

## 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 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590771

研究課題名（和文） たこつぼ心筋障害の成因と病態に関する実験モデル動物を用いた包括的検討

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of pathogenesis and etiology of Takotsubo Cardiomyopathy by use of experimental model animal

研究代表者：

上山 敬司 (TAKASHI UEYAMA)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50264875

研究成果の概要（和文）：たこつぼ心筋障害のメカニズムと病態を、ストレス負荷誘発モデル動物を用いて検討した。遺伝子群を網羅的に解析し、血管では $\alpha$ 刺激、心臓では $\beta$ 刺激による遺伝子レベルでの適応を明らかにした。扁桃体中心核と外側核は他の垂核や下位の視床や脳幹の脚傍核からの入力が集まること、内側核は視床下部の各垂核へ遠心性の出力を行っていることを明らかにした。ストレス→辺縁系→扁桃体→特に内側核→視床下部→自律神経系→心血管系→遺伝子応答という流れを示した。

研究成果の概要（英文）： We investigated the pathogenesis and etiology of Takotsubo Cardiomyopathy by use of stress-induced rat model. Activation of  $\alpha 1$ -adrenoceptor in the blood vessels or activation of  $\beta 1$ -adrenoceptors in the heart was mainly responsible for emotional stress-induced alteration of cardiac and vascular genes profiles. All amygdalid subnuclei receive psychological information from other limbic brain, while the lateral and central subnuclei receive peripheral and sensory information. Output to the hypothalamus and peripheral sympathetic system mainly originates from the medial amygdala.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 内科学一般（含 心身医学）

キーワード：ストレス、心身症、モデル動物、脳、心臓、網羅的発現解析、酸化ストレス

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ストレス応答は、個体・組織・細胞の各レベルで研究されている。細胞周囲の環境変化（熱、低酸素、活性酸素など）により細胞が直接影響を受ける場合と、脳を中心とした生体調節系、すなわち神経系・内分泌系を介して細胞に影響を与える場合があるが、そのいずれにおいても、細胞のストレス応答として *immediate early genes (IEG)* などの遺伝子発現の変化が見られる。細胞レベルの『ストレス』と心身医学での『ストレス』を統合的に理解するため、臨床像を忠実に反映した動物モデルを開発し、臨床ではできない侵襲を伴う実験的検討を行い、心（中枢神経系）と身体（内臓）において、細胞レベルにまで還元した研究系を構築し、心身症の理解を目指している。

(2) たこつぼ心筋障害は、我が国で見出され、世界的にも非常に注目されている。精神的ストレスが誘因で発症する例が多く、ほとんどの症例が高齢の女性であるが、その病因は不明である。私どもは、覚醒下のラットを仰臥位で拘束するストレス負荷（*immobilization stress : IMO*）で臨床所見が再現できること、 $\alpha\beta$ 遮断薬の投与で完全にストレスの影響を防止できること、エストロゲン補充でも改善されることを見出した。さらにそのメカニズムを探るため、中枢神経系および心臓で *IEG* 発現を指標に、細胞レベルでストレス応答を検討したところ、エストロゲン投与により、辺縁系など高次交感神経系の神経核および副腎、心臓で *IEG* 発現が低下すること、つまりストレス負荷による交感神経-副腎髄質系の過剰興奮を抑制すること、一方心臓では心房性ナトリウムペプチドや熱ショックタ

ンパクを増加させること、つまりエストロゲンは、神経系の過剰な興奮を抑制し、末梢でのカテコラミンの放出を抑制するとともに、心臓では心保護物質を増加させ、生体レベルのストレス応答を緩和する作用があることが示唆した。例えば、扁桃体内側核の神経細胞は、多シナプ斯的に末梢交感神経-副腎髄質系に投射し、ストレスで興奮し、エストロゲン受容体が高密度に存在する。これらの領域を破壊すれば、ストレス負荷による交感神経-副腎髄質系の過剰興奮を抑制でき、逆に刺激すれば、ストレス負荷と同様に、交感神経-副腎髄質系が過剰興奮し、過剰な心血管系の応答、カテコラミンの直接障害から心機能の低下が予想される。またエストロゲンがこの経路を制御することも予想される。

(3) さらに *IMO* 後、酸化ストレス関連遺伝子である *Hemeoxygenase 1 (HO-1)* や *Cyclooxygenase 2 (COX-2)* が心血管系にあるマクロファージで増加すること、 $\alpha\beta$ 遮断薬の投与で抑制できることを確認した。すなわち、精神的ストレスにより、大脳辺縁系-視床下部・循環中枢系-交感神経-副腎髄質系が興奮し、増加したカテコラミンが心血管系の細胞では酸化ストレスを引き起こし、たこつぼ心筋障害を発症すること、エストロゲンがこれらを緩和するが示唆される。

### 2. 研究の目的

ストレス負荷ではなく、中枢神経系の刺激やカテコラミンの投与により、たこつぼ心筋障害の新規のモデルを開発することによって、ストレス→中枢神経→交感神経系の過剰興奮が誘因という仮説をより明確に証明すること、および心血管系の細胞では酸化的ストレスが起こっていることを証明することである。

