

機関番号：16401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21790729

研究課題名 (和文) 内在性アセチルコリンの心筋保護作用の機序解明と
虚血性心不全の新規薬物治療への応用研究課題名 (英文) Novel pharmacotherapy for ischemic heart disease
with cardioprotective activity of endogenous acetylcholine.

研究代表者

有川 幹彦 (ARIKAWA MIKIHICO)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：20432817

研究成果の概要 (和文)：

副交感神経活動がもたらす心不全病態改善作用のメカニズムを分子レベルで理解することを目的として、心筋梗塞モデル動物に対するコリンエステラーゼ (アセチルコリン分解酵素) 阻害剤の影響を検討した。その結果、コリンエステラーゼ阻害剤は、心筋梗塞急性期において、梗塞部位に浸潤してきた炎症系細胞からの細胞外基質分解酵素の産生を抑制し、心拍数および血圧非依存的に左心室自由壁破裂による死亡率を低下させることが明らかになった。また、コリンエステラーゼ阻害剤の浸潤細胞に対する抗炎症作用は、非コリン作動系のシグナル伝達を介している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

In the present study, we investigated the acute effect of donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, on cardiac dysfunction and remodeling during an acute phase of myocardial infarction (MI) in mice. As results, donepezil inhibited matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)-related acute inflammatory tissue injury in the infarcted myocardium, thereby reduced the risk of left ventricular free wall rupture during the acute phase of MI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
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：内科系臨床医学・循環器内科

キーワード：生体機能利用、心機能保護、コリンエステラーゼ阻害剤、アセチルコリン

1. 研究開始当初の背景

現代の高齢化社会において、死因第二位と

される虚血性心疾患の治療法開発および予防対策は、循環器領域の基礎・臨床研究における重要課題のひとつである。申請者が所属

する研究グループでは、これまでに、迷走神経刺激が虚血性慢性心不全モデル動物の生命予後を劇的に改善することを明らかにし、副交感神経系の未知の作用、すなわち迷走神経活動の心不全病態改善効果を新たに見出した (Circulation 2004)。さらなる研究により、迷走神経刺激がギャップ結合タンパク質であるコネクシン 43 を保護し致死性不整脈の発生率を低減させること (Circulation 2005)、アセチルコリンが非低酸素条件下において PI3K/Akt/HIF-1 α 経路を介して心筋細胞に虚血耐性をもたらすこと (FEBS letters 2005) を明らかにした。これらの研究結果より、迷走神経刺激によって神経末端より放出されるアセチルコリンは心筋細胞および心臓に対して短期的な、あるいは不全心を持つ個体に対して長期的な保護作用を持つことが示唆された。したがって、アセチルコリン誘導性のストレス防御機構に関わる因子の定量解析、およびアセチルコリンが有する心臓リモデリング予防効果と心機能温存効果の定性解析を行い、迷走神経刺激の虚血性心不全に対する保護作用の分子メカニズムを解明することが強く望まれる。

2. 研究の目的

虚血性心疾患治療においては、心臓リモデリングを制御し、心収縮機能の減弱を抑えることによって、心不全発症に至るまでの一連の経過を如何に遅延できるかが重要であり、その治療成績は心機能の向上 (または低下抑制) と生存率の改善をもって評価される。本研究では、臨床現場での内科的薬物治療による虚血性心疾患への早期介入を想定して、心筋梗塞急性期におけるアセチルコリンの構造的・機能的リモデリングに対する短期的効果を検証し、副交感神経活動がもたらす心不全病態改善作用のメカニズムを分子レベルで理解することを目指す。

3. 研究の方法

コリンエステラーゼ阻害剤は生体内でのアセチルコリン分解を抑制し、内在性アセチルコリンレベルの上昇を引き起こす。本研究では、内在性アセチルコリンが持つ心筋保護作用を検討するために、心筋梗塞モデル動物に対するコリンエステラーゼ阻害剤の影響を検討した。さらには、その作用機序を明らかにする目的で、単離マクロファージに対す

るコリンエステラーゼ阻害剤の影響を検討した。

(1) In vivo 実験：マウス心筋梗塞モデルに対するコリンエステラーゼ阻害剤の影響

- ①マウスの左冠動脈を結紮して心筋梗塞モデルを作成し、コリンエステラーゼ阻害剤投与群と非投与群に分ける。
- ②術後3日目に tail-cuff 法によって心拍数および血圧を測定し実験群間で比較する。
- ③非投与群の自然歴における心破裂 (左心室自由壁破裂) による死亡率を求め、投与群のそれと比較する。
- ④心臓を単離して以下の点において実験群間で比較する。
 - a) 左心室リモデリング：組織形態学的手法により、左心室内腔の直径や左心室壁の厚さ、および梗塞サイズを測定し比較する。
 - b) 梗塞部位の繊維化：免疫組織化学的手法により、心筋壊死領域または壊死領域と正常領域との境界において、炎症系細胞数や細胞外基質量の比較を行う。
 - c) 組織リモデリング：梗塞部位の繊維化に関わる細胞外基質分解酵素について、遺伝子およびタンパク質の発現量を測定する。また酵素電気泳動法により酵素活性を測定する。

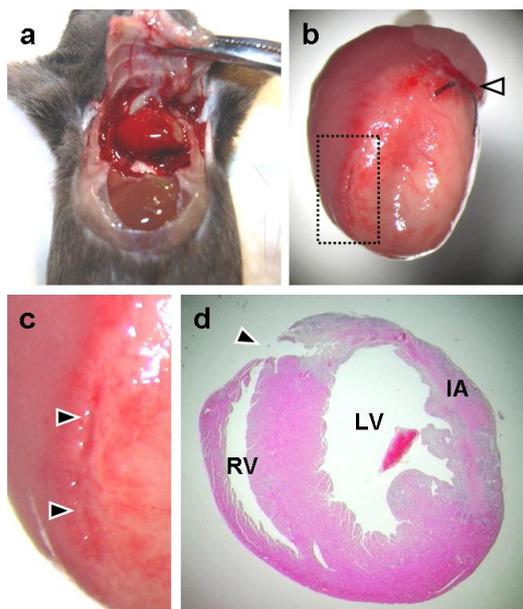
(2) In vitro 実験：単離マクロファージに対するコリンエステラーゼ阻害剤の影響

- ①マウス腹腔内よりマクロファージを単離し、初代培養系を得る。
- ②ACh またはコリンエステラーゼ阻害剤処理後、内毒素 (LPS) による炎症刺激を行い、培養上清と細胞のサンプリングを行う。
- ③培養上清または細胞における細胞外基質分解酵素の定量解析を行う。また酵素電気泳動法により酵素活性を測定する。
- ④ニコチン性またはムスカリン性 ACh 受容体拮抗薬存在下で、ACh およびコリンエステラーゼ阻害剤の抗炎症作用を評価する。

4. 研究成果

(1) 心筋梗塞モデル動物における実験

- ①心筋梗塞モデルマウスは、急性期に梗塞領域と非梗塞領域との境界部に穿孔が生じ、高頻度で心破裂により死亡した。



② コリンエステラーゼ阻害剤は心拍数および血圧非依存的に急性期心破裂の危険率を有意に低減した。

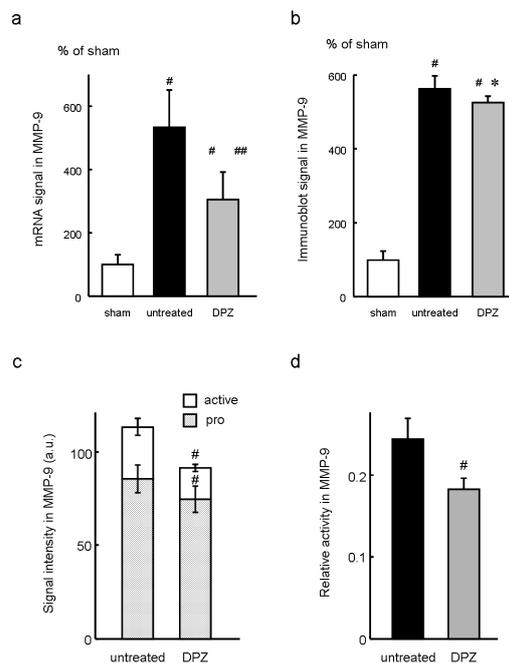
	sham	infarcted	
		untreated	DPZ
HR (bpm)	493 ± 70	548 ± 53	528 ± 43
BP (mmHg)	98.9 ± 5.0	81.6 ± 7.4 #	78.3 ± 7.9 #
rupture rate (%)	0	30.6	8.7 #

③ コリンエステラーゼ阻害剤は軽度の心筋リモデリング抑制効果を示し、また、梗塞領域へ浸潤する炎症系細胞の数を有意に減少させた。

	untreated	DPZ
HW/BW (mg/g)	5.85 ± 0.66	5.60 ± 0.39
Wall thickness		
left ventricle (μm)	68.7 ± 10.7	89.8 ± 21.5
septum (μm)	134.6 ± 13.1	132.0 ± 6.2
left ventricle / septum	0.51 ± 0.07	0.69 ± 0.20 #
right ventricle (μm)	56.1 ± 8.91	43.9 ± 7.31 #
Infarct size (%)	68.3 ± 3.12	62.6 ± 9.61
Nuclear density (×10³/mm²)	4.42 ± 0.36	3.50 ± 0.29 #

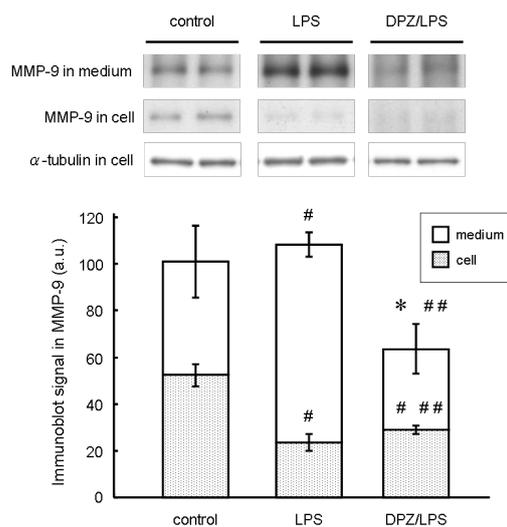
④ コリンエステラーゼ阻害剤は梗塞領域における細胞外基質分解酵素 (MMP-9) の発現量および酵素活性を有意に抑制した。

a) mRNA. b) protein. c) enzymatic activity (pro and active form). d) relative enzymatic activity (active / total).

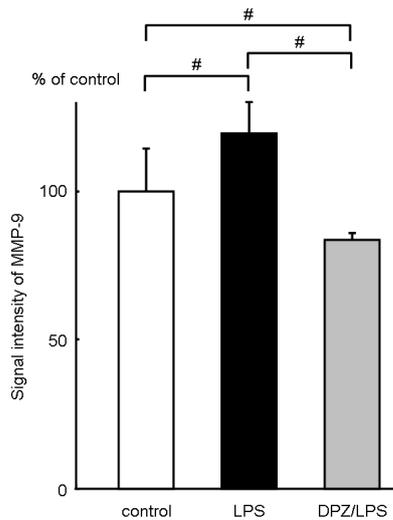


(2) 単離マクロファージにおける実験

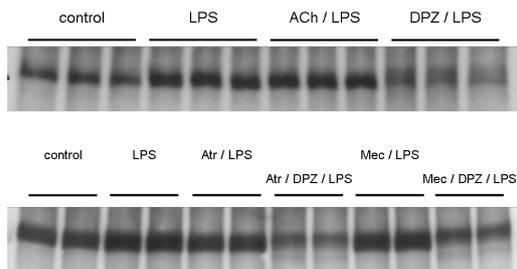
① コリンエステラーゼ阻害剤処理したマクロファージでは、培養上清中および細胞内のMMP-9量が有意に低かった。



② コリンエステラーゼ阻害剤処理したマクロファージでは、培養上清中に分泌されたMMP-9の酵素活性が有意に低かった。



③ コリンエステラーゼ阻害剤は非コリン作動系を介してマクロファージMMP-9を抑制した。



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7件)

① Arikawa M, Kakinuma Y, Handa T, Yamasaki F, Sato T. Donepezil, anti-Alzheimer's Disease Drug, Prevents Cardiac Rupture during Acute Phase of Myocardial Infarction in Mice. PLoS ONE, 2011 (in press). 査読有

② Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Yamasaki F, Sato T. Differential regulation of TNF receptors by vagal nerve stimulation protect heart against acute ischemic injury. J Mol Cell Cardiol, 49: 234-244, 2010. 査読有

③ Kakinuma Y, Furihata M, Akiyama T, Arikawa M, Handa T, Katare RG, Sato T.

Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, promotes angiogenesis in an ischemic hindlimb model. J Mol Cell Cardiol, 48: 680-693, 2010. 査読有

④ Handa T, Katare RG, Kakinuma Y, Arikawa M, Ando M, Sasaguri S, Yamasaki F, Sato T. Anti-Alzheimer's drug, donepezil, markedly improves long-term survival after chronic heart failure in mice. J Card Fail, 15: 805-811, 2009. 査読有

⑤ 半田武巳, Katare GR, 柿沼由彦, 有川幹彦, 安藤元紀, 山崎文靖, 佐藤隆幸, 篠栗志朗. Donepezil を使用した容量負荷心不全マウスにおける心機能改善効果、生存率改善効果の検討. 心臓, 41: 115-123, 2009. 査読有

⑥ Katare GR, Kakinuma Y, Arikawa M, Yamasaki F, Sato T. Chronic intermittent fasting improves the survival following large myocardial ischemia by activation of BDNF/VEGF/PI3K signaling pathway. J Mol Cell Cardiol, 46: 405-412, 2009. 査読有

⑦ Katare GR, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Handa T, Yamasaki F, Sato T. Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of opening of mitochondrial permeability transition pore independent of the bradycardiac effect. J Thorac Cardiovasc Surg, 137: 223-231, 2009. 査読有

[学会発表] (計6件)

① Arikawa M, Kakinuma Y, Zheng C, Yamasaki F, Sato T. Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, reduces the risk of left ventricular free wall rupture during an acute phase of myocardial infarction by attenuating macrophage matrix metalloproteinase-9. 19th International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society, Fukuoka, Japan, 2010. 9. 23-26. 査読有

② Kakinuma Y, Akiyama T, Arikawa M, Sato T. Effects of a non-neuronal cholinergic system equipped for cardiomyocytes, as a molecular brake, on overshooting cardiac energy metabolism.

19th International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society, Fukuoka, Japan, 2010. 9. 23-26. 査読有

③ 柿沼由彦、秋山剛、有川幹彦、半田武巳、佐藤隆幸。

Effects of a non-central and non-neuronal acetylcholine synthesis system equipped for cardiomyocytes, as a molecular brake, on overshooting cardiac energy metabolism.

第31回日本循環制御医学会総会, 大阪府豊中市, 2010. 5. 28-29. 査読有

④ Kakinuma Y, Akiyama T, Arikawa M, Handa T, Sato T.

Effects of a non-neuronal acetylcholine synthesis system equipped for cardiomyocytes, as a molecular brake, on overshooting cardiac energy metabolism.

第74回日本循環器学会総会・学術集会. 京都市, 2010. 3. 5 - 7. 査読有

⑤ Handa T, Katare RG, Kakinuma Y, Arikawa M, Sasaguri S, Yamasaki F, Sato T.

Donepezil, An acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, prevents remodeling and improves survival in volume overload heart failure mice.

American College of Cardiology 58th Annual Scientific Session, Orlando USA, 2009. 3. 28-31. 査読有

⑥ Handa T, Kakinuma Y, Arikawa M, Sasaguri S, Yamasaki F, Sato T.

Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, prevents remodeling in volume-overload heart failure mice: Local and central effect of donepezil.

第73回日本循環器学会総会・学術集会, 大阪市, 2009. 03. 20 - 21. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有川 幹彦 (ARIKAWA MIKIHICO)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 20432817