

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25年5月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590830

研究課題名（和文） 心血管病変形成におけるコリン作動性抗炎症経路の役割の解明と治療への応用

研究課題名（英文） The role of cholinergic anti-inflammatory pathway in the development of cardiovascular diseases.

研究代表者

市来 俊弘（ICHIKI TOSHIRO）

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：80311843

研究成果の概要（和文）：

アセチルコリンエステラーゼ阻害薬によるコリン作動性抗炎症経路の活性化は、アポリポ蛋白 E 欠損マウスにおける動脈硬化性病変の形成や、下肢虚血モデルマウスの血流回復を抑制した。これらの効果にはサイトカイン産生の抑制が重要な役割を果たす事が示唆された。アセチルコリンエステラーゼ阻害薬が心血管病治療の新たな戦略となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Activation of cholinergic anti-inflammatory pathway by acetylcholine esterase inhibitors attenuated atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice fed a high-fat diet and blood flow recovery in a hindlimb ischemia model in mice. These effects seemed to be mediated by suppression of cytokine expression. Acetylcholine esterase inhibitors may be a novel strategy for the treatment of cardiovascular diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医薬薬学

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：コリン作動性抗炎症経路、コリンエステラーゼ阻害薬、自然免疫、動脈硬化、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

ACE 阻害薬やスタチンなどによる、心不全や心筋梗塞患者の心血管イベントの抑制は30%前後であり、満足すべき効果とは言えない。一方これらの薬剤が広く処方される結果、既存の薬剤を追加投与しても心血管イベントのさらなる抑制は得られないとする報告もなされている。したがって、新たな機序に基づく循環器疾患の治療法の開発が切望

されている。

動脈硬化は血管壁における慢性的炎症・増殖反応であり、血管壁に浸潤したマクロファージなどの炎症細胞や平滑筋細胞などから産生される炎症性サイトカインやケモカインが動脈硬化進展の要因の一つとされる(N Engl J Med. 1999;340:115)。これらの過程においてNADPH oxidaseなどにより産生される活性酸素が重要な役割を果たすことが数

多く報告されている。最近 Toll-like receptor (TLR)を介する自然免疫も動脈硬化形成に重要であることが知られてきた (Semin Immunopathol. 2009;31:5)。

炎症を抑制する神経制御系として迷走神経が注目されており、コリン作動性抗炎症経路と呼ばれている (J Clin Invest. 2007;117:289)。迷走神経末端から分泌されるアセチルコリンは、マクロファージなどに発現する $\alpha 7$ nicotinic アセチルコリン受容体 (nAChR) に作用して、リポポリサッカライド (LPS) によって誘導される TNF α の発現を抑制する事が報告されている。 (Nature 2000;405:458)。この機序の一つとしては $\alpha 7$ nACh 受容体を介した NF- κ B 活性化の抑制が報告されている (Nature Med. 2004;10:1216)。また SOCS3 経路の活性化によるサイトカインシグナルのブロックも報告されている。このコリン作動性抗炎症作用は敗血症性ショックや出血性ショックモデルなどを用いて多くの研究がなされている。循環器疾患領域では、心不全ラットの迷走神経を電氣的に刺激すると、生存率が改善するという報告はなされているが、動脈硬化症や血管新生など、血管におけるコリン作動性抗炎症経路の役割は解明されていない。

2. 研究の目的

薬理的なコリン作動性抗炎症経路の活性化が心血管系の炎症や組織再構築、病変形成に及ぼす影響を検討すると共に、その分子機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 10 週齢のオスのアポリポ蛋白 (Apo)E 欠損マウスに高脂肪食 (HFD) およびアンジオテンシン (Ang) II (490ng/kg/day) を 4 週間投与し、動脈硬化モデルを作製した。Ang II は皮下に埋め込んだ浸透圧ミニポンプを用いて投与した。このモデルにコリンエステラーゼ阻害薬であるドネペジル (経口投与: 5mg/kg/day) とフィゾスチグミン (浸透圧ミニポンプ 2mg/kg/day) を同期間投与した。また、ApoE 欠損マウスに高脂肪食のみを 8 週間負荷した群も作製し、ドネペジルを同期間投与した。大動脈を Oil Red O にて染色し、動脈硬化病変の面積を評価した。大動脈弁輪部におけるマクロファージの浸潤を F4/80 に対する抗体による免疫染色法により評価した。大動脈における遺伝子発現を定量的 PCR により評価した。活性酸素の産生を dihydroethidium による蛍光で評価し、NADPH oxidase 活性をルシジェニン法により定量した。NOX 蛋白の発現をウエスタンブロット法により評価した。

(2) 8 週齢の C57BL/6 マウスの一側の大股動脈を結紮し、急性虚血から徐々に血流が回復するモデルを作成した。血流はレーザードップラー法により測定し、健側の血流との比率で評価した。虚血下肢の筋肉内毛細血管密度を抗 CD31 抗体による内皮細胞の免疫染色により評価した。このモデルにコリンエステラーゼ阻害薬であるドネペジルとフィゾスチグミンを投与した。虚血下肢の遺伝子発現を定量的 PCR 法により評価した。血中および下肢筋肉のサイトカイン量は ELISA 法により定量した。C2C12 筋芽細胞を低酸素 (1%O₂) に暴露し、mitogen activated kinase などの活性化をウエスタンブロット法により検討した。

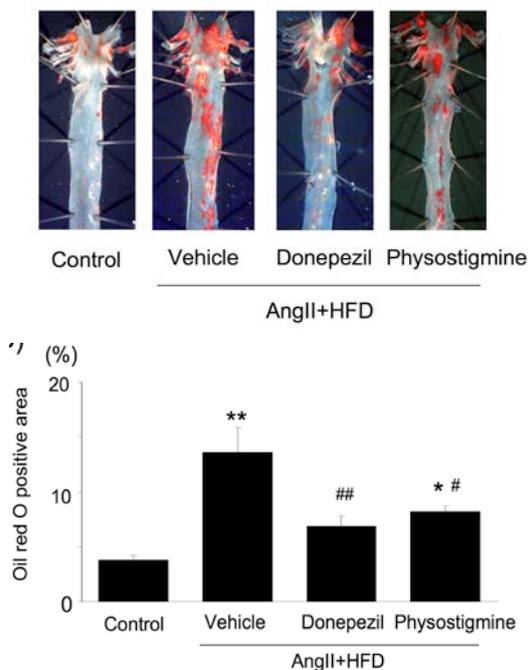
4. 研究成果

(1) コリンエステラーゼ阻害薬が動脈硬化形成に及ぼす影響の検討

【結果】10 週齢のオスの ApoE 欠損マウスに高脂肪食および Ang II を投与してできる動脈硬化症モデルにドネペジルおよびフィゾスチグミンを 4 週間投与した。これらの薬剤は体重、血圧、心拍数、血清コレステロール値には有意な影響は与えなかった。

ドネペジルおよびフィゾスチグミン投与によりマウス大動脈における Oil red O 陽性の面積で表される動脈硬化病変の広がり有意に抑制された。

(下図参照)



(*P<0.05, **P<0.01 vs Control, #P<0.05, ##P<0.01 vs Vehicle)

ドネペジルおよびフィゾスチグミンの投与は大動脈弁輪部へ浸潤するマクロファージ数と Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 陽性細胞数を有意に抑制した。また、ドネペジル投与は、ApoE欠損マウスに高脂肪食のみを8週間投与してできる動脈硬化病変の形成も抑制した。

ドネペジル投与は大動脈における活性酸素の産生およびNADPH oxidaseの活性を抑制した。ドネペジル投与は大動脈におけるMCP-1とTumor Necrosis Factor- α のmRNA発現を有意に抑制した。Interleukin-6の発現も抑制されたが、統計的には有意差は無かった。

NADPH oxidaseのサブユニットの一つであるp47Phoxの大動脈での蛋白発現がドネペジル投与により抑制された。

【考察】本研究により、ドネペジルによる薬理的な迷走神経刺激には顕著な抗酸化、抗動脈硬化作用のあることが明らかとなった。フィゾスチグミンでもほぼ同様の結果が得られたので、この作用はアセチルコリンの分解抑制に基づく効果と考えられる。過去の研究からはアセチルコリンはマクロファージへ作用していることが示唆されるが、実際に動脈硬化形成の過程において、どの細胞に作用しているかについては今後の検討が必要である。

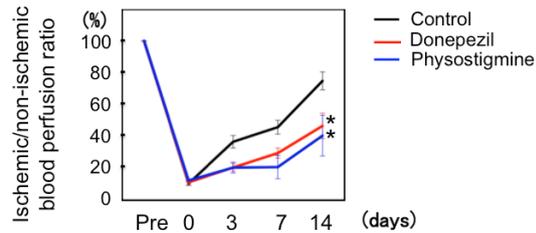
分子機序としては、酸化ストレスの減少がサイトカイン発現を抑制し、動脈硬化を抑制する可能性が示唆される。p47Phoxの発現低下を認めたが、アセチルコリンが活性酸素産生を抑制する機序についてもさらなる検討が必要と考えられる。

この結果を直接ヒトの動脈硬化症にあてはめるには注意が必要であるが、コリンエステラーゼ阻害薬は動脈硬化性心血管病変の新たな治療法として有用である可能性が示された。インスリン抵抗性の形成など様々な慢性疾患において慢性炎症の関与が示唆されている。コリンエステラーゼ阻害薬のもつ抗炎症・抗酸化作用が他の慢性疾患の治療へも応用できる可能性が有り、今後の検討が必要と考えられる。

(2) コリンエステラーゼ阻害薬が血管新生へ及ぼす影響の検討。

【結果】8週令のC57BL/6マウスの一側の大動脈を結紮し、下肢虚血モデルを作製した。ドネペジルおよびフィゾスチグミンの投与はレーザードップラー法により評価した虚血下肢の血流回復を抑制した。

(下図参照)



同じモデルにおいて、ニコチンの投与はわずかに血流回復を促進し、バタネコールの投与は強く血流回復を抑制したことから、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬による血流回復の抑制は、アセチルコリンムスカリニック受容体の活性化を介したものと考えられた。内皮細胞の免疫染色により検討した2週間後の虚血下肢の筋肉内毛細血管密度は、血流のデータとほぼ一致しており、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬投与により低下していた。

ドネペジルを投与されたマウスの虚血下肢ではvascular endothelial growth factor (VEGF)とinterleukin (IL)-1 β の発現が低下していた。また蛋白レベルでも発現低下が確認された。下肢虚血モデルにドネペジル投与と同時にIL-1 β を筋肉内注射すると、ドネペジルによる血流回復の低下、虚血下肢の筋肉内毛細血管密度の低下、VEGFの発現低下が改善した。

C2C12筋芽細胞を低酸素(1%O₂)に12時間暴露するとIL-1 β mRNAの発現が誘導された。アセチルコリンはこのIL-1 β の誘導を抑制した。アセチルコリンによる抑制はアトロピンで解除されたが、メカミラミンでは解除されなかったため、ムスカリニック受容体を介する事が示唆された。またPI3-kinaseの阻害薬であるLY294002も低酸素によるIL-1 β mRNAの発現誘導を阻害した。低酸素暴露はC2C12細胞のAktを活性化し、アセチルコリンはAkt活性化を抑制した。マウスの虚血肢ではAktが活性化されていたが、ドネペジルの投与によりAkt活性化が抑制された。

【考察】本研究により、コリンエステラーゼ阻害薬による薬理的な迷走神経刺激は虚血下肢におけるIL-1 β の発現抑制によるVEGFの産生減少を介して血管新生を抑制することが明らかとなった。培養細胞を用いた検討からは、アセチルコリンが筋肉細胞のAktのリン酸化を抑制するためにIL-1 β の発現が抑制されると考えられた。

虚血下肢の血流回復の低下や、低酸素によるIL-1 β 誘導の抑制はいずれもムスカリニック受容体を介する効果と考えられた。したがって、 α 7nAChRを介するいわゆるコリン作動性抗炎症性経路を介していない可能性が考えられる。

また、下肢筋肉への迷走神経の支配は知られておらず、アセチルコリンがどの細胞あるいは臓器に由来するのかについて更なる検討が必要と考えられた。

粥状動脈硬化病変における血管新生はプラークの不安定化に寄与すると考えられている。ドネペジルの血管新生抑制効果が動脈硬化症を有する患者のイベントにどのような影響を与えるかについては臨床的な研究が必要であるが、コリンエステラーゼ阻害薬が新たな動脈硬化治療薬となる可能性が示唆される。

予備的な実験において、ドネペジルがマウスの背部に移植した悪性黒色腫細胞の増殖、腫瘍中の血管新生を抑制するとの結果を得ており、コリンエステラーゼ阻害薬は血管新生阻害薬として様々な疾患の治療へ応用できる可能性がある。

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2件)

- (1) Miyazaki R, Ichiki T, Hashimoto T, Ikeda J, Kamiharaguchi A, Narabayashi E, Matsuura H, Takeda K, Sunagawa K.

Acetylcholinesterase Inhibitors Attenuate Angiogenesis. 査読有

Clin Sci (Lond). 2012;123::241-249

- (2) Inanaga K, Ichiki T, Miyazaki R, Takeda K, Hashimoto T, Matsuura H, Sunagawa K.

Acetylcholinesterase inhibitors attenuate atherogenesis in

apolipoproteinE-knockout mice. 査読有
Atherosclerosis. 2010;213:52-58

[学会発表] (計6件)

- (1) Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2010 Scientific Sessions (2010 4/8-4/10, San Francisco, California, USA)

Ichiki T, Sunagawa K

Cholinesterase inhibitor attenuates atherogenesis in apolipoprotein E knockout mice through anti-oxidant and anti-inflammatory effects.

- (2) 19th International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society (2010 9/23-26, Fukuoka, Japan)

Ichiki T, Inanaga K, Miyazaki R, Sunagawa K.

Anti-atherogenic and anti-angiogenic effect of cholinesterase inhibitors.

- (3) 60th Annual Scientific Sessions of American

College of Cardiology (2011 4/2-4/5, New Orleans, Louisiana, USA)

Ichiki T, Sunagawa K

Anti-atherogenic and anti-angiogenic effects of donepezil: a drug for Alzheimer's disease

- (4) 第43回日本動脈硬化学会 (2011、7月15、16日、札幌市)

Toru Hashimoto, Toshihiro Ichiki

Pharmacological activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.

- (5) 第59回日本心臓病学会学術集会 (2011年9月23-25日、神戸市)

市来俊弘、砂川賢二

アルツハイマー病治療薬のドネペジルは血管新生と腫瘍形成を抑制する。

- (6) 第76回日本循環器学会総会 (平成24年3月16-18日、福岡)

Toshihiro Ichiki, Kenji Sunagawa

Role of Acetylcholinesterase in Atherogenesis and Angiogenesis

[図書] (計0件)

[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

http://www.med.kyushu-u.ac.jp/cardiol/3_shinkekkan/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市来 俊弘 (ICHIKI TOSHIRO)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：80311843

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

武田宏太郎 (TAKEDA KOTARO)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：50467908