心拍数、臓器重量、生存率については、2 群間で有意差は認
19 められなかった (図 11A-C)。

1

2 LIPUS 治療は PAB マウスの心筋肥大と間質の線維化を改善する

3 組織学的な評価では、PAB-LIPUS マウスは、PAB-placebo マウスと比較して、心筋
4 肥大と間質の線維化が有意に低下していた (図 12A-D)。一方、CD31 の免疫染色を用
5 いて評価した毛細血管密度については、2 群間で差は認めなかった (図 12E、F)。

6

7 LIPUS 治療による eNOS-NO-sGC-cGMP-PKG シグナル伝達経路の活性化

8 LIPUS 治療により PAB マウスの右心機能の改善が認められた。続いてそのメカニ
9 ズム解明のために LIPUS 治療直後の右室における蛋白発現の評価を行った。PAB-
10 LIPUS マウスでは PAB-placebo マウスと比較し、eNOS の Thr495 のリン酸化には有意
11 差は認められなかったが、Ser1177 のリン酸化の有意な増加が認められ、eNOS の活性
12 化が示唆された (図 13A、B)。また、PAB-LIPUS マウスでは、PAB-placebo マウスに
13 比較して、可溶性グアニル酸シクラーゼ α (sGC α) や PKG I α といった eNOS の下流
14 のシグナル発現の有意な増加も認められた (図 13A、B)。さらに、eNOS の Ser1177 の
15 リン酸化と sGC α 、PKG I α 発現の間には有意な正の相関関係が認められ (図 13C)、
16 LIPUS 治療により eNOS-NO-cGMP-PKG シグナル伝達経路に関連する蛋白発現が上昇
17 したことが示された。eNOS の Ser1177 をリン酸化する酵素は複数あることが知られ
18 ているため、⁴⁶ 続いて eNOS のリン酸化酵素の評価を行った。Akt のリン酸化は、
19 PAB-LIPUS マウスにおいて PAB-placebo マウスと比較し有意に増加していたが、

1 AMPK のリン酸化および CaMKII の発現は 2 群間で同等であった (図 14A、B)。ま
2 た、eNOS の Ser1177 のリン酸化の割合とリン酸化された Akt との間には有意な正の
3 相関関係が認められたが、eNOS の Ser1177 のリン酸化の割合とリン酸化された AMPK、
4 total AMPK、CaMKII の発現の間には相関関係は認められなかった (図 14C)。以上よ
5 り、LIPUS 治療は Akt をリン酸化させることで Ser1177 のリン酸化を介して eNOS を
6 活性化させ、その下流の sGC-cGMP-PKG 経路の蛋白発現が増加した結果、右心機能
7 が改善したと考えられた。

8

9 LIPUS 治療における eNOS の重要性

10 LIPUS 治療において eNOS の活性化の重要性をさらに検証するため、eNOS^{-/-}-PAB
11 マウスに対する LIPUS 治療の効果を検討した (図 15A)。eNOS^{-/-}-PAB マウスに対する
12 LIPUS 治療によって生存率、心臓超音波検査やカテーテル検査によって評価した右心
13 機能、心筋細胞の肥大、間質の線維化、毛細血管密度に有意差は認められなかった (図
14 15B-F)。さらに、eNOS^{-/-}-PAB マウスに対する LIPUS 治療においては eNOS-NO-cGMP-
15 PKG 経路の下流の蛋白発現に有意な変化は見られなかった (図 15G、H)。以上より、
16 eNOS は、PAB マウスの治療において LIPUS の治療効果に不可欠であることが示され
17 た。

18

19 LIPUS 治療は SU/Hx ラットの右心機能障害を改善する

1 LIPUS 治療の右心不全に対する有効性をより臨床的なモデルで検証するために、続
2 いて PAH モデル動物である SU/Hx ラットを用いて実験を行った (図 16A、B)。心臓
3 超音波検査では、SU/Hx ラットでは野生型ラットに比べ、三尖弁輪収縮期移動距離
4 (TAPSE)、CO、三尖弁輪収縮期運動速度 (S')、右室面積変化率 (RVFAC) の有意な
5 低下に加え、RVDd および RVWT の有意な増加を認め、右心機能の低下が認められた
6 (図 16C、D、図 18A)。SU/Hx-LIPUS ラットでは、SU/Hx-placebo ラットと比較して
7 三尖弁輪収縮期移動距離 (TAPSE)、RVDd、CO、右室面積変化率 (RVFAC) など右心
8 機能の有意な改善が認められた (図 16C、D、図 17A)。左室駆出率 (LVEF) および
9 RVWT については、2 群間で有意差は認められなかった (図 17A)。心臓 MRI でも心
10 臓超音波検査に一致して、SU/Hx-LIPUS ラットにおいて SU/Hx-placebo ラットと比較
11 し RVEDV および RVESV の有意な減少、RVEF の有意な上昇など、右心機能の改善を
12 認めた (図 16E、F)。SU/Hx ラットでは、野生型ラットに比べて有意な右室肥大、右
13 室質量の増加、左室拡張末期容積の低下が認められたが、LIPUS 治療の有無によって
14 有意差は認められなかった (図 17B)。また、左室収縮末期容積 (LVESV)、左室駆出
15 率 (LVEF)、左室質量についても、2 群間で有意な差はなかった (図 17B)。侵襲的
16 行動態評価では、SU/Hx ラットは、野生型ラットと比較して平均肺動脈圧 (mPAP)、
17 RVSP、RVEDP、RVEDV、および肺血管抵抗 (RVR) の有意な上昇を認め、肺高血圧
18 症と右心機能障害が認められた (図 16G、H)。MRI と心臓超音波検査のデータと一致
19 して、SU/Hx-LIPUS ラットは SU/Hx-placebo ラットと比較して RVEDP、RVESV の有

1 意な低下、CO、RVEF の有意な増加を認め、右心機能の改善が認められた (図 16G、
2 H)。一方、+dP/dt および -dP/dt は、LIPUS 治療の有無で有意差を認めなかった (図 17C)。
3 SU/Hx-placebo ラットと SU/Hx-LIPUS ラットの RVSP、mPAP、PVR、Ea で同程度の上
4 昇が認められたことから、肺高血圧症の程度は 2 群間で同等であることが示唆された
5 (図 16H、図 17C)。下大静脈を閉塞させることで得られた右室拡張末期圧-容積関係
6 (EDPVR) は 3 群間で有意差は認めず、収縮末期圧-容積関係 (ESPVR) は SU/Hx-
7 placebo ラットと SU/Hx-LIPUS ラットは同等の上昇を認めた (図 17D、E)。SU/Hx ラ
8 ットは野生型ラットに比べて体重が有意に減少したが、血圧と心拍数に有意差は認め
9 なかった (図 18A、B)。トレッドミルによる運動耐容能評価では、SU/Hx ラットは野
10 生型ラットに比べて運動耐容能が有意に低下していたが、SU/Hx-LIPUS ラットでは運
11 動耐容能の改善傾向が認められた (図 18C)。右室と肺の重量は、SU/Hx ラットで野
12 生型ラットと比較し有意な増加が認められたが、SU/Hx-placebo ラットと SU/Hx-
13 LIPUS ラットの間には有意差は認められなかった (図 18D)。肝臓重量は 3 群間で同程
14 度であった (図 18D)。

15

16 LIPUS 治療は SU/Hx ラットの心筋肥大と間質の線維化を改善する

17 SU/Hx ラットの組織学的評価を行ったところ、心筋細胞の断面積 (CSA) と間質の
18 線維化が有意に増加し、毛細血管密度が有意に減少していた (図 19A-F)。SU/Hx-LIPUS
19 ラットは、SU/Hx-placebo ラットと比較して、心筋細胞の肥大と間質の線維化の有意

1 な改善が認められた (図 19A-D)。毛細血管密度は 2 群間に有意差は認められなかつ
2 た (図 19E、F)。肺の小血管 (200 μ m 未満) の閉塞率も 2 群間で同等であり (図 19G、
3 H)、LIPUS 治療は肺血管のリモデリングには影響を及ぼさないことが示された。

4

5 **LIPUS 治療は SU/Hx ラットの単離心筋細胞における収縮弛緩特性と Ca^{2+} handling 関**
6 **連タンパク発現を改善する**

7 続いて、組織レベルでの心筋収縮弛緩能と Ca^{2+} handling に対する LIPUS 治療の効果
8 を評価するために、右心室から trabeculae を採取し電気刺激下での張力と細胞内 Ca^{2+}
9 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化を評価した。2 群間で発生張力に有意差は認められなかったが、
10 SU/Hx-LIPUS ラットでは、最大張力発生速度 (dF/dt max) と最大張力低下速度 (dF/dt
11 min) が SU/Hx-placebo ラットに比べて有意に増加していた (図 20A、B)。 $[Ca^{2+}]_i$ の変
12 化に関しては、SU/Hx-LIPUS ラットでは、SU/Hx-placebo 群に比べて $[Ca^{2+}]_i$ 減衰速度
13 の時定数 (TC) が有意に低下していたが、拡張期の $[Ca^{2+}]_i$ には有意な差はなかった (図
14 20C、D)。これらの結果は、LIPUS 治療が心筋細胞レベルで心筋の収縮能および拡張
15 能を改善することを示唆している。さらに、右室の Ca^{2+} handling に対する LIPUS 治療
16 の分子メカニズムを明らかにするために、右室における筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase
17 (SERCA2a) やホスホランパン (PLN) などの心筋における Ca^{2+} handling に関連する
18 蛋白発現及びその活性を評価した。PLN の Ser16 でのリン酸化は、SU/Hx ラットでは
19 野生型ラットに比べて有意に低かったが、SU/Hx-LIPUS ラットでは PLN の Ser16 の

1 リン酸化の有意な改善を認めた (図 20E、F)。一方、PLN の Thr17 のリン酸化や total
2 PLN の発現量は、3 群間で差がなかった (図 20E、F)。さらに、SU/Hx-LIPUS ラット
3 では、SU/Hx-placebo ラットと比較して、SERCA2a の発現が有意に上昇していた (図
4 20E、F)。total eNOS の発現は、SU/Hx ラットでは有意に減少していたが、SU/Hx-LIPUS
5 ラットにおいて増加する傾向が認められた (図 20E、F)。total eNOS の発現と PLN の
6 Ser16 のリン酸化、SERCA2a 発現との間に有意な正の相関関係が見られたが、PLN の
7 Thr17 リン酸化との間では有意な相関関係は認められなかった (図 20G)。

8

6. 考察

1
2 本研究によって得られた主な結果は、(1)eNOS の機能不全が右心不全の発症に関与
3 していること、(2)マウスの右室圧負荷による右心不全モデル (PAB モデル) では、
4 LIPUS 治療により eNOS-NO-sGC-cGMP-PKG 経路に関連する蛋白発現の増加を介し
5 て右心機能障害を改善すること、(3)ラットの肺動脈性肺高血圧症モデル (SU/Hx モデ
6 ル) では、LIPUS 治療が肺血管に影響を与えることなく右心機能障害と心筋における
7 Ca^{2+} handling を改善することである。今回の研究は、LIPUS 治療が右心不全患者に対
8 する低侵襲かつ効果的な治療法になる可能性を示したものといえる。

9

10 右心不全に対する新たな治療方法としての LIPUS 治療

11 私達の研究室では、これまで左心不全モデルマウスを用いて LIPUS 治療の有効性
12 と安全性を示してきたが、^{14,15} その機序として eNOS の活性化が重要な役割を果たす
13 ことが示されていた (表 1)。本研究では、PAB 後の右室で eNOS Ser1177 のリン酸化
14 が有意に減少し、eNOS Thr495 のリン酸化が有意に増加していた (表 1)。eNOS の
15 Ser1177 部位は eNOS を活性化する主要なリン酸化部位であるが、複数のリン酸化酵
16 素や刺激によってリン酸化されることが知られている。⁴⁶ 一方、eNOS の Thr495 の
17 リン酸化は eNOS 活性を抑制することで知られているが、PKC がそのリン酸化に関与
18 している。⁴⁷ PKC は圧負荷、交感神経刺激、レニン・アンジオテンシン・アルドステ
19 ロン系によって活性化される。⁴⁸ 右室は圧負荷に対して脆弱とされているが、⁴⁹ 本研

1 究ではそのメカニズムとして圧負荷による右室での PKC の発現増加と eNOS の
2 Thr495 でのリン酸化が原因となっていることが示唆された。本研究で示されたよう
3 に、右心不全では eNOS-NO-sGC-cGMP-PKG 経路の慢性的な抑制が生じており、LIPUS
4 治療はその抑制状態を是正することで右心不全に対する有効な治療法となり得る。

5 本研究では、LIPUS 治療が SU/Hx ラットの右室の心筋細胞における収縮能・弛緩能
6 および Ca^{2+} handling を改善することも明らかにした。肺高血圧症動物モデルでは、
7 SERCA2a や PLN などの Ca^{2+} handling に関連する蛋白発現が低下していることが報告
8 されており、⁵⁰ また、心肺移植を受けた肺動脈性肺高血圧症患者の右室においても
9 Ca^{2+} handling に関連する蛋白発現に異常が認められることが報告されている。⁵¹ 本研
10 究の SU/Hx ラットを用いた検討では、PAB マウスでの結果と同様に、LIPUS 治療に
11 よって心筋肥大と間質の線維化が抑制され、それに伴って心筋細胞の Ca^{2+} handling と
12 右心機能が改善した。SU/Hx ラットにおいては LIPUS 治療の急性期の効果を示すこ
13 とはできなかったが、total eNOS の発現量と PLN の Ser16 のリン酸化の間に有意な正
14 の相関関係があることが示され、eNOS の関与が示唆された。PLN の Ser16 部位は PKG
15 による主要なリン酸化部位であることから、⁵² LIPUS 治療はこの PKG を介した PLN
16 の活性化によって心筋の Ca^{2+} handling を改善する可能性がある。

17

18 右心不全のメカニズムにおける eNOS の機能不全の重要性

19 eNOS は心血管疾患において重要な役割を果たしている。^{18,19} eNOS とその下流の

1 シグナルである NO-sGC-cGMP-PKG 経路は、心臓の炎症、肥大、線維化を改善するこ
2 とが知られているが、²¹ 右室圧負荷における eNOS の役割はまだ十分に解明されてい
3 ない。本研究では、PAB 後 1 週間時点で、右室における total eNOS の発現は変化しな
4 かったが、eNOS 活性および下流の NO-sGC-cGMP-PKG 経路に関連する蛋白発現が有
5 意に抑制されていた。この eNOS の抑制は、圧負荷による PKC の過剰発現により、
6 eNOS の Thr495 部位のリン酸化が亢進したことに起因すると考えられた。さらに、
7 eNOS^{-/-}マウスに PAB を行ったところ、WT マウスに PAB を行った時と比べて右心不
8 全の増悪が認められた。PKC による Thr495 部位のリン酸化を起点とする eNOS とそ
9 の下流シグナルの抑制が、圧負荷による右心機能障害の病態に大きく関与している可
10 能性が高い。さらに、酸化ストレスは右心不全において eNOS の機能障害とそれに伴
11 う NO の生理学的利用能の低下を生じる原因の 1 つとされており、⁵³ 私達の研究室
12 では、圧負荷に対する酸化ストレス誘導が左室よりも右室で大きい傾向があることを
13 過去に報告している。⁵⁴ つまり、圧負荷による内皮機能障害と eNOS 活性の低下が右
14 心不全の病態では左心不全に比べより重要である可能性が高い。

15

16 **LIPUS 治療は eNOS のリン酸化部位を変化させ、eNOS-NO-sGC-cGMP-PKG 経路を**
17 **活性化させることで PAB マウスの右心機能障害を改善する**

18 本研究では、LIPUS 治療が PAB マウスと SU/Hx ラットの右心機能障害を改善し、
19 心筋肥大と間質の線維化を改善することを明らかにした。PAB マウスを用いた検討で

1 は、LIPUS 治療後に Akt のリン酸化が亢進することで eNOS の Ser1177 のリン酸化が
2 増加することと、それに伴う eNOS-sGC-cGMP-PKG 経路に関連する蛋白発現の増加
3 が重要な役割を果たしていることを示した。Akt は eNOS Ser1177 のリン酸化酵素の
4 一つであり、Akt の活性化はチロシンキナーゼ、G タンパク質共役型受容体刺激、細
5 胞表面に対する機械的刺激によって制御されている。⁵⁵ また、eNOS の Ser1177 のリ
6 ン酸化酵素として、AMPK と CaMKII が知られているが、本研究ではそれらの分子活
7 性と LIPUS 治療の関与は明らかではなかった。さらに、eNOS の Thr495 での脱リン
8 酸化も eNOS を活性化する可能性があるが、LIPUS 治療後の右室では eNOS の Thr495
9 のリン酸化には変化は見られなかった。以上の結果から、eNOS の Thr495 のリン酸化
10 が亢進している右心不全では、LIPUS 治療により eNOS のリン酸化部位が Thr495 か
11 ら Ser1177 に切り替わり、その結果、eNOS-sGC-cGMP-PKG 経路に関連する蛋白発現
12 が増加していることが示唆された。近年、sGC-cGMP-PKG 経路を活性化する sGC 刺
13 激薬が収縮力の低下した左心不全治療薬として承認されたが、²⁷ この薬剤は eNOS の
14 下流である sGC に作用する。また、cGMP を分解する酵素である PDE5 を阻害するこ
15 とで cGMP-PKG 活性を間接的に促進させる PDE5 阻害剤は、この経路の下流で cGMP
16 を増強させる血管拡張薬として使用されている。このように eNOS-NO-sGC-cGMP-
17 PKG 経路に作用する薬剤は複数存在しているものの、低血圧等の問題により導入困
18 難となることも少なくない。LIPUS 治療は低侵襲で安全性が高く、eNOS の Thr495 の
19 リン酸化を抑制し、経路の最も上流にある Ser1177 のリン酸化を促進させることで作

1 用することに加え、局所的な eNOS の活性化により低血圧などの全身性の副作用が抑
2 制できる点が既存の治療薬に対する優位性であると言える。LIPUS 治療は、eNOS の
3 活性を制御することで eNOS-sGC-cGMP-PKG 経路を強化し、右心機能障害を改善す
4 るための新しい治療法となり得る。

5

6 研究の限界

7 本研究にはいくつかの限界がある。第一に、本研究では2つの異なる右心不全動物
8 モデルを使用した。各モデルの病態生理は異なるため、LIPUS 治療の効果の詳細な
9 メカニズムが完全に解明されていない。特に、SU/Hx ラットにおいては治療後3週間
10 の時点で右心機能が改善しうることを示すことはできたが、治療前や治療直後の
11 eNOS 動態を明らかにすることはできなかった。第二に、本研究で用いた PAB モデル
12 では、右心機能が Sham 群と比較して有意に低下していたものの (図 6C)、これまで
13 の報告と比べ死亡率の低い軽症の右心不全モデルとなっている。本研究では 25 ゲー
14 ジ針を用いて PAB モデルを作成したが、既報では 27G 針を用いて手術を行い、術後
15 1 週間の時点で心臓超音波検査において縮窄部分の圧較差が 20-35mmHg のものを軽
16 症、35-60mmHg で右室拡大の無いものを中等症、35-60mmHg で右室拡大を認めるも
17 のを重症と定義されている。⁵⁶ 中等症と重症のマウスの生存期間の半減期はそれぞ
18 れ術後 50.8 日、19.6 日であったが、軽症のモデルでは死亡例は認められなかったとさ
19 れている。⁵⁶ 本研究では術後 5 週の時点での生存率は 96%と良好で PAB 群において

1 右心不全による体重増加も認められず結果的には軽症の右心不全モデルであった。当
2 初 27 ゲージ針を使用した重症のモデル作成を試みたが、周術期死亡率が高く、生存
3 したマウスも LIPUS 治療の長時間の麻酔中に死亡する例が多く、結果として 25 ゲー
4 ジ針を用いて作成した PAB マウスを用いて実験を行った。また、eNOS^{-/-}マウスに対
5 して PAB を施行した場合には重症の右心不全を認め、生存率の低下、肝重量の増加
6 を認めたが有意な体重増加は認められなかった。eNOS^{-/-}マウスは野生型マウスに比べ
7 体重の増加率が低下することが報告されており、⁵⁷ 今回の結果に影響を与えた可能性
8 がある。また、体重変化に関しては食事摂取量の影響も考えられるが、本研究では食
9 事摂取量は未評価であった。第三に、本研究では、右室の虚血評価を毛細血管密度の
10 みで評価しており、右室の血流評価を行っていないため、LIPUS 治療の血管新生効果
11 の有無については今後さらなる検討を要する。第 4 に、PAH と右心不全の病態生理に
12 は炎症の関与が報告されているが、⁵⁹ 本研究では炎症関連因子を検討していない。
13 LIPUS 治療の抗炎症作用については、今後の研究で検討する必要があると考えられる。

14

15

16

17

18

19

7. 結論

1
2 本研究で、PAB マウスにおいて LIPUS 治療が eNOS-NO-cGMP-PKG 経路を活性化
3 することで右心機能障害を改善し、SU/Hx ラットにおいて右心機能障害に加え心筋細
4 胞の Ca^{2+} handling を改善することを実証した。このことは、LIPUS 治療が、PAH を含
5 む右心不全患者に対する非薬物的かつ低侵襲的な新しい治療戦略となる可能性を示
6 唆している。

7

8

9

1
2
3
4
5
6
7
8
9

8. 謝辞

本研究の実施にあたり、多大なるご指導を頂きました当教室の安田聡教授、下川宏明名誉教授に深く感謝を申し上げます。

また、研究を直接ご指導下さいました当教室の進藤智彦講師および東北大学大学院臨床生理検査学分野の三浦昌人教授に改めまして深謝申し上げます。

最後に、実験の補助をして頂きました当教室の研究補助員である渡部由美さん、山下宏美さん、加齢医学研究所・応用脳科学研究分野の野中博意さんに心より感謝を申し上げます。

9. 文献

- 1
2
3 1. Arrigo M, Huber LC, Winnik S, Mikulicic F, Guidetti F, Frank M, Flammer AJ,
4 Ruschitzka F. Right ventricular failure: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Card*
5 *Fail Rev.* 2019;5:140-146.
- 6 2. Weatherald J, Boucly A, Chemla D, Savale L, Peng M, Jevnikar M, Jais X, Taniguchi Y,
7 O'Connell C, Parent F, Sattler C, Herve P, Simonneau G, Montani D, Humbert M, Adir
8 Y, Sitbon O. Prognostic value of follow-up hemodynamic variables after initial
9 management in pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2018;137:693-704.
- 10 3. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock
11 A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G,
12 Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT,
13 Zompatori M, Hoeper M. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of
14 pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of
15 Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European
16 Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and
17 Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation
18 (ISHLT). *Eur Heart J.* 2016;37:67-119.
- 19 4. Pierre-Yves C, Géraldine PJ, Chahéra K, Christian S, Ségolène T, Jean-Charles G,
20 Bénédicte M, Béatrice G, Anne-Sophie BL, Alfred D, Geneviève D, Marc H, Jean-
21 François M, Jean-François C, Vincent C. Prognostic value of right ventricular ejection
22 fraction in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2015;45:139-149.
- 23 5. van de Veerdonk MC, Kind T, Marcus JT, Mauritz GJ, Heymans MW, Bogaard HJ,
24 Boonstra A, Marques KM, Westerhof N, Vonk-Noordegraaf A. Progressive right
25 ventricular dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension responding to
26 therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58:2511-2519.

- 1 6. Melenovsky V, Hwang SJ, Lin G, Redfield MM, Borlaug BA. Right heart dysfunction in
2 heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J*. 2014;35:3452-3462.
- 3 7. Feldman D, Pamboukian SV, Teuteberg JJ, Birks E, Lietz K, Moore SA, Morgan JA,
4 Arabia F, Bauman ME, Buchholz HW, Deng M, Dickstein ML, El-Banayosy A, Elliot T,
5 Goldstein DJ, Grady KL, Jones K, Hryniewicz K, John R, Kaan A, Kusne S, Loebe M,
6 Massicotte MP, Moazami N, Mohacsi P, Mooney M, Nelson T, Pagani F, Perry W,
7 Potapov EV, Eduardo RJ, Russell SD, Sorensen EN, Sun B, Strueber M, Mangi AA,
8 Petty MG, Rogers J. The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation
9 Guidelines for mechanical circulatory support: executive summary. *J Heart Lung*
10 *Transplant*. 2013;32:157-187.
- 11 8. Ryan JJ, Archer SL. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of
12 metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res*.
13 2014;115:176-188.
- 14 9. Xin Z, Lin G, Lei H, Lue TF, Guo Y. Clinical applications of low-intensity pulsed
15 ultrasound and its potential role in urology. *Transl Androl Urol* 2016;5:255-266.
- 16 10. Xiaoxue J, Oleksandra S, Yufeng L, Shiang Q, Tianlin Y, Wei Z, Jie C. Review of Low-
17 Intensity Pulsed Ultrasound for Therapeutic Applications. *IEEE Trans Biomed Eng*.
18 2019;:2704-2718.
- 19 11. Hanawa K, Ito K, Aizawa K, Shindo T, Nishimiya K, Hasebe Y, Tuburaya R, Hasegawa
20 H, Yasuda S, Kanai H, Shimokawa H. Low-intensity pulsed ultrasound induces
21 angiogenesis and ameliorates left ventricular dysfunction in a porcine model of chronic
22 myocardial ischemia. *PLoS One*. 2014;9:e104863.
- 23 12. Shindo T, Shimokawa H. Therapeutic angiogenesis with sound waves. *Ann Vasc Dis*.
24 2020;13:116-125.
- 25 13. Shindo T, Ito K, Ogata T, Hatanaka K, Kurosawa R, Eguchi K, Kagaya Y, Hanawa K,
26 Aizawa K, Shiroto T, Kasukabe S, Miyata S, Taki H, Hasegawa H, Kanai H, Shimokawa

- 1 H. Low-intensity pulsed ultrasound enhances angiogenesis and ameliorates left
2 ventricular dysfunction in a mouse model of acute myocardial infarction. *Arterioscler*
3 *Thromb Vasc Biol.* 2016;36:1220-1229.
- 4 14. Ogata T, Ito K, Shindo T, Hatanaka K, Eguchi K, Kurosawa R, Kagaya Y, Monma Y,
5 Ichijo S, Taki H, Kanai H, Shimokawa H. Low-intensity pulsed ultrasound enhances
6 angiogenesis and ameliorates contractile dysfunction of pressure-overloaded heart in
7 mice. *PLoS One.* 2017;12:e0185555.
- 8 15. Monma Y, Shindo T, Eguchi K, Kurosawa R, Kagaya Y, Ikumi Y, Ichijo S, Nakata T,
9 Miyata S, Matsumoto A, Sato H, Miura M, Kanai H, Shimokawa H. Low-intensity pulsed
10 ultrasound ameliorates cardiac diastolic dysfunction in mice. -A possible novel therapy
11 for HFpEF. *Cardiovasc Res.* 2021;117:1325-1338.
- 12 16. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.*
13 2012;33:829-837.
- 14 17. Wallerath T, Gath I, Aulitzky WE, Pollock JS, Kleinert H, Forstermann U. Identification
15 of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes,
16 megakaryocytes and platelets. *Thromb Haemostasis.* 1997;77:163-167.
- 17 18. Lundberg JO, Gladwin MT, Weitzberg E. Strategies to increase nitric oxide signalling in
18 cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14:623-641.
- 19 19. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. Endothelial dysfunction and vascular
20 disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf).* 2017;219:22-96.
- 21 20. Farah C, Michel LYM, Balligand J-L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and
22 disease. *Nature Reviews Cardiology.* 2018;15:292-316.
- 23 21. Emdin M, Aimo A, Castiglione V, Vergaro G, Georgiopoulos G, Saccaro LF, Lombardi
24 CM, Passino C, Cerbai E, Metra M, Senni M. Targeting cyclic guanosine monophosphate
25 to treat heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2020;76:1795-1807.

- 1 22. Park M, Sandner P, Krieg T. cGMP at the centre of attention: emerging strategies for
2 activating the cardioprotective PKG pathway. *Basic Res Cardiol.* 2018;113:24.
- 3 23. Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson
4 KL, Wang Y, Kass DA. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents
5 and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2005;11:214-222.
- 6 24. Nagayama T, Hsu S, Zhang M, Koitabashi N, Bedja D, Gabrielson KL, Takimoto E, Kass
7 DA. Sildenafil stops progressive chamber, cellular, and molecular remodeling and
8 improves calcium handling and function in hearts with pre-existing advanced
9 hypertrophy caused by pressure overload. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:207-215.
- 10 25. Nergui S, Fukumoto Y, Zhulanqiqige D, Nakajima S, Shimizu T, Ikeda S, Elias-Al-
11 Mamun M, Shimokawa H. Role of endothelial nitric oxide synthase and collagen
12 metabolism in right ventricular remodeling due to pulmonary hypertension. *Circ J.*
13 2014;78:1465-1474.
- 14 26. Bisserier M, Pradhan N, Hadri L. Current and emerging therapeutic approaches to
15 pulmonary hypertension. *Rev Cardiovasc Med.* 2020;21:163-179.
- 16 27. Armstrong PW, Pieske B, Anstrom KJ, Ezekowitz J, Hernandez AF, Butler J, Lam CSP,
17 Ponikowski P, Voors AA, Jia G, McNulty SE, Patel MJ, Roessig L, Koglin J, O'Connor
18 CM. Vericiguat in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J*
19 *Med.* 2020;382:1883-1893.
- 20 28. Ichijo S, Shindo T, Eguchi K, Monma Y, Nakata T, Morisue Y, Kanai H, Osumi N,
21 Yasuda S, Shimokawa H. Low-intensity pulsed ultrasound therapy promotes recovery
22 from stroke by enhancing angio-neurogenesis in mice in vivo. *Sci Rep.* 2021;11:4958.
- 23 29. X P Yang, Y H Liu, E G Shesely, M Bulagannawar, F Liu, O A Carretero. Endothelial
24 Nitric Oxide Gene Knockout Mice Cardiac Phenotypes and the Effect of Angiotensin-
25 Converting Enzyme Inhibitor on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Hypertension.*
26 1999;34:24-30.

- 1 30. Arraj M, Lemmer B. Endothelial Nitric Oxide Is Not Involved in Circadian Rhythm
2 Generation of Blood Pressure: Experiments in Wild-Type C57 and eNOS Knock-Out
3 Mice under Light-Dark and Free-Run Condit. *Chronobiol Int.* 2007;24:1231-40.
- 4 31. Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, Heinig M, Clarke T, Campbell-Thompson M,
5 Yuzawa Y, Atkinson MA, Johnson RJ, Croker B. Diabetic Endothelial Nitric Oxide
6 Synthase Knockout Mice Develop Advanced Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.*
7 2007;18:539-550
- 8 32. Le Gouill E, Jimenez M, Binnert C, Jayet PY, Thalmann S, Nicod P, Scherrer U,
9 Vollenweider P. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) knockout mice have defective
10 mitochondrial beta-oxidation. *Diabetes.* 2007;56:2690-6.
- 11 33. Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, Voelkel NF, McMurtry IF, Oka
12 M. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial
13 hypertension. *Circulation.* 2010 Jun 29;121(25):2747-54.
- 14 34. Toba M, Abdallah A, Kealan D O'Neill, Salina G, Matsumoto Y, Oshima K, Abe K, Oka
15 M, Ivan FM. Temporal hemodynamic and histological progression in Sugen5416/hypoxia/
16 normoxia-exposed pulmonary arterial hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*
17 2014;306:243-250.
- 18 35. Savai R, Al-Tamari HM, Sedding D, Kojonazarov B, Muecke C, Teske R, Capecchi MR,
19 Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, Pullamsetti SS. Pro-proliferative
20 and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary
21 hypertension. *Nat Med.* 2014;20:1289-1300.
- 22 36. Kohut A, Patel N, Singh H. Comprehensive echocardiographic assessment of the right
23 ventricle in murine models. *J Cardiovasc Ultrasound.* 2016;24:229-238.
- 24 37. Mendes-Ferreira P, Maia-Rocha C, Adao R, Mendes MJ, Santos-Ribeiro D, Alves BS,
25 Cerqueira RJ, Castro-Chaves P, Lourenco AP, De Keulenaer GW, Leite-Moreira AF, Bras-

- 1 Silva C. Neuregulin-1 improves right ventricular function and attenuates experimental
2 pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res.* 2016;109:44-54.
- 3 38. Yin X, Wang L, Qin G, Luo H, Liu X, Zhang F, Ye Z, Zhang J, Wang E. Rats with
4 chronic, stable pulmonary hypertension tolerate low dose sevoflurane inhalation as well
5 as normal rats do. *PLoS One.* 2016;11:e0154154.
- 6 39. Boehm M, Lawrie A, Wilhelm J, Ghofrani HA, Grimminger F, Weissmann N, Seeger W,
7 Schermuly RT, Kojonazarov B. Maintained right ventricular pressure overload induces
8 ventricular-arterial decoupling in mice. *Exp Physiol.* 2017;102:180-189.
- 9 40. Ryan JJ, Marsboom G, Fang YH, Toth PT, Morrow E, Luo N, Piao L, Hong Z, Ericson K,
10 Zhang HJ, Han M, Haney CR, Chen CT, Sharp WW, Archer SL. PGC1 α -mediated
11 mitofusin-2 deficiency in female rats and humans with pulmonary arterial hypertension.
12 *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:865-878.
- 13 41. Fish R, Danneman PJ, Brown M, Karas A. Anesthesia and Analgesia in Laboratory
14 Animals. Academic Press, 2nd ed, 2008.
- 15 42. Miura M, Wakayama Y, Endoh H, Nakano M, Sugai Y, Hirose M, Ter Keurs HE,
16 Shimokawa H. Spatial non-uniformity of excitation-contraction coupling can enhance
17 arrhythmogenic-delayed afterdepolarizations in rat cardiac muscle. *Cardiovasc Res.*
18 2008;80:55-61.
- 19 43. Miura M, Nishio T, Hattori T, Murai N, Stuyvers BD, Shindoh C, Boyden PA. Effect of
20 nonuniform muscle contraction on sustainability and frequency of triggered arrhythmias
21 in rat cardiac muscle. *Circulation.* 2010;121:2711-2717.
- 22 44. Miura M, Handoh T, Taguchi Y, Hasegawa T, Takahashi Y, Morita N, Matsumoto A,
23 Shindoh C, Sato H. Transient elevation of glucose increases arrhythmia susceptibility in
24 non-diabetic rat trabeculae with non-uniform contraction. *Circ J.* 2020;84:551-558.

- 1 45. Edward GS, Maeda N, HS. Kim, Kaushik MD, John HK, Victor EL, Paula AS, William
2 CS, Oliver S. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase.
3 *Proc Nat Acad Sci USA*. 1996;93:13176-13181.
- 4 46. Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis
5 by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42:271-279.
- 6 47. Matsubara M, Hayashi N, Jing T, Titani K. Regulation of endothelial nitric oxide
7 synthase by protein kinase C. *J Biochem*. 2003;133:773-781.
- 8 48. Ferreira JC, Brum PC, Mochly-Rosen D. β IIPKC and ϵ PKC isozymes as potential
9 pharmacological targets in cardiac hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*.
10 2011;51:479-484.
- 11 49. Reddy S, Bernstein D. Molecular Mechanisms of Right Ventricular Failure. *Circulation*.
12 2015;132:1734-1742.
- 13 50. Power AS, Hickey AJ, Crossman DJ, Loiselle DS, Ward ML. Calcium mishandling
14 impairs contraction in right ventricular hypertrophy prior to overt heart failure. *Pflugers*
15 *Arch*. 2018;470:1115-1126.
- 16 51. Rain S, Bos Dda S, Handoko ML, Westerhof N, Stienen G, Ottenheijm C, Goebel M,
17 Dorfmueller P, Guignabert C, Humbert M, ogaard HJ, Remedios CD, Saripalli C, Hidalgo
18 CG, Granzier HL, Vonk-Noordegraaf A, van der Velden J, de Man FS. Protein changes
19 contributing to right ventricular cardiomyocyte diastolic dysfunction in pulmonary
20 arterial hypertension. *J Am Heart Assoc*. 2014;3:e000716.
- 21 52. Frantz S, Klaiber M, Baba HA, Oberwinkler H, Volker K, Gabetaner B, Bayer B,
22 Abebetaer M, Schuh K, Feil R, Hofmann F, Kuhn M. Stress-dependent dilated
23 cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-
24 dependent protein kinase I. *Eur Heart J*. 2013;34:1233-1244.
- 25 53. Li H, Witte K, August M, Brausch I, Godtel-Armbrust U, Habermeier A, Closs EI, Oelze
26 M, Munzel T, Forstermann U. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling

- 1 and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in
2 hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:2536-2544.
- 3 54. Ikeda S, Satoh K, Kikuchi N, Miyata S, Suzuki K, Omura J, Shimizu T, Kobayashi K,
4 Kobayashi K, Fukumoto Y, Sakata Y, Shimokawa H. Crucial role of rho-kinase in
5 pressure overload-induced right ventricular hypertrophy and dysfunction in mice.
6 *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1260-1271.
- 7 55. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF,
8 Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide
9 production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999;399:597-601.
- 10 56. Urashima T, Zhao M, Wagner R, Fajardo G, Farahani S, Quertermous T, Bernstein D.
11 Molecular and physiological characterization of RV remodeling in a murinemodel of
12 pulmonary stenosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:1351-1368.
- 13 57. Razny U, Kiec-Wilk B, Wator L, Polus A, Dyduch G, Solnica B, Malecki M,
14 Tomaszewska R, Cooke JP, Dembinska-Kiec A. Increased nitric oxide availability
15 attenuates high fat diet metabolic alterations and gene expression associated with insulin
16 resistance. *Cardiovasc Diabetol.* 2011;10:68.
- 17 58. Dewachter L, Dewachter C. Inflammation in right ventricular failure: Does it matter?
18 *Front Physiol.* 2018;9:1056.
- 19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

10. 図の説明

1

2 図 1. 右室と左室の構造的・機能的差異

3 右室と左室は収縮方向、壁厚や心室の形、心室にかかる圧等が異なっており、右心不
4 全では浮腫などの体うっ血の症状が、左心不全では呼吸困難などの肺うっ血の症状が
5 認められる。

6

7 図 2. 肺動脈性肺高血圧症における右心機能の重要性

8 肺動脈性肺高血圧症患者に対して、肺血管拡張薬を用いて加療を行い、その生命予後
9 を解析した研究である。右室駆出率（RVEF）が保たれた群では肺血管抵抗（PVR）に
10 関わらず予後が良好であったのに対し、RVEF が低下していた群では PVR の値に関わ
11 らず予後不良であった。

12

13 図 3. 右心不全において想定されているメカニズム

14 右心不全のメカニズムは心筋虚血、炎症、代謝異常、間質の線維化などの様々な要因
15 が提唱されているが、詳細はまだ明らかとなっていない。

16

17 図 4. LIPUS 先行研究：条件設定

18 LIPUS のサイクル数を変更し、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）における VEGF の
19 mRNA 発現を評価したところ、32 サイクルのパルス波を照射した際に有意な上昇が

1 認められた。

2

3 図 5. 肺動脈縮窄術の方法

4 (A) 第 2 肋間より開胸を行う。黒点線：左第 2 肋骨。(B) 大動脈と肺動脈を分離す
5 る。(C) 主肺動脈の下にピンセットを通す。(D) 主肺動脈周囲に縫合糸を留置する。

6 (E) 肺動脈と縫合糸の間に 25 ゲージの針を挟む。(F) 縫合糸を結紮し、針をすぐに
7 抜去することで、肺動脈の縮窄を行う。(G) 肺動脈の結紮後に閉胸を行う。(H) 閉胸
8 後、表皮の閉創を行う。

9

10 図 6. PAB マウスにおける右心機能障害と eNOS 活性の低下

11 (A) 実験プロトコル。(B) 肺動脈縮窄部位での流速（上段）と傍胸骨短軸像（下
12 段）の代表的な心エコー画像。(C) PAB 後 1 週間時点での各種評価項目（PA peak
13 velocity、TAPSE、CI、RVDd および RVWT）を示すグラフ（Sham、n=5 ; PAB、
14 n=10)。(D、E) マウスの右心室におけるリン酸化 eNOS (Ser 1177/Thr 495)、PKC、
15 total eNOS、sGC α 、PKGI α の代表的なウエスタンブロット画像とその定量評価の結
16 果（Sham、n=5 ; PAB、n=10)。(F) PKC の発現とリン酸化 eNOS (Thr 495) の相関
17 関係、リン酸化 eNOS (Ser 1177) と sGC α 、PKGI α の相関関係、sGC α と PKGI α との
18 相関関係を示すグラフ（Sham、n=5 ; PAB、n=10)。全ての結果は平均値±標準偏差
19 で標記した。(*P<0.05)

1

2 **図 7. PAB マウスにおける eNOS の重要性**

3 (A) 実験プロトコル。(B) 肺動脈縮窄術 (PAB) 後の野生型 (WT) マウスと

4 eNOS^{-/-}マウスの Kaplan-Meier 曲線 (WT PAB、n=24 ; eNOS^{-/-} PAB、n=25)

5 (*P<0.05、Log-rank test)。(C) hematoxylin-eosin (HE、スケールバー、100 μ m)、

6 Masson-trichrome (MT、スケールバー、100 μ m)、抗 CD31 抗体 (スケールバー、

7 100 μ m) で染色した心筋組織の代表的な画像、および肝臓の肉眼的所見 (スケール

8 バー、1cm)。(D) 心筋細胞断面積 (CSA) の定量分析 (HE 染色)、心筋の線維化領

9 域の定量分析 (MT 染色)、抗 CD31 免疫染色における毛細血管密度の定量分析、お

10 よび肝臓重量の定量的分析の結果 (WT sham、n=5 ; eNOS^{-/-} sham、n=4 ; WT PAB、11 n=16 ; eNOS^{-/-} PAB、n=14)。(E) PAB の 1 週間後 (上) と 5 週間後 (下) の傍胸骨

12 短軸像の代表的な心エコー画像。黄色の矢印は心嚢液貯留を示す。(F) 経胸壁心臓

13 超音波検査の各種評価項目 (TAPSE : 三尖弁輪収縮期移動距離、CI : 心拍出量係

14 数、RVDd : 右室拡張末期径、RVWT : 右室壁厚、および LVEF : 左室駆出率) の経

15 時的変化を示すグラフ (WT sham、n=5 ; eNOS^{-/-} sham、n=5 ; WT PAB、n=16 ;16 eNOS^{-/-} PAB、n=14-20)。全ての結果は平均値±標準偏差で標記した。(*P<0.05 vs.17 WT sham group、† P<0.05 vs. eNOS^{-/-} sham group、# P<0.05 vs. WT PAB group)

18

19 **図 8. PAB マウスの体重、血圧、心拍数、および臓器重量の評価**

1 (A) 収縮期血圧、拡張期血圧、心拍数、体重の時間経過を示すグラフ (WT Sham、
2 n=5 ; eNOS^{-/-} Sham、n=5 ; WT PAB、n=16 ; eNOS^{-/-} PAB、n=14-20)。 (B) 右室重量、
3 肺、肝臓の重量を示すグラフ (WT Sham、n=5 ; eNOS^{-/-} Sham、n=5 ; WT PAB、
4 n=16 ; eNOS^{-/-} PAB、n=14)。全ての結果は平均値±標準偏差で標記した。 (*P<0.05
5 vs. WT Sham、 † P<0.05 vs. eNOS^{-/-} Sham, #P<0.05 vs. WT PAB)

6

7 図 9. LIPUS 治療は PAB マウスの右心機能障害を改善する

8 (A) 実験プロトコル。 (B) マウスの心臓における LIPUS 照射を示す模式図。
9 (C) PAB の 1 週間後 (上) と 5 週間後 (下) の傍胸骨短軸像の代表的な心エコー画
10 像。 (D) 経胸壁心臓超音波検査の各種評価項目 (PA peak velocity : 肺動脈最大血流
11 速度、TAPSE、RVDd、CI、および LVEF) の経時的変化を示すグラフ (PAB-
12 placebo、n=16 ; PAB-LIPUS、n=16)。 (E) 代表的な右室圧容量曲線を示す。 (F) 侵
13 襲的血行動態評価 (右室カテーテル検査) による各種評価項目 (RVSP : 右室収縮期
14 圧、RVEDP : 右室拡張末期圧、CO : 心拍出量、および dp/dt max : 最大右室圧上昇
15 速度を示すグラフ (PAB-placebo、n=16 ; PAB-LIPUS、n=16)。全ての結果は平均値±
16 標準偏差で標記した。 (*P<0.05)

17

18 図 10. WT PAB マウスに対して LIPUS 治療を行った際の右心機能

19 (A) RVFAC、RVWT、および S'の経時的変化を示すグラフ (PAB-placebo、n=16 ;

1 PAB-LIPUS、n=16)。(B) 侵襲的血行動態評価 (右室カテーテル検査) による各種評
2 価項目 (SW : 一回仕事量、SV : 一回拍出量、RVEDV : 右室拡張末期容積、
3 RVESV : 右室収縮末期容積、および dp/dt min : 最大右室圧減少速度) を示すグラフ
4 (PAB-placebo、n=16 ; PAB-LIPUS、n=16)。全ての結果は平均値±標準偏差で標記
5 した。(*P<0.05)

6
7 **図 11. WT PAB マウスに対して LIPUS 治療を行った際の体重、血圧、心拍数、臓**
8 **器重量、および生存率**

9 (A) 体重、収縮期血圧、拡張期血圧、および心拍数の経時的変化を示すグラフ
10 (PAB-placebo、n=16 ; PAB-LIPUS、n=16)。(B) 右室、肺、および肝臓の重量を示
11 すグラフ (PAB-placebo、n=16 ; PAB-LIPUS、n=16)。(C) PAB-placebo マウスおよび
12 PAB-LIPUS マウスの Kaplan-Meier 曲線 (PAB-placebo, n=24; PAB-LIPUS, n=24) (Log-
13 rank test)。全ての結果は平均値±標準偏差で標記した。

14

15 **図 12. LIPUS 治療は、PAB マウスの心筋肥大と間質の線維化を抑制するが、毛細血**
16 **管密度は変化させない**

17 (A、C、E) hematoxylin-eosin (HE、スケールバー、100 μ m)、Masson-trichrome
18 (MT、スケールバー、(上図) 1mm、(下図) 100 μ m)、抗 CD31 抗体 (スケールバ
19 ー、100 μ m) で染色した心筋組織の代表的な画像。(B、D、F) 心筋細胞断面積

1 (CSA) の定量分析 (HE 染色)、心筋の線維化領域の定量分析 (MT 染色)、抗
2 CD31 免疫染色における毛細血管密度の定量的分析の結果 (PAB-placebo, n=16; PAB-
3 LIPUS, n=16)。

4

5 図 13. WT PAB マウスに対して LIPUS 治療を行った際の右室での蛋白発現①

6 (A、B) マウスの右心室における eNOS、リン酸化 eNOS (Ser1177/Thr495)、可溶
7 性グアニル酸シクラーゼ α (sGC α)、可溶性グアニル酸シクラーゼ β (sGC β)、プロ
8 テインキナーゼ GI α (PKGI α) の代表的なウエスタンブロット画像および定量評価
9 の結果 (PAB-placebo, n=10 ; PAB-LIPUS, n=10)。 (C) リン酸化 eNOS (Ser 1177)
10 と、sGC α 、PKGI α 発現の相関関係、sGC α と PKGI α 発現の相関関係を示すグラフ
11 (PAB-placebo, n=10 ; PAB-LIPUS, n=10)。 全ての結果は平均値 \pm 標準偏差で表し
12 た。 (*P<0.05)

13

14 図 14. WT PAB マウスに対して LIPUS 治療を行った際の右室での蛋白発現②

15 (A、B) マウスの右心室における Akt、リン酸化 Akt、AMPK、リン酸化 AMPK、
16 および CaMKII の代表的なウエスタンブロット画像とその定量評価 (PAB-placebo、
17 n=10 ; PAB-LIPUS, n=10)。 (C) リン酸化 eNOS (Ser 1177) と、リン酸化 Akt、リン
18 酸化 AMPK、total AMPK、および CaMKII との相関関係を示すグラフ (PAB-
19 placebo, n=10 ; PAB-LIPUS, n=10)。 全ての結果は平均値 \pm SD で標記した。

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

図 15. eNOS^{-/-}PAB マウスに対する LIPUS 治療は右心機能障害を改善しない

(A) 実験プロトコル。(B) eNOS^{-/-} PAB マウスに LIPUS 治療を行った場合と行わなかった場合の Kaplan-Meier 曲線 (eNOS^{-/-} PAB-placebo、n=24 ; eNOS^{-/-} PAB-LIPUS、n=24) (Log-rank test)。(C) 経胸壁心臓超音波検査による各種評価項目 (TAPSE、CI、RVDD、RVWT、および LVEF) の経時的変化を示すグラフ (eNOS^{-/-} PAB-placebo、n=12-16 ; eNOS^{-/-} PAB-LIPUS、n=12-16)。(D) RVSP : 右室収縮期圧、RVEDP : 右室拡張末期圧、CO : 心拍出量、SV : 一回拍出量および dp/dt max : 最大右室圧上昇速度を示すグラフ (eNOS^{-/-} PAB-placebo、n=12 ; eNOS^{-/-} PAB-LIPUS、n=10)。(E) hematoxylin-eosin (HE、スケールバー、100 μ m)、Masson-trichrome (MT、スケールバー、500 μ m)、抗 CD31 抗体 (スケールバー、100 μ m) で染色した心筋組織の代表的な画像。(F) 心筋細胞断面積 (CSA) の定量分析 (HE 染色)、心筋の線維化領域の定量分析 (MT 染色)、抗 CD31 免疫染色における毛細血管密度の定量分析の結果 (eNOS^{-/-} PAB-placebo、n=12 ; eNOS^{-/-} PAB-LIPUS、n=12)。(G、H) マウスの右心室における可溶性グアニル酸シクラーゼα (sGCα)、可溶性グアニル酸シクラーゼβ (sGCβ) プロテインキナーゼ GIα (PKGIα) の代表的なウエスタンブロット画像および定量評価の結果 (eNOS^{-/-} PAB-placebo、n=10 ; eNOS^{-/-} PAB-LIPUS、n=10)。全ての結果は平均値±標準偏差で標記した。

1 図 16. LIPUS 治療は SU/Hx ラットの右心機能障害を改善する

2 (A) 実験プロトコル。(B) ラットの心臓における LIPUS 照射を示す模式図。(C、
3 D) 経胸壁心臓超音波検査による心尖部四腔像の代表的な画像、および各種評価項目
4 (TAPSE、RVDd、LVEF) を示すグラフ (WT、n=5 ; SU/Hx-placebo、n=12 ; SU/Hx-
5 LIPUS、n=12)。(E、F) 心臓 MRI 検査の代表的な画像、および各種評価項目
6 (RVEDV : 右室拡張末期容積、RVESV : 右室収縮末期容積、RVEF : 右室駆出率)
7 を示すグラフ (WT、n=3 ; SU/Hx-placebo、n=8 ; SU/Hx-LIPUS、n=8)。(G) 代表的
8 な右室圧容量曲線、右室圧、肺動脈圧を示す。(H) 侵襲的血行動態評価 (右室カテ
9 ーテル検査) による各種評価項目 (RVSP : 右室収縮期圧、mPAP : 平均肺動脈圧、
10 RVEDP : 右室拡張末期圧、CO : 心拍出量、RVEDV : 右室拡張末期容積、RVESV :
11 右心室収縮末期容積、RVEF : 右心室駆出率、PVR : 肺血管抵抗) を示すグラフ
12 (WT、n=5 ; SU/Hx-placebo、n=16 ; SU/Hx-LIPUS、n=16)。全ての結果は平均値±
13 標準偏差で標記した。(*P<0.05 vs. WT、† P<0.05 vs. SU/Hx-placebo)

14

15 図 17. SU/Hx ラットにおける右心機能

16 (A) 経胸壁心臓超音波検査による各種評価項目 (RVWT、PAAT/PET、RVFAC、
17 S'、および LVEF) を示すグラフ (WT、n=5 ; SU/Hx-placebo、n=12 ; SU/Hx-LIPUS、
18 n=12)。(B) 心臓 MRI 検査による各種評価項目 (RV mass : 右室質量、LVEDV : 左
19 室拡張末期容積、LVESV : 左心室収縮末期容積、LVEF : 左室駆出率、および LV

1 mass : 左室質量) を示すグラフ (WT、n=3 ; SU/Hx-placebo、n=8 ; SU/Hx-LIPUS、
2 n=8)。 (C) 侵襲的血行動態評価 (心臓カテーテル検査) による各種評価項目 (SW :
3 一回仕事量、dP/dt max : 最大右室圧上昇速度、dP/dt min : 最大右室圧減少速度、
4 Ea : 動脈実効エラスタンス、および LVEDP : 左室拡張末期圧) を示すグラフ
5 (WT、n=5 ; SU/Hx-placebo、n=16 ; SU/Hx-LIPUS、n=16)。 (D) 下大静脈閉塞時の
6 代表的な右室圧容量曲線。 (E) EDPVVR : 拡張末期圧容量関係および ESPVVR : 収縮末
7 期圧容量関係を示すグラフ (WT、n=5 ; SU/Hx-placebo、n=11-12 ; SU/Hx-LIPUS、
8 n=15)。 全ての結果は平均値±標準偏差で標記した。 (*P<0.05 vs. WT、 †P<0.05 vs.
9 SU/Hx-placebo)

10

11 図 18. SU/Hx ラットの体重、血圧、心拍数、トレッドミルテスト、および臓器重量

12 (A) 体重の経時的変化を示すグラフ (WT、n=5 ; SU/Hx-placebo、n=16 ; SU/Hx-
13 LIPUS、n=16)。 (B) 収縮期血圧、拡張期血圧、および心拍数を示すグラフ (WT、
14 n=5 ; SU/Hx-placebo、n=16 ; SU/Hx-LIPUS、n=16)。 (C) トレッドミルテストの走行
15 距離を示すグラフ (WT、n=5 ; SU/Hx-placebo、n=16 ; SU/Hx-LIPUS、n=16)。 (D)
16 右室、肺、肝臓の重量を示すグラフ (WT、n=5 ; SU/Hx-placebo、n=16 ; SU/Hx-
17 LIPUS、n=16)。 全ての結果は平均値±標準偏差で標記した。 (*P<0.05 vs. WT)

18

19 図 19. LIPUS 治療は SU/Hx ラットの心筋細胞の肥大と間質の線維化を抑制する

1 が、毛細血管密度や肺動脈閉塞は改善しない

2 (A、C、E) hematoxylin-eosin (HE、スケールバー、 $100\mu\text{m}$)、Masson-trichrome

3 (MT、スケールバー、 $100\mu\text{m}$)、抗 CD31 抗体 (スケールバー、 $100\mu\text{m}$) で染色し

4 た心筋組織の代表的な画像。(B、D、F) 心筋細胞断面積 (CSA) の定量分析 (HE

5 染色)、心筋の線維化領域の定量分析 (MT 染色)、抗 CD31 免疫染色における毛細血

6 管密度の定量分析の結果 (WT、 $n=5$; SU/Hx-placebo、 $n=16$; SU/Hx-LIPUS、

7 $n=16$)。(G、H) Elastica-Masson (EM、スケールバー、 $100\mu\text{m}$) で染色した肺動

8 脈の代表的な画像と、肺動脈の閉塞率を示すグラフ (SU/Hx-placebo、 $n=16$; SU/Hx-

9 LIPUS、 $n=16$)。全ての結果は平均値 \pm 標準偏差で標記した。(* $P<0.05$ vs. WT、 \dagger

10 $P<0.05$ vs. SU/Hx-placebo)

11

12 **図 20. LIPUS 治療は in vitro で単離心筋組織の収縮・弛緩特性および Ca^{2+} handling**

13 **関連タンパクの発現を改善する**

14 (A) 右心室から単離した心筋組織 (trabeculae) に 0.5Hz の電気刺激を与えた際の、

15 発生張力の変化の代表的なトレース (22°C 、細胞外 $\text{Ca}^{2+}=0.7\text{mmol/l}$)。(B) Developed

16 force : 発生張力、 $dF/dt \text{ max}/N$: 最大収縮速度/発生張力、 $dF/dt \text{ min}/N$: 最大弛緩速度/

17 発生張力を示すグラフ (SU/Hx-placebo、 $n=6$; SU/Hx-LIPUS、 $n=6$)。(C) 右心室か

18 ら単離した心筋組織 (trabeculae) に 0.5Hz の電気刺激を与えた際の、細胞内 Ca^{2+}

19 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の変化の代表的なトレース (22°C 、細胞外 $\text{Ca}^{2+}=0.7\text{mmol/l}$)。(D) $[\text{Ca}^{2+}]_i$

1 decay : $[Ca^{2+}]_i$ 減衰の時定数、Diastolic $[Ca^{2+}]_i$: 拡張期 $[Ca^{2+}]_i$ を示すグラフ (SU/Hx-
2 placebo、n=6 ; SU/Hx-LIPUS、n=6)。(E、F) ホスホランバン (PLN) のリン酸化
3 (Ser16/Thr17) total PLN、SERCA2a、total eNOS の代表的なウエスタンブロット画
4 像とおよび定量評価の結果 (WT、n=3 ; SU/Hx-placebo、n=10 ; SU/Hx-LIPUS、
5 n=10)。(G) total eNOS の発現と PLN のリン酸化 (Ser16/Thr17)、または SERCA2a
6 との相関を示すグラフ。全ての結果は平均値±標準偏差で標記した。(* $P<0.05$ vs.
7 WT、† $P<0.05$ vs. SU/Hx-placebo

8

9 図 21. LIPUS 治療の右心不全に対する治療効果のメカニズムを示す概略図

10 圧負荷を受けた右室では、PKC を介して Thr495 のリン酸化が亢進した結果 eNOS の
11 機能が抑制され、下流の NO-sGC-cGMP-PKG のシグナル経路が障害され、心筋肥
12 大、間質の線維化、右室における Ca^{2+} handling に異常を生じ、右心不全に至る。本
13 研究では、LIPUS 治療により Akt のリン酸化を介して eNOS Ser1177 のリン酸化が亢
14 進され、下流の eNOS-NO-cGMP-PKG 経路が活性化された結果、右心機能障害が改
15 善することを示した。

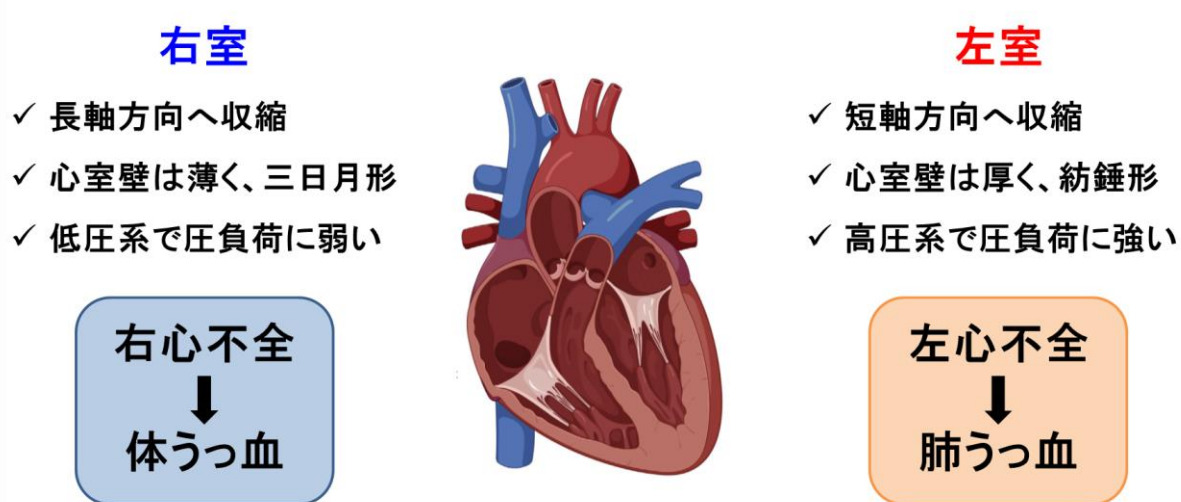
16

17 図 22-26. 各実験におけるウエスタンブロットのバンドを示した図

1

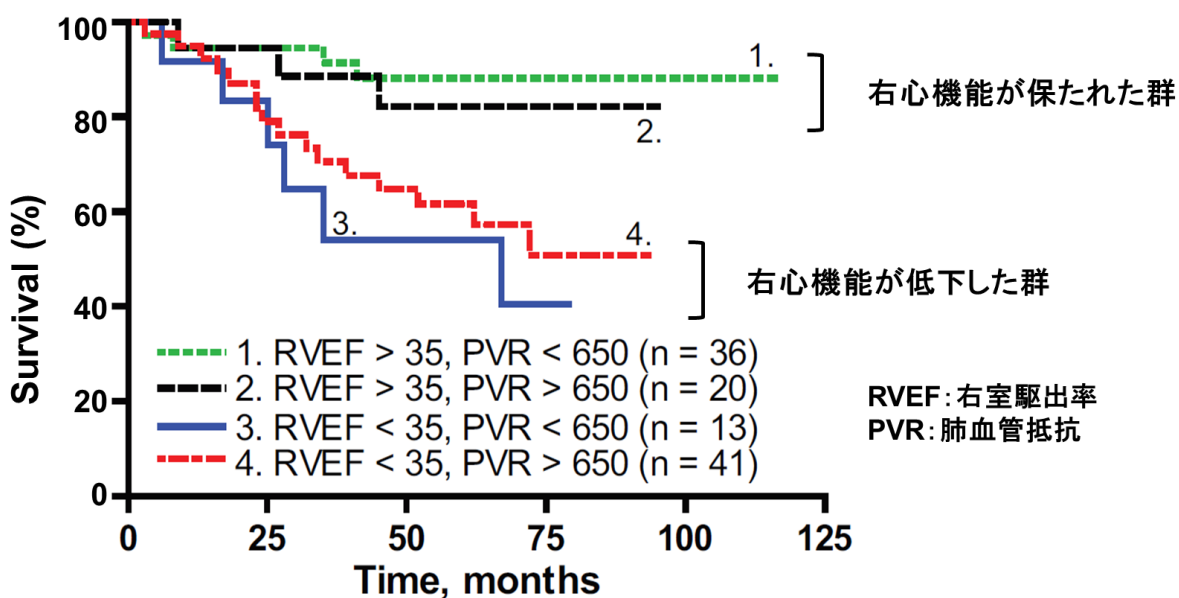
12. 図

図 1 右室と左室の構造的・機能的差異



3

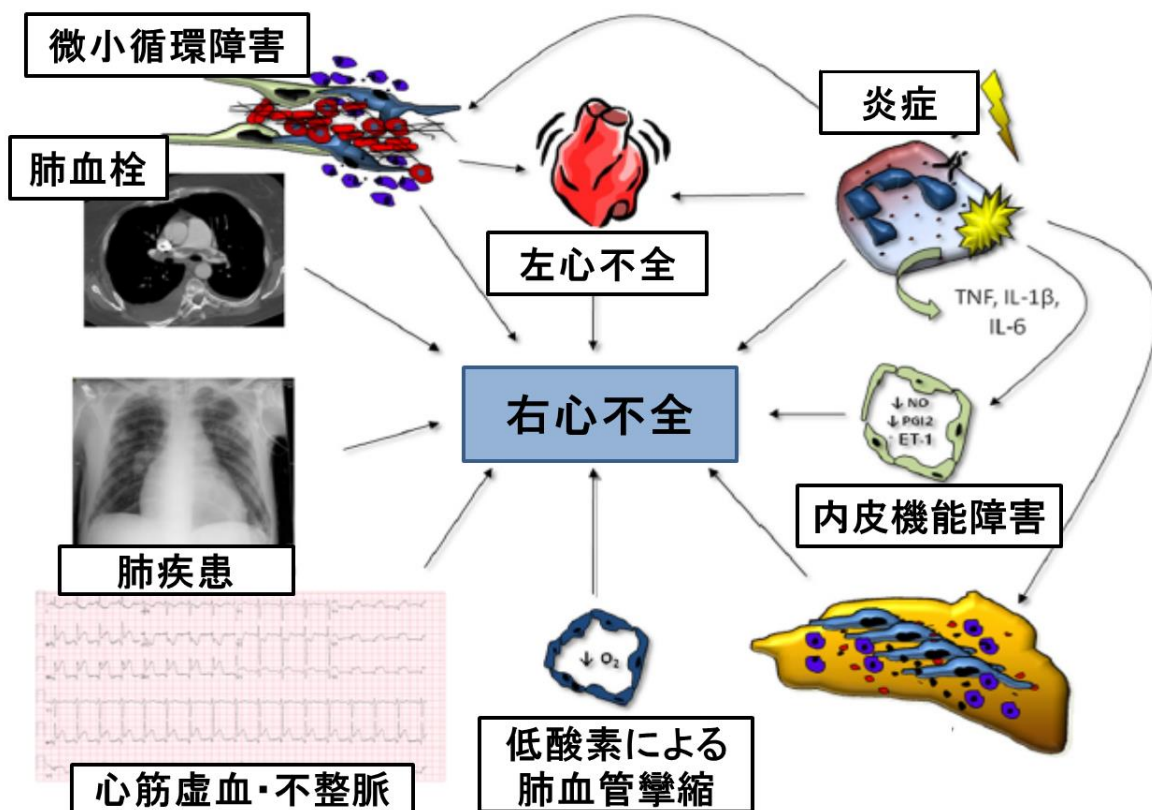
図 2 肺動脈性肺高血圧症における右心機能の重要性



4

5

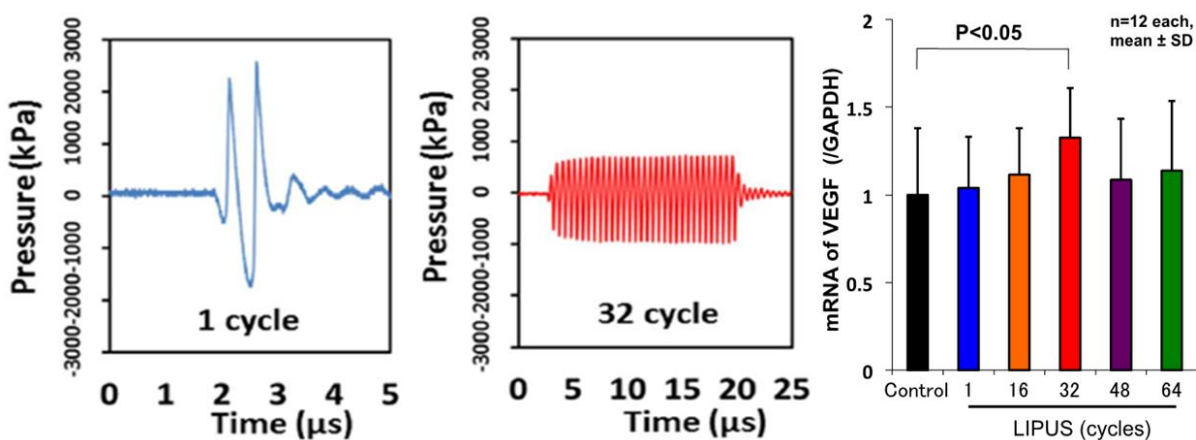
図3 右心不全において想定されているメカニズム



1
2

Tim L, Daniel RM, et al. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56:1435-1446. 改変

図4 LIPUS 先行研究：条件設定



3

Hanawa K, Shimokawa H, et al. *PLoS One.* 2014;9:e104863.

図5 肺動脈縮窄術の方法

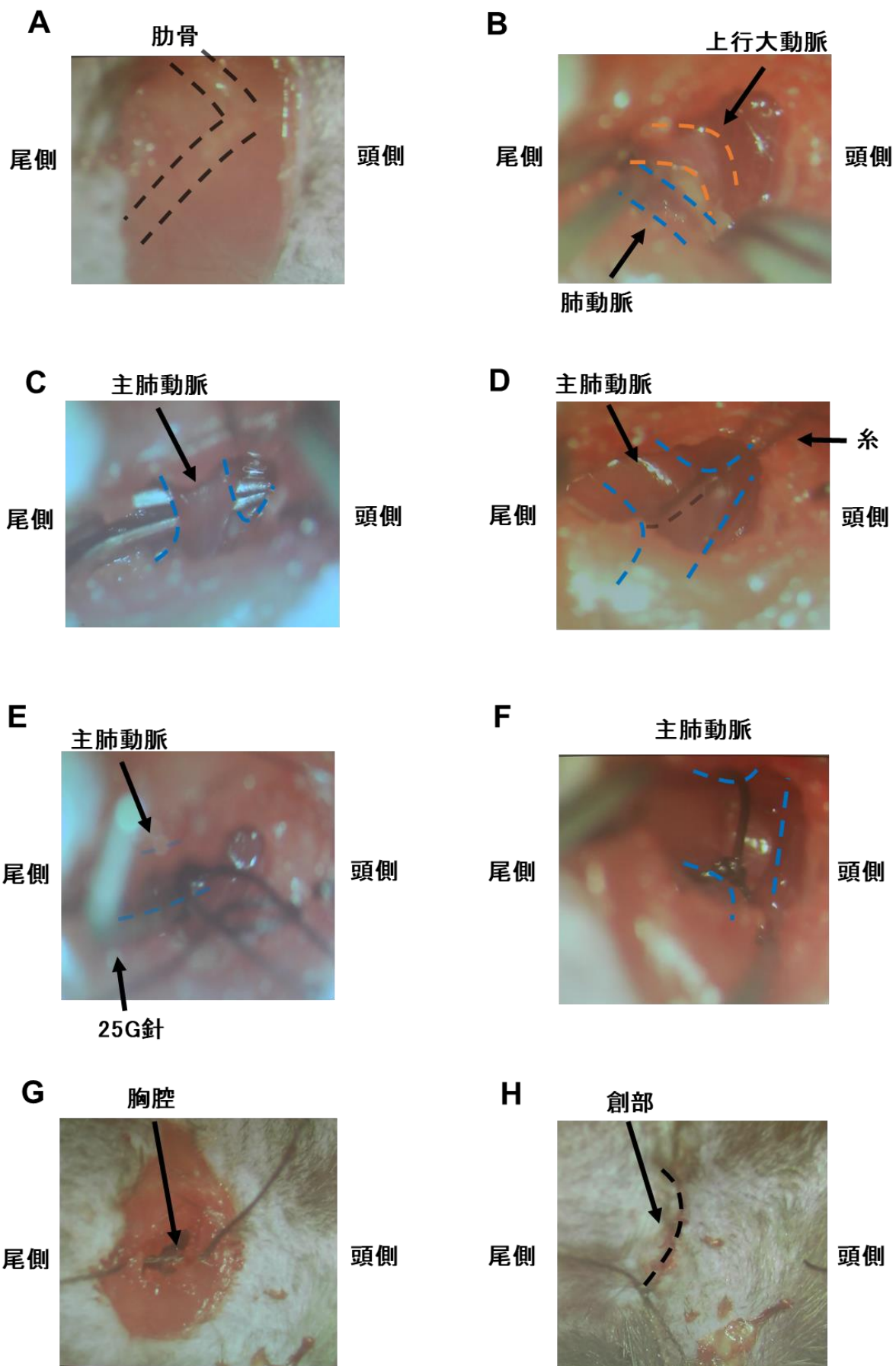


図 6 PAB マウスにおける右心機能障害と eNOS 活性

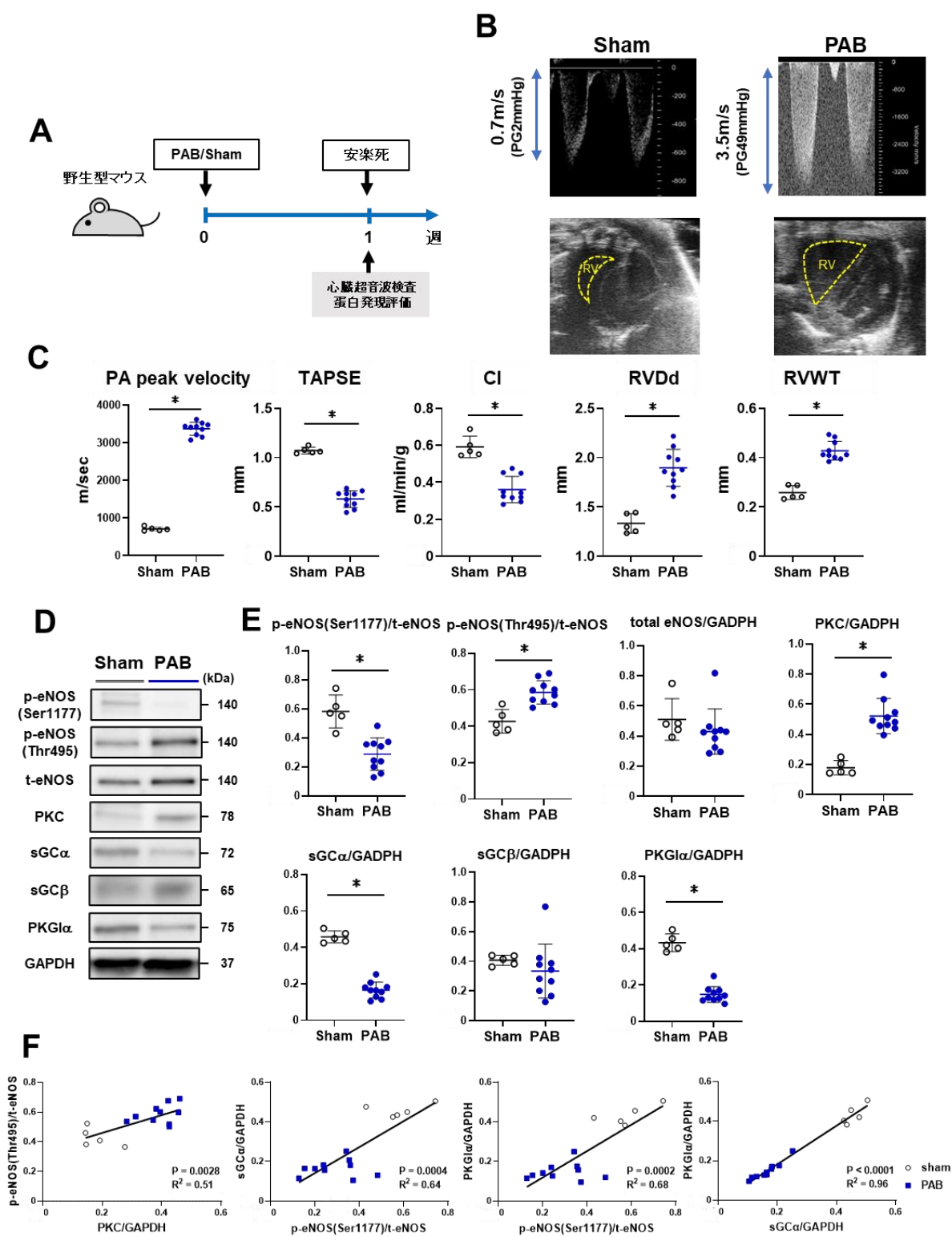


図7 PAB マウスにおける eNOS の重要性

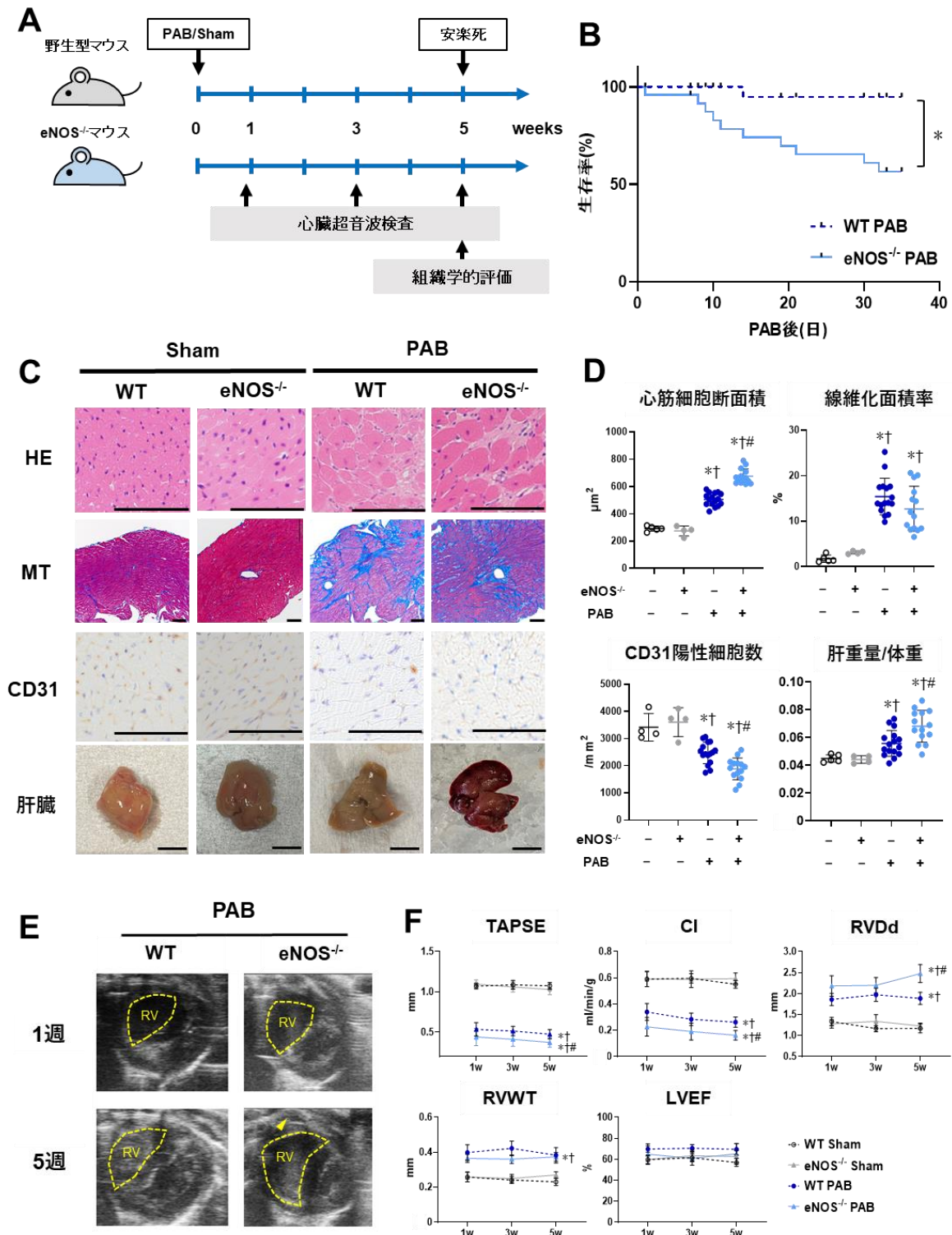
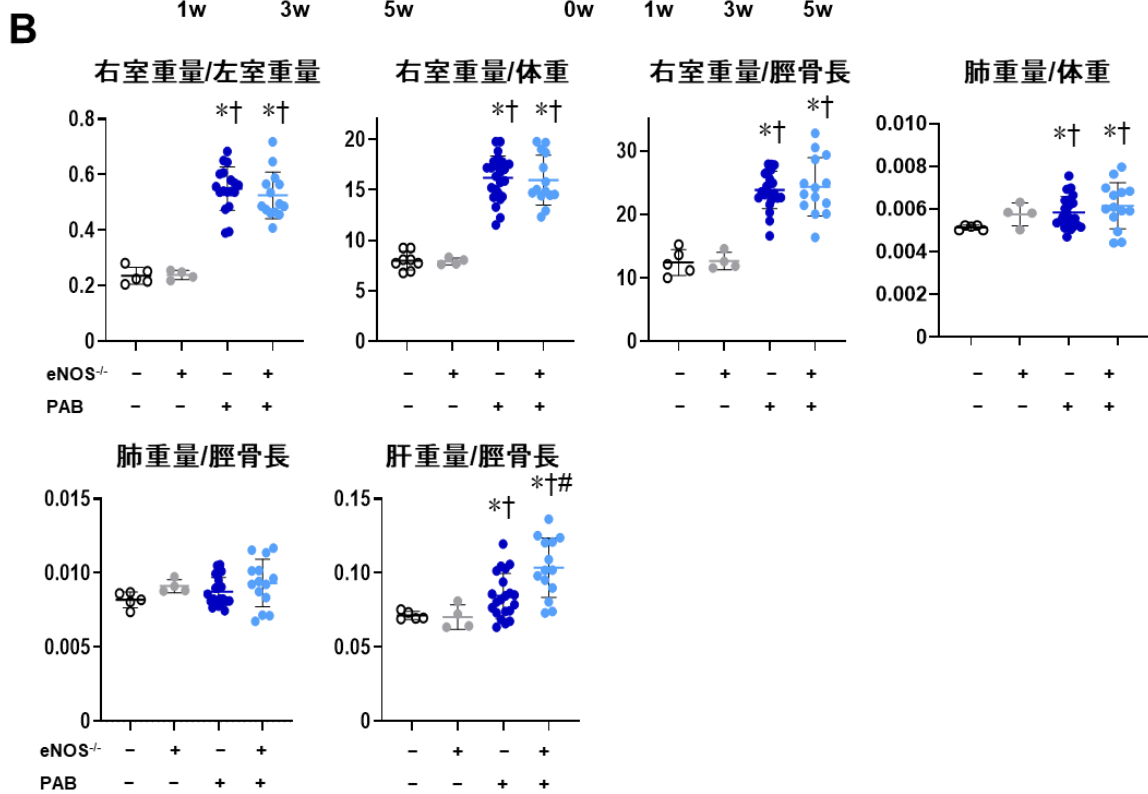
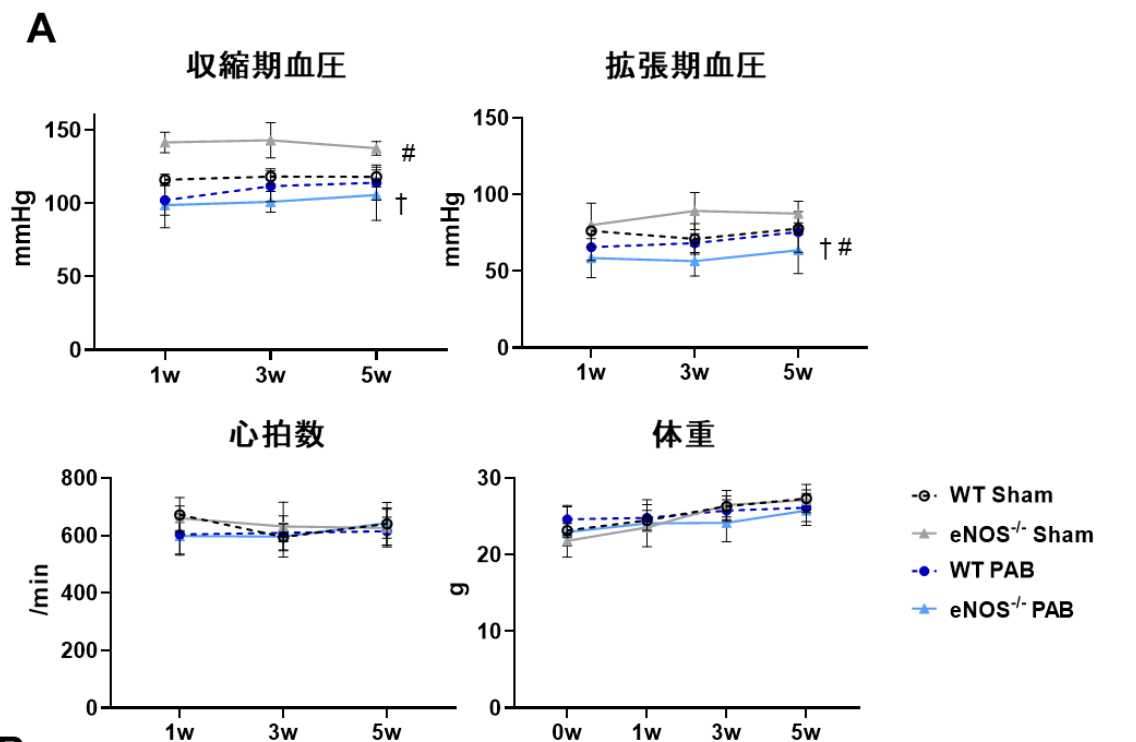


図 8 PAB マウスの体重、血圧、心拍数、および臓器重量
の評価

1



2

図9 LIPUS 治療は PAB マウスの右心機能障害を改善する

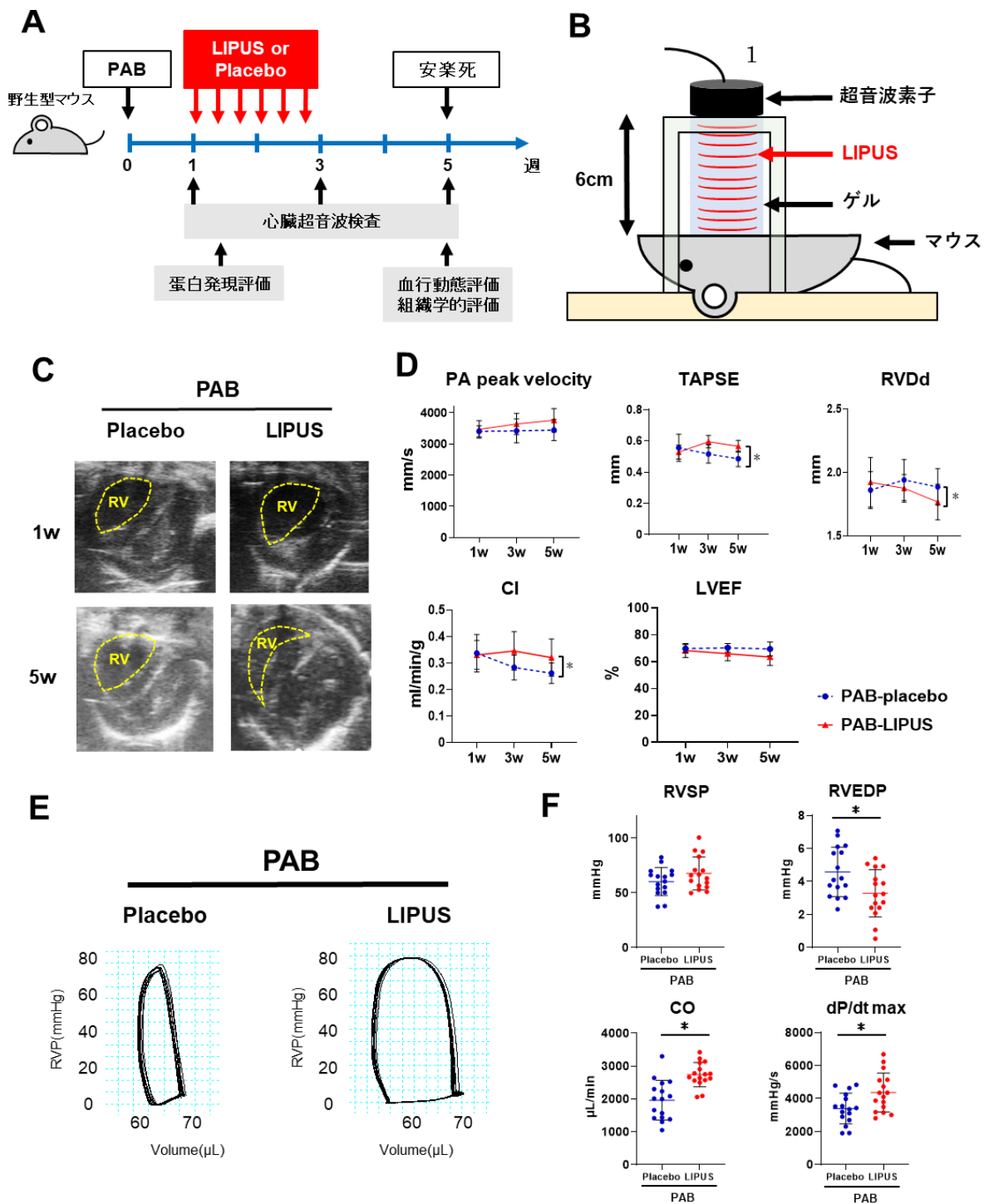


図 10 WT PAB マウスに対して LIPUS 治療を行った際の
右心機能

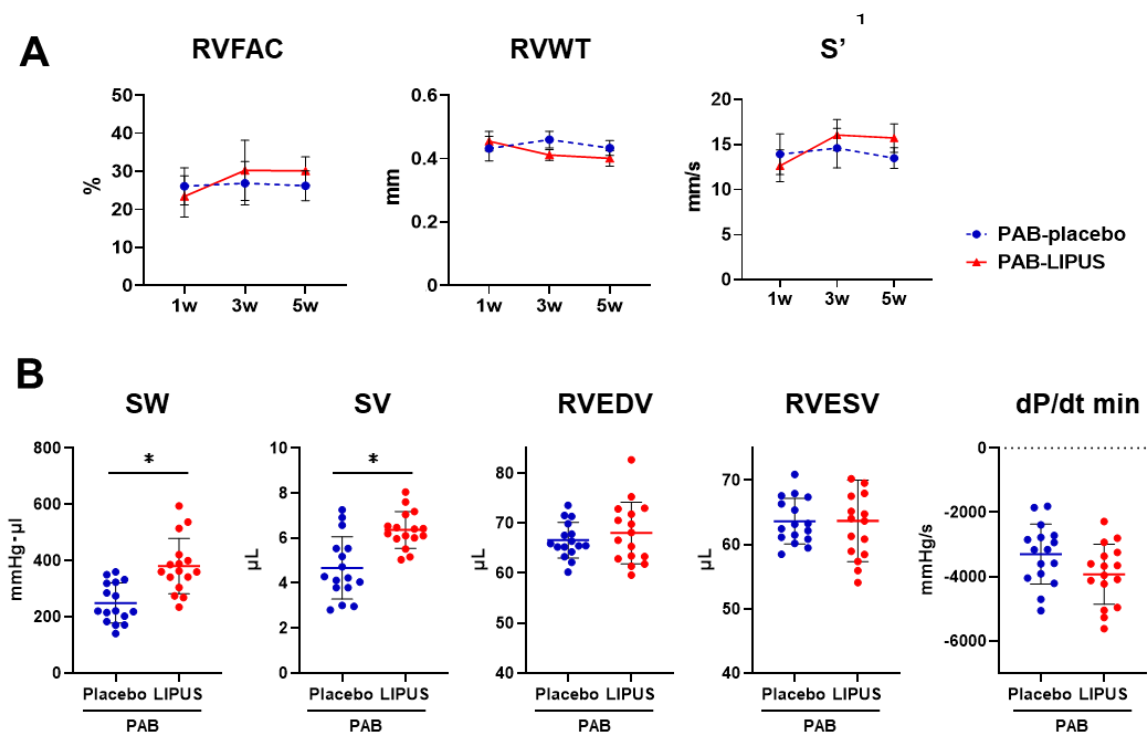


図 11 WT PAB マウスに対して LIPUS 治療を行った際の体重、血圧、心拍数、臓器重量、および生存率

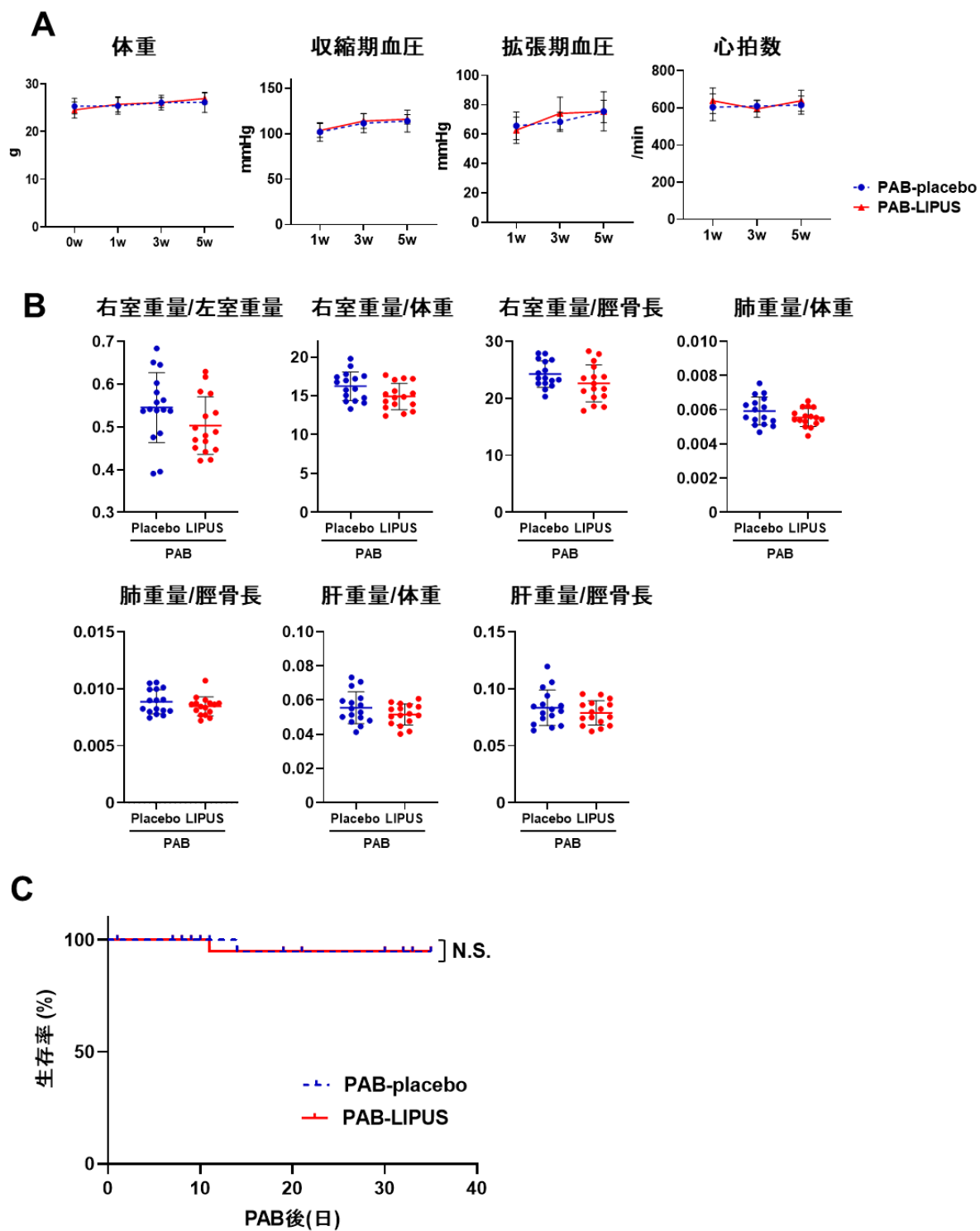


図 12 LIPUS 治療は、PAB マウスの心筋肥大と間質の線維化を抑制するが、毛細血管密度は変化させない

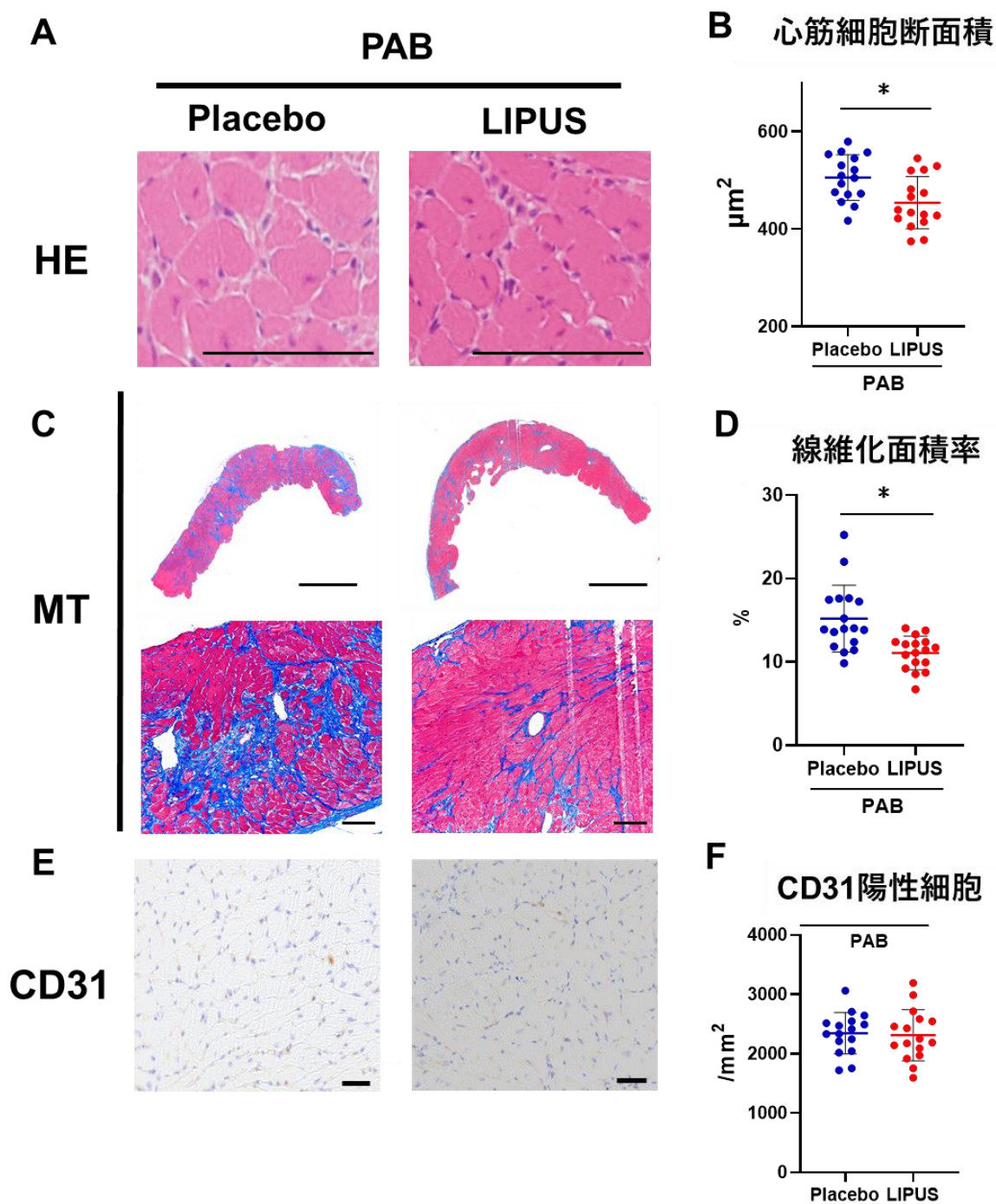


図 13 WT PAB マウスに対して LIPUS 治療を行った

際の右室での蛋白発現①

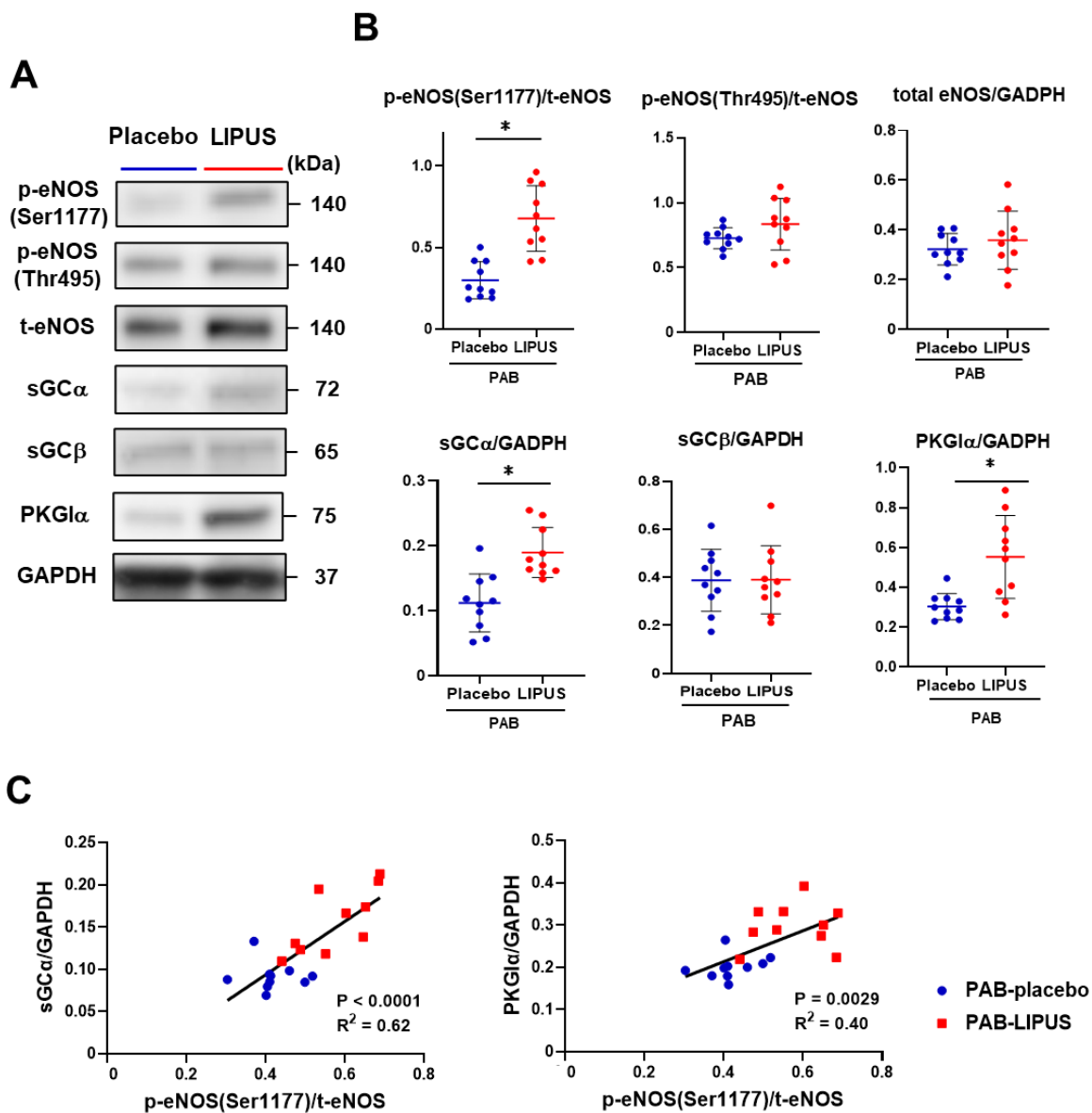


図 14 WT PAB マウスに対して LIPUS 治療を行った際の右室での蛋白発現②

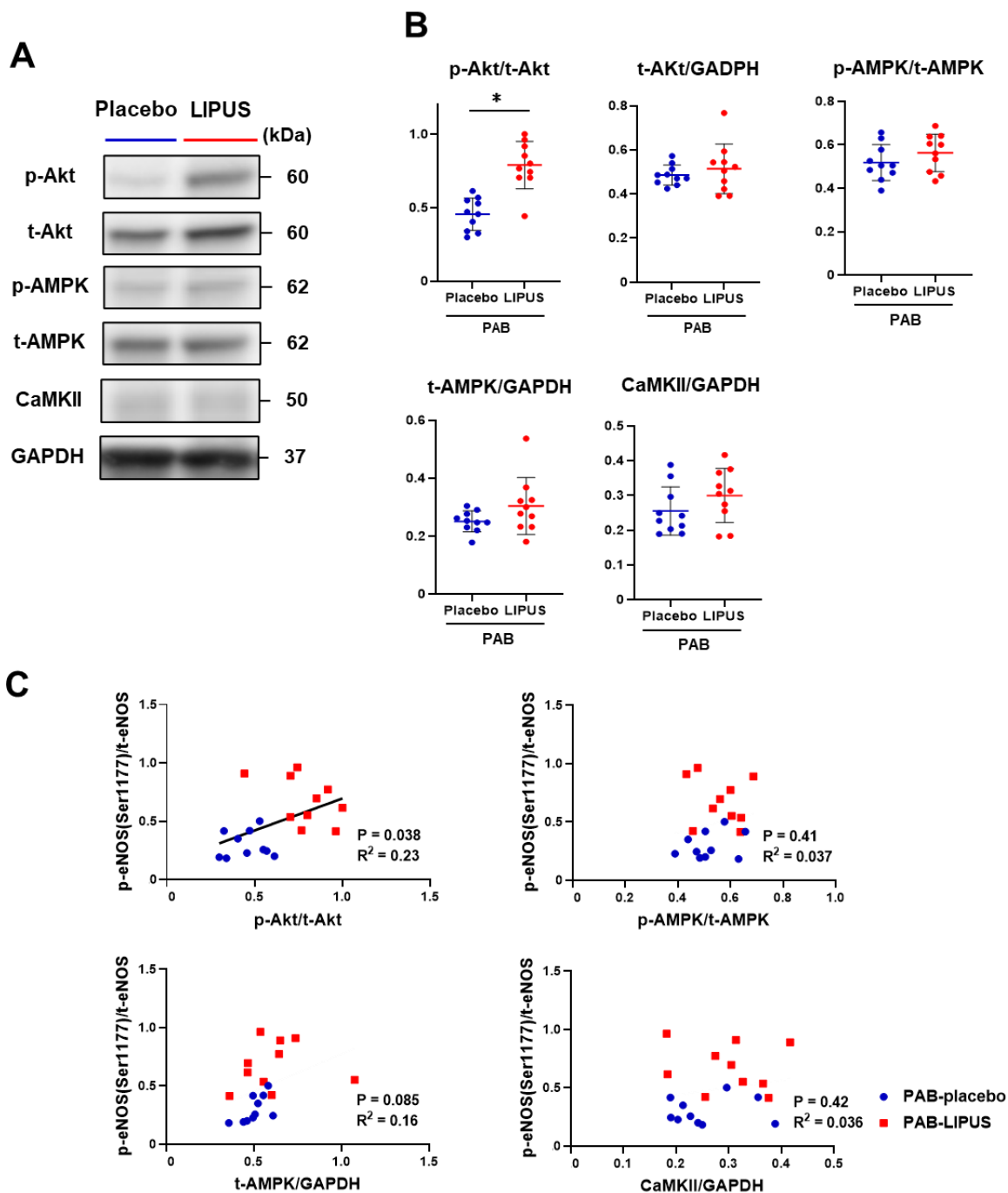


図 15 eNOS^{-/-}-PAB マウスに対する LIPUS 治療は右心機能障害を改善しない

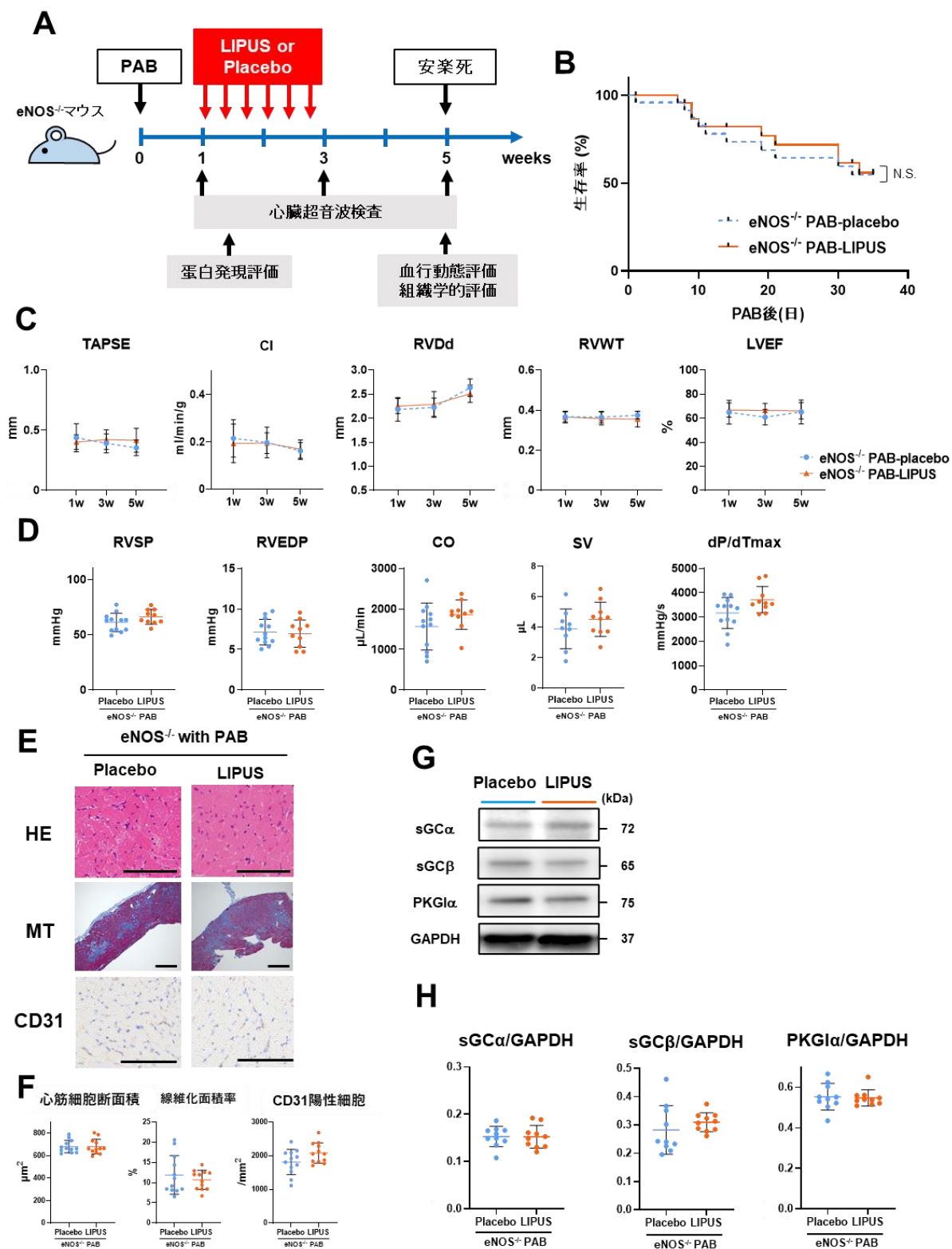


図 16 LIPUS 治療は SU/Hx ラットの右心機能障害を改善する

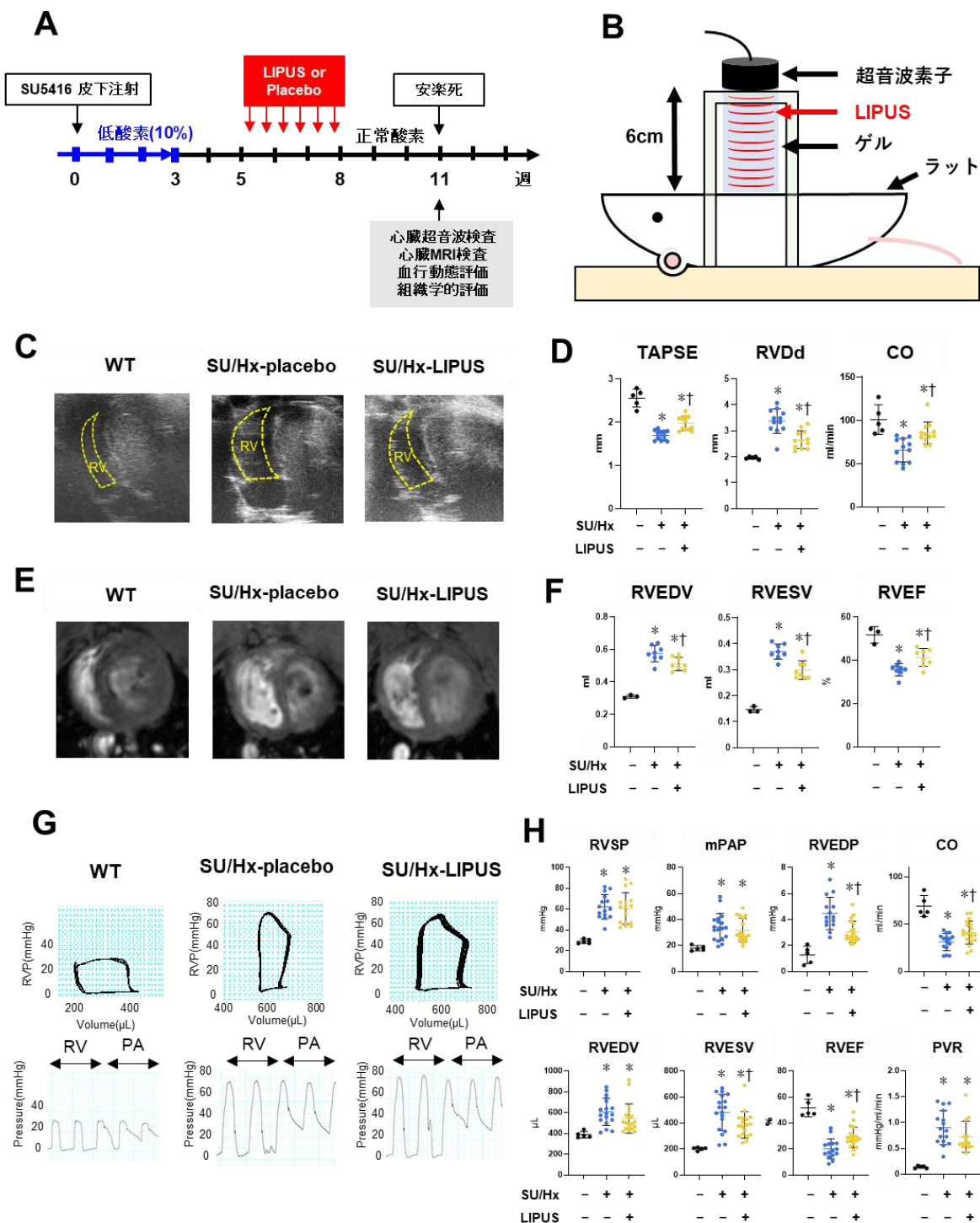


図 17 SU/Hx ラットにおける右心機能

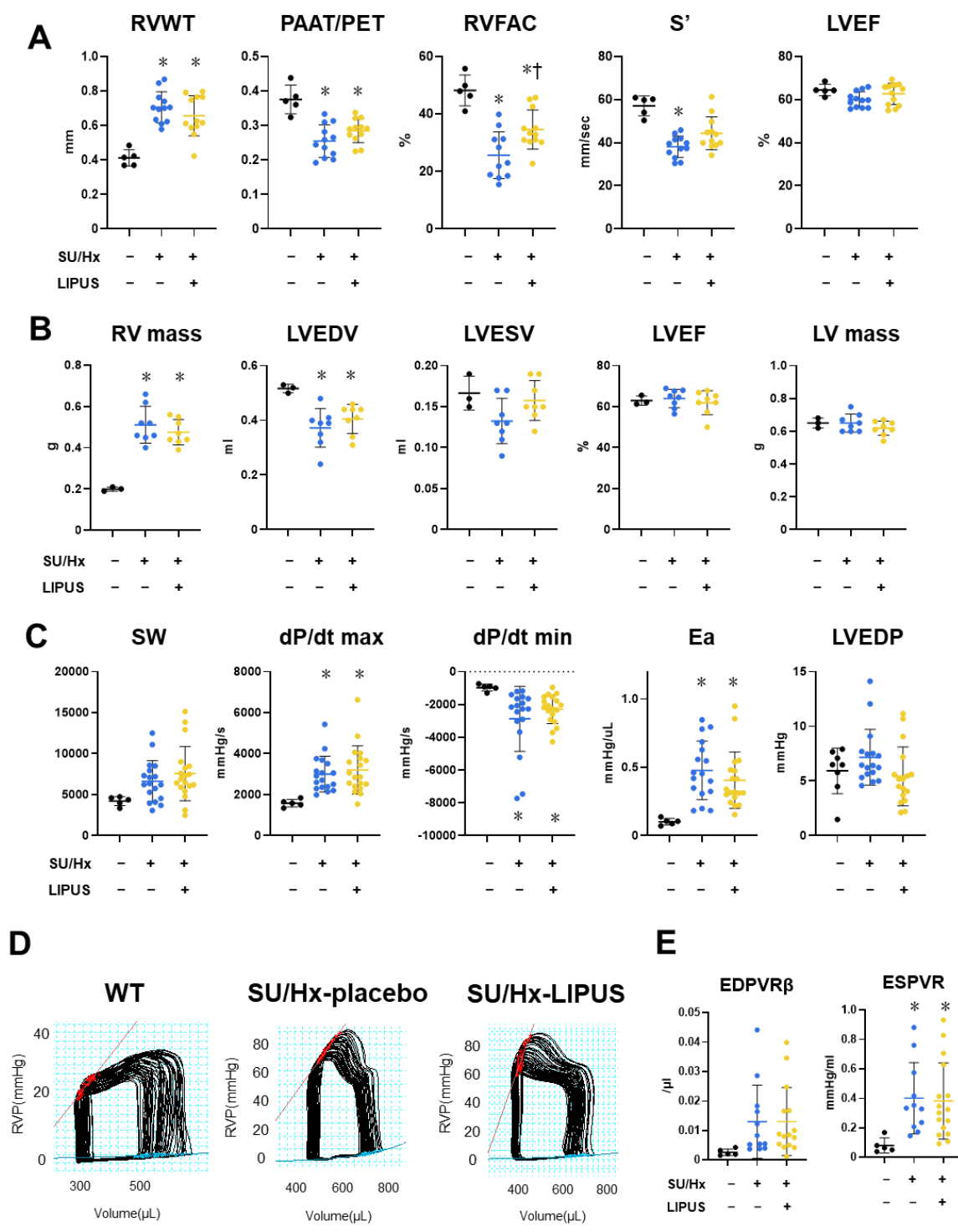


図 18 SU/Hx ラットの体重、血圧、心拍数、
トレッドミルテスト、および臓器重量

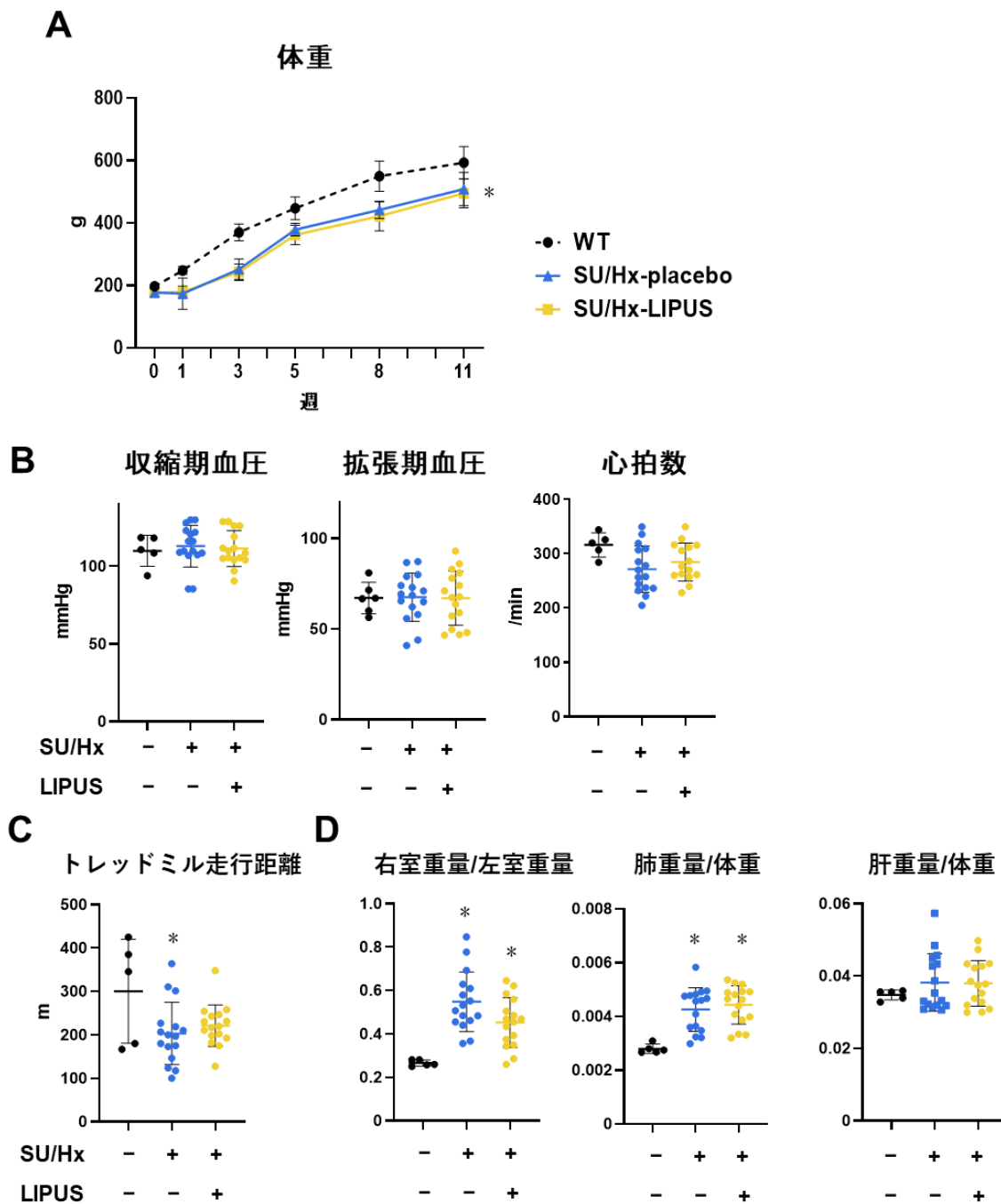


図 19 LIPUS 治療は SU/Hx ラットの心筋細胞の肥大と
 間質の線維化を抑制するが、毛細血管密度や肺動脈閉塞
 は改善しない

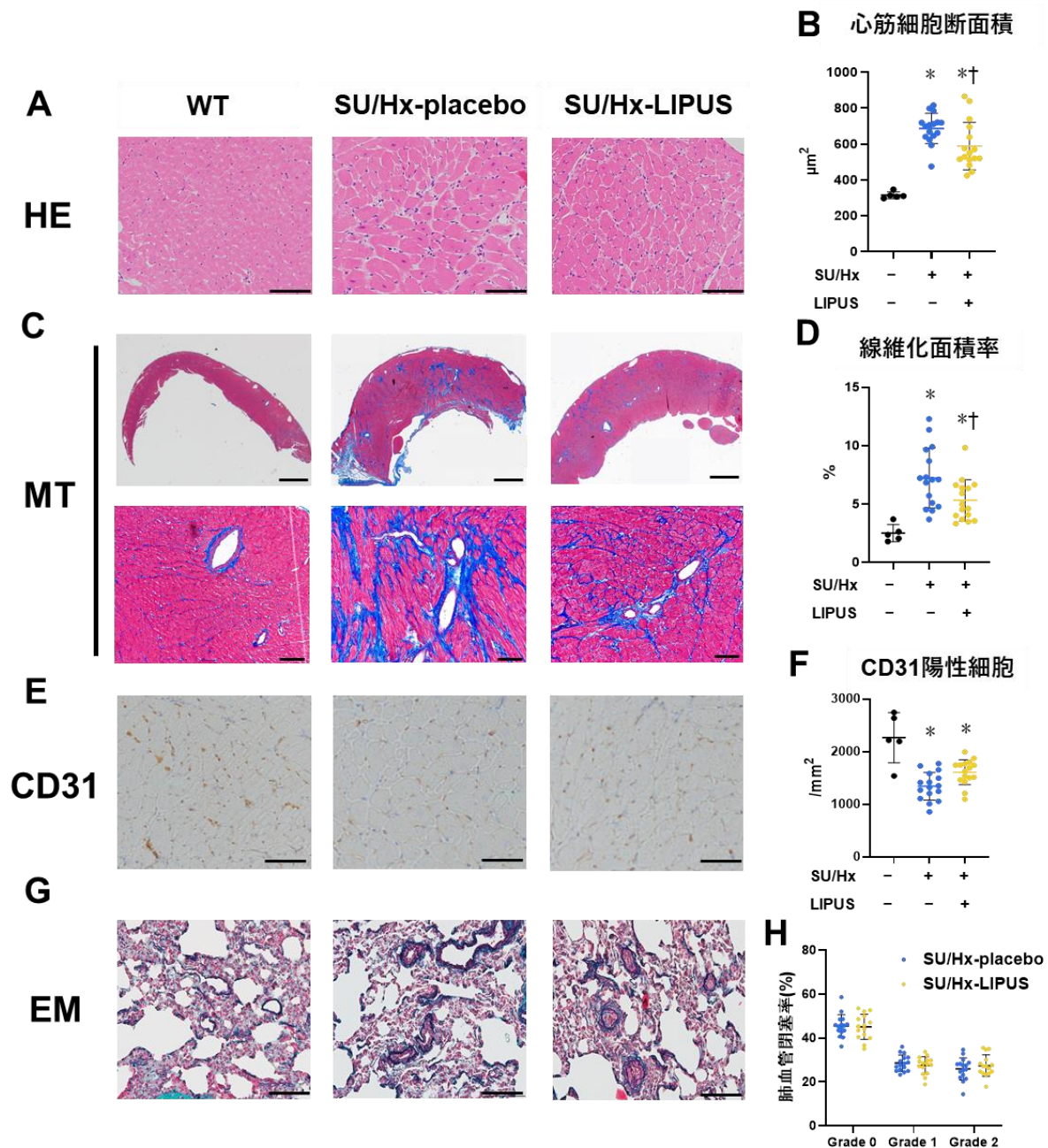


図 20 LIPUS 治療は *in vitro* で単離心筋組織の収縮・弛緩特性および Ca^{2+} handling 関連タンパクの発現を改善する

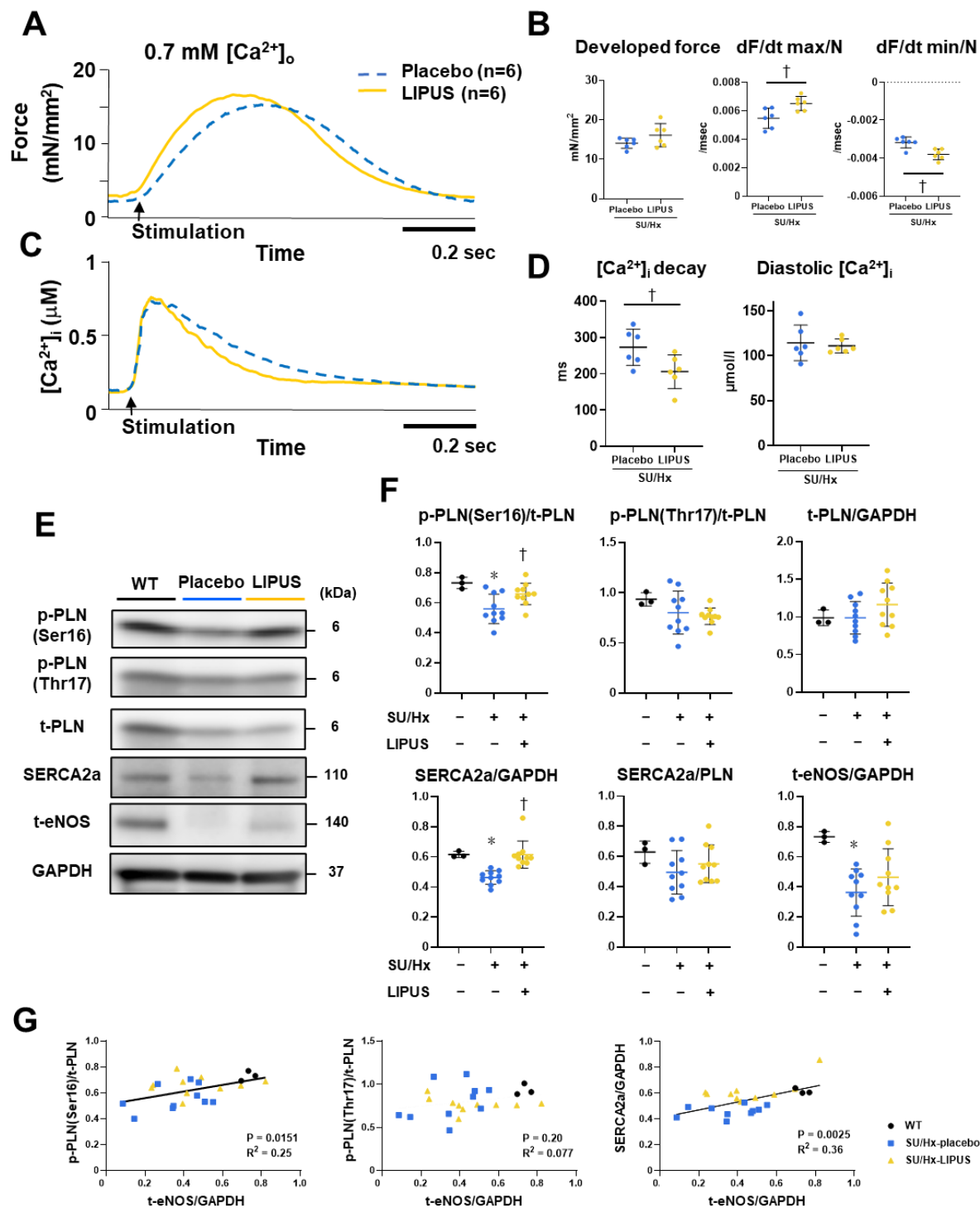
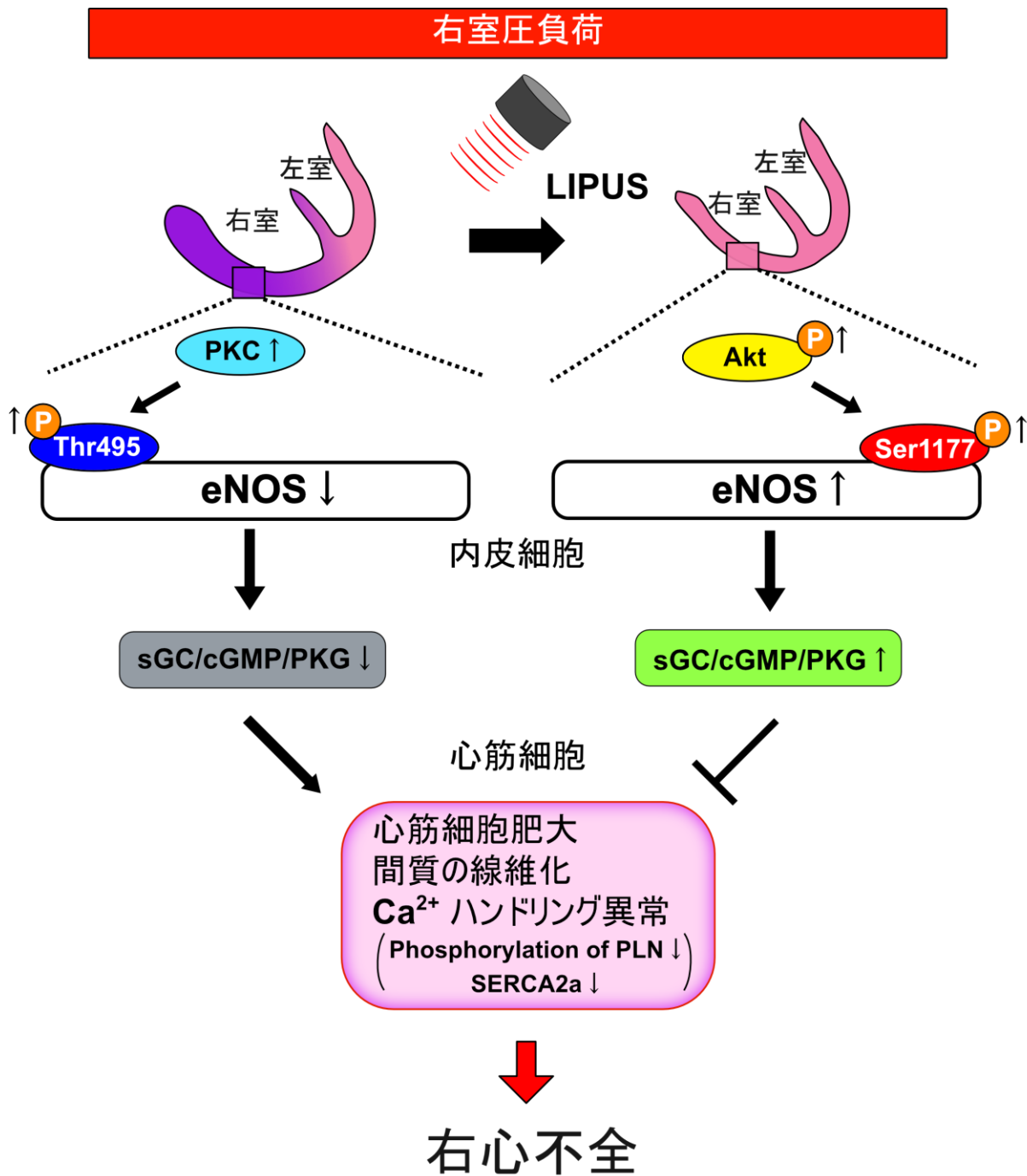


図 21 LIPUS 治療の右心不全に対する治療効果のメカニズムを示す概略図

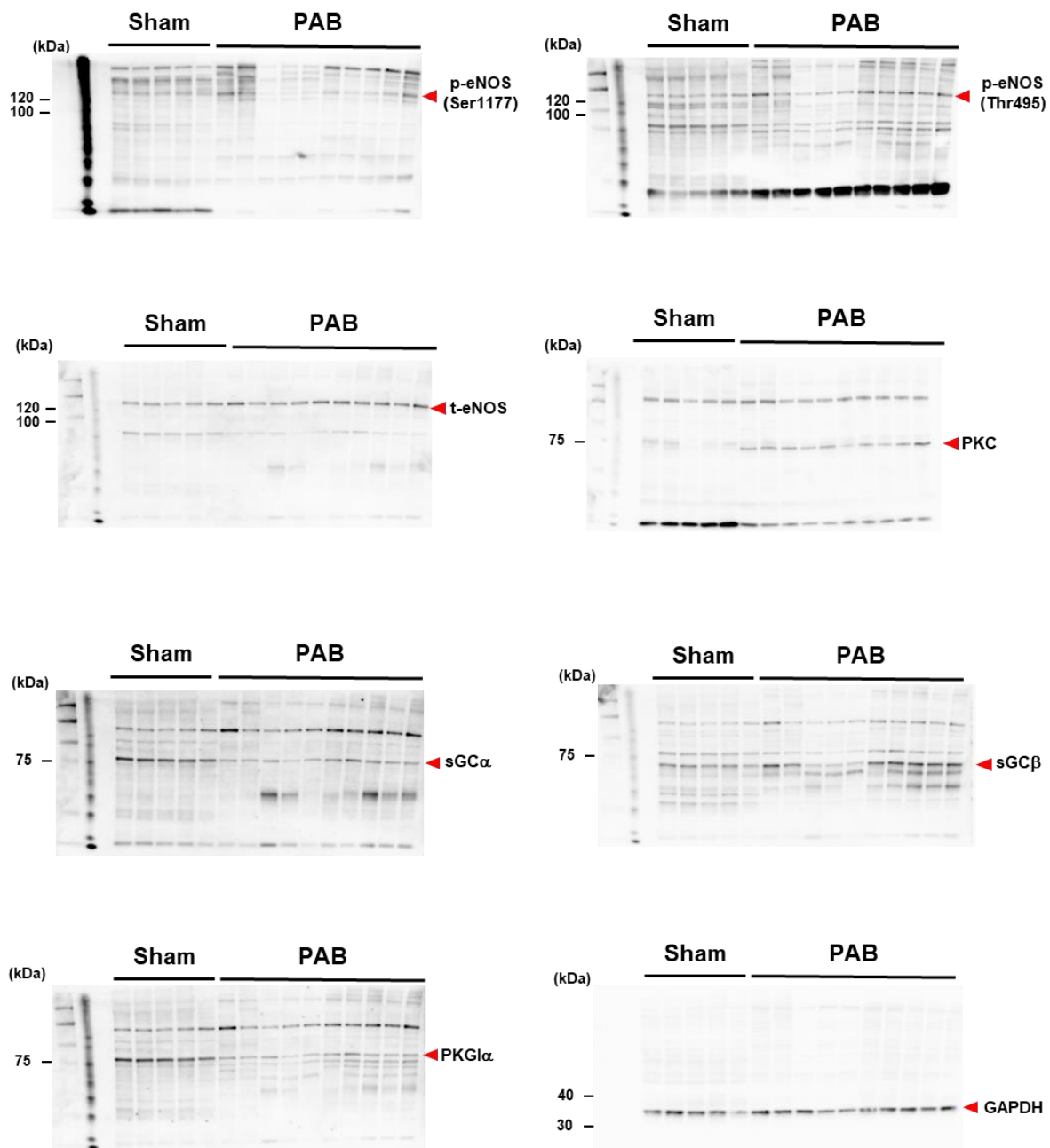


1

図 22 PAB1 週間後の右室におけるウエスタンブロット

2

3



4

5

6

7

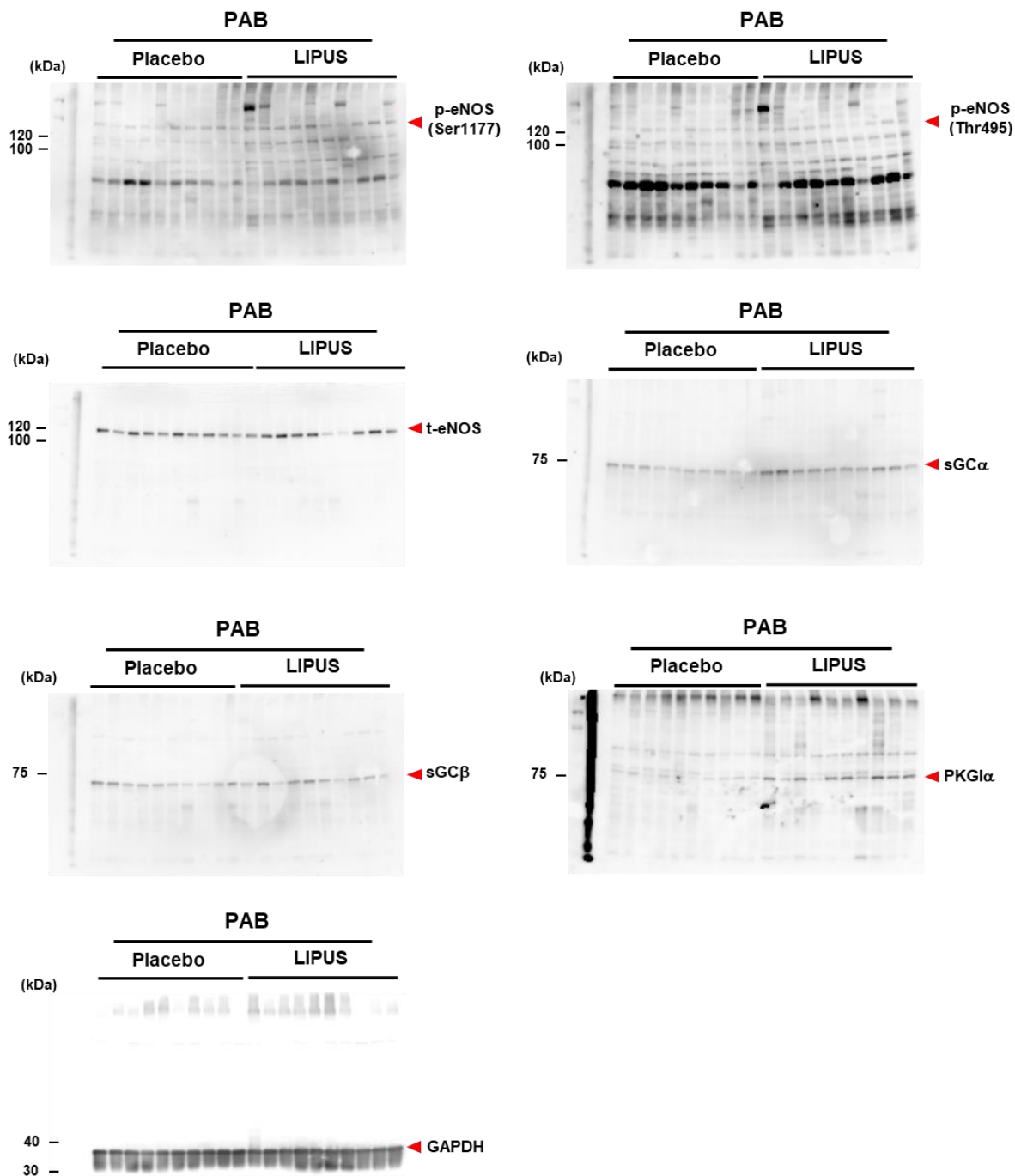
8

9

10

1

図 23 PAB マウスに対する LIPUS 治療後の右室における
ウエスタンブロット①



2

3

4

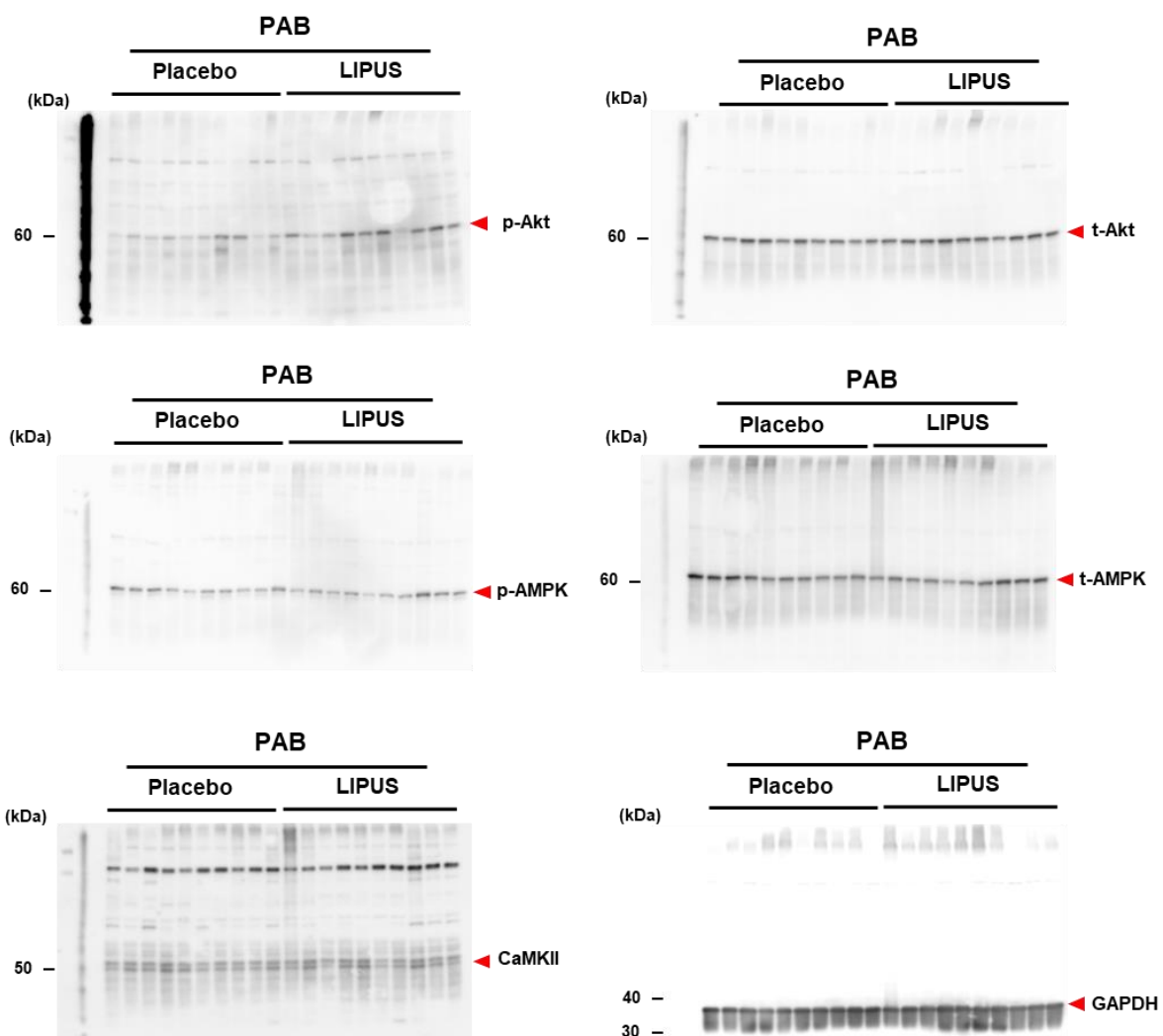
1

図 24 PAB マウスに対する LIPUS 治療後の右室における
ウエスタンブロット②

2

3

4



5

6

7

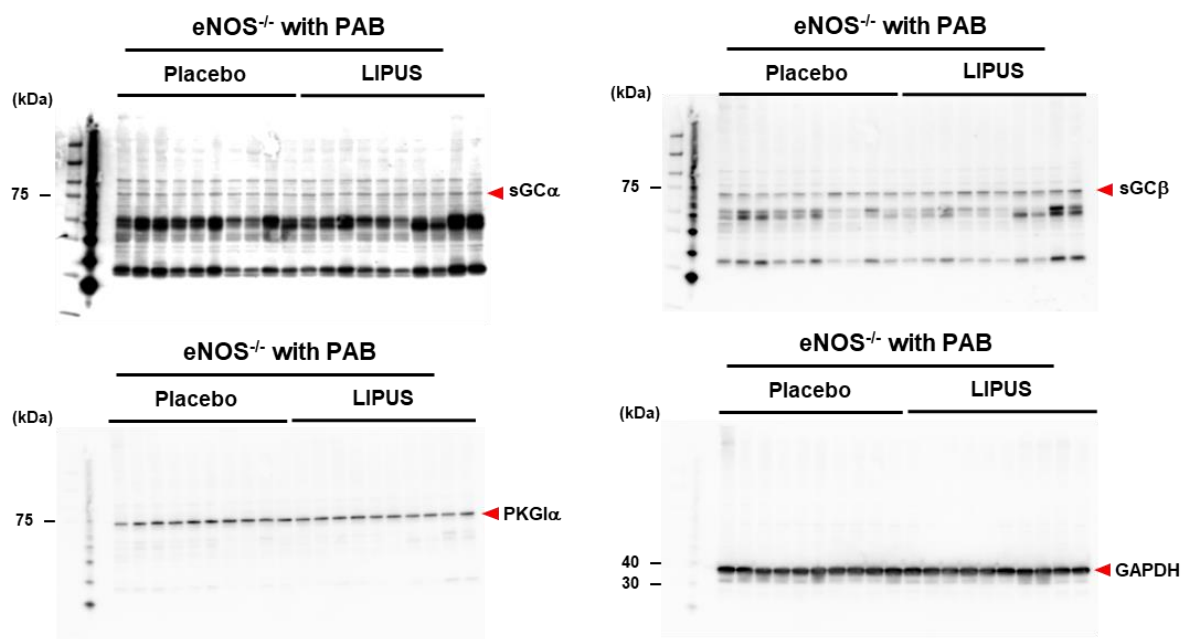
8

9

10

1

図 25 eNOS^{-/-}マウスに対する LIPUS 治療後の右室における
ウエスタンブロット



2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

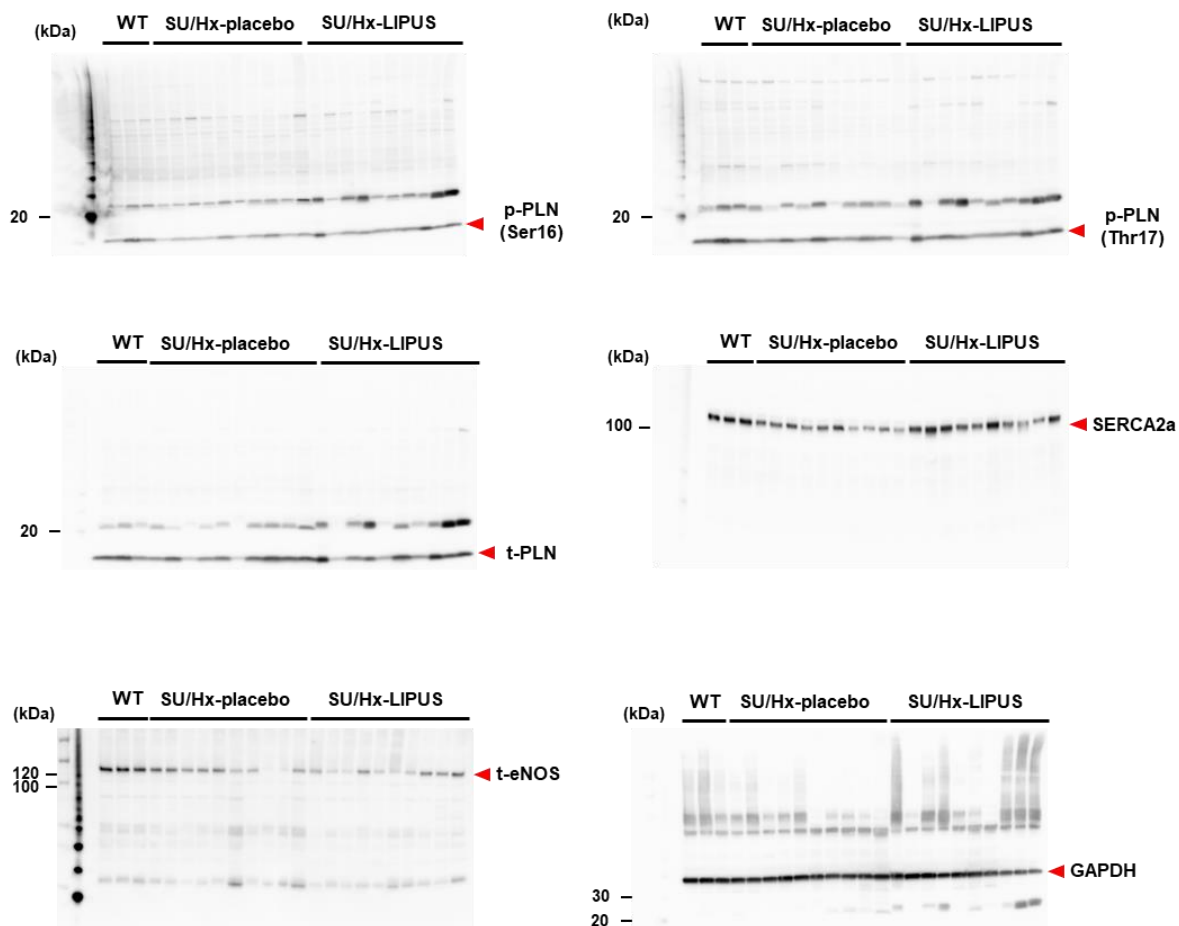
14

15

1

図 26 SU/Hx ラットに対する LIPUS 治療後の右室における
ウエスタンブロット

2



3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

表 1

13. 表

2 LIPUS 治療の左心不全モデルと右心不全モデルに対する治療効果の違い

マウスモデル	左室				右室	
	TAC ¹²		2 型糖尿病 ¹³		PAB (本研究)	
	Control	LIPUS	Control	LIPUS	Control	LIPUS
心臓超音波検査						
収縮能	↓	↑	→	→	↓	↑
拡張能	n/a	n/a	↓	↑	n/a	n/a
心室壁厚	↑	→	→	→	↑	→
心室内径	→	→	→	→	↑	↓
組織学的評価						
心筋肥大	↑	→	↑	↓	↑	↓
間質線維化	↑	↓	↑	↓	↑	↓
毛細血管密度	↓	↑	→	→	↓	→
蛋白発現						
VEGF	→	↑	n/a	n/a	→	→
p-eNOS(Ser1177)/t-eNOS	→	→	→	↑	↓	↑
p-eNOS(Thr495)/t-eNOS	n/a	n/a	n/a	n/a	↑	→
t-eNOS/GAPDH	→	↑	→	→	→	→
p-Akt/t-Akt	→	↑	n/a	n/a	→	↑
t-Akt/GAPDH	→	→	n/a	n/a	→	→
sGC/GAPDH	n/a	n/a	→	↑	↓	↑
PKG/GAPDH	n/a	n/a	→	↑	↓	↑
病態生理	心筋肥大による相対的虚血		内皮機能障害による eNOS-NO-sGC-cGMP-PKG 経路の障害		PKC の活性化による eNOS の Thr495 のリン酸化の上昇と、eNOS の Ser1177 のリン酸化低下による eNOS 活性の低下	
LIPUS 治療の効果	eNOS 活性化による血管新生		eNOS の Ser1177 のリン酸化による eNOS-NO-sGC-cGMP-PKG 経路の是正。血管新生は生じない		Akt のリン酸化を介した eNOS の Ser1177 のリン酸化による eNOS-NO-sGC-cGMP-PKG 経路の是正。血管新生は生じない	

3 TAC, trans-aortic banding; PAB, pulmonary artery banding.

4 → 不変, ↑ 増加, ↓ 減少, n/a 未評価