

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09544

研究課題名（和文）臨床実用化を目指した薬理的迷走神経刺激による新規心血管再生治療法の確立

研究課題名（英文）Development of a new cardiovascular regenerative treatment method by pharmacological vagus nerve stimulation aiming for practical clinical use

研究代表者

李 梅花 (Li, Meihua)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：60443496

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：虚血再灌流後の心臓において、急性期心筋細胞の生存数は、慢性期の心筋梗塞面積・心臓リモデリング・心機能不全の進行に關する重要な要素である。

本研究で、私たちは臨床実用化を目指して、虚血30分後再灌流心筋梗塞ラットにおいて、ドネペジル早期投与による薬理的迷走神経刺激が、急性期の抗アポトシス・抗炎症作用・免疫調節作用によって、心筋細胞の生存を有意に上昇することを明らかにした。その結果、遠隔期の心筋梗塞の縮小と心臓の繊維化及び肥大を抑制し、心血管新生を有意に促進した。そして、心不全の重要な指標である血中カテコラミンやBNP等低下させ、心臓リモデリングや心機能不全の進行を有意に抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで臨床でPCIの進歩・普及によって急性心筋梗塞の死亡率は劇的に低下するが、壊死心筋組織や再灌流による炎症反応によって、多くの心筋細胞を失って、遠隔期の心臓リモデリングや心不全まで進行し、最終的に慢性心不全の患者数が莫大に増加し、長い年月で入院繰り返すことによって、社会的に大きな医療負担を増加する。本研究の研究成果は、ドネペジルの早期投与を臨床でPCI後の新しい薬物補助治療として、急性期の抗アポトシス・抗炎症作用によって心筋細胞の生存率を増加し、心血管新生を促進することによって、遠隔期の心筋梗塞を縮小し、心臓リモデリング・心不全の進行を突き止め、社会的医療負担の低下に貢献できる考える。

研究成果の概要（英文）：Myocardial salvage, which due to microvascular dysfunction and fatal reperfusion injury after ischemia-reperfusion, is an important factor in reducing reperfused myocardial infarct size and preventing cardiac remodeling in the chronic stage. In this study, pharmacological vagal stimulation by early administration of donepezil significantly improves myocardial salvage in 30-min reperfused myocardial infarction rats after ischemia by anti-apoptotic, anti-inflammatory, and immunomodulatory effects in acute phase was shown. As a result, early administration of donepezil significantly reduced the myocardial infarct size, suppressed cardiac fibrosis and hypertrophy, promoted angiogenesis and/or cardiovascularization, and significantly decreased plasma levels of catecholamines and BNP. Significantly suppressed the progression of cardiac remodeling and dysfunction, and prevented progressed chronically to heart failure.

研究分野：心筋梗塞・心不全、循環動態制御、自律神経制御、再生医療

キーワード：急性心筋梗塞 慢性心不全 薬理的迷走神経刺激 心臓リモデリング 心血管新生・分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、治療法の進歩によって急性冠疾患の生存率が劇的に改善するとともに心不全患者数は急激に増加しており、慢性心不全患者の治療はその重要性を増している。特に、重症心不全患者の予後は、内科的薬物療法の進歩、補助循環装置を含めた外科的治療法の発達にもかかわらず不良であり、2年間の生存率は約 **50%**とされている。心臓移植は根治的治療であるが、心不全の患者数の多さや少子高齢化に伴う患者数の増加を考えると、心臓ドナー数の不足は明白であり、心移植に代わる画期的な新しい治療法の確立は急務である。

近年の研究により、長い間終末分化型の臓器と見られた心臓にごくわずかながら自己増殖能をもった心筋幹/前駆細胞が存在し、心筋梗塞や心不全の病態において心筋細胞の自己複製を行っていることが確認され、心筋幹/前駆細胞による再生療法が注目されている。近年、再生医療は機能不全に至った臓器に対する新しい根治療法としてあらゆる臓器で研究されている。心臓においても、胚性幹細胞、骨髄間葉系幹細胞・造血幹細胞・骨格筋芽細胞・心筋幹細胞などの組織幹細胞による再生医療が意欲的に研究されており、一部の組織幹細胞による細胞移植治療では臨床応用も進みつつある。しかしながら、機序に不明な点が多いこと、必ずしも治療効果が一定でないこと、胚性幹細胞に関する倫理面での問題、副作用としての不整脈発生の可能性など解決すべき問題は多い。再生医療の最先端治療法として、**iPS** 細胞から得られた心筋細胞シートによる治療も報告されているが、その効果と長期安全性については引き続き慎重に検討すべきである。安全性および倫理的観点からは、再生医療の手段として内在性幹細胞を賦活化して失われた機能を再生させることは理想的である。しかしながら、この内在性心筋幹細胞の絶対数、生存率、増殖能力、分化効率は低く、これらの内在性心筋幹細胞をいかに増殖・分化させるかが大きな課題となっている。現在、心筋局所・冠動脈に様々な増殖因子を注入する方法や甲状腺ホルモンの増加等で内在性心筋幹細胞の増殖能力と分化効率を増加させる試みや、自家 **CD34+**細胞の移植が行われているがこれらによる心筋再生能力は依然として低く、心機能改善までの心臓修復には届いていないのが現状である。

一方、研究代表者らは、異常な循環調節系に人工的に介入することで心不全の進行や重症化を阻止する治療方法を開発してきた。これまでに、急性心筋梗塞ラットでの迷走神経刺激による著明な抗不整脈効果や、慢性心不全ラットモデルにおいて迷走神経刺激によって心臓リモデリングの進展が抑制され、治療開始 **20** 週後の生存率が **50%**から **86%**までに改善することを報告した (**Circulation. 2004;109:120-24**)。さらに、迷走神経刺激によって急性心筋梗塞ラットにおける間葉系幹細胞移植治療効果が向上することも報告した。一連の基礎研究結果に基づいて、近年、**NECTAR-HF**, **ANTHEM-HF** および **INOVATE-HF** の迷走神経刺激による慢性心不全治療の大規模臨床試験も行われた。しかしながら、治療効果は一定でなく、予後改善効果は確認できていない。その原因として、迷走神経刺激治療の機序に不明な点が多いこと、対象患者が不適切であった可能性、神経刺激方法が最適化されていないことなどが挙げられる。また、デバイスを用いた神経刺激治療では、植込み手術の必要性やデバイスの価格などの面で、実臨床での広範な適応が制限されることが懸念される。

近年、研究代表者らは心筋梗塞後重症心不全ラットにアセチルコリンエステラーゼ阻害薬(ドネペジル)を経口投与し、慢性心不全に対する薬理的副交感神経賦活化治療(薬理的迷走神経刺激治療)の効果を検討した。その結果、ドネペジル投与によって心臓リモデリングが抑制され、長期生存率が著明に改善することが明らかとなった (**Circ J. 2013;77:2519-25**)。さらに、ドネペジルとロサルタンの併用投与によって、心不全に対する標準的治療法である 遮断薬 + **ACE** 阻害薬/**ARB** の治療効果を大きく上回る予後改善効果が得られることも報告している (**Eur J**

Heart Fail. 2014;16:1056-65)。これらの治療効果の機序として、副交感神経賦活化による心負荷軽減以外に、副交感神経賦活化による心血管新生作用や抗アポトーシス効果、ギャップ結合のリモデリング抑制作用の関与が推測されているが、詳細は不明である。一方、最近の研究によって、副交感神経系は、様々な病態において免疫・炎症反応の調節重要な役割を果たすこと(コリン性炎症経路)や、肝臓や肺、脳神経などではムスカリン受容体を介して **PI3K-Akt** 経路を活性化させ幹/前駆細胞の増殖に関与していることが報告されている。また、**PI3K-Akt** 経路の活性化が心臓においても心筋幹/前駆細胞の増殖や分化に重要な役割を果たすことが明らかとなって来ている。最近、研究代表者らは、急性心筋梗塞ラットモデルにおいて迷走神経刺激による内在性心筋幹/前駆細胞の増殖・分化促進作用を報告した。これらの背景から、心筋梗塞急性期からの薬理的迷走神経刺激によって内在性心筋再生賦活化を介して心筋梗塞の予後を改善することができるのではないかと着想した。

2 . 研究の目的

本研究では、心筋梗塞・慢性心不全の新しい治療戦略として、自律神経系への介入による生体内在性再生能力の賦活化を利用した新規心血管再生治療法を確立する。病態モデルにおいて、薬理的迷走神経刺激による内在性心筋幹 / 前駆体細胞の増殖・分化誘導に対する影響を検討する。また、薬理的迷走神経刺激による抗炎症・抗アポトーシス効果・免疫調節効果、心臓リモデリングや心機能等におよぼす影響を詳細に検討することによって、薬理的迷走神経刺激による心血管再生と治療効果との関係を明確に評価する。

3 . 研究の方法

【急性心筋梗塞再灌流モデルの作成及び心電図・血圧テレメトリ装置の植え込み】

8 週齢のオス SD ラットを用いて、1.5%ハロセン麻酔下に、腹部皮下に心電図・血圧テレメトリ装置 (TCA-F40;HD-S10,DSI) を植え込む。1 週間後、ラットを再び 1.5%ハロセン麻酔下に、開胸し、プロリン 5.0 で左冠状動脈の基部を閉塞し急性心筋梗塞を作成する、30 分後に再灌流する。急性心筋梗塞作成時と再灌流時に高頻度に心室細動を起こすため、急性心筋梗塞作成及び再灌流後の 30 分までに心電図を観察し、心室細動は心臓マッサージによる機械的除細動を行う。除細動に成功したラットは閉胸し、麻酔から回復させ、無作為にドネベジル治療群 (**DT**)、メトプロロール治療群 (**MT**)、**DT** と **MT** 併用治療群 (DMT) と偽治療群 (UT) に振り分けて薬理的迷走神経刺激治療を 10 週間にわたって行う。これまでの研究結果から、平均心拍数を 10%低下させるように、**DT** ではドネベジル (5mg/kg/日)、**MT** ではメトプロロール (70mg / kg / 日)、DMT では (ドネベジル、5mg/kg/日 ; メトプロロール、70mg / kg / 日) を飲み水に溶かして投薬する。

【心筋梗塞再灌流急性期から介入した薬理的迷走神経刺激による治療効果の評価】

治療を行う 1 週間後、一部のラットを安楽死後に心臓を摘出し、病理切片作成後にマッソン・トリクローム染色、TUNEL 染色、免疫組織化学染色などによって、心臓虚血領域におけるアポトーシス、好中球やマクロファージの浸潤率の結果によって抗アポトーシス効果・抗炎症効果・免疫調節効果を評価し、早期薬理的迷走神経刺激介入によって心筋梗塞再灌流急性期の心筋細胞の生存に及ぼす効果を総合的に評価する。

【覚醒ラットの血行動態;心臓リモデリング・心機能および血中神経液性因子・炎症因子の評価】

治療を行う 10 週間の間、連続的に計測した心電図・心拍数・血圧を 4 群間で比較検討する。また、治療終了後、1.5%ハロセン麻酔下に、心臓カテーテル検査を行い、左心室圧、右房圧、心拍出量などの血行動態測定を行い、心機能を評価する。血行動態の測定終了の 10 分後、頸部動脈から採血を行い、血中脳性ナトリウムペプチド (BNP)、カテコラミン、CRP などの分析を行う。安楽死後に心臓を摘出し、心臓重量を測定し、心臓リモデリング評価にはラット両心室の重量を

体重で補正した値を用いる。また、最後にはランゲンドールフを用いて、心筋梗塞再灌流時留置したプロリン 5.0 で再度閉塞し、大動脈から **PIGMENT BLUE INK** を流して、虚血領域を定量的に評価する、その後病理切片など作成する。

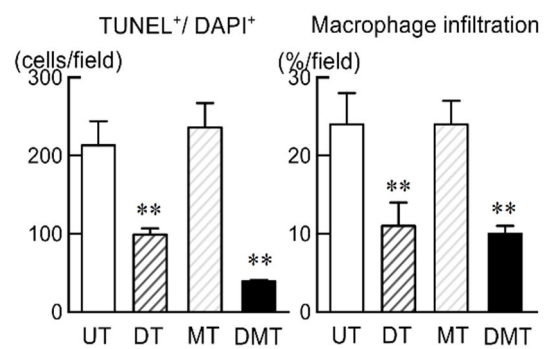
【薬理的迷走神経刺激による心筋梗塞巣・内在性心血管再生能力の評価】

マッソン・トリクローム染色により心筋梗塞巣の大きさ、心筋繊維化と心筋細胞の大きさの評価を定量的に定量的に行い、また免疫組織化学染色によって早期から介入した薬理的迷走神経刺激によって、内在性心血管再生能力などを評価する。

4. 研究成果

(1) 早期薬理的迷走神経刺激による心筋梗塞再灌流急性期の治療効果

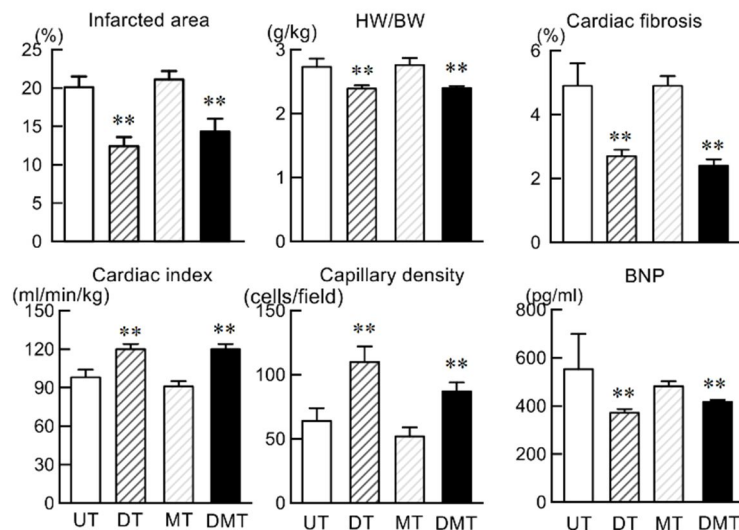
早期ドネペジル投与による薬理的迷走神経刺激はメトプロロール有る (DMT)・無し (DT) に関わらず、心筋梗塞再灌流モデルにおいて、非治療群 (UT) に比べて、心筋虚血領域のアポトーシスを有意に抑制し、心筋虚血領域における好中球やマクロファージの浸潤を有意に抑制することによって、心筋梗塞再灌流急性期の心筋細胞の生存を有意に増加した (下図)。これらの結果から、早期ドネペジル投与による薬理的迷走神経刺激は、心筋梗塞再灌流の急性期に抗アポトーシス・抗炎症作用・免疫調節作用などの著明な治療効果を明らかにした、ともに既存の臨床治療薬であるメトプロロールも併用投与も可能である。しかしながら、本研究で **MT** の治療効果は見られなかった。



(2) 早期薬理的迷走神経刺激による心筋梗塞再灌流遠隔期の治療効果

早期ドネペジル投与による薬理的迷走神経刺激は、心筋梗塞再灌流の急性期に抗アポトーシス・抗炎症作用・免疫調節作用などの著明な治療効果を明らかにした、ともに既存の臨床治療薬であるメトプロロールも併用投与も可能である。これらの急性期の治療効果は、心筋梗塞再灌流後の遠隔期の心筋梗塞巣の縮小及び著明な心臓リモデリングの抑制と心機能の改善治療効果を示した (下図)。UT 群に比べて、DT と DMT は心筋梗塞を有意に低下し、心筋細胞の繊維化や心臓肥大を有意に抑制し、心臓内の血管新生を有意に促進し、また血中の神経液性因子 (BNP) など有意に低下した。しかしながら、MT の治療効果は見られなかった。これらの結果から、早期ドネペジル投与による薬

理的迷走神経刺激は、またドネペジルは既存の治療薬であるメトプロロール有る・無しにも関わらず、その治療効果が著明であり、メトプロロールとの併用投与の可能性も明らかになった。ですので、ドネペジルの早期投与は、今後臨床の PCI 後の新しい薬物補助治療法になる可能性を示唆した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, Sugimachi M	4. 巻 70
2. 論文標題 Intracerebroventricular infusion of donepezil prevents cardiac remodeling and improves the prognosis of chronic heart failure rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Physiol Sci.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-020-00739-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Li Meihua, Zheng Can, Kawada Toru, Inagaki Masashi, Uemura Kazunori, Sugimachi Masaru	4. 巻 69
2. 論文標題 Chronic vagal nerve stimulation exerts additional beneficial effects on the beta-blocker-treated failing heart	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol Sci.	6. 最初と最後の頁 295 ~ 303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12576-018-0646-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uemura Kazunori, Kawada Toru, Zheng Can, Li Meihua, Sugimachi Masaru	4. 巻 Jul
2. 論文標題 Low-Dose Landiolol Reduces Heart Rate and Cardiac Oxygen Consumption Without Compromising Initial Hemodynamic Resuscitation in a Canine Model of Endotoxin Shock	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Shock.	6. 最初と最後の頁 25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SHK.0000000000001224. [Epub ahead of print]	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zheng Can, Li Meihua, Kawada Toru, Inagaki Masashi, Uemura Kazunori, Sugimachi Masaru	4. 巻 5
2. 論文標題 Frequent drinking of small volumes improves cardiac function and survival in rats with chronic heart failure	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e13497 ~ e13497
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.13497	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Uemura Kazunori, Kawada Toru, Zheng Can, Li Meihua, Sugimachi Masaru	4. 巻 17
2. 論文標題 Computer-controlled closed-loop drug infusion system for automated hemodynamic resuscitation in endotoxin-induced shock	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12871-017-0437-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Uemura Kazunori, Inagaki Masashi, Zheng Can, Kawada Toru, Li Meihua, Fukumitsu Masafumi, Sugimachi Masaru	4. 巻 32
2. 論文標題 Acute ivabradine treatment reduces heart rate without increasing atrial fibrillation inducibility irrespective of underlying vagal activity in dogs	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 484 ~ 494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-016-0922-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Li Meihua
2. 発表標題 Oral Administration of Donepezil Markedly Prevents the Progression of Chronic Heart Failure in Renal Artery Stenosis-Induced Hypertensive Rats
3. 学会等名 ESC2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Li Meihua
2. 発表標題 Development of a Chronic Heart Failure Model by Renal Artery Stenosis-Induced Hypertension in Rats
3. 学会等名 JCS2020 (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Li Meihua
2. 発表標題 Donepezil Markedly Attenuates the Progression of Cardiac/Renal Remodeling in Rats with Renal Artery Stenosis-Induced Hypertension
3. 学会等名 JCS2020 (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Li Meihua
2. 発表標題 Donepezil Treatment Prevents the Progression of Chronic Heart Failure and Improves the Prognosis in Spontaneously Hypertensive Rats with Myocardial Infarction
3. 学会等名 第97回日本生理学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 李 梅花
2. 発表標題 迷走神経刺激は心筋梗塞ラットにおける間葉系幹細胞移植の治療効果を増強する
3. 学会等名 日本第58回生体医工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Li Meihua
2. 発表標題 Feasibility and Efficacy of Early Donepezil With or Without Metoprolol in Reperfused Myocardial Infarction Rats
3. 学会等名 ESC2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Li Meihua
2. 発表標題 Oral Donepezil Markedly Suppresses the Progression of Cardiovascular Remodeling and Improves the Prognosis in Spontaneously Hypertensive Rats with Myocardial Infarction
3. 学会等名 ESC2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Li Meihua
2. 発表標題 Donepezil Treatment Prevents the Progression of Cardiac Remodeling and Dysfunction in Obesity-induced Hypertensive Rats with Reperfused Myocardial Infarction
3. 学会等名 ESC2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Li Meihua
2. 発表標題 Early Donepezil Treatment, With or Without Metoprolol Significantly Improves Myocardial Salvage and Prevents Cardiac Remodeling in Reperfused Myocardial Infarction Rats
3. 学会等名 JCS2019 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Li Meihua
2. 発表標題 Donepezil Markedly Suppresses Progression of Cardiac Remodeling and Dysfunction in Obesity-induced Hypertensive Rats with Reperfused Myocardial Infarction
3. 学会等名 JCS2019 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Li Meihua
2. 発表標題 Donepezil treatment is superior to metoprolol for improving myocardial salvage and preventing cardiac remodeling in reperfused myocardial infarction rats
3. 学会等名 ESC 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Li Meihu
2. 発表標題 Donepezil treatment prevents the progression of chronic heart failure in spontaneously hypertensive rats with extensive myocardial infarction
3. 学会等名 ESC 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Li Meihua
2. 発表標題 Donepezil but not Metoprolol Improves Myocardial Salvage and Prevents Cardiac Remodeling after Reperfused Myocardial Infarction in Rats
3. 学会等名 JCS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2017年 ~ 2018年

1. 発表者名 Li Meihua
2. 発表標題 Donepezil Markedly Prevents the Progression of Cardiac Remodeling and Improves Survival
3. 学会等名 JCS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2017年 ~ 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	鄭 燦 (Zheng Can) (50443495)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任 研究員 (84404)	
研究 分担者	稲垣 正司 (Inagaki Masashi) (80359273)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常 勤研究員 (84404)	
連携 研究者	川田 徹 (Kawada Toru) (30243752)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	
連携 研究者	上村 和紀 (Uemura Kazunori) (10344350)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	