

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15854

研究課題名(和文) 交感神経リモデリング現象への介入による心不全治療戦略の構築 - 脳心連関の視点から -

研究課題名(英文) Construction of Heart Failure Treatment Strategy by Sympathetic Neural Remodeling -From the Viewpoint of Brain-Heart Connection-

研究代表者

野寺 穰 (Nodera, Minoru)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教

研究者番号：40769593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではラットで心筋梗塞モデルを作成し、その1-2週間後に脊髄中間外側核(IML: intermediolateral nucleus)が局在する胸髄と星状神経節(SG)を摘出し、SG及びIMLの神経リモデリング評価及び、IMLにおけるbrain-derived neurotrophic factor (BDNF)、tropomyosin-related kinase receptor B (TrkB)のタンパク発現の検討を行なった。結果としては心筋梗塞後においてはSGだけではなくIMLも神経リモデリングをきたし、それにはBDNF/TrkB経路の活性化が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋梗塞後の交感神経活性亢進にはSGのneural remodelingが関与していると考えられている。この現象が交感神経系においてSGのみならず他の部位でも認められるのかは明らかにはされていない。本研究では心筋梗塞後においてはIMLも neural remodelingをきたし、それにはBDNF/TrkB経路の活性化が関与していることが示唆された。心筋梗塞後、交感神経系全体において神経リモデリング現象が生じ、それが更なる交感神経緊張を引き起こしている可能性がある。本研究は心筋梗塞を始めとする慢性心不全患者における交感神経過剰活性の抑制という新たな治療法を確立する基盤になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Myocardial infarction (MI) was induced in a rat model by ligation of the left anterior descending artery. Neural remodeling in the intermediolateral nucleus (IML) and stellate ganglia (SG) was assessed by immunohistochemistry 2 weeks after MI. The mRNA and protein expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), tropomyosin-related kinase receptor (TrkB) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) were measured by quantitative RT-PCR, immunohistochemistry and Western blotting 1 week after MI. The neuronal size and axonal density of IML were increased after MI compared to sham. The fluorescence intensity of BDNF and TrkB in IML were significantly higher in the MI group than in the sham group. In addition, mRNA expressions of BDNF and TrkB in the spinal cord at the Th2 level was increased after MI. Finally, the percentage of phospho-ERK-immunoreactive cells in IML was significantly higher in the MI group than in the sham group.

研究分野：循環器

キーワード：Neural remodeling 心筋梗塞 脊髄中間外側核 BDNF TrkB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全患者の予後は、各種治療法が進歩した現在においても未だ不良であり、新しい治療戦略の構築が求められている。心筋梗塞や心筋症患者致死性不整脈の発生要因として交感神経活性の亢進があげられる。心臓への遠心性交感神経支配は主に星状神経節を介しているため、薬物療法やカテーテルアブレーションが無効な心室性不整脈に対して、星状神経節摘除術の有効性が言われてきたが、手技の複雑さや合併症リスクにより広く普及していない。

一方、心筋梗塞後の交感神経活性亢進には交感神経細胞体の neural remodeling という現象が関係している(Olujimi A et al. J Am Coll Cardiol. 2012)。neural remodeling は、神経栄養因子である Nerve growth factor (NGF) や Brain derived neurotrophic factor (BDNF) の作用により、神経細胞体の肥大や軸索の増生などの形態学的変化及び機能亢進を起こす現象である。例えば心筋梗塞では心筋組織での NGF の産生が増加し、心筋を支配している交感神経節後線維に NGF が取り込まれ、逆行性輸送により星状神経節に至り、neural remodeling を引き起こす。neural remodeling の結果、交感神経活性の亢進により心室自動能の亢進や不応期のばらつきが生じ、心室性不整脈が生じやすくなる。

交感神経系は RVLM が制御中枢であり、IML-星状神経節を介して心臓を支配しているが、心不全により増加したアンジオテンシン II が交感神経を更に活性化させる脳心連関という概念が確立している。そのため、慢性心不全病態においては、延髄、脊髄においても neural remodeling が生じ、更なる交感神経緊張を引き起こしている可能性も考えられるがまだ報告はない。我々は予備実験において、心筋梗塞ラットモデルを作成し、neural remodeling を検討したところ、心筋梗塞作成 2 週間後に Sham ラットと比較して星状神経節および IML の神経細胞体の有意な肥大を観察しており、脊髄レベルでも neural remodeling が生じることを確認している。neural remodeling の分子機序は不明な点が多いが、慢性心不全病態においては、アンジオテンシン II が中枢神経に作用し、延髄腹外側野を刺激することで交感神経活性が上昇するという脳心連関と呼ばれる病態が知られている。そのため、neural remodeling の詳細を明らかにすることは、脳心連関の細胞レベルの病態解明を意味しており、脳心連関への介入による慢性心不全治療という新たな治療戦略の構築につなげる事が可能となる。

2. 研究の目的

本研究は以下の3点を中心に遂行し、慢性心不全病態での neural remodeling の機序を明らかにし、治療介入の可能性を検討する。

- (1) 各種心不全モデルラット(急性心筋梗塞、圧負荷心不全)における星状神経節、IML、RVLM の neural remodeling の有無を確認し、蛍光タンパク質を発現する NeuRet ベクターを用いることで neural remodeling を来す神経細胞ネットワークの詳細を明らかとする。
- (2) 脳、脊髄、星状神経節、心筋において各種神経栄養因子およびそのレセプタータンパク質の定量、遺伝子発現を評価し neural remodeling の分子機序を解明する。
- (3) neural remodeling を引き起こす神経栄養因子のレセプターのアゴニスト、アンタゴニストを発現する NeuRet ベクターを接種することで、neural remodeling、心機能、不整脈発生頻度の変化をみる。

本研究を遂行するにあたり、研究協力者である福島県立医科大学 生体情報伝達研究所・生体機能研究部門 小林和人教授らが作成した神経細胞特異の高頻度逆行性遺伝子導入ベクター (NeuRet ベクター) を用いる。NeuRet ベクターはレンチウイルスから開発したベクターであり、神経終末から取り込まれ、軸索を逆行性に輸送され神経細胞体において目的とするタンパク質

を発現することができる(Kato S, Kobayashi K, et al. Human Gene Therapy 2011)。申請者は既に星状神経節へ NeuRet ベクターを接種し、蛍光タンパク質を IML の神経細胞体で発現させ、星状神経節へニューロンを伸ばしている細胞体を同定できている。本ベクターを用いることで、脳心連関に関与する交感神経ネットワークの可視化、心臓交感神経細胞選択的なタンパク発現や細胞死誘導が可能となるため、未だ明らかとなっていない neural remodeling に関するタンパク質の同定、発現制御を行える可能性がある。本研究は neural remodeling への介入による心機能、不整脈の変化を検討することも可能であり、慢性心不全病態における交感神経機能亢進機序の解明から心室性不整脈の抑制などの新規治療戦略の確立まで循環器診療に大きな貢献ができる有望な研究テーマであると考えられる。

3. 研究の方法

【平成 30 年度の研究計画】

・ラット心不全モデルにおける neural remodeling の確認

心不全モデルとしてラットを麻酔下に開胸し、左前下行枝を結紮した心筋梗塞モデルもしくは大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルを作成する。それぞれモデル作成 2 週、4 週後に、星状神経節、IML を含む胸髄、RVLM を含む脳幹部を摘出し、蛍光免疫染色を行う。コリン作動性である IML、RVLM の神経細胞体は細胞質がコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)陽性となるため、ChAT を発現している細胞面積を計測することで、Sham ラットを対照に neural remodeling の程度を評価する。星状神経節においては ChAT 染色を行い、IML の軸索増生の程度を評価する。また交感神経節後細胞のマーカであるチロシン水酸化酵素の染色を行い、こちらについても Sham ラットと細胞面積の比較を行い、星状神経節の細胞体腫大の程度を評価する。これらの remodeling の時系列での変化、心不全モデルの違いによる neural remodeling の違いを評価する。

・neural remodeling の分子機序の検討

neural remodeling に関与する神経栄養因子の評価を行うために、心筋、星状神経節、IML、RVLM における神経栄養因子及びそのレセプターの TRK 受容体を中心に western blot 法及び PCR 法で定量評価を行う。ただ脊髄に関しては IML、RVLM のみを採用することは困難であり、western blot および PCR 評価は脊髄もしくは脳幹全体とならざるを得ず、免疫蛍光染色を併用することで、部位特異的な評価を行う。以上の検査結果を総合的に評価し、IML の neural remodeling に関与する神経栄養因子を明らかにする。

【令和元年度の研究計画】

・NeuRet ベクターによる IML の neural remodeling への介入

平成 30 年度の実験結果から予想された neural remodeling を引き起こす神経栄養因子もしくは緑膿菌毒素(細胞死を誘導)を発現する NeuRet ベクターを作成する。ベクターを心筋、星状神経節に接種し、それぞれの部位を支配する神経細胞体に標的タンパク質を発現させ、心不全モデルを作成することで、neural remodeling への介入が可能かどうか検討を行う。緑膿菌毒素を誘導し神経細胞死を誘導することで、脳心連関のブロックが心機能に及ぼす影響を合わせて検討する。

・neural remodeling 抑制後の心室不整脈、心臓リモデリング評価

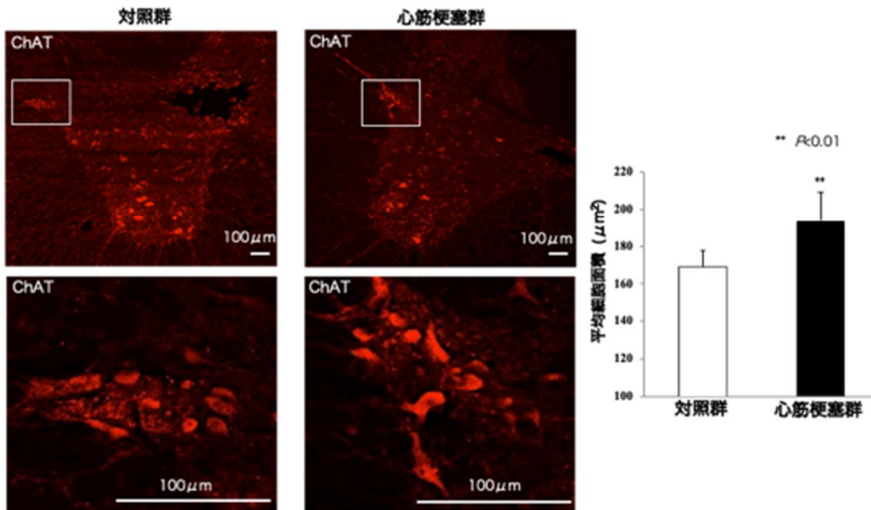
Neural remodeling の抑制もしくは亢進が確認できた場合、星状神経節の電気刺激による心室性不整脈の誘発、発生頻度の変化を評価する。また、心筋組織への交感神経活性が抑制されることで、心筋細胞肥大や心筋線維化に代表される心筋リモデリングが抑制されうるかを合わせて検

討を行う。

4. 研究成果

Sham ラットと比較して心筋梗塞 2 週間後ラットの星状神経節は、左右ともに神経細胞体の大きさの有意な増加が認められた。IML においても心筋梗塞群において、左右ともに神経細胞体の大きさ及び軸索密度の有意な増加が認められた。

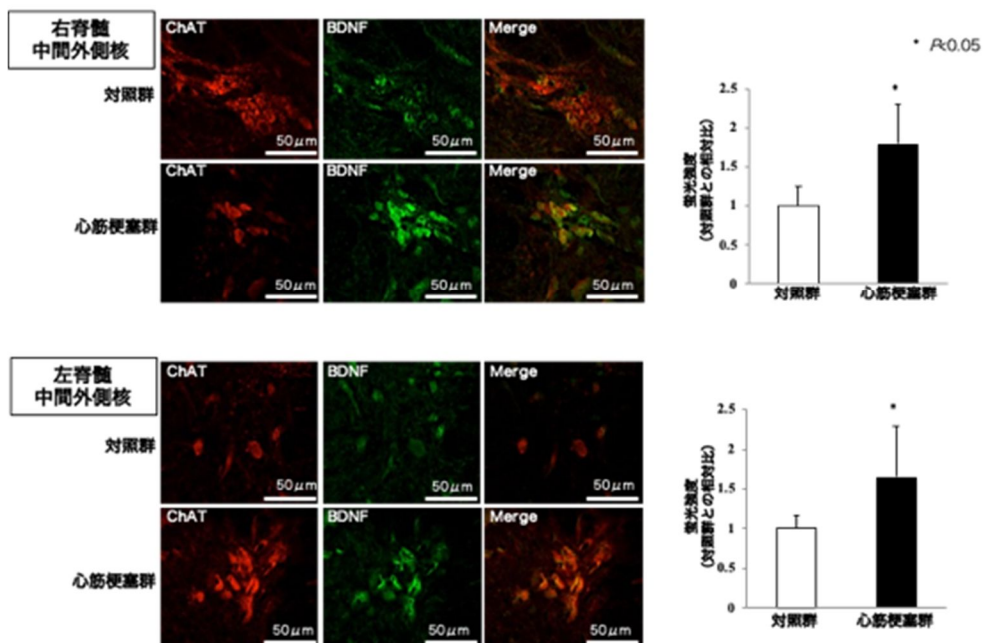
右脊髄中間外側核細胞面積 (心筋梗塞2週間後)



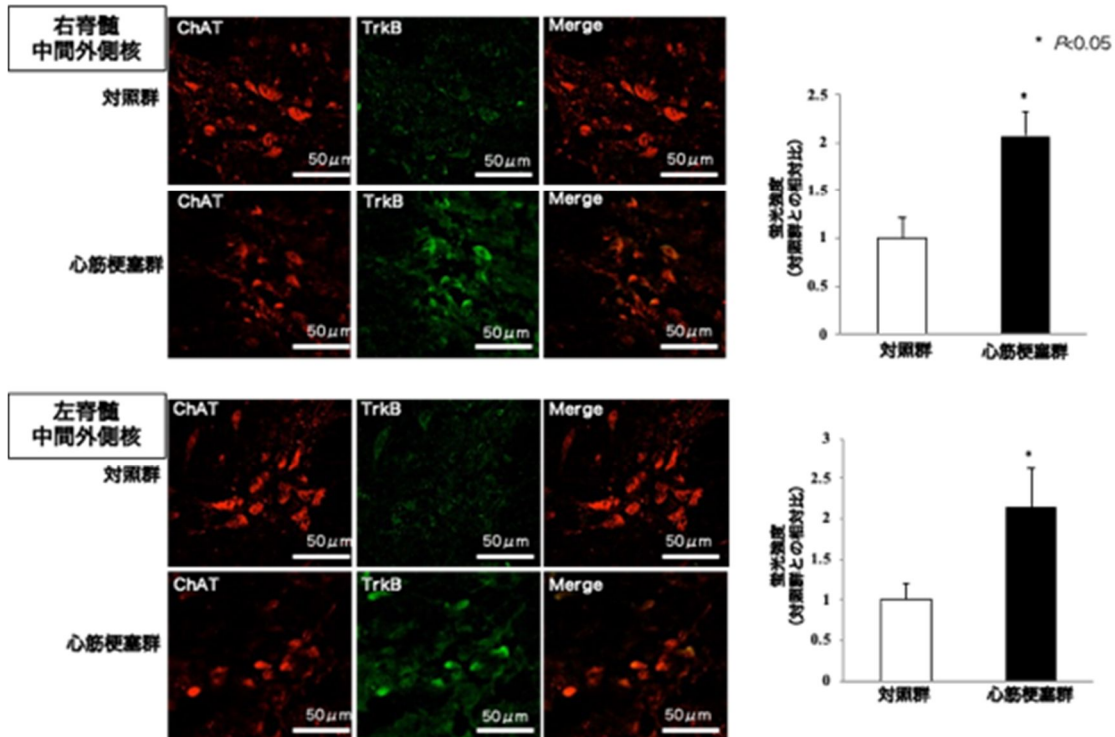
また、軸索新生のマーカーである growth associated protein-43 の陽性軸索の密度も心筋梗塞群において有意に高値であった。次に心筋梗塞 1 週間後の胸髄において BDNF と TrkB の mRNA 発現を分析したところ、両者ともに心筋梗塞群において有意な発現の増加が認められた。

また IML における BDNF と TrkB のタンパク質発現を評価するために蛍光免疫染色による蛍光強度分析を行なったところ、両者ともに心筋梗塞群において有意に高値であった。

脊髄中間外側核におけるBDNFの蛍光強度 (心筋梗塞1週間後)



脊髄中間外側核におけるTrkBの蛍光強度 (心筋梗塞1週間後)



後に IML における BDNF の TrkB を介したシグナル伝達の亢進を評価するために、ERK (Extracellular signal-regulated kinase) のリン酸化が起きている細胞の割合を蛍光免疫染色で評価したところ、その割合は心筋梗塞群において有意に高値であった。

(考察) 本研究は、心筋梗塞後の IML の Neural remodeling を神経細胞体の腫大と軸索増生の観点から示した初めての研究である。IML において BDNF 及び TrkB のタンパク質の発現増加及び ERK のリン酸化によるシグナル伝達の亢進が認められたことから、IML の neural remodeling は BDNF/TrkB 経路を介した現象と推察される。胸髄における BDNF の mRNA の発現増加については、その局在は明らかではないが、BDNF の mRNA は IML の位置する脊髄中間層にのみ存在するという報告があり、それを考慮すると、IML で増加していた BDNF の由来は IML の細胞体による自己分泌、あるいはグリア細胞からの傍分泌の可能性が考えられる。

(結論) 本研究により、心筋梗塞後の IML の neural remodeling が BDNF/TrkB 経路の活性化によって引き起こされていることが示された。心筋梗塞後、星状神経節だけではなく交感神経系全体において neural remodeling が生じ、それが更なる交感神経緊張を引き起こしている可能性がある。本研究は将来的に Neural remodeling の制御による交感神経活性の抑制という新たな治療法を確立する基盤になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Minoru Nodera, Masayoshi Oikawa, Kazuhiko Nakazato, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi	4. 巻 685
2. 論文標題 Sympathetic nervous remodeling is induced in the intermediolateral nucleus T after myocardial infarction; Role of BDNF-TrkB axis-	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 114-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 0.1016/j.neulet.2018.08.004	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Minoru Nodera, Masayoshi Oikawa, Kazuhiko Nakazato, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi
2. 発表標題 Sympathetic Nervous Remodeling in the Intermediolateral Nucleus Is Induced after
3. 学会等名 第82回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 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
---------------------------	-----------------------	----