

機関番号：84404

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590242

研究課題名 (和文) 心・肺機能の神経性調節：低酸素下で生き延びる機構を探る

研究課題名 (英文) Neural regulatory mechanisms of cardiopulmonary function in hypoxic conditions.

研究代表者

白井 幹康 (MIKIYASU SHIRAI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・心臓生理機能部・部長

研究者番号：70162758

研究成果の概要 (和文)：急性および慢性低酸素性肺高血圧、急性出血性低血圧、睡眠時無呼吸症候群、急性心筋梗塞のラットモデル並びに M₂ ムスカリン性アセチルコリン受容体欠損マウスを用いて、低酸素状態や運動時あるいは心臓虚血時に生き延びる機構として、交感神経系を介した肺血管トーンおよび心拍リズムの調節が極めて重要であることを明らかにした。また、自律神経調節作用を有するグレリンが急性心筋梗塞時の不整脈発生および低酸素性肺高血圧の進展に対して抑制効果を持ち、臨床応用の候補となり得ることを示した。

研究成果の概要 (英文)：Using rat models of acute and chronic hypoxic pulmonary hypertension, acute hemorrhagic hypotension, sleep apnea syndrome and acute myocardial infarction, and M₂ muscarinic cholinergic receptor KO mice, this study clarified that the sympathetic nervous system-mediated control of pulmonary vascular tone and heart rate and rhythm is essential to survive under the condition of hypoxia, exercise or cardiac ischemia. Furthermore, this study suggested that ghrelin, which regulates the autonomic nerve function, has cardiopulmonary protective effects in myocardial infarction and pulmonary hypertension.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学 (含体力医学・栄養生理学)

キーワード：低酸素、肺高血圧、出血性低血圧、睡眠時無呼吸症候群、心筋梗塞、グレリン

1. 研究開始当初の背景

低酸素環境で生き延びるための心・肺機能調節機構を解明し、さらに、その知見を治療法に結びつけるためには、以下の不明な点を研究することが重要と考えた。

(1) 急性肺胞性低酸素時、酸素運搬能を増やすため心拍出量は増加する。他方、肺循環では低酸素性肺血管収縮 (HPV) が起こる。

この状況で、肺高血圧・右心不全はどのように回避されるのであろうか？緊張した交感神経の役割はどうか？急性出血性低血圧時も、臓器虚血・低酸素状態を伴い、交感神経は緊張する。このときの交感神経の肺循環調節上の役割は低酸素時と同様であらうか？

(2) 慢性低酸素下では、血管リモデリング

と血管収縮によって肺高血圧症が進展する。肺血管リモデリングは主にどのレベル（太さ）の血管に起こり、血管数に影響を及ぼすのか？また、低酸素性収縮応答は神経性調節によってどのような影響を受けるのか？

(3) 睡眠時無呼吸症候群 (SAS) での肺高血圧進展については、いまだ議論の余地がある。この病態では肺高血圧進展を抑制する機構があるのか？

(4) 運動開始直後の心拍応答は、酸素運搬能力を増大し、生体を低酸素状態から守るために極めて重要な応答であるが、その神経性機構については議論の余地がある。

(5) 心臓梗塞モデルラットにグレリンを投与すると、梗塞2週間後に心臓線維化（リモデリング）の抑制と心機能改善が得られたと報告されている。では、心筋梗塞急性期にグレリンは固有の自律神経調節作用を介して心臓保護的に働くのか？また、グレリンはCOPD に対して呼吸機能改善効果を有するといわれているが、肺高血圧症時に肺保護作用を発揮するのか？

2. 研究の目的

(1) 麻酔下ラットにおいて、急性肺胞性低酸素時および急性出血性低血圧時の交感神経系の肺循環調節上の役割を、放射光微小血管造影法で肺微小循環を可視化して調べる。

(2) 慢性低酸素性肺高血圧ラットの肺微小循環を上述造影法で可視化し、血管リモデリングの部位および低酸素応答に対する中枢を介した肺循環の神経性調節機構を調べる。

(3) SAS モデルラットを慢性的間歇的低酸素 (IH) 負荷で作製し、上述可視化法で肺循環を観察する。また、急性低酸素負荷に対する肺血管応答を調べ、肺循環異常の有無を検証する。

(4) 運動開始直後の心拍応答での副交感神経の役割を明確にするため、心筋の主なムスカリン性アセチルコリン受容体である M_2 受容体が欠損したマウス (M_2KO マウス) で、運動時の心電図をテレメトリー計測する。

