

平成 31 年 5 月 7 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08560

研究課題名(和文) 心筋アセチルコリン産生システム機能亢進による中枢介入機構・効果の検討

研究課題名(英文) The effects of the augmented non-neuronal cardiac cholinergic system on the central nervous system

研究代表者

柿沼 由彦 (Kakinuma, Yoshihiko)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授

研究者番号：40233944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：心臓心筋細胞自らがアセチルコリン(ACh)を産生するシステム(NNCCS)を亢進させると、心臓自身の虚血耐性を高めるだけでなく、迷走神経求心路を介して、亢進したシステムによる心臓内で過剰に産生される一酸化窒素NOにより、あたかも迷走神経を上行性に刺激したような表現型が、NNCCS機能亢進マウス(ACh合成酵素遺伝子choline acetyltransferase)において認められた。具体的には、抗不安・抗うつ・抗ストレス作用であり、さらに痙攣抵抗性効果である。以上よりNNCCSの機能亢進は心-脳連関により、中枢へ積極的な効果を及ぼすことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋細胞でアセチルコリン(ACh)を産生するSystem(NNCCS)が、心臓のみならず中枢神経系にも大きな効果(抗不安、抗うつ、抗ストレス、抗痙攣誘発性)を引き起こすことが、明らかとなった。このことは、このシステムを亢進させると、現代病でもある、ストレスをより感じにくくし余計な負荷を中枢神経系にかけなくて済むことを示唆している。したがって、心臓のこのシステムを鍛えることが、健康増進させる手段となることを物語っている。

研究成果の概要(英文)：Augmentation of the non-neuronal cardiac cholinergic system (NNCCS) plays a role in modifying the central nervous system (CNS) through the ascending vagus nerve, which is triggered to be activated by increased NO production in the heart. The CNS effects of NNCCS includes anti-anxiety like, anti-depression like, and anti-stress like effects as well as anti-convulsive effect. These effects induced by activated NNCCS means that the heart-brain axis, not the brain-to-axis, exists when the NNCCS is activated. Therefore, NNCCS can be a crucial player to modify the CNS function. The ChAT gene overexpressing mice (ChAT tg) are considered to be mice, which seem to be subjected to vagus nerve stimulation.

研究分野：循環生理

キーワード：アセチルコリン 心臓 心筋細胞 エネルギー代謝 中枢神経系

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、2009年に世界に先駆けて、心臓において一つの心筋細胞自らがアセチルコリン (ACh) を産生し分泌するシステムを持つことを報告し、それを非神経性心臓コリン作働系または非神経性心臓 ACh 産生システム (non-neuronal cardiac cholinergic system: NNCCS) と呼んだ。このシステムは、その時まで徐々に明らかとなってきた免疫担当細胞における非神経性 ACh 産生システム (non-neuronal ACh: NNA) の心筋細胞版という概念として考えるとよりわかりやすいと言える。免疫担当細胞における NNA は特に T 細胞における  $\alpha 7$  nicotinic receptor を介した免疫応答調節機構が注目を浴びてきたが、一方で、心臓における NNA (または NNCCS) については、研究代表者が、心室心筋細胞特異的 ACh 合成酵素 (Choline acetyltransferase ChAT) 遺伝子トランスジェニックマウス (ChAT tg) を用いて、国内で中心的に研究を行い、虚血耐性機構の亢進、細胞酸素消費量の調節、細胞エネルギー基質指向性の調節、血管新生促進作用、NNA 自身が NNA を活性化させる positive feedback 機構による調節、等の特色ある生理学的機能を持っていることがこれまで明らかにされ、報告してきた。

一方、この ChAT tg には心臓限局の表現型のみではなく、中枢神経系 (CNS) の表現型の可能性も示唆されてきた。したがって、直接的な心臓への NNCCS の効果のみならず、CNS への効果も加味されて総合的に ChAT tg の個体レベルの表現型が制御されると考えられた。

## 2. 研究の目的

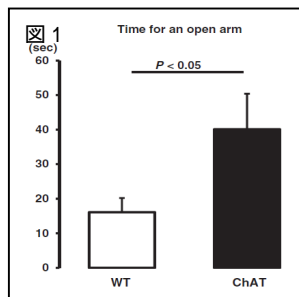
ChAT tg の CNS における表現系を詳細に解析し、どのようなカテゴリーに属する表現型であるか、またその表現型の責任因子は何かを明らかにすることが、本研究の目的である。これが明らかになれば、NNCCS に対する介入法の可能性を探ることが可能となり、またそれによってさらに CNS 機能への介入という新たな課題が見出すことが可能と考えられる。

## 3. 研究の方法

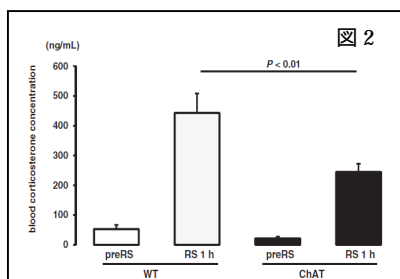
ChAT tg と野生型マウス (WT) を用いて、以下の行動解析を行った。

1) 抗うつ反応 (強制水泳試験・尾懸垂試験) 時の無動時間の比較、2) 明暗反応試験における明所での滞在時間の比較、3) 高架式十字迷路におけるオープン領域での滞在時間の比較、4) 拘束ストレス (1 時間) の前後での血中コルチコステロンレベルの比較、5) pilocarpine (100 mg/kg/dose を 20 分おきに 3 回腹腔内投与)、1,5-pentamethylenetetrazole (40mg/kg/dose を 20 分おきに 3 回腹腔内投与) を投与し、その間の痙攣持続時間・痙攣重積による死亡率等を比較、6) 左側迷走神経頸部での切断による上記表現型への影響を評価、7) 延髄迷走神経中枢である NTS 付近の c-fos 陽性細胞の比較、8) 心臓 NO 産生能の比較、9) 中枢ノルエピネフリン含量の比較、10) L-NAME による CNS 表現型への影響の比較

## 4. 研究成果



**【結果 1】** ChAT tg は WT と比較し夜間の探索行動量が有意に少なかった (特に 20 ~ 24 時にかけて)。また WT と比較し ChAT tg では高架式十字迷路でよりオープン領域での滞在時間が有意に長かった (図 1)。また、強制水泳試験・尾懸垂試験における無動時間は ChAT tg では WT よりも有意に短かった。また明暗試験では ChAT tg にはより明るい場所に滞在する傾向が強かった。以上より、ChAT tg はより鬱状態に対しては抵抗性であることが示唆された。



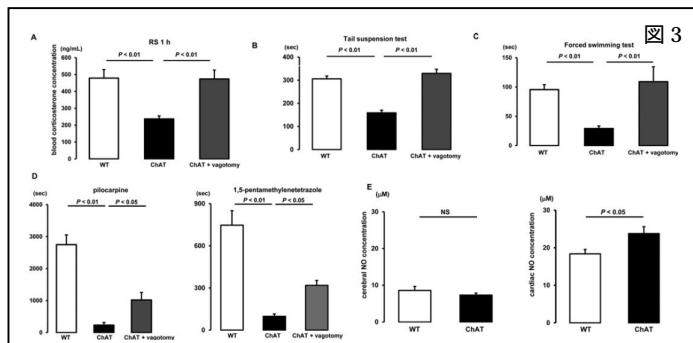
**【結果 2】** 1 時間の拘束ストレスでは ChAT tg の血中コルチコステロンピーク値 ( $216.7 \pm 21.6$  ng/mL) は WT ( $434.2 \pm 49.9$  ng/mL) のほぼ半分であり有意に抑制されており、よりストレス抵抗性であることが示唆された (図 2)。

**【結果 3】** ChAT tg は WT と比較してより痙攣抵抗性を示した。痙攣持続時間・痙攣重積時の死亡率ともに ChAT tg では、どちらの痙攣誘発剤においても有意に低値を示した (例えば pilocarpine での持続時間: WT  $3237.8 \pm 141.4$  秒 vs ChAT tg:  $329.0 \pm 64.8$  秒  $P < 0.01$ 、死亡率: WT 92.9% vs ChAT tg 18.2%  $P < 0.05$ )。

**【結果 4】** ChAT tg の延髄孤束核 (NTS) 付近の c-fos 陽性細胞数は、WT よりも有意に増加していた。また、視床下部ノルエピネフリン (NE) 組織含有量は ChAT tg で WT よりも有意に増加していた。大脳半球  $\Delta$ FosB 蛋白発現量は ChAT tg でより増加していた。このことは、ChAT tg では心臓からの神経学的情報がより多く副交感神経中枢に入力していることを示唆した。また、

迷走神経刺激時に認められる組織中 NE 含量の増加、および  $\Delta$ FosB 蛋白発現レベルの上昇からも、ChAT tg はあたかも内在的に迷走神経刺激を受けているのと同様の表現型を示すことが示唆された。

[結果 5] 左側迷走神経切断により、ChAT tg の CNS 表現型はほぼ WT と同レベルにまで戻った。



(拘束ストレス時の血中コルチコステロン 1 時間値・強制水泳/尾懸垂試験での無動時間・痙攣誘発剤の痙攣持続時間すべてにおいて、図 3)

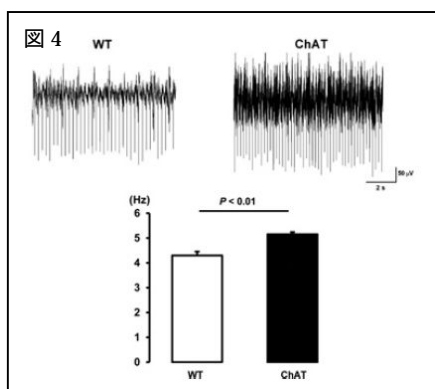
また、ChAT tg では WT と比べて神経活動発火頻度が有意に増加していた (図 4)。

[結果 6] NO 合成酵素阻害薬 L-NAME (10 mg/kg/dose) の直前 30 分投与によっても、迷走神経

切断と同様に、ChAT tg で認められていた抗うつ反応の抑制 (無動時間の増加) 抗痙攣性の抑制、拘束ストレス抵抗性の抑制、夜間活動量低下の抑制等、ChAT tg の特徴的 CNS 表現型が L-NAME によって抑制された。

一方、WT マウスの迷走神経刺激 (左頸部迷走神経の 3V/3Hz/10ms 持続時間/10 分間の電気刺激) は、ChAT tg とほぼ同様の CNS 表現型を示した。

以上より、ChAT tg はあたかも迷走神経刺激と同様の CNS 表現型を持ち、その起源は心臓 ChAT 強制発現による ACh 過剰産生とその結果としてのより高い NO 産生レベルであると考えられた。



## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Oikawa S, Kai Y, Mano A, Nakamura S, Kakinuma Y. A novel nitric oxide donor, S-Nitroso-NPivaloyl-D-Penicillamine, activates a non-neuronal cardiac cholinergic system to synthesize acetylcholine and augments cardiac function. *Cell Physiol Biochem* (査読有) 2019;52(4):922-934.

Saw EL, Kakinuma Y, Fronius M, Katare R. The non-neuronal cholinergic system in the heart: A comprehensive review. *J Mol Cell Cardiol* (査読有) 2018;125:129-139.

Nemoto T, Kakinuma Y Involvement of Noncoding RNAs in Stress-Related Neuropsychiatric Diseases Caused by DOHaD Theory : ncRNAs and DOHaD-Induced Neuropsychiatric Diseases. *Adv Exp Med Biol* (査読有) 2018;1012:49-59.

Takenaka Y, Inoue I, Nakano T, Ikeda M, Kakinuma Y, Ikegami Y, Shimada A, Noda M. Evaluation of Teneligliptin Effects on Transcriptional Activity of PPAR $\gamma$  in Cell-Based Assays. *J Nippon Med Sch* (査読有) 2018;85:95-101.

Kurabayashi A, Tanaka C, Matsumoto W, Naganuma S, Furihata M, Inoue K, Kakinuma Y. Murine remote preconditioning increases glucose uptake and suppresses

gluconeogenesis in hepatocytes via a brain-liver neurocircuit, leading to counteracting glucose intolerance. Diabetes Res Clin Pract (査読有) 2018;139:288-299.

〔学会発表〕(計3件)

Kurabayashi A, Kakinuma Y. Remote ischemic preconditioning affects gluconeogenesis via the brain-liver route to improve glucose intolerance

9<sup>th</sup> Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS2019), Kobe Convention Center, Kobe, Japan, March 28-31, 2019

Kakinuma Y. 心臓非神経性 ACh 産生システムの臓器間クロストークとその生理機能学的意味 **学会企画シンポジウム 第28回日本病態生理学会大会 横浜市立大学へボンホール 横浜 8/4, 2018**

Kakinuma Y, Oikawa S, Kai Y, Mano A, Ohata H, Nemoto K. Modified regulation in the non-neuronal acetylcholine in the heart (NNCCS) by circadian rhythmicity and sexual dimorphism **第95回日本生理学会大会 サンポートホール高松、高松シンポルタワー 香川 3/28-30, 2018**

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：心臓アセチルコリン産生能誘導薬

発明者：柿沼 由彦・中村 成夫

権利者：日本医科大学

種類：特許願

番号：J21362A1

出願年：平成30年

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

特記すべきことなし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 分担者はなし

(2)研究協力者(連携研究者として)

研究協力者氏名：村本 和世

ローマ字氏名：Muramoto Kazuyo

研究協力者氏名：根本 崇宏

ローマ字氏名：Nemoto Takahiro

研究協力者氏名：洲鎌 秀永

ローマ字氏名：Sugama Shuei

研究協力者氏名：眞野 あすか  
ローマ字氏名：Mano Asuka

研究協力者氏名：大畠 久幸  
ローマ字氏名：Ohata Hisayuki

研究協力者氏名：津田 雅之  
ローマ字氏名：Tsuda Masayuki