

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460333

研究課題名(和文) 心筋細胞ACh産生系制御による代謝リモデリング介入効果についての基盤的研究

研究課題名(英文) The study investigating the effects of non-neuronal cardiac cholinergic system on intervention of the metabolic remodelling

研究代表者

柿沼 由彦 (Kakinuma, Yoshihiko)

日本医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40233944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞みずからがもつACh産生システムであるNNCCS (non-neuronal cardiac cholinergic system)のin vivoにおける生理学的機能を、心室筋心筋細胞特異的にcholine acetyltransferase (ChAT)を発現させるChAT tgm (ChATトランスジェニックマウス)を作製し解析した。その結果、このシステムは心筋細胞の虚血耐性を亢進させ、心室筋における血管新生を促進し、エネルギー基質を糖利用にシフトさせる機能を持つことが明らかとなり、NNCCSは今後治療ターゲットとなることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In vivo biological functions of a non-neuronal cardiac cholinergic system (NNCCS) was investigated using the heart-specific ChAT tg mice (ChAT tgm), in which choline acetyltransferase (ChAT) gene was overexpressed under the control of an alpha MHC promoter. ChAT tgm showed comparable hemodynamic parameters and cardiac functions, compared with WT mice. ChAT tgm was resistant against myocardial infarction with a remarkably improved survival rate, more intact myocardium in the infarcted area as well as enhanced angiogenesis, and more glucose uptake in cardiomyocytes, compared with WT mice. Isolated ChAT tgm hearts showed a longer beating period even in the global ischemia and faster recovery of beating after ischemia canceled. These results suggest that NNCCS can be a therapeutic target against cardiovascular diseases.

研究分野：循環器内科学

キーワード：アセチルコリン 心臓 非神経性心臓コリン作動系

心筋細胞 ACh 産生系制御による代謝リモデリング介入効果についての基盤的研究

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞 ACh 産生系という概念は、研究代表者が 2009 年に FEBS J 2009;276:5111-5125 において提言し発表したものである。すなわち、心室筋細胞自らが ACh を産生しそれを細胞内に蓄え輸送するシステムを持つということ、このシステムはその後、a non-neuronal cardiac cholinergic system (NNCCS)または、最近では心筋における non-neuronal ACh (NNA)と呼ばれているものである。この NNCCS は、その後他の研究者によっても独立して 2009~2012 年の間に報告され、このシステムの存在については、ほぼコンセンサスが得られたものと考えられている (Auton Neurosci 2010, J Mol Cell Cardiol 2012, FASEB J 2013)。

問題は、この NNCCS がどのような生理的機能をもっているかという点であり、それについては研究代表者がこれまでに、主に in vitro 培養細胞等を用いた実験にて下記のことを明らかにしている。

1) NNCCS は心筋細胞におけるギャップ結合機能をつかさどるコネクシン蛋白の膜安定化および局在化に必須であり、NNCCS によりギャップ結合が正に制御を受けている (PLoS One 2012)

2) NNCCS による ACh はミトコンドリア機能を負に制御し、細胞酸素消費量を調節している (FEBS J 2009)。

3) NNCCS は細胞内 ATP 消費を抑制し、細胞内代謝におけるグルコース依存度を高める (PLoS One 2012)。

4) NNCCS はノルエピネフリンによる心筋細胞の細胞死を、その酸素消費量を抑制することで、抑止する (PLoS One 2012)。

5) 抗アルツハイマー薬ドネペジルは、心臓において NNCCS を活性化させ、心臓心室筋内 ACh 含量を増加させる (FEBS J 2009)。

6) ドネペジルは心臓心室筋のみならず、血管内皮細胞においても NNA を機能亢進させ、HIF-1 $\alpha$ 制御下の遺伝子群転写亢進を介して血管新生を促進させる (J Mol Cell Cardiol 2010)。

2. 研究の目的

しかし、研究背景においてあげられた

NNCCS の新規生理学的機能は、すべて培養細胞を用いた in vitro における知見に基づくものであり、in vivo においてこれらを証明した研究はこれまでに存在しない。また、我々が発見した NNCCS または心筋における NNA の機能を端的に示す in vivo モデル動物というものもこれまでに存在しない。

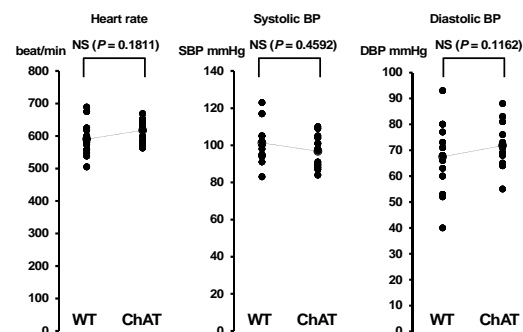
そこで本研究の目的は、この NNCCS 究極のモデル動物である心臓心室筋特異的 ChAT (ACh 合成酵素 choline transferase)トランスジェニックマウス (ChAT tgm) を作製し、そのフェノタイプを解析することで、NNCCS の生理学的機能について検討した。

3. 研究の方法

mChAT tgm の心筋梗塞モデルを作製し、その生存率・血行動態・心機能評価を野生型 WT マウスと比較した。心臓における各種蛋白発現・免疫組織学的評価を行った。各マウスからの心筋細胞を培養し、24 時間低酸素暴露を行いその細胞代謝・ATP 含量を WT と比較した。また心臓を単離しランゲンドルフ灌流心を用いて、global ischemia に対する影響を評価した。

4. 研究の成果

**【結果】 ChAT トランスジーンは心臓心室筋にのみ発現し、脳を含めた臓器においては発現を認めなかった**



$\alpha$ MHC をプロモーター、mChAT をトランスジーンとして、また IRES システム下に GFP 遺伝子を発現させ遺伝子導入細胞のみ GFP 陽性となるよう設計し、心室筋特異的 ChAT tgm を作製した。このマウスは解剖学的異常を認めず、妊孕性に問題なくメンデルの法則に従い、また寿命もほぼ野生型 (WT) と比較して差はなかった。

**【結果】 ChAT tgm は WT と同様の血行動態を示し、特に心拍数 HR においては両者に差を認めなかった**

収縮期・拡張期血圧、心拍数いずれも WT と同等であった。

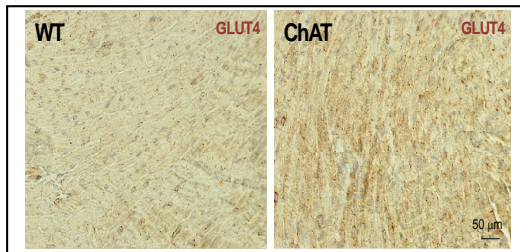
Echocardiographic parameters in WT and ChAT tgm

	WT (n=9)	ChAT (n=10)	
IVSTd (mm)	0.83 ± 0.07	0.76 ± 0.05	NS
LVDd (mm)	3.95 ± 0.21	4.32 ± 0.09	NS
LVDs (mm)	2.89 ± 0.17	3.25 ± 0.28	P<0.05
LVPWd (mm)	0.68 ± 0.01	0.72 ± 0.06	NS
LVEDV (μL)	69.3 ± 8.8	76.2 ± 8.6	NS
EF	53.0 ± 1.5	49.7 ± 1.6	NS
FS	26.8 ± 0.9	25.1 ± 1.0	NS

さらに ChAT tgm の心機能も心臓超音波検査で評価する限り WT と同等であった。

**【結果】 ChAT tgm の心臓は WT と比べて質的にグルコース利用を促進する反応を示す**

ChAT tgm の心臓においては、HIF-1α 蛋白発現、Akt リン酸化、Glut 1&4 蛋白発現がいずれも増加していた。また、この tgm 由来の初代培養心筋細胞と WT の心筋細胞とを比べると、ミトコンドリア機能の指標である MTT 活性が低下しており、ミトコンドリア機能は WT と比べて抑制されていた。



心筋細胞における Glut4 免疫活性は ChAT tgm において上昇しており、細胞膜および細胞質に認められた。

**【結果】 ChAT 一過性強制発現 HEK293 細胞においては HIF-1α 蛋白発現が亢進し、一方 ChAT siRNA ノックダウン細胞においては、HIF-1α 蛋白は低下し ACh による HIF-1α 蛋白安定化が惹起された**

ChAT 強制発現系ではミトコンドリア機能が一部抑制され、かつ細胞内 ATP 含量は保存された

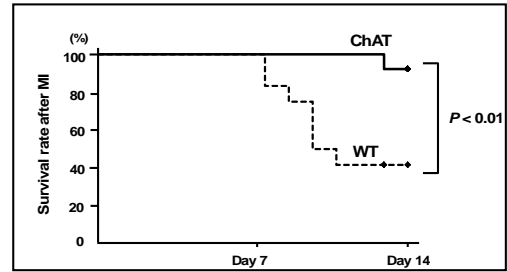
この結果により in vitro 同様の結果が in vivo でも認められた。このことは、心室筋という心臓臓器内での ACh 産生機能亢進により、その心筋細胞は HIF-1α 制御下に遺伝子発現が惹起されることが示唆された。

また、細胞内 ACh 産生を亢進させると、ミトコンドリア機能の一部抑制 (P<0.01) と、細胞内 ATP 含量の増加 (P<0.01) を認めた。

**【結果】 ChAT tgm は WT と比べて心筋梗塞後の生存は著しく改善された**

人工呼吸管理下での左冠動脈結紮による心筋梗塞では、梗塞後 2 週間での WT 生存率は

41.7% であるのに対して、ChAT tgm では 92.3% であり、2 倍以上の改善を認めた (P<0.01)。



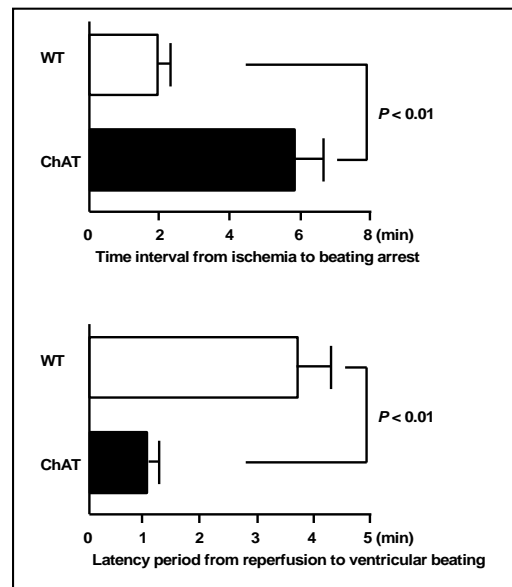
さらに、この時の心臓/体重比をみると ChAT tgm では 8.60 ± 0.58 であり、WT の 11.78 ± 0.94 mg/g と比べて有意に低下していた (P<0.05)。また、梗塞心筋における残存心筋量の程度は、ChAT tgm においてより多かった (30.99 ± 2.42% vs. 14.48 ± 0.74%, P<0.05)。

**【結果】 心筋梗塞後の心臓内血管新生は WT と比べて ChAT tgm において著明に亢進した**

vWF を用いて梗塞後の心臓壁における血管新生の程度を評価したところ ChAT tgm では WT と比べて著明に亢進していた (P<0.05)。梗塞前の vWF 陽性領域についても、WT と比べ ChAT tgm において有意に増加していた。

この所見は、ChAT tgm において梗塞サイズがより小さいこと (P<0.01) の原因因子と考えられた。つまり、梗塞領域に特に血管新生促進効果が強く ChAT tgm に認められたことが残存心筋量の多さにつながると考えられた。

**【結果】 単離心臓を用いたランゲンドルフ心では ChAT tgm の心臓でより虚血耐性が亢進していた**



それぞれから心臓を単離しランゲンドルフ還流装置に接続し還流し、その後還流を止め

ることで global ischemia に曝した場合、ChAT tgm では WT よりも約 3 倍長く拍動を続けていた。その後還流を再開すると、やはり ChAT tgm では WT よりも約 3.5 倍早く拍動を開始した。このことは ChAT tgm の心臓はより虚血耐性を獲得し、そのことが心機能保護にも関わっていることを示唆した。

#### 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 14 件)

Kakinuma Y. Future perspectives of a cardiac non-neuronal acetylcholine system targeting cardiovascular diseases as an adjunctive tool for metabolic intervention. *Int Immunopharmacol* 2015;29:185-188. 査読有  
DOI: 10.1016/j.intimp.2015.05.029.

Oikawa S, Mano A, Takahashi R, Kakinuma Y. Remote ischemic preconditioning with a specialized protocol activates the non-neuronal cardiac cholinergic system and increases ATP content in the heart. *Int Immunopharmacol*. 2015;29:181-184. 査読有  
DOI: 10.1016/j.intimp.2015.06.004.

Oikawa S, Mano A, Iketani M, Kakinuma Y. Nicotinic receptor-dependent and -independent effects of galantamine, an acetylcholinesterase inhibitor, on the non-neuronal acetylcholine system in C2C12 cells. *Int Immunopharmacol* 2015;29:31-35. 査読有  
DOI: 10.1016/j.intimp.2015.04.057.

Nemoto T, Kakinuma Y., Shibasaki T. Restraint-induced glucocorticoid receptor downregulation is dysregulated in high fat diet-fed rats

likely from impairment of miR-142-3p expression in the hypothalamus and hippocampus. *Am J Life Sciences* 2015;3:24-30. 査読有  
DOI: 10.11648/j.ajls.s.2015030302.15

Arikawa M, Kakinuma Y., Noguchi T, Sato T. Donepezil, Therapeutic Acetylcholinesterase inhibitor, prevents the progression of ventricular dysfunction by promoting myocardial glucose utilization in rat model of chronic heart failure following myocardial infarction. *Cardiol Pharmacol* 2014;3:121. 査読有  
DOI: 10.4172/2329-6607.1000121

Noguchi T, Kakinuma Y., Arikawa M, Okazaki K, Hoshino E, Iiyama T, Kubo T, Kitaoka H, Doi Y, Sato T. Donepezil can improve ischemic muscle atrophy by activating angiomyogenic properties of satellite cells. *Circulation J* 2014;78:2317-2324. 査読有  
DOI: 10.1253/circj.CJ-14-0095

Kakinuma Y. Nicotinic and non-nicotinic receptor-mediated mechanisms responsible for anti-atrophy effects in muscle. *Receptors & Clinical Investigation* 2014; 1: e286. 査読有  
<http://www.smartscitech.com/index.php/rci/issue/view/31>

Kakinuma Y. A concept of Non-neuronal cardiac cholinergic system *J Nippon Med Sch* 2014;81:296-297. 査読有

Oikawa S, Iketani M, Kakinuma Y. A Non-neuronal cholinergic system regulates cellular ATP levels to maintain cell viability. *Cell Physiol*

Biochem 34:781-789, 2014 査読有

DOI: 10.1159/000363042

Kakinuma Y, Noguchi T, Okazaki K, Oikawa S, Iketani M, Kurabayashi M, Furihata M, Sato T. Antimuscle atrophy effect of nicotine targets muscle satellite cells partly through an alpha7 nicotinic receptor in a murine hindlimb ischemia model. *Transl Res* 164: 32-45, 2014 査読有

DOI:10.1016/j.trsl.2014.02.005

Kakinuma Y, Okada S, Nogami M, Kumon Y. The human female heart incorporates glucose more efficiently than the male heart. *Int J Cardiol* 2013;168:2518-2521. 査読有

DOI:10.1016/j.ijcard.2013.03.016.

Kurabayashi A, Kakinuma Y, Morita T, Inoue K, Sato T, Furihata M. Conditional VHL gene deletion causes hypoglycemic death associated with disproportionately increased glucose uptake by hepatocytes through an upregulated IGF-I receptor. *PLoS One* 2013;8:e69139. 査読有

DOI:10.1371/journal.pone.0069139

Kakinuma Y, Okada S, Ikenoue N, Nogami M, Kumon Y. Estrogen is involved in improvement of impaired cardiac glucose uptake in cancer patients. *J Cardiol Cases* 2013;7:e24-e26. 査読有

DOI:10.1016/j.jccase.2012.09.009

Kakinuma Y, Tsuda M, Okazaki K, Akiyama T, Arikawa M, Sato T. Heart-specific overexpression of choline acetyltransferase gene protects murine heart against ischemia through hypoxi-inducible factor-1-related defense mechanisms. *J Am Heart Assoc*

2013;2:e004887. 査読有

DOI: 10.1161/JAHA.112.004887

PMID: 25391697

[学会発表](計10件)

柿沼 由彦、及川詩乃、眞野 あすか  
Remote ischemic preconditioning with a specialized protocol activates the non-neuronal cardiac cholinergic system and increases ATP content in the heart

第93回日本生理学会大会 札幌コンベンションセンター 北海道 3/22-24, 2016

根本 崇宏、柿沼 由彦

Elevation of blood pressure in F2 offspring of dams delivered from carbohydrate-restriction during pregnancy

第93回日本生理学会大会 札幌コンベンションセンター 北海道 3/22-24, 2016

洲鎌 秀永、柿沼 由彦

Chronic restraint stress triggers the dopaminergic and noradrenergic neurodegeneration-possible role of chronic stress in the onset of Parkinson's disease

第93回日本生理学会大会 札幌コンベンションセンター 北海道 3/22-24, 2016

柿沼 由彦

循環器領域における NNA (non-neuronal ACh)の関与の可能性

第9回運動循環器病学会 大田区産業プラザ Pio 東京 2/20, 2016

洲鎌 秀永、柿沼 由彦

Stress-induced microglial activation may be triggered by noradrenergic neurons

第92回日本生理学会大会 神戸コンベンションセンター 兵庫 3/21-3/23, 2015

柿沼 由彦

循環器領域における非神経性コリン作動系の病態への関与

第4回四国シンフォニー研究会 土佐ロイヤルホテル 高知 8/2-3, 2014

根本 崇宏、柿沼 由彦、芝崎 保

通常食及び高食塩負荷の低出生体重ラットでみられた血圧上昇と視床下部と心臓での Ucns mRNA 発現量の低下

第41回日本神経内分泌学会学術集会 都道府県会館 東京 10/31-11/2, 2014

根本 崇宏、柿沼 由彦、芝崎 保

拘束ストレス負荷による心および肝の  
IGF-1 発現量の変化  
第 87 回日本内分泌学会学術総会 福岡国  
際会議場・福岡サンパレス 福岡  
4/24-26, 2014

柿沼 由彦、津田 正之、秋山 剛、岡崎  
佳代、池谷 光江、及川 詩乃、佐藤 隆  
幸  
ストレス誘発性心筋症の新たな病態生理  
学的側面  
第 91 回日本生理学会大会 鹿児島大学郡  
元キャンパス・鹿児島 3/16-18, 2014

柿沼 由彦

たこつぼ心筋症と性差  
第 66 回日本自律神経学会総会 シンポジ  
ウム 2 ストレス応答と性差  
愛知県産業労働センターウイंकあいち  
名古屋 10/24-25, 2013

〔図書〕(計 1 件)

柿沼由彦

心臓の力 休めない臓器はなぜ「それ」を宿  
したのか  
ブルーバックス 講談社 ISBN-10:  
4062579294 2015 年 8 月 20 日発行

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿沼 由彦 (KAKINUMA YOSHIHIKO)

日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教  
授

研究者番号：40233944

(高知大学・教育研究部・准教授より異動)

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐藤隆幸 (SATO TAKAYUKI)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：90205930