(5) 急性心筋梗塞および肺高血圧症モデルラットに対するグレリンの臓器保護効果を調べる。

3. 研究の方法

(1) 麻酔下ラットに Spring8 放射光微小血管造影法を応用し、急性低酸素負荷 (8% O_2 を5分間吸入) 時および急性出血性低血圧(全

血の20%を5分で脱血) 時の肺小血管応答を可視化する。いずれのストレス刺激時も、対照 (7匹)、両側星状神経節切除 (7匹) および両側副腎摘出ラット (7匹) 間で応答を比較する。また、対照では血漿中のカテコラミン濃度の変化を計測する。

(2) 低酸素の3週間負荷で作製した慢性低酸素性肺高血圧ラット (7匹) の肺小血管を上述の造影法で可視化し、各種薬剤および急性低酸素 (8% O_2) に対する応答を対照 (7匹) と比較する。

(3) IH (昼間8時間に渡り、ケージ内を3分毎に5% O_2 と room air で切り替える) を4週間負荷し、SAS モデルラット (3匹) を作製する。麻酔下で肺循環を可視化し、各種薬剤と急性低酸素 (8% O_2) に対する応答を対照 (4匹) と比較する。

(4) M_2KO マウス (5匹) と野生型マウス (5匹) に心電図用送信器 (DSI 社製) を埋め込み、自発運動開始時の心拍応答をテレメトリー計測する。

(5) ① 急性心筋梗塞に対するグレリンの効果 (8匹): 麻酔下ラットを開胸し、心臓交感神経活動を記録する。この後、左冠動脈前下行枝を結紮して急性心筋梗塞を作製し、結紮後5時間に渡り、神経活動変化と不整脈死の発生率を以下の2群間で比較する。結紮時、グレリン (150 μ g/kg sc) 投与群及び生食投与群。② 慢性低酸素性肺高血圧に対するグレリンの効果: 3週間の低酸素負荷期間、毎日グレリン (150 μ g/kg sc) 投与 (7匹) および生食投与 (7匹) を行った2群のラット間で、肺小血管応答を比較する。

4. 研究成果

(1) 対照ラットでの肺小動脈 (100-600 μ m 内径) の応答は、低酸素時は $8 \pm 1\%$ 、脱血時は $20 \pm 2\%$ の収縮であった。 α -及び β -遮断剤を投与した後同じ刺激を与えると、低酸素時の収縮は $23 \pm 2\%$ へ増大し、脱血時の収縮は $5 \pm 2\%$ へ減弱した。低酸素時の収縮 (8%) は、副腎摘除で $18 \pm 2\%$ へ、さらに星状神経節切除を加えると $25 \pm 2\%$ へ増大した。脱血時の収縮 (20%) は、逆に、副腎摘除で $14 \pm 2\%$ へ、除神経を加えると $6 \pm 2\%$ へ減弱した。血中ノルエピネフリン (NE) とエピネフリン (Epi) 濃度の増加の比率 (Δ NE/ Δ Epi) は両刺激間で大きく異なった。即ち、低酸素時は $+0.20/+0.72 = \sim 0.3$ で Epi 優位型応答を、脱血時は $+1.20/+0.13$ (ng/ml) = ~ 9 で NE 優位型応答を示した。以上より、急性低酸素時、副腎を含めた交感神経系は、主に β -受容体性肺血管拡張機構を賦活することで、肺の局所性機

構で起こる低酸素性肺血管収縮応答 (HPV) を減弱することが示唆された。この β 性拡張機構は、急性低酸素時の肺高血圧進展を抑制する全身循環維持機構と考えられた。出血性低血圧では、交感神経系は、逆に、主に α -受容体性肺血管収縮機構を活性化することで肺内血液を体循環にシフトさせ、vital organ の低灌流を改善するものと考えられた。

(2) 慢性低酸素性肺高血圧ラットでは、対照と比較すると、内径 $200\ \mu\text{m}$ 以下の肺細動脈に限局して、血管数が $40\sim 50\%$ 少ないことが分った。また、このレベルの肺細動脈は、HPV が最も強く起こる部位であるが、肺高血圧ラットでは収縮強度が対照と比較して $\sim 20\%$ 減弱していた。この減弱は β -遮断剤でほぼ消失した。また、交感神経活動低下を引き起こすとされている NO donor (SIN-1) の脳室内投与でも消失した。以上より、慢性低酸素時には、持続的な交感神経系の活動増大によって、 β -受容体性肺血管拡張機構の活性化を介した肺細動脈の HPV の緩和が起こり、肺高血圧症の進展が抑制されていることが示唆された。

(3) IH ラットでは、急性低酸素に対する肺小動脈 ($100\sim 600\ \mu\text{m}$) の収縮応答はほぼ消失していた。しかし、 β -受容体遮断下では、対照ラットの低酸素応答 ($20\sim 25\%$) より強い $30\sim 35\%$ の収縮応答が起こった。この結果より、IH 時、 β -受容体性肺血管拡張機構が強く賦活され、肺高血圧症の進展を防いでいる可能性が示唆された。SAS では、この機構の活性化の程度により、肺高血圧に進展するか否かが決まるのかもしれない。

(4) 野生型マウスではムスカリン受容体アゴニスト、bethanechol 投与に対する除脈や心拍の呼吸性変動の増大が起こったが、 $M_2\text{KO}$ マウスでは見られなかった。そこで、運動開始時の心拍数増大応答を $M_2\text{KO}$ と野生型マウスで比較してみたが、両者間で差は無かった。また、 $M_2\text{KO}$ の増大応答は β -受容体遮断剤で消失した。運動開始時の心拍数増大には、迷走神経性の副交感神経活動減少が強く関与するとされてきたが、この結果は、交感神経活動増大も重要な因子であることを示唆した。

(5) ラットの急性心梗塞モデルでは、梗塞直後から心臓交感神経活動は増大し始め、6 時間後には $\sim 100\%$ 増大した。しかし、梗塞直後にグレリンを皮下注射すると、この活動増大は完全に消失した。同時に、重篤な不整脈による死亡率は $\sim 70\%$ から $\sim 30\%$ に低下した。グレリン皮下注射の心臓副交感神経活動への影響を調べるため、心臓マイクロダイ

アリシス法で心筋間質アセチルコリン濃度を調べたが、変化はなかった。しかし、グレリンを脳室内に投与するとアセチルコリン濃度が有意に上昇することが分った。グレリンは迷走神経の求心性線維末端にある成長ホルモン分泌促進因子受容体を介して成長ホルモン分泌と摂食の情報を延髄孤束核に伝えることが分っているが、今回の皮下注射での心臓交感神経活動に対する特異的な抑制効果の情報伝達機構は今後の研究課題である。

慢性低酸素性肺高血圧ラットのグレリン注射群と生食注射群を比較すると、肺動脈圧は $32.7\ \text{vs}\ 43.4\ \text{mmHg}$ 、右室重量/左室重量+中隔重量は $0.52\ \text{vs}\ 0.68$ 、肺細動脈の wall-to-lumen ratio は $1.2\ \text{vs}\ 1.8$ であった。また、Northern blot 解析による肺組織の ET-1 の mRNA 発現レベルは、生食注射群では正常ラットの約 2 倍であったが、グレリン注射群では、ほぼ正常ラットと同レベルであった。以上より、グレリン注射は低酸素性肺高血圧に対して、降圧作用および抗リモデリング作用を有することが分ったが、作用メカニズムは不明である。

以上の結果より、グレリンは、将来、急性心筋梗塞および肺高血圧症の治療薬となり得ると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sonobe T, Kamiya A, Shishido T, Tokudome T, Hosoda H, Shirai M Centrally administered ghrelin activates cardiac vagal nerve in anesthetized rabbits. *Auton. Neurosci.* 2011 May 2. [Epub ahead of print] (査読有)
- ② Sonobe T, Schwenke DO, Pearson JT, Yoshimoto M, Fujii Y, Umetani K, Shirai M Imaging on the closed-chest mouse pulmonary circulation using synchrotron radiation microangiography. *J. Appl. Physiol.* 2011 Apr 28. [Epub ahead of print] (査読有)
- ③ Shioyama W, Nakaoka Y, Higuchi K, Minami T, Taniyama Y, Nishida K, Kidoya H, Sonobe T, Naito H, Arita Y, Hashimoto T, Kuroda T, Fujio Y, Shirai M, Takakura N, Morishita R, Yamauchi-Takahara K, Kodama T, Hirano T, Mochizuki N, Komuro I. Docking protein Gab1 is an essential component of postnatal angiogenesis after ischemia via HGF/cmet signaling. *Circ.*

- Res. 2011 Mar 18; 108(6): 664-675, Epub 2011 Feb 3. (査読有)
- ④ Schwenke, D. O., Pearson, J. T., Sonobe, T., Ishibashi-Ueda H., Shimouchi, A., Kangawa, K. Umetani, K., Shirai, M. Role of Rho kinase signaling and endothelial dysfunction in modulating blood flow distribution in pulmonary hypertension. J Appl Physiol. 2011 Apr;110(4):901-8. Epub 2011 Jan 6. (査読有)
- ⑤ Akiyama T, Yamazaki T, Kawada T, Shimizu S, Sugimachi M, Shirai M. Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in catecholamine release from in vivo rat adrenal medulla. Neurochem. Int. 56(2):263-269, 2010. (査読有)
- ⑥ Kawada T, Akiyama T, Shimizu S, Kamiya A, Uemura K, Sata Y, Shirai M. Sugimachi M. Large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit vagal acetylcholine release at the rabbit sinoatrial node. Auton. Neurosci. 156(1-2):149-151, 2010 (査読有)
- ⑦ Shimouchi A., Nose, K. and Shirai, M. Analysis of breath and skin gases emanating during exercise using an original biogas sampling system connected to an atmospheric pressure ionization mass spectrometer. IEEE Sensors J. 10 (1): 85-91, 2010 (査読有)
- ⑧ Schwenke DO, Pearson JT, Kangawa K, Cragg PA, Shirai M. Exogenous ghrelin accentuates the acute hypoxic ventilatory response after two weeks of chronic hypoxia in conscious rats. Acta Physiol 200: 279-287, 2010 (査読有)
- ⑨ Kawada T, Akiyama T, Shimizu S, Kamiya A, Uemura K, Li M, Shirai M. Sugimachi M. Detection of endogenous acetylcholine release during brief ischemia in the rabbit ventricle: a possible trigger for ischemic preconditioning. Life Sci 85: 597-601, 2009 (査読有)
- ⑩ Eppel, G. A., Jacono, D. L., Shirai, M., Umetani, K., Evans, R. G. and Pearson, J. T. Contrast angiography of the renal microcirculation in vivo using synchrotron radiation. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 296: F1023-F1031, 2009 (査読有)
- ⑪ Schwenke, D. O., Pearson, J. T., Shimouchi, A., Kangawa, K., Tsuchimochi, H., Umetani, K., Shirai, M. and Cragg PA. Changes in pulmonary blood flow distribution in monocrotaline compared with hypoxia-induced models of pulmonary hypertension. J Hypertens. 27(7):1410-1419, 2009 (査読有)
- ⑫ Shirai, M., Schwenke, D.O., Eppel, G.A., Evans, R.G., Edgley, A.J., Tsuchimochi, H., Umetani, K. and Pearson J.T. Synchrotron-based angiography for investigating regulation of vasomotor function in the microcirculation *in vivo*. (Frontiers in Research Review) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 36: 107-116, 2009 (査読有)
- ⑬ Schwenke, D.O., Tokudome, T., Kishimoto, I., Horio, T., Shirai, M., Cragg, P.A. and Kangawa, K. Early ghrelin treatment following myocardial infarction prevents an increase in cardiac sympathetic tone and reduces mortality. Endocrinology 149: 5172-5176, 2008 (査読有)
- ⑭ Schwenke, D.O., Pearson, J.T., Umetani, K., Kangawa, K. and Shirai, M. Changes in macrovessel pulmonary blood flow distribution following chronic hypoxia - assessed using synchrotron radiation microangiography. J. Appl. Physiol. 104: 88-96, 2008 (査読有)
- ⑮ Schwenke D.O., Tokudome, T., Shirai, M., Hosoda, H., Horio, T., Kishimoto, I. And Kangawa, K. Exogenous ghrelin attenuates the progression of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in conscious rats. Endocrinology 149: 237-244, 2008 (査読有)
- [学会発表] (計 15 件)
- ① 白井幹康、シュエンキ・ダリル、曾野部崇、藤井豊、吉本光佐、下内章人、寒川賢治、梅谷啓二 モノクロタリン肺高血圧ラットでの血管内皮とRho-kinaseの機能障害は肺微小血管レベルで起こる 第88回日本生理学会大会 2011年3月29日、横浜
- ② 曾野部崇、シュエンキ・ダリル、徳留健、岸本一郎、寒川賢治、白井幹康 グレリンノックアウトマウスでは慢性低酸素負荷で怒る換気適応が減弱する 第88回日本生理学会大会 2011年3月29日、横浜
- ③ 柳田洋、下内章人、曾野部崇、藤井豊、芝本利重、白井幹康 アナフィラキシー

- ショックに対するラット門脈の血管収縮応答 第 88 回日本生理学会大会 2011 年 3 月 29 日、横浜
- ④ 吉本光佐、三木健寿、白井幹康、Osborn John アンジオテンシンII慢性投与による交感神経活動と動脈圧の変化 第 88 回日本生理学会大会 2011年3月28日、横浜
- ⑤ 白井幹康、シュエンキ・ダリル、徳留健、岸本一郎、寒川賢治 グレリン投与は急性心筋梗塞時の心臓交感神経活動増大と致死率を低下させる 第 87 回日本生理学会大会 2010年5月20日、盛岡
- ⑥ 曾野部崇、シュエンキ・ダリル、ピアースン・ジェームズ、梅谷啓二、白井幹康. In vivo放射光微小血管造影法によるマウス肺循環系の評価. 第 87 回日本生理学会大会 2010年5月19日、盛岡
- ⑦ 秋山剛、川田徹、清水秀二、曾野部崇、杉町勝、白井幹康. マグネシウム静脈内投与の副腎交感神経節伝達に及ぼす影響. 第 87 回日本生理学会大会 2010年5月19日、盛岡
- ⑧ 下内章人、野瀬和利、白井幹康. 運動負荷に伴う呼吸・皮膚ガス微量成分の動態. 第 87 回日本生理学会大会 2010年5月20日、盛岡
- ⑨ 清水秀二、秋山剛、川田徹、神谷厚範、宍戸稔聡、白井幹康、杉町勝. 心臓交感・副交感神経活動に対する α_2 アゴニストの影響. 第 87 回日本生理学会大会 2010年5月21日、盛岡
- ⑩ Shirai M, Eppel GG, Jacono DL, Umetani K, Evans RG, Pearson J contrast angiography of the rat renal microcirculation in vivo using synchrotron radiation. 36th International congress of Physiological Sciences Aug 1, 2009, Kyoto.
- ⑪ Pearson J, Yagi N, Schwenke DO, Shirai M The importance of interfilament spacing in the regulation of crossbridge kinetics in the in situ heart. 36th International congress of Physiological Sciences July 28, 2009, Kyoto.
- ⑫ Pearson J, Jenkins MJ, Okura Y, Tani D, Schwenke DO, Umetani K, Kangawa K, Shirai M. Dynamic synchrotron imaging of the coronary vasculature in vivo in rat models of heart failure and diabetes. 36th International congress of Physiological Sciences July 30, 2009, Kyoto.
- ⑬ Schwenke DO, Pearson JT, Kangawa K, Ymetani, K, Shirai M, Cragg PA. Changes in pulmonary blood flow in

- monocrotaline and hypoxia-induced models of pulmonary hypertension, assessed using synchrotron radiation. 36th International congress of Physiological Sciences July 29, 2009, Kyoto.
- ⑭ 白井幹康、シュエンキ・ダリル、ピアースン・ジェームズ、梅谷啓二 放射光高速微小血管造影法を用いた低酸素性肺循環応答の観察：閉胸ラットを用いて 第 85 回日本生理学会大会 2008年3月27日 東京.
- ⑮ 白井幹康 放射光を用いた心血管機能の評価 第 152 回医用画像情報学会（特別講演）2008年10月4日 広島

〔図書〕（計 1 件）

- ① 下内章人、白井幹康. 低酸素性血管攣縮. 酸素ダイナミクス研究会「からだに酸素の事典」高橋英嗣、精山明敏編集 朝倉書店 242-244, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 幹康 (SHIRAI MIKIYASU)
独立行政法人国立循環器病研究センター・心臓生理機能部・部長
研究者番号：70162758

(2) 研究分担者

曾野部 崇 (SONOBE TAKASHI)
独立行政法人国立循環器病研究センター・心臓生理機能部・流動研究員
研究者番号：70548289
稲盛 修二 (INAMORI SHUJI)
広島国際大学・保健医療学部・講師
研究者番号：60412334

研究協力者

James T. Pearson
Dept. of Physiology, Monash University
Daryl O. Schwenke
Dept. of Physiology, University of Otago
秋山 剛
独立行政法人国立循環器病研究センター・心臓生理機能部
徳留 健
独立行政法人国立循環器病研究センター・生化学部
土持 裕胤
独立行政法人国立循環器病研究センター・心臓生理機能部
吉田 謙一
東京大学大学院医学系研究科・公共健康医学専攻法医学
梅谷啓二
(財) 高輝度光科学研究センター