

学 位 論 文 題 名

Pravastatin Attenuates Left Ventricular Remodeling  
and Diastolic Dysfunction  
in Angiotensin II-Induced Hypertensive Mice

(AngII で誘導した心筋リモデリングと拡張型心不全へ及ぼす  
スタチンの影響に関する研究)

学位論文内容の要旨

Background

A substantial proportion of patients with heart failure have a normal ejection fraction and diastolic dysfunction. However, there are few data available to guide the therapy of these patients. The effects of statins on cardiac remodeling are well documented in animal models and it is reported that statin therapy revealed a survival benefit in patients with diastolic heart failure. However, the exact mechanisms of statins possibly explaining the decreased cardiovascular morbidity and mortality in patients with diastolic heart failure have not been elucidated

Methods

Eight-week-old male C57BL/6J wild type mice (n=48) were randomly divided into 4 groups and were treated over a four week period. Each of the four groups received the following treatment: oral normal saline and saline pump (Sal/Sal n=8), oral Pra (10mg/kg.day) and saline pump (Pra/Sal n=9), oral normal saline and AII (2  $\mu$  g/kg per minute) pump (Sal/AII n=15), and oral Pra (10mg/kg day) and AII (2  $\mu$  g/kg per minute) pump (Pra/AII n=16). Before implantation of the pumps and at the end of this study, SBP and heart rate were measured in a conscious state in all mice. Trans-thoracic echocardiography was performed to investigate cardiac function and morphological change. After conducting *in vivo* hemodynamic studies, the heart was excised and dissected into the right ventricle and the left ventricle (LV) which included the septum. At that time, the whole heart and the LV were weighed. The LV was cut into 3 transverse sections: apex, middle ring, and base, for myocardial histopathology and biochemical analysis. Before euthanization, artery blood samples (1ml) were collected to determine plasma total cholesterol and low density lipoprotein (LDL) cholesterol levels. All results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Multiple comparisons among 3 or more groups were performed by 2-way ANOVA and Fisher exact test for post hoc analyses. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

Results

1. After four weeks treatment, AII infusion significantly elevated both the SBP and cholesterol levels. Pravastatin treatment had no effect on these changes.

2. LV systolic function was assessed using percent fractional shortening (%FS) and LV diastolic function was assessed using the E/A ratio and c-IRT. Using these measurements, the data show that the administration of angiotensin over a 28-day period did not cause any abnormalities in systolic performance. However, the E/A ratio was reduced and c-IRT was prolonged in the Sal/AII group, indicating that there was some evidence of diastolic dysfunction after angiotensin administration. Finally, the data show that pravastatin treatment did improve the diastolic dysfunction caused by administration of angiotensin II.

3. The increase of LVW/BW was strongly inhibited by pravastatin treatment. LV hypertrophy judged by posterior wall thickness and myocyte cross-sectional area was also clearly induced by angiotensin II treatment, which was significantly attenuated by pravastatin administration.

4. A significant degree of cardiac fibrosis was observed among cardiomyocytes and the surrounding coronary arteries in Sal/AII but not in Pra/AII mice. Quantitative immunohistochemical analyses showed that an infusion of angiotensin II increased both interstitial and perivascular fibrosis to a greater extent in Sal/AII than in Pra/AII mice. This indicates that pravastatin could attenuate cardiac fibrosis in angiotensin II-induced hypertensive mice.

5. Using RT-PCR and real time-PCR, we analyzed critical markers of fibrosis and cardiac hypertrophy. An angiotensin II infusion increased TGF  $\beta$ , ANF, IL-6, TNF- $\alpha$ , ROCK1 and collagen I mRNA expression. However, this increase was markedly less in Pra/AII mice. Interestingly, the expression of MMPs was enhanced by angiotensin II, and the administration of pravastatin could inhibit this increase. Also, when compared to Sal/AII-treated mice, the expression of eNOS significantly increased in pravastatin-treated mice. We analyzed the cardiac gene and protein expression of ROCK1. With real time-PCR and western blot analysis, the ROCK1 expression was significantly increased by an infusion of angiotensin II. Moreover, this Ang II-induced increase was almost completely abrogated by pravastatin administration.

## Discussion

1. Pravastatin improved diastolic dysfunction in angiotensin II-induced hypertensive mice, which was associated with the amelioration of left ventricular hypertrophy and remodeling.

2. The cardioprotective effects of pravastatin were closely associated with the down regulation of collagen I, TGF- $\beta$ , MMP-2, 3, ANF, interleukin-6, TNF- $\alpha$ , ROCK1 gene expression and the up-regulation of eNOS gene expression.

3. statin treatment showed no effect on the increased systolic blood pressure or cholesterol levels by angiotensin II infusion.

## Conclusions

In conclusion, the current study has shown that pravastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor, improves diastolic dysfunction and attenuates cardiac remodeling in an angiotensin II-induced hypertensive murine model. These effects include improving or restoring endothelial function and decreasing vascular inflammation which are independent of any change in lipid profiles or blood pressure. These findings suggest the potential involvement of ROCK1. Our findings should provide a novel mechanism to explain the pathophysiology of DHF and the clinical benefits of statins in treatment of DHF. While clinical studies are warranted, these initial findings may prove beneficial in shedding some light on the mechanisms of statins for further experimental and randomized clinical trials.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 輪 聡 一

副 査 教 授 筒 井 裕 之

副 査 教 授 川 口 秀 明

学 位 論 文 題 名

## Pravastatin Attenuates Left Ventricular Remodeling and Diastolic Dysfunction in Angiotensin II-Induced Hypertensive Mice

(AngII で誘導した心筋リモデリングと拡張型心不全へ及ぼす  
スタチンの影響に関する研究)

多くの臨床報告によって、拡張不全の頻度は、心不全による入院患者の 20 ないし 50%と報告されている。また、治療戦略としては、十分な対応策が解明されないでいる。生命予後と細胞内メカニズムを改善する治療法については、高血圧、虚血性心疾患など原因疾患の治療の他に、分子レベルでの治療、つまり、心筋弛緩、心筋線維化および肥大の改善などが求められる。さらに、近年の基礎研究と臨床試験から、HMG-CoA 還元酵素阻害剤、いわゆるスタチン系薬剤がコレステロールの変化と関係なしに、さまざまな心血管疾患の改善につながる作用をもつことが注目されている。したがって、Ang II 投与により高血圧性肥大大心モデルを作成し、プラバスタチンが Ang II で誘導した左室リモデリングと拡張不全を改善するかどうかを検討した。

方法：8 週齢の C57BL/6J マウスをまず 2 群に分け、浸透圧ポンプを用いて生理的食塩水あるいはアンジオテンシン II ( $2 \mu\text{g/kg/day}$ ) を投与、さらに各群を 2 つに分け、それぞれ生理食塩水単独あるいはプラバスタチン( $10\text{mg/kg/day}$ )を溶解した生理食塩水、を経口で 4 週間投与した。4 週間後、麻酔下に心エコー検査を施行し、心収縮機能と拡張機能を評価した。PCR 法により、心肥大関連分子 ANF、線維化関連分子 collagen type1、TGF  $\beta$ 、MMP-2、-3、ROCK1、炎症性サイトカイン IL6、TNF  $\alpha$  の遺伝子発現レベルを検討、Masson 染色により線維化面積と心筋細胞横断面積を計測、さらに、Western Blotting 解析により ROCK1 蛋白発現を検討した。

結果：4 週間後、AII 投与群では、total cholesterol, LDL cholesterol と血圧が control 群より有意に高くなった。プラバスタチンはその増加に影響しなかった。AII 投与により収縮機能が保たれた、拡張機能不全のモデルが作成できた。プラバスタチンは AII 投与にて誘導した拡張不全を改善した。Masson 染色の結果によって、AII 投与したマウスでは、心筋細胞の横断面積、心筋間質の線維化および血管周辺の線維化は control 群より増加しており、Pra 投与はそれらの増加を明らかに抑制した。control 群と比較して、Sal/AII 群では collagen I, TGF  $\beta$ , ROCK1, MMP-2, 3, IL-6, TNF  $\alpha$  と ANF の遺伝子発現が増加しており、Pra 投与によりそれらの遺伝子発現は有意に抑制された。逆に、Sal/AII 群と比べて、Pra 投与は明らかに eNOS の発現を増加した。

考察：

- I. AII 投与により、心筋肥大・線維化・拡張機能障害が惹起され、高血圧性心肥大モデルマウスを作成できた。
- II. プラバスタチン投与は、血圧、コレステロールの変化を伴わずに、心肥大・線維化・拡張機能障害を改善した。
- III. プラバスタチンの左室リモデリングおよび拡張機能改善効果に心肥大関連分子、心筋線維化関連分子、心筋炎症性サイトカイン抑制、eNOS 増大が関与すると考えられた。

結論：AII 投与により作成した高血圧性肥大心モデルマウスにおいて、プラバスタチンは左室リモデリングと拡張不全を改善した。臨床的にも、スタチンは、脂質低下以外の作用、いわゆる多面的効果によって高血圧性心肥大など拡張不全を引き起こす病態を改善することが期待されている。

口頭発表に際し、副査川口秀明教授からアンジオテンシン II と心筋線維化および細胞死の関係についての質問があり。次いで副査筒井裕之教授からスタチンの投与量および臨床効果についての質問があり。最後に主査からアンジオテンシン II のコレステロールを上昇する機序および血中と細胞中のコレステロールレベルに対してスタチンの影響について質問及び今後の研究への課題を指示した。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果や文献的知識を引用し、適切な回答を行った。

この論文は、スタチンの多面的な作用は臨床的に非常に意義があることで高く評価され、今後の細胞内のコレステロールレベルの制御機序を解明することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。