### 3. 研究の方法

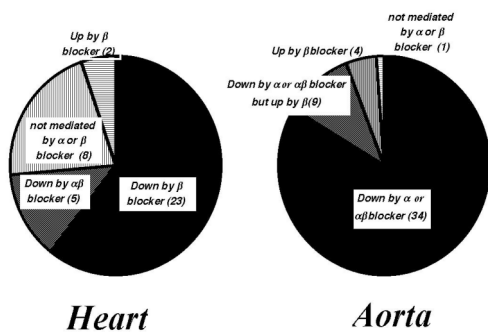
(1) 脳の特定の領域を破壊したラットにストレス負荷を与えて、左心室造影および心電図を検討し、自律神経機能を評価する。これにより、ストレスにより心不全を起こす脳内の責任領域を絞り込めると同時に、自律神経機能を評価する。

(2) トレーサー法で、脳の特定の領域の相互関係を検討し、ストレス応答の神経回路を明らかにする。

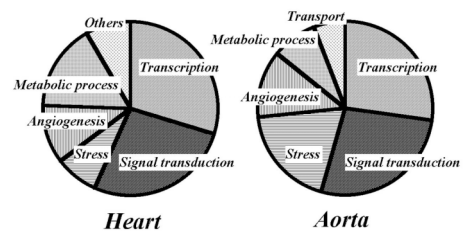
(3) Microarray 法を用いて、ストレスにより発現が変化する遺伝子群をスクリーニングし、特に酸化的ストレス関連遺伝子の変化を明らかにする。

#### 4. 研究成果

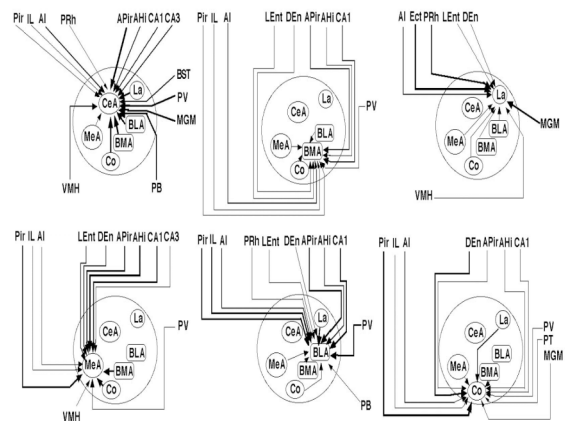
(1) ストレス負荷後のラットの心臓および大動脈のサンプルで、Microarray 法で発現が変化する遺伝子群を網羅的に解析し、擬陽性を除くため RT-PCR 法で選別し、さらに  $\alpha$  受容体遮断薬あるいは  $\beta$  受容体遮断薬前投与のサンプルでも解析した。心臓では主に  $\beta$  刺激により 37 種類の遺伝子が、血管では主に  $\alpha$  刺激により 48 種類の遺伝子発現が変化的ことが判明した。



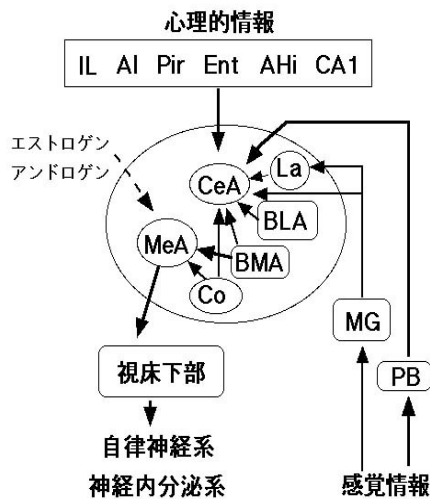
(2) これらは転写因子、シグナル伝達関連因子、代謝、血管新生、ストレス応答に関するものであり、これらのほとんどはストレスに対してその影響を減ずるように作用していることが報告されており、これらの遺伝子応答はストレスに対する適応応答と考えられる。



(3) また扁桃体や視床下部を中心としたストレス応答の神経回路の検討を続けていて、扁桃体の垂核の相互連絡や求心路、扁桃体から視床下部の諸核への投射を検討した。扁桃体の各垂核には、より上位の辺縁系、および視床、視床下部、脳幹からの入力があるが、垂核間で相違があること、扁桃体内での相互連絡にも特徴があることを明らかにした。



(4) 特に中心核と外側核は、他の垂核や下位の視床や脳幹の脚傍核からの入力が集まること、一方、内側核は、視床下部の各垂核へ遠心性の出力を行っていることを明らかにした。すなわち、ストレス→辺縁系→扁桃体→特に内側核→視床下部→自律神経系、→心血管系→ $\alpha$  受容体と  $\beta$  受容体→遺伝子応答という流れを示すことができた。



(5) 一方、脳の特定の部位の破壊や刺激による検討では一定の結果が得られず、今後の検討課題である。本年度からは、フィードバック機構である、圧受容体反射の関与を踏まえたモデルでの検討を続けている。

#### 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 18 件)

1. Ueyama T, Yamamoto, Y, Ueda K, Kawabe T, Hano T, Ito T, Tsuruo Y, Ichinose M, Yoshida K Cardiac and vascular gene profiles in an animal model of takotsubo cardