

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 3月 31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590095

研究課題名（和文） 血管周囲神経の再生・再分布機構の解明研究

研究課題名（英文） Reinnervation and redistribution of perivascular nerves

研究代表者

川崎 博己 (KAWASAKI HIROMU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60125151

研究成果の概要（和文）：

研究代表者は、神経成長因子（NGF）の神経再分布促進作用には Angiotensin II Type 2（AT2）受容体の発現が重要であることを示唆してきた。そこで、本研究では NGF の作用機序における AT2 受容体の役割を *in vivo* 系および *in vitro* 系で検討した。その結果、*in vivo* 血管周囲神経除神経法において、NGF が交感神経および CGRP 神経再分布促進作用および AT2 受容体の蛋白発現量を増加させること、再分布作用が AT2 受容体遮断薬によって抑制されることを見出し、NGF の神経成長作用に AT2 受容体が重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、脊髄後根節および交感神経節の初代培養神経細胞を用いた *in vitro* 系研究では、NGF による軸索伸張作用も AT2 受容体が関与していることが確認された。本研究から従来提唱されている NGF の血管周囲神経再分布作用機序とは異なった機序を介している可能性を示唆した。

研究成果の概要（Abstract）：

We have reported that reinnervation and/or redistribution of perivascular nerves induced by nerve growth factor (NGF) were associated with activation of angiotensin receptors (ATR). The present study was designed to investigate the precise role of ATR in NGF-induced reinnervation of perivascular nerves in rat mesenteric arteries. In *in vivo* study, perivascular adrenergic and CGRPergic nerves in distal mesenteric arteries were injured by topical application of Phenol on the superior mesenteric artery. The density of perivascular innervation was determined by computer-assist immunohistochemical methods. NGF facilitated reinnervation of perivascular sympathetic NPY- or TH-containing nerves and CGRP-containing nerves injured by topical phenol application in rat superior mesenteric artery. AT1R antagonist inhibited reinnervation of TH-containing nerves and AT2R antagonist suppressed reinnervation of CGRP-containing nerves. In *in vitro* study using primal culture of superior cervical ganglia (SCG) cells and dorsal root ganglia (DRG) cells, NGF facilitated outgrowth of neurite from cell body and AT2R mRNA

expression. In DRG cells, AT2R, but not AT1R, antagonist inhibited NGF-induced neurite outgrowth, while AT1R antagonist inhibited NGF-induced increase in AT2R mRNA expression. In SCG cells, AT1R and AT2R antagonists inhibited NGF-induced neurite outgrowth. These results suggest that NGF facilitates perivascular reinnervation through activation of angiotensin receptors, type 2 subtype.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2010年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：循環薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：血管周囲神経、交感神経、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 含有神経、腸間膜動脈、神経成長因子、脊髄後根神経節、上頸交感神経節、ラット

1. 研究開始当初の背景

組織・臓器の生命維持に必須である血液供給は血管によって維持調節されている。血管、特に細・小動脈から構成される抵抗血管は組織・臓器の隅々まで血液を供給し、血流量を調節することで全細胞の生命維持を掌っている。抵抗血管の緊張度調節は主として血管外膜層に網目状に分布する血管周囲支配神経によって行われ、刻々と変わる組織・臓器の血液需要に対応している。従来、血管周囲神経は血管収縮性の交感神経のみが分布し、その神経活動を変化することで血管緊張を調節していると考えられてきた。しかし、研究代表者は強力な血管弛緩ペプチド（カルシトニン遺伝子関連ペプチド、CGRP）を伝達

物質とする CGRP 作動性神経が網目状に分布し、この神経活動によって血管拡張が生じること、さらに、交感神経と CGRP 神経が相互に関与して緊張度を調節していることを世界に先駆けて発見した(Kawasaki et al., Nature, 335: 164, 1988; J Pharmacol Exp Ther, 252: 403, 1990)。CGRP 神経の病態における役割に関する研究では、高血圧状態（高血圧自然発症ラット；SHR）では、CGRP 神経の分布が減少する結果、血管拡張機能が減弱し、結果として交感神経機能の亢進が生じていることを明らかにし、血管周囲神経リモデリング説を提唱した（Kawasaki et al., Circ Res, 67: 733, 1990）。このリモデリングの改善は高血圧治療に応用できるという着想に至り、各種抗高

血圧薬を長期投与して薬物治療を行い両神経機能を正常化するかの検討を行った。その結果、レニン-アンジオテンシン系を抑制する抗高血圧薬のみが CGRP 神経のリモデリングを正常化すること、その作用は長期投与によってのみ起こることを明らかにした (Kawasaki et al., *Jpn J Pharmacol*, 79: 221, 1999; Hobara et al., *J Pharmacol Sci*, 96: 391, 2004; Hobara et al., *Hypertens Res*, 28: 465, 2005)。これら一連の研究から、血管周囲神経リモデリングに関する新しい研究分野を提唱している。その後、研究代表者は、伝達物質が Adrenomedullin (Hobara et al., *Peptide*, 25: 589, 2004) または一酸化窒素 (NO) (Hatanaka et al., *J Pharmacol Exp Ther*, 316: 490, 2006) である拡張性神経の分布と機能についても明らかにしている。さらに、研究代表者は *in vivo* 系で上腸間膜動脈周囲に Phenol を局所塗布することによって遠位小動脈の血管周囲神経が除神経される実験的神経リモデリング法を確立した (Hobara et al., *Neuroscience*, 141: 1087, 2006)。この方法により、NGF が障害・除神経された血管周囲神経を再分布させること、再分布された神経は血管収縮や血管拡張を起こす機能を持つことを世界に先駆けて明らかにした (Hobara et al., *Neuroscience*, 141: 1087, 2006)。さらに、Angiotensin II (Hobara et al., *Neuroscience*, 150: 730, 2007) や CGRP と類似構造を持つ Adrenomedullin にも NGF に類似した神経再分布作用があることも発見している (Hobara et al., *Neuroscience*, 144: 72, 2007)。また、肝細胞成長因子 (HGF) が血管周囲神経の中で CGRP 神経のみ再分布促進作用があることを明らかにしている (Hobara et al., *J Pharmacol Sci*, 108: 495, 2009)。これら評価系の確立と基礎的研究は新たな研究分野を広げる独創的な研究であり、この独創的な研究から、血管周囲神経は再分布することが

明らかになったばかりでなく、血管周囲神経の再分布を促進させる物質の発見に繋がっている。

2. 研究の目的

組織・臓器の血流調節に重要な役割を果たしている血管周囲神経は網目状に血管に分布しているため、障害を受けると再分布はないと考えられている。研究代表者は傷害した血管周囲神経の分布変化を *in vivo* 系で評価できる神経リモデリング法を開発し、神経成長因子 (NGF、HGF) が再分布を促進することを明らかにした。本研究では、神経成長因子による血管周囲神経の再分布機序を *in vivo* 系神経リモデリング法および上頸交感神経節と脊髄神経節の初代培養細胞を用いた *in vitro* 系実験を用いて、免疫組織化学的、血管薬理学的、神経薬理学的および分子薬理学的に詳細に検討した。

3. 研究の方法

神経成長因子(NGF)による血管周囲神経再分布促進の作用機序とAT2受容体の役割について詳細に検討するために、研究代表者が開発した *in vivo* 系実験的神経リモデリング法を用いた。ラットを麻酔下に開腹し、腹部大動脈から分岐した上腸間膜動脈付近にPhenol溶液を塗布して閉腹し、7日間の回復期間を設けた。この手術時に、NGF単独または神経成長・栄養因子とAT2受容体遮断薬(PD123,319)の2薬物を腹腔内に植え込んだ浸透圧ミニポンプを介して同時連続投与した。Angiotensin II Type-1 (AT1) 受容体遮断薬 (losartan) は飲料水に溶解して経口投与した。術後、7日目に上腸間膜動脈から遠位の腸間膜動脈血管を摘出し、交感神経分布密度をTyrosine hydroxylase (TH) 抗体またはNeuropeptide Y (NPY)抗体、CGRP神経分

布密度をCGRP抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。また、摘出腸間膜動脈灌流標本を作製し、灌流圧変化を血管緊張度変化の指標にし。血管周囲神経を経壁電気刺激して、血管反応と交感神経刺激によって流出する伝達物質

(Noradrenaline) を測定し、再分布した神経の機能変化を検討した。同時にAT1およびAT2受容体の関与について、脊髄後根神経節 (DRG) におけるAT1、AT2受容体たんぱく質とmRNA発現をWestern blot法とRT-PCR法で解析した。さらに、NGF、AT1受容体遮断薬、AT2受容体遮断薬の3薬物を同時投与時の血管周囲神経分布密度の変化についても検討した。次に、in vitro系研究として、血管周囲交感神経の細胞体がある頸部交感神経節またはCGRP神経細胞体のある脊髄後根神経節 (DRG) の初代培養細胞を用いて検討した。ラットのDRG (10週齢) または頸部交感神経節 (生後1日目) を摘出し、コラゲナーゼ処理をして初代培養細胞標本作製した。この培養神経細胞にNGFを添加し、細胞体から伸長する軸索(neurite)で、細胞体を中心とした半径120 μ mの円と交わる軸索の数を計測し、神経軸索伸長作用を評価した。伸長が認められた細胞をTHおよびCGRP抗体で免疫染色し、交感神経およびCGRP神経を確認した。次に、NGFに各種AT1およびAT2受容体の作動薬または受容体遮断薬を同時添加して培養し、神経軸索伸長作用の変化を観察測定した。次に、初代培養DRG神経細胞を用いて、各薬物処置におけるAT1およびAT2受容体のたんぱく質発現をWestern blot法で、両受容体mRNAの発現をRT-PCR法で測定した。

4. 研究成果

(1) In vivo系研究におけるNGFによる血管周囲神経再分布とAT1およびAT2受容体の関与

研究代表者が開発した in vivo系実験的神経リモデリング法において、Phenol局所塗布によって遠位小動脈の血管周囲神経の分布密度がTHおよびCGRP神経分布ともに40%から80%減少した。ミニポンプで投与したNGFは減少した血管周囲神経 (TH および CGRP神経) 分布密度を溶媒投与群の分布近くまで増加させ、これら血管周囲神経が再分布することが確認された。Phenol局所塗布処置した摘出腸間膜動脈灌流標本では、交感神経刺激による血管収縮反応とNoradrenaline遊離が減少し、CGRP神経性血管拡張反応が減弱した。交感神経性収縮反応は、NGF投与によって回復したが、CGRP神経性の血管拡張反応は有意な回復は認められなかった。NGFによるTH神経分布密度増加作用は、AT1R遮断薬によって抑制されたが、AT2受容体遮断薬は影響しなかった。一方、NGFによるCGRP神経分布増加作用はAT2受容体遮断薬によって抑制されたが、AT1受容体遮断薬は影響しなかった。この研究結果により、NGFによる交感神経再分布作用にはAT1受容体が関与し、NGFによるCGRP神経再分布作用にはAT2受容体が重要な役割を果たしていることが示唆される。DRGにおけるAT1受容体およびAT2受容体のmRNA発現量を測定した結果、NGFによってAT1RおよびAT2受容体のmRNA発現量が増加した。NGFによるAT2mRNA発現量増大作用は、AT1受容体遮断薬 losartan のみによって抑制された。一方、AT2受容体遮断薬 (PD123,319) はNGFによるAT1受容体mRNA増大作用のみを抑制した。以上の結果、NGFによるCGRP神経の再分布にはAT2受容体の発現が関与し、その発現量調節にはAT1受容体が影響していることを明らかにした。

(2) In vitro系研究におけるAT受容体の関

与

NGFによる血管周囲神経再分布作用にAT2受容体の発現が重要であることが確認されたので、*in vitro*系研究においてその関与を検討した。血管周囲神経の細胞体は、交感神経では交感神経節、CGRP神経では脊髄後根神経節(DRG)にあるので、これら神経節の初代培養細胞を用いた。

①脊髄後根神経節(DRG)神経細胞：CGRP神経ラットDRGの培養神経細胞においてNGFを添加すると、濃度依存的に細胞体から軸索が伸長した。軸索伸長が認められた細胞はCGRP抗体で免疫陽性に染色されたので、CGRP神経細胞体と確認された。NGFによるCGRP神経軸索伸長作用はAT2受容体遮断薬(PD123,319)によって抑制されたが、AT1受容体遮断薬(losartan)では抑制されなかった。また、Angiotensin IIおよびAT2受容体作動薬はCGRP神経軸索の伸長を促進し、AT2受容体遮断薬によって抑制された。

②頸部(上頸)交感神経節神経細胞：上頸交感神経節の初代培養細胞において、NGFは濃度依存的に細胞体から軸索伸長作用を示した。NGFによって軸索伸長を示した細胞体はTH抗体によって免疫陽性を示したので交感神経節細胞と確認された。NGFとAT1受容体遮断薬であるlosartanを併用添加させるとNGF単独投与に比べ、神経細胞突起伸長が有意に抑制された。また、NGFとAT2受容体遮断薬(PD123,319)の併用添加によっても神経細胞突起伸長が有意に抑制された。一方、上頸神経節細胞には、Western blotting法によってAT1受容体およびAT2受容体のタンパク質発現が認められた。NGFはAT1受容体およびAT2受容体の両タンパク質発現量を有意に増加させた。AT1受容体遮断薬はNGFのAT1受容体タンパク質発現量増大作用を抑制し、AT2受容体タンパク質発現も軽度抑

制した。さらに、NGFはAT1受容体およびAT2受容体mRNAの増加を生じた。AT1受容体遮断薬はNGFによるAT1受容体mRNAの増加を抑制したがAT2受容体mRNAの増加は抑制しなかった。逆に、AT2受容体遮断薬はNGFによるAT2受容体mRNAの増加のみを有意に抑制した。これらの結果から、交感神経細胞は、NGF依存的に神経伸長するが、その神経伸長作用にAngiotensin II受容体(AT1受容体およびAT2受容体)が関与している可能性が示唆される。

以上の本研究の成果から、血管周囲神経の交感神経およびCGRP神経は再分布することを明らかにし、その再分布は神経成長因子(NGF)によって促進されることを明らかにした。このNGFによる血管周囲神経再分布促進効果には、Angiotensin II受容体が関与しており、特にAT2受容体が重要な役割を果たしている。本研究成果は、NGFの神経成長・維持作用にAngiotensin II受容体が重要な役割を果たしていることを明らかにした初めての研究で、神経変性性疾患の病院解明と新規治療薬の開発研究に貢献すると考えられる。

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1件)

①Hiromu Kawasaki, Shingo Takatori, Yoshito Zamami, Toshihiro Koyama, Mitsunobu Goda, Kazuhiro Hirai, Panot Tangsucharit, Xin Jin, Narumi Hobara and Yoshihisa Kitamura: Paracrine control of mesenteric perivascular axo-axonal interaction. *Acta Physiologica* 203: 3-11 (2011) (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

①Hiromu Kawasaki : Paracrine modulation of

perivascular innervation. The 12th Symposium on Vascular Neuroeffector Mechanisms (Odense, Denmark, 7月24日-26日, 2010)

- ②芳原成美、日野隼人、橋川直也、川崎博己：
血管周囲神経リモデリングにおけるアンジオテンシン受容体の役割. 日本薬学会第130年会（岡山市、3月28日-30日、2010）
- ③日野隼人、芳原成美、橋川直也、川崎博己：
神経成長因子(NGF)による上頸神経節初代培養細胞の神経伸長におけるアンジオテンシンII受容体の関与. 第83回日本薬理学会年会（大阪市、3月16日-18日、2010）
- ④日野隼人、芳原成美、橋川直也、川崎博己：
神経成長因子(NGF)による交感神経初代培養細胞の神経伸長におけるアンジオテンシンII受容体の関与. 第48回日本薬学会中国四国支部学術大会（徳島市、11月7-8日、2009）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 博己 (KAWASAKI HIROMU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：60125151

(2) 研究分担者

北村 佳久 (KITAMURA YOSHIHISA)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：40423339

(3) 連携研究者

(0)

(4) 研究協力者

高取真吾 (TAKATORI SHINGO)
岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20368707

橋川（芳原）成美 (HASHIKAWA-HOBARA NARUMI)

岡山理科大学・准教授

研究者番号：30511159

日野隼人 (HINO HAYATO)

岡山大学附属病院薬剤部・薬剤師