

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591058

研究課題名(和文)慢性心不全における交感神経活動活性化機序としての脳内アストロサイト異常解明

研究課題名(英文)Assessment for abnormality of astrocyte in the sympathoexcitation of chronic heart failure

研究代表者

岸 拓弥(KISHI, Takuya)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70423514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目標は、慢性心不全における過剰な交感神経活動の機序として、脳内アストロサイトの役割に着目することであった。平成24-25年度に脳延髄交感神経中枢の神経細胞ではなくアストロサイトがアポトーシスにより減少することを示した。研究期間最終年度である平成26年度には、アストロサイトのみアンジオテンシンII受容体が発現しないマウスを作成し、心筋梗塞後心不全の予後が劇的に改善することを明らかにした。

3年間の本研究により、従来は明確ではなかった慢性心不全における脳内異常の首座が神経細胞ではなくアストロサイトのアンジオテンシンII受容体が重要である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In the present research, I focused on brain astrocyte in sympathoexcitation of chronic heart failure. In the first 2 years, I evaluated neuron and astrocytes in rostral ventrolateral medulla, which is known as a vasomotor center in brainstem. In myocardial infarction-induced heart failure mice, astrocytes, not neurons, were reduced accompanied with apoptosis mediated by angiotensin II receptor and oxidative stress. In final year, we made astrocyte-specific angiotensin II type 1 receptor deletion mice using Cre-Lox P system, and determined that the survival of myocardial infarction-induced heart failure mice was significantly improved in astrocyte-specific angiotensin II type 1 receptor deletion mice.

These obtained results indicated that angiotensin II at astrocytes, not neuron, mainly cause abnormal sympathoexcitation in chronic heart failure, and that angiotensin II at astrocytes could be a novel therapeutic target in the treatment for chronic heart failure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：循環器・高血圧 生理学 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢人口の増加に伴い循環器疾患が爆発的に増加する中で、最終型である慢性心不全が激増・重症化しており、様々な内服薬やデバイスの登場にも関わらず依然5年生存率が50%前後である。重症慢性心不全の発症進展においては、過剰かつ不適切な交感神経活動活性化が極めて重要であり、予後との相関も強く、 β 遮断薬の登場が劇的に長期予後を改善した。その交感神経活動は「脳」の出力であることから、「脳」内異常は心不全の原因であり重要な治療対象であるはずであるが、慢性重症心不全の治療は心臓・血管・腎臓を標的とした治療に留まっている。

(2) 本研究代表者は、これまでに交感神経活動中枢である脳の頭側延髄腹外側野に関する研究を行ってきた。頭側延髄腹外側野の神経活動がシナプスを介さずに直接脊髄後核に出力され交感神経活動となる。すなわち、「頭側延髄腹外側野の神経活動」＝「交感神経活動」である。その頭側延髄腹外側野において、交感神経活動を活性化する最大の要素がアンジオテンシンIIタイプI受容体を介して産生される酸化ストレスによるアポトーシスであることを示した(Kishi T. *Circulation* 2004, *Hypertension* 2010)。頭側延髄腹外側野でのアポトーシスは、神経活動を減少させ交感神経活動を低下させると予想したが、実際には頭側延髄腹外側野でのアポトーシスは交感神経活動を活性化した。

(3) そこで、本研究代表者は、神経細胞ではなくアストロサイトに着目した。脳を構成する大部分は神経細胞ではなくアストロサイトであり、近年その機能的な重要性、特に神経細胞保護作用が注目されている。すなわち、アストロサイトは神経細胞に対し抑制的に作用しており、頭側延髄腹外側野においてアストロサイトがアポトーシスで減少することで、神経細胞が異常発火を起し交感神経活動が活性化するのはという着想に至った。本研究代表者は、すでに、交感神経活性化型高血圧ラットの頭側延髄腹外側野において神経細胞ではなくアストロサイトが減少していることに加え、脳質周囲組織から採取した神経幹細胞から選択的分化培養した自家アストロサイトを用いた頭側延髄腹外側野への自家アストロサイト移植によりアストロサイトを増加させることで、交感神経活性化型高血圧ラットの交感神経活動を強力かつ持続的に抑制できることを明らかにした(2010年米国心臓協会学術集会以て発表)。これらの経緯から、頭側延髄腹外側野におけるアストロサイトのアポトーシスによる減少が慢性心不全における交感神経活動活性

化の重要な機序である可能性を考えた。脳によって調節されている交感神経活動が過剰かつ不適切に活性化していることが慢性心不全の重要な病因であるにもかかわらず脳は慢性重症心不全の治療においてターゲットになっていない。それは、その脳内機序が十分に解明されていないからである。本研究により慢性心不全における交感神経活動活性化の新たな機序が明らかになれば、十分な交感神経活動抑制から画期的な慢性心不全予後改善へとつながる「脳をターゲットにした慢性心不全治療」への基盤となることが期待される。

(4) 本研究のような脳をターゲットにした慢性重症心不全治療は基礎研究・臨床ともに存在しない。交感神経活動活性化の中枢性機序に関しては、本研究代表者を含めて研究が行われているが、アストロサイトに着目した研究は研究開始当初には存在しない。

2. 研究の目的

本研究は、交感神経活動調節異常である慢性心不全に対し、交感神経活動を規定している脳内異常として神経細胞ではなくアストロサイトに着目し、脳延髄交感神経活動中枢におけるアストロサイトの異常が過剰な交感神経活動の原因となっているかどうかを明らかにして、「慢性心不全は脳内アストロサイト異常による交感神経調節異常疾患」という概念から「脳を標的とした画期的心不全治療開発」へとつなげることが目的である。

3. 研究の方法

(1) 慢性心不全モデルラットの脳延髄交感神経中枢におけるアストロサイトの評価
慢性心不全モデル→冠動脈結紮による心筋梗塞心不全ラット
心不全の評価→心エコーによる左室径および収縮能評価・カテーテルによる左室内圧測定・心臓および肺重量測定・尿中カテコールアミンによる交感神経活動評価
脳延髄交感神経中枢におけるアストロサイトの評価→神経細胞およびアストロサイトの免疫染色(アストロサイト数の評価)、TUNEL染色および活性化caspase-3との二重染色により、アポトーシスの細胞別局在性を評価する。摘出した脳延髄交感神経中枢組織におけるcaspase-3活性測定、脳延髄交感神経中枢におけるアストロサイトの慢性心不全の程度・時間経過との関係も検討

(2) 脳スライス標本を用いた脳延髄交感神経中枢の神経活動に対するアストロサイトの影響

慢性心不全モデル→冠動脈結紮による心筋梗塞心不全ラット

自家アストロサイト作成→側脳室周囲より採取した組織から neurosphere 法により神経幹細胞を抽出し、BMP 2 と LIF を添加して培養し、アストロサイトに選択的分化誘導する (Adachi N, et al. *J Neurosci Res.* 2005) 脳延髄スライス標本作成

→・延髄スライスの神経細胞活動記録 (パッチクランプ法)

・自家アストロサイトを延髄スライスに添加することによる神経細胞活動の変化を観察

(3)慢性心不全モデルラットに対する脳延髄交感神経活動中枢へのアストロサイト自家移植の心不全・交感神経活動・生命予後改善への効果を検討

慢性心不全モデル→冠動脈結紮による心筋梗塞心不全ラット

血圧・心拍数測定→腹部大動脈に挿入したカテーテルと接続して腹腔内に植え込んだ送信機によるラジオテレメトリーシステムによる、無麻酔覚醒下での連続測定

自家アストロサイト作成

脳延髄交感神経中枢へのアストロサイト自家移植→麻酔下で延髄背部から脳延髄交感神経中枢にガラスマイクロピペットを挿入し、自家アストロサイトを注入

心不全の評価→心エコーによる左室径および収縮能評価、カテーテルによる左室内圧測定、心臓および肺重量測定

交感神経活動評価→尿中カテコールアミン測定

生命予後評価→予後曲線の作成

死亡原因の評価摘出した心筋の組織学的評価 (繊維化の程度)

(4)改変アストロサイト移植を用いたアポトーシスの原因・心不全への効果の機序解明

改変アストロサイト作成→自家アストロサイト作成において、選択的分化培養を行う際に、抗酸化ストレス酵素 (CuZn-SOD, MnSOD) や神経保護因子 (BDNF) を過剰発現させたり、アポトーシスを誘導する酵素 (caspase-3) を SiRNA を用いて knock down したアストロサイトや、酸化ストレス産生系や caspase-3 を過剰発現しアポトーシスを起こしやすくしたアストロサイトを作成。この改変アストロサイトを用いた脳延髄交感神経中枢への自家アストロサイト移植を行い、慢性心不全モデルの心不全・交感神経活動・生命予後がどのように変化するかを評価することで、心不全における脳延髄交感神経中枢でのアストロサイトのアポトーシスの機序の検討を行う。さらに、アストロサイトにおけるアンジオテンシン II タイプ 1 受容体を knock

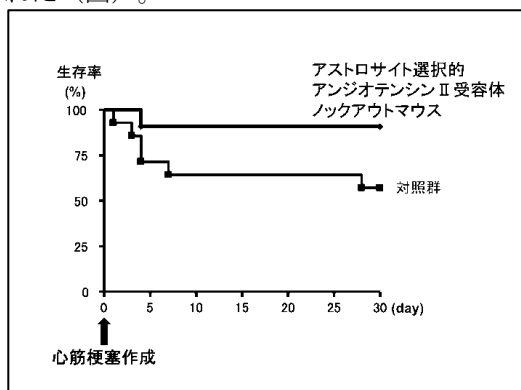
down (Cre-Lox P システムを用いる) したマウスを作成し、アストロサイトでのみアンジオテンシン II タイプ 1 受容体を阻害した場合の変化を観察し、アストロサイトのアンジオテンシン II タイプ 1 受容体の役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1)平成 24 年度には、心筋梗塞後慢性心不全モデルラットの脳延髄交感神経中枢において、神経細胞ではなくアストロサイトがアポトーシスにより減少することを示した。その変化は心筋梗塞作成 2-3 日後には認められ、持続的であることを確認した。また、その際に正常のアストロサイトでは一切発現が認められないアンジオテンシン II タイプ 1 受容体が、心筋梗塞後心不全でアストロサイトにおいて増加していることも確認できた。また、側脳室より採取分離した自家神経幹細胞から選択的分化培養による自家アストロサイト作成も行った。

(2)平成 25 年度には、実際に冠動脈結紮による心筋梗塞心不全モデルラットの脳延髄交感神経中枢に自家アストロサイトを注入し、交感神経の大幅な低下と生命予後の改善を認めた。しかし、注入したアストロサイトが、生理的なアストロサイトとは長期的な経過が異なる細胞となっており、この結果がアストロサイトを増やしたことによる効果とは言えない。また、「脳スライス標本を用いた脳延髄交感神経中枢の神経活動に対するアストロサイトの影響」については、安定した電位の記録ができず、アストロサイト自体の電気活動が静的である可能性があり、十分な結果をえるには至らなかった。

(3)平成 26 年度は、アストロサイトに angiotensin II 受容体を発現できないように Cre-LoxP システム (GFAP-Cre マウスと angiotensin II type 1 receptor-LoxP マウスの交配により作成) を用いて作成したマウスに心筋梗塞誘発性慢性心不全を作成し、コントロール群に比し明らかに脳内酸化ストレスの減少と交感神経活動の適正化が得られ、その結果として劇的な心不全予後改善を得られ、*Am J Physiol* に論文が採択・掲載された (図)。



3年間の本研究により、従来は明確ではなかった慢性心不全における脳内異常の首座が神経細胞ではなくアストロサイト、さらにはアストロサイトのアンジオテンシン II 受容体が重要である可能性が示された。

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 1 件)

Isegawa K, Hirooka Y, Katsuki M, Kishi T, Sunagawa K. Angiotensin II type 1 receptor expression in astrocytes is upregulated leading to increased mortality in mice with myocardial infarction-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307: H1448-H1455, 2014. (査読あり)
DOI: 10.1152/ajpheart.00462.2014

[学会発表] (計 5 件)

① 岸 拓弥.

脳内アンジオテンシン II 受容体が高血圧の原因であり未到達治療目標である(招待講演).

第 50 回高血圧関連疾患モデル学会学術集会

2014 年 12 月 6 日、和歌山県立医科大学 生涯研修センター (和歌山県和歌山市)

② 岸 拓弥.

Heart Failure as a Dysfunction of Dynamic Circulatory Homeostasis Mediated of Brain Astrocyte Just Like Central Processing Unit (招待講演).

第 18 回日本心不全学会学術集会

2014 年 10 月 12 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

③ 岸 拓弥.

循環中枢異常と自律神経変調がもたらす循環器疾患 (招待講演).

第 66 回日本自律神経学会総会

2013 年 10 月 25 日、愛知県産業労働センターウイंकあいち (愛知県名古屋市)

④ 岸 拓弥.

Hypertension: Pathophysiology and Therapy (Invited Lecture).

第 35 回国際生体医工学会

2013 年 7 月 4 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

⑤ 岸 拓弥.

脳内 neuron-astrocyte uncoupling による交感神経調節異常 (招待講演).

第 90 回日本生理学会

2013 年 3 月 29 日、タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

[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]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸 拓弥 (KISHI, Takuya)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 70423514

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし