

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700754

研究課題名(和文) 運動習慣と心肥大の形成に関する脳内因子の解明

研究課題名(英文) Establishment of neural factor for regulating exercise activity and cardiac hypertrophy

研究代表者

森島 真幸 (Morishima, Masaki)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40437934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々が構築した世界初の高自発運動モデル動物SPORTSを実験のツールとして用い、運動習慣の制御機構だけでなく、心筋肥大の形成機構を同時に解析することを本事業の目的とした。SPORTSラットにおいては、運動による血圧増加を伴わず生理的な刺激による心筋の成熟機構とは異なる機序で心筋肥大が形成されていることが判明した。さらに、脳内モノアミンは運動習慣の制御のみならず、心拍数制御や心筋の肥大形成に関与することで、自発運動に適応する心臓循環機能を獲得することに貢献する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established a new animal model called SPORTS rats. The aim of this study was to investigate the role of the L-type Ca^{2+} channel in cardiomyocytes and its relation with intracellular Ca^{2+} -dependent signalings in cardiac adaptation responding to high physical activity. Injection of Ca^{2+} channel antagonist verapamil markedly decreased wheel-running activity with a reduction of heart rate in SPORTS rats. In isolated neonatal rat cardiomyocytes from SPORTS rats, spontaneous beating rate, L-type Ca^{2+} current, and the expression of its mRNAs were significantly higher than those in control rat. Phosphorylation of CREB and Akt were significantly elevated in SPORTS rat myocytes in the basal condition. These results suggest that phosphorylation of the CREB via activation of PI3K/Akt signaling pathway in SPORTS rats positively regulates the L-type Ca^{2+} channel expression, which is responsible for the enhancement of physiological hypertrophy and chronotropy in the heart.

研究分野：運動生理学

キーワード：脳内モノアミン 心肥大 運動習慣 自発運動

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病を引き起こす負の要因として、不適切な食習慣による肥満や高脂血症の重要性はこれまで指摘され、広く受け入れられているが、逆に、生活習慣病を予防あるいは改善する正の要因としての運動習慣をもたらす個体側因子の研究は少ない。我々は個人々の生活習慣に遺伝的要素が関与する可能性があると考え、自発的に高い走行運動を行うモデルラット SPORTS (Spontaneously Running Tokushima Shikoku; Wistar 系) の近交系 (遺伝子バックグラウンドが均一) を世界で初めて確立し、これを用いて運動習慣を規定する脳内因子、あるいはその分子基盤について解明してきた (Morishima et.al, *Life Sci.* 2005)。SPORTS ラットは生まれつき強い運動意欲を有しており、同系の対照ラットに比べ、自発的回転かご運動において約 10 倍の走行量を示す。私は、自発的回転かご運動は脳内モノアミン動態の変化 (モノアミン酸化酵素 A の活性低下) に起因することを発見し報告してきた (Morishima et.al, *Neuropsychopharmacology.* 2006)。

さらに、回転かご運動のできない安静飼育状態の SPORTS ラットは、運動を行っていないにも関わらず心筋収縮能が亢進し、対照ラットに比べ明らかな心肥大がみられ、心肥大のマーカー分子 (ANP, BNP) の発現も上昇していることを発見し報告してきた (2010 年国際心臓病研究学会にて発表)。通常、適度な運動は血圧を上昇させ心筋を生理的に肥大させるため、心臓は持続的な運動負荷に耐えて血行動態を維持できる状態となる。しかし、不思議なことに我々が構築した SPORTS ラットでは、運動による血圧増加を伴わず、生理的な刺激による心筋の成熟機構とは異なる機序で心筋肥大が形成されていた。これまでに、運動を介さない脳内因子による心肥大形成メカニズムについては報告がなくその機序についてもあまりよく知られていない。

2. 研究の目的

本研究は、「脳内モノアミンは運動習慣と心筋肥大を同時に制御する中枢性の因子 (脳内因子) であり、それによって運動を介さなくとも心肥大が引き起こされるのではないか」という仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、SPORTS ラットの脳内モノアミンバランスが心臓支配自律神経活動に及ぼす影響について、テレメトリー埋め込み法による心電図記録、及び心拍変動スペクトル解析により評価する。心電図記録と縦列して、脳灌流を行い脳内モノアミン放出量を定量する。我々の研究からすでに分かっている細胞外モノアミン濃度を各種薬剤により再現した際の心臓自律神経活動を解析することで、脳内モノアミン動態と心臓循環調節機構

との関わりが把握できる。さらに、モノアミン自体あるいはそのアナログ (拮抗薬、トランスポーター阻害薬など) や交感神経遮断薬 (α 遮断薬、 β 遮断薬) をラット脳内へ直接投与し、自発運動量の変化と心拍数、心臓自律神経活動を解析することで心機能異常を伴わない脳内モノアミンによる運動制御機構と心拍数制御のシグナル伝達経路を同定する。

(1) 脳内モノアミン量の変化が自発運動、心拍数、及び心臓自律神経活動に及ぼす影響。対照ラットの腹腔内に各種薬剤 (アドレナリン α 遮断薬、 β 遮断薬、モノアミン等) を投与し、中枢及び末梢におけるモノアミン構成を再現あるいは変化させた際のラットの心電図、及び自発運動量を解析する。得られた心電図波形を用いて心拍変動解析を行い、心臓自律神経活動の異常を引き起こさない脳内分子をある程度同定する。さらに、脳内モノアミン定量により得られた結果を踏まえ、特徴ある変動を示すモノアミンを中心にそれぞれ、あるいはそのアナログ、拮抗薬などを SPORTS 及び対照ラットの脳内局所に直接投与し、心電図と走行距離の変化を観察する。

(2) 自発運動に対する心筋の分子適応機構の解析。安静群及び自発運動群の SPORTS ラット及び対照ラットの心筋を採取した後、RNA やタンパクを抽出し、心筋の構造的、あるいは電気的リモデリングにかかわるタンパク (イオンチャネル、細胞内キナーゼ、転写因子等) の pathway 解析を Bioplex や real-time PCR 法、Western blot 法により行う。心筋肥大の形態学的評価は、HE 染色法あるいはマッソン・トリクローム染色により行う。

(3) DNA マイクロアレイを用いた心臓遺伝子発現の解析。

脳内モノアミン代謝、及び心拍数制御の上流あるいは下流に位置する遺伝子発現を網羅的に解析するため、SPORTS ラットと対照ラットの脳、及び心臓から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行う。マイクロアレイ解析により得られる両ラット間の遺伝子発現の差異を整理し、SPORTS ラット脳内モノアミンの分子制御機構、及び自発運動に与える影響について検討する。

4. 研究成果

(1) 脳海馬マイクロダイアリスの結果、SPORTS ラットのモノアミン (ノルエピネフリン) 放出量は、対照ラットに比べ有意に上昇しており、これにより自発運動が誘発されている可能性が示唆された。また、テレメトリー埋め込み法により安静時及び自発運動時の SPORTS ラット及び対照ラットの心電図を記録し、心拍変動スペクトル解析により心臓自律神経活動を比較することで、SPORTS ラットの心機能の評価を行った。

非運動環境下 (安静時) における SPORTS ラットの心電図解析の結果、SPORTS ラットは

対照ラットに比べ速い心拍を示し、著名な心肥大を呈することが判明した。また、心電図データを用いた心拍変動解析により、SPORTS ラットの心拍数の増加に伴い心臓交感神経活動が亢進しており、その際の血中エピネフリン濃度は著著に増加していることが確認された。以上の結果より、SPORTS ラットの高運動性基質は、安静時の交感神経機能の亢進により規定されており、安静時における速い心拍が原因となり心肥大を呈している可能性が考えられた。

(2)対照ラットの腹腔内に各種薬剤(α 遮断薬、 β 遮断薬、モノアミン等)を投与し、中枢及び末梢におけるモノアミン構成を再現あるいは変化させた際のラットの自発運動量や心臓自律神経活動を解析した。対照ラットにモノアミン酸化酵素 A (MAOA) 阻害薬を投与し脳海馬モノアミン量を定量したところ、SPORTS ラットと同程度に海馬ノルエピネフリン放出量が増加し、自発運動量や心拍数の増加が認められた。また、心拍変動解析の結果、MAOA 阻害薬投与ラットでは、SPORTS ラットと同様に心拍数の増加の認められた夜間活動時間帯で交感神経活動指標である L/H 比が有意に上昇していることが判明した。以上の結果より、ラットの自発運動量は脳海馬におけるノルエピネフリン放出量を変化させることで調節されており、また心拍変動を増加させることにも貢献していることが示唆された。

対照ラット脳海馬に、脳灌流用プローブを用いて各種薬剤(α 遮断薬、 β 遮断薬)を拡散投与させた結果、 α_1 遮断薬である prazosin、及び α_2 遮断薬 yohimbine 投与により自発運動量の顕著な抑制が認められた。 β 遮断薬投与はラットの自発運動量に影響を及ぼさなかった。さらに、 α_2 刺激薬である clonidine 投与によってもラットの自発運動量は顕著に抑制された。このため、SPORTS ラット及び対照ラットの脳(海馬、大脳、小脳、脳幹)における α_2 受容体発現量を Western blot 法により定量した結果、SPORTS ラット脳海馬では対照ラットに比べ、 α_2A 受容体タンパク発現量が有意に低下していることが判明した。以上の結果より、SPORTS ラット脳海馬におけるノルエピネフリン代謝亢進には、 α_2A 受容体タンパク発現量の低下が起因しており、これが高運動性を誘発する一因となっている可能性が示唆された。

SPORTS ラットの心臓組織の形態を観察するため、脱血、灌流固定後にパラフィン切片を作成し HE 染色とマッソン・トリクローム染色を行った。SPORTS ラットの心筋において、筋原線維の肥大が顕著に認められたが、線維化は両ラット有意な差は認められなかった。また、SPORTS ラットの単離心筋においては、生理的心肥大に関わる細胞内シグナル分子(Akt, PI3K, CREB)のリン酸化が亢進しており、これにより心筋 L 型カルシウムイオン

チャンネル(Cav1.2)の発現が顕著に増大していることが判明した。ラット心筋におけるこれらの因子の発現増加は、心血管に対し保護作用を示す可能性が示唆された。

(3)SPORTS ラットと対照ラットから心筋と脳(海馬、線条体)を採取し、RNA 抽出後 DNA マイクロアレイ解析を行い遺伝子発現の差異を網羅的に解析した。SPORTS ラットの脳海馬ではトランスサイレチンや catechol-O-methyl transferase(COMT)などの脳内カテコールアミンの制御因子の遺伝子発現が有意に低下し、一方、神経栄養因子(NGF, NT-3, BDNF)は有意に発現が亢進していることがわかった。心筋(心房、心室)においては、細胞内カルシウム制御因子(L 型 Ca^{2+} チャンネルや Na^+/Ca^+ exchanger)の発現が有意に増加していた。これらの遺伝子発現変化は通常であれば自発運動後に起こるものであると考えられているが、SPORTS ラットにおいては生まれつき自発活動量が高いため脳海馬や心臓においてこれらの遺伝子発現が変化していることがわかった。

本事業により、脳内モノアミンは運動習慣の制御のみならず、心拍数制御や心筋の肥大形成に関与することで、自発運動に適応する心臓循環機能を獲得することに貢献する可能性が示唆される。また、心拍数制御因子と脳内モノアミンが相互作用することによっても運動習慣が規定される可能性も示唆される。

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5件)

1. Shimaoka T, Wang Y, Morishima M, Miyamoto S, Ono K. Hypomagnesemic down-regulation of L-type Ca_{2+} channel in cardiomyocyte as an arrhythmogenic substrate in rats. *Pathophysiology*. 22(2):87-93, 2015 (査読有)

2. Morishima M, Iwata E, Nakada C, Tsukamoto Y, Takanari H, Miyamoto S, Moriyama M, Ono K. MicroRNA-dependent regulation of K^+ channel remodeling in human cardiomyocytes with persistent atrial fibrillation. *Jap J Electrocardiol*. 34 Suppl(3), 319, 2014 (査読有)

3. Morishima M, Osagawa S, Inagaki T, Tsuchimochi H, Shirai M, Ono K. Role of T-type Ca^{2+} channel expression in cardiomyocytes exposed to hypoxic condition in the heart. *J Physiol Sci*. 64(1), 128, 2014 (査読有)

4. Mawatari K, Yoshioka E, Toda S, Yasui S, Furukawa H, Shimohata T, Ohnishi T, Morishima M, Harada N, Takahashi A, Sakaue H, Nakaya Y. Enhancement of endothelial function inhibits left

atrial thrombi development in an animal model of spontaneous left atrial thrombosis. *Circ J*. 78(8): 1980-1988, 2014 (査読有)

5. Ohnishi T, Hisaoka F, Morishima M, Takahashi A, Harada N, Mawatari K, Arai H, Yoshioka E, Toda S, Izumi K, Nakaya Y. Establishment of model of Spontaneously-Running- Tokushima-Shikoku rats with left atrial thrombosis. *J Toxicol Pathol*: (1):51-6, 2014 (査読有)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Haruyama T, Morishima M, Takanari H, Ono K. Role of apelin in human atrial tissue with persistent atrial fibrillation. 第 92 回日本生理学会大会 神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2015.3.21-23

2. Takahashi M, Takanari H, Morishima M, Ono K. Influence of high-cholesterol on arrhythmogenicity in mouse atrium. 第 92 回日本生理学会大会 神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2015.3.21-23

3. 森島真幸, 岩田英理子, 中田知里, 塚本善之, 高成広起, 宮本伸二, 守山正胤, 小野克重. 心房細動におけるイオンチャネルリモデリングを制御する microRNA. 第 65 回西日本生理学会 琉球大学(沖縄県那覇市) 2014.10.24

4. 馬 芳芳, 増田季美子, 森島真幸, 高成広起, 小野克重. 新生獣ラット心室筋の内向き整流カリウムチャネルに対するペプリジルの長期作用. 第 24 回日本病態生理学会大会 北九州国際会議場(福岡県北九州市) 2014.8.9

5. Morishima M, Iwata E, Nakada C, Tsukamoto Y, Takanari H, Miyamoto S, Moriyama M, Ono K. MicroRNA-dependent regulation of K⁺ channel remodeling in human cardiomyocytes with persistent atrial fibrillation. 第 29 回日本不整脈学会 / 第 31 回日本心電学会合同学術大会 東京プリンスホテル(東京都港区) Young Investigator's Award 優秀賞受賞. 2014.7.22-25

6. 森島真幸, 岩田英理子, 中田知里, 塚本善之, 高成広起, 宮本伸二, 守山正胤, 小野克重. 心房細動ヒト心筋で異常発現する microRNA の機能解析. 第 13 回九州脳・高血圧・循環制御研究会 ホテル日航博多(福岡県福岡市) 2014.7.19

7. Morishima M, Osagawa S, Inagaki T, Tsuchimochi H, Shirai M, Ono K. Role of T-type Ca²⁺ channel expression in cardiomyocytes exposed to hypoxic condition in the heart. 第 91 回日本生理学会大会 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市) 2014.3.16-18

8. Masuda K, Wang Y, Ma FF, Morishima M, Takanari H, Ono K. Testosterone abbreviates QT intervals and up-regulates KvLQT1 channel in cardiomyocytes through genomic pathway. 第 91 回日本生理学会大会 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市) 2014.3.16-18

9. 森島真幸, 藤田崇史, 小野克重. 脳由来神経栄養因子 BDNF とその受容体 TrkB の低酸素環境下心筋における発現動態. 第 23 回日本病態生理学会 東京慈恵会医科大学(東京都港区) 2013.8.3

〔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
<http://www.med.oita-u.ac.jp/pathophysiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森島 真幸(MORISHIMA MASAKI)
大分大学・医学部・病態生理学講座・助教
研究者番号: 40437934

(2) 研究分担者
無し

(3) 連携研究者
無し