

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21249051

研究課題名（和文）

心不全における交感神経機能の可塑性に関する研究

研究課題名（英文）

The investigation of the plasticity of cardiac sympathetic neurons in heart failure

研究代表者

福田 恵一（FUKUDA KEIICHI）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：20199227

研究成果の概要（和文）：心不全では、全身の交感神経活動が亢進することが知られているが、逆説的に交感神経終末から分泌されるノルエピネフリンの心筋内含量は減少している。この現象が交感神経の副交感神経化によるものかどうかを検証するために研究を行った。結果、交感神経を副交感神経に変換する因子として知られる白血病抑制因子とカルジトロフィン - 1 の発現が、不全心筋において増加し、これらの因子により、心臓を支配する交感神経が副交感神経に分化転換することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：During congestive heart failure (CHF), sympathetic neural tone is upregulated, but there is a paradoxical reduction in norepinephrine synthesis and reuptake in the cardiac sympathetic nervous system (SNS). Here we examined whether cholinergic transdifferentiation can occur in the cardiac SNS in rodent models of CHF and investigated the underlying molecular mechanism(s) using genetically modified mice. The cholinergic differentiation factors leukemia inhibitory factor (LIF) and cardiotrophin-1 (CT-1) were strongly upregulated in CHF. Thus, CHF causes target-dependent cholinergic transdifferentiation of the cardiac SNS via gp130 signaling cytokines secreted from the failing myocardium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	15,100,000	4,530,000	19,630,000
2010年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2011年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
総計	35,500,000	10,650,000	46,150,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、循環器内科学

キーワード：神経科学、循環器・高血圧、生体分子、脳・神経、発生・分化、心臓、心不全、白血病抑制因子

## 1. 研究開始当初の背景

心不全の原因疾患は、高血圧、心臓弁膜症、

虚血性心疾患、心筋症など多岐にわたり、その病態生理も複雑である。その中でも心臓交

感神経の関与が極めて重要であることは、これまでの研究、臨床で明らかである。

心不全では、持続的な交感神経活性の亢進に伴って、心筋における NE 含量は減少し枯渇するとされている。これは、交感神経終末においてノルエピネフリン (NE) の turnover が亢進し、過剰放出や再吸収障害 (uptake<sub>1</sub>) などにより NE の保持能力が低下するためとされている。さらに、NE 合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) の発現も低下し、解剖学的交感神経の除神経そのものが原因とされてきた。これまでのさまざまな研究から心不全における交感神経系の異常が示されてきたが、特に TH の発現がなぜ低下するのかなど、その詳細なメカニズムや意義については明確な結論が出ていないのが現状である。

近年、心不全の病態にさまざまなサイトカインが関与していることが明らかとなってきた。その中でも IL-6 サイトカインファミリーに属する LIF (leukemia inhibitory factor) や CT-1 (cardiotrophin-1) の心筋での発現が心不全において上昇していることは周知の事実である。一方、神経領域の研究では、心筋培養上清を培養交感神経細胞に加えることによって、アドレナリン作動性交感神経をコリン作動性神経に分化誘導する、つまり、培養神経細胞においては神経伝達物質を NE からアセチルコリンに転換 (switching) する現象が報告されてきた。この現象は、neurotransmitter switching、または cholinergic differentiation と称され、さらに、この分化誘導する物質が LIF であることが同定された。

以上の背景より、心不全時に観察される神経体液性因子の変化が、交感神経機能を修飾している可能性、具体的には神経細胞の有する可塑性によると思われるカテコラミン作

動性神経からコリン作動性神経への機能転換 (cholinergic differentiation) の可能性が推測された。

## 2. 研究の目的

心不全時に観察される神経体液性因子の変化が、交感神経機能を修飾している可能性、具体的には神経細胞の有する可塑性によると思われるカテコラミン作動性神経からコリン作動性神経への機能転換 (cholinergic differentiation) の可能性を推測し、新たな心不全の病態生理の解明、ならびに治療法の糸口がつかむ目的で本研究を開始した。

## 3. 研究の方法

### ラット・マウス動物実験

全ての実験は、慶應義塾大学倫理委員会の承認を得た。6週齢の Dahl 食塩感受性ラット (DS ラット) および対照群 (DR ラット) を日本クレアより購入した。9週間にわたり高濃度食塩食餌 (NaCl 8%) を与え、心不全モデルを作製した。

遺伝子改変マウスは、MHC (alpha myosin heavy chain) プロモーターにより心筋特異的に Cre 酵素を発現するマウス (MHC-Cre: Imperial College London の Dr. Michael D. Schneider より享受) と loxP 配列を持つ LIF-flox マウス (慶應義塾大学内科学教室、林松彦教授より享受) を交配することによって、心筋特異的に LIF を強発現させたマウスを作製した。

さらに、DBH (dopamine hydroxylase) プロモーターにより交感神経特異的に Cre 酵素を発現するマウス (DBH-Cre マウス: ドイツ、German Cancer Research Center の Dr. Günther Schütz より享受) と loxP 配列を持つ gp130-flox マウス (ドイツ、GBF mbH の Dr. Werner Müller より享受) を交配し、交感神経特異的に gp130 受容体をノックアウト

したマウス(gp130 conditional knock out; gp130 -CK0)を作製した。

#### 細胞培養

新生仔ラットの初代心筋培養細胞を用いて実験を行った。アンジオテンシン 刺激は  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  で投与し、培養交感神経刺激に用いる培養上清採取の場合には 24 時間刺激、心筋刺激の場合は 30 分間の刺激を行った。その他、 $50 \mu\text{mol/l}$  の過酸化水素 (3 時間)、 $1 \mu\text{mol/l}$  のドキシソルピシン (2 時間)、 $10 \mu\text{mol/l}$  のノルエピネフリン (30 分間)、 $5 \mu\text{mol/l}$  のセラミド (15 分間) 刺激を行った。さらに、低酸素刺激は  $90\% \text{N}_2 / 5\% \text{CO}_2 / 5\% \text{O}_2$  の条件下で 2 時間、ラミニンコート培養皿にて 20% 機械的伸展刺激を 2 時間施行した。

LIF、CT-1 および対照の siRNA は Ambion より購入し、Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen) を用いて、心筋細胞への導入を行った。

交感神経培養は、日本クレアより購入した新生仔 Wistar ラットから星状神経節を摘出し、5%FBS および  $50 \text{ ng/ml}$  の神経成長因子 (Upstate) を含む DMEM (Sigma) を用いて、ポリリジンコート培養皿上で行った。非神経細胞増殖抑制のため、 $10 \mu\text{M}$  cytosine  $1\text{-d-arabino furanoside}$  (Sigma) を添加した。また、刺激実験では LIF (Chemicon) または、心筋培養上清を培養開始 2 日目から投与した。

#### 定量的 RT-PCR と RT-PCR

全 RNA は Trizol 試薬 (GIBCO) を用いて抽出し、逆転写し用いた。各々の時間点において、おのおの少なくとも 3 回は行った。PCR primer は主論文の methods に掲載されている。定量分析の前に、PCR サイクルの線形範囲は各々の遺伝子ごとに計測し、PCR サイクルの適当な数は測定した。GAPDH を、internal

control として用いた。ABI Prism7500 を用いた TaqMan リアルタイム PCR 分析評価において、cDNA をテンプレートとして用いた。全てのデータは、GAPDH により正常化し評価した。LIF の primer と probe は、 $5' \text{-CCTCTAGAGTCCAGCCCATAA-3'}$  と  $5' \text{-CTCTAGAAGGCCTGGACCAC-3'}$  を用いた。

#### Western blot

検体は、 $20 \text{ mmol/l}$  トリス HCl (pH 7.4)、 $100 \text{ mmol/l}$  NaCl、 $5 \text{ mmol/l}$  EDTA、 $1.0\%$  トライトン X-100、 $10\%$  グリセロール、 $0.1\%$  SDS、 $1.0\%$  デオキシコール酸、 $50 \text{ mmol/l}$  NaF、 $10 \text{ mmol/l}$   $\text{Na}_3\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $1 \text{ mmol/l}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、 $1 \text{ mmol/l}$  phenylmethylsulfonyl fluoride、 $10 \mu\text{g/ml}$  aprotinin と  $10 \mu\text{g/ml}$  ロイペプチンを含んだ緩衝液で溶解した。タンパク質は、 $5\% \sim 10\%$  の SDS-PAGE の上で分離し、LIF (AB-449-NA; R&D) に対するヤギポリクローナル抗体を一次抗体として用いた。信号は検出キット (SuperSignal West Pico, PIERCE) で視覚化した。

#### 免疫組織染色

検体は、 $0.4\%$  パラホルムアルデヒドを用いて固定し、Tissue-Tek OCT (サクラ Finetek) または、パラフィンを使って包埋した。一次抗体は、交感神経マーカーとして、チロシンヒドロキシラーゼ (TH, Chemicon, Sigma, ImmunoStar)、ドパミン ヒドロキシラーゼ (DBH, Chemicon) を用いた。副交感神経マーカーとしては、コリントランスポーター (CHT, Chemicon)、コリンアセチルトランフェラーゼ (ChAT, Chemicon) を用いた。さらに、神経線維マーカーとして、ニューロフィラメント (NF)、感覚神経マーカーとして CGRP (Biogenesis) を用いた。

二次抗体は Alexa488、546、633 (Molecular

Probes)、TRITC(DAKO)を用いた。核は、TOTO3 (Molecular Probes)を用いて染色した。また、パラフィン検体においては、抗体賦活前処置として 10 mM クエン酸緩衝液(pH 6) または、20 mM トリス HCL 緩衝液(pH 9)による煮沸処理を行った。すべての蛍光免疫組織染色は、LSM510 META (Carl Zeiss)を使用した。神経面積の定量的評価は、Image J softwareを用いた。ヒト剖検例における交感神経節の組織染色には cresyl violet 染色 (Nissl 染色)を行った。

#### 交感神経の順行性標識

10%ピオチン標識デキストランを DR、DS ラット人工呼吸器下に開胸し、ハミルトンシリンジを用いて左星状神経節に注入した。注入3日後に星状神経節、心臓を摘出し、0.4%パラホルムアルデヒドにて固定した後、免疫組織染色を行った。

#### 電子顕微鏡

0.1M のカコディレート緩衝液に 0.2%グルタルアルデヒド、0.4%パラホルムアルデヒドを含む固定液を用いて、ラット心臓を固定し、エポキシ樹脂にて包埋した。80nm に薄切した後、JOEL -1230 走査型電子顕微鏡にて観察した。

#### マウス心不全モデル

左心不全モデルは、大動脈縮窄モデルを使用した。27ゲージ針を用いて、7.0 ナイロン糸で大動脈を結紮し、4週間後に Vevo770 scanner (VisualSonics)により心機能評価を施行した。右心不全モデルは、10%低酸素状態で8週間飼育し、1.0Fr カテーテル (SPR -1000; Millar Instruments)を用いて、ポリグラフシステム (iWorx Systems)による血行動態の評価を行った。

すべての実験は、2%イソフルレン麻酔下にて施行した。

#### ヒト剖検サンプル

全ての実験は、慶應義塾大学および国立循環器病センターの倫理委員会の承認を得た。心臓死、非心臓死患者の心筋組織 (左室) および星状神経節を摘出し、0.4%パラホルムアルデヒドを用いて固定し、Tissue -Tek OCT( サクラ Finetek)にて包埋し、免疫組織染色を施行した。

#### 統計分析

全ての値は平均値 ± 標準誤差で表示した。2群間の統計学的有意差は、Student's t-test で行った。生存解析は Kaplan-Meier 法を用い、Kaplan-Meier 生存曲線は SPSS software を使用した。p<0.05 を統計学的に有意とした。

#### 4. 研究成果

(1) 正常心臓における交感神経、副交感神経の分布：心臓内の交感神経と比較して副交感神経の心筋内分布密度は低いものの、主に心内膜側に分布していることを明らかにした。心不全モデル動物における交感神経の分化転換による副交感神経化：Dahl 食塩感受性心不全モデルラットと非感受性コントロールラットの比較では、心不全により心臓交感神経に副交感神経マーカーである CHT(choline transporter)や ChAT(choline acetyl transferase)を発現する神経が増加していることを確認した。心不全モデル動物における星状神経節神経の分化転換による副交感神経化：心不全の進行に伴って、星状神経節に ChAT を発現する交感神経細胞体が存在することを確認した。

(2) 心筋培養上清の培養交感神経への作

用：初代培養した交感神経細胞に対して、LIF(leukemia inhibitory factor)を投与したところ、交感神経から副交感神経への分化転換を惹起することを確認した。この培養実験系を用い、通常培養時と心不全時を模した状態（アンジオテンシン負荷、虚血再灌流負荷、過酸化水素負荷など）の心筋細胞の培養上清を培養交感神経に投与したところ、心筋細胞からのLIFとCT-1(cardiotrophin-1)の発現が増加し、これらの培養上清に交感神経を副交感神経に分化転換させる活性が存在することを見いだした。心臓特異的LIF過剰発現モデルの作成：MHC-CreマウスとLIF-LoxPマウスを作成し交配した。LIF発現の容量依存性に心臓交感神経が副交感神経化している様子が観察された。心臓特異的gp130ノックアウトマウスの作成：交感神経特異的にCre recombinaseを発現するマウスとgp130-LoxPマウスを交配し、交感神経特異的gp130欠損マウスを作成した。このマウスを用いて大動脈縮窄や低酸素による心不全マウスを作成し、対照マウスの心不全モデルに比して交感神経特異的gp130欠損心不全マウスでは交感神経の副交感神経化は観察されなかった。交感神経特異的gp130欠損心不全マウスの血行動態および予後は、対照マウス心不全モデルに比較して不良であり、交感神経の副交感神経化は生体にとって適応現象である可能性が示唆された。

(3) 心不全患者における副交感神経化：慢性心不全にて死亡した症例の剖検心例、心不全以外の原因で亡くなった症例の剖検例（年齢を一致させる）の心臓と交感神経を免疫染色し、交感神経が副交感神経化しているかを観察した。対照例6例の心臓および星状神経節では交感神経の副交感神経への分化転換は観察されなかった。これに対し、心不全例では心筋内交感神経と星状神経節の副交感

神経への分化転換が観察された。

## 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5件)

1. Kimura K, Ieda M, Fukuda K. Development, maturation, and transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves. **Circ Res.** 2012;110:325-36. (Corresponding author, IF = 9.504) 査読有
2. Hideaki Kanazawa, Masaki Ieda, Kensuke Kimura, Takahide Arai, Haruko Kawaguchi-Manabe, Jin Endo, Takashi Kawakami, Tokuhiro Kimura, Toshiaki Monkawa, Matsuhiko Hayashi, Akio Iwanami, Hideyuki Okano, Yasunori Okada, Hatsue Ishibashi-Ueda, Satoshi Ogawa, Keiichi Fukuda. Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-mediated cytokines. **J Clin Invest.** 2010;120(2):408-21. (Corresponding author, IF = 17.089) 査読有
3. Kensuke Kimura, Hideaki Kanazawa, Masaki Ieda, Haruko Kawaguchi-Manabe, Yoshiko Miyake, Takashi Yagi, Takahide Arai, Motoaki Sano, Keiichi Fukuda. Norepinephrine-induced nerve growth factor depletion causes cardiac sympathetic denervation in severe heart failure. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.** 2010 156:27-35. (IF=2.130) 査読有
4. Ieda M, Fukuda K. Cardiac innervation and sudden cardiac death. **Curr Cardiol Rev.**

2009;5:289-95.査読有

5. Masaki Ieda, Keiichi Fukuda. Cardiac innervation and sudden cardiac death. **Current Cardiology Review**. 5: 289-295, 2009.査読有

〔学会発表〕(計79件)

1. American Heart Association, 81th Scientific Meeting. Hideaki Kanazawa, Masaki Ieda, Satoshi Ogawa, and Keiichi Fukuda. Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-mediated cytokines. Melvin L. Marcus Young Investigator's Award Prize. 2009.11.14-17, Orlando, FL, USA.

〔図書〕(計2件)

1. 金澤英明、福田恵一。医学のあゆみ特集『心不全：研究と臨床の最前線』 『心不全における交感神経異常：交感神経の可塑性と新しい病態生理』2010年；232巻5号：370 - 377。医歯薬出版
2. 金澤英明、福田恵一。『心不全における交感神経の分化転換』 Heart View 2010年8月14巻8号60-65。

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 恵一 (FUKUDA KEIICHI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：20199227

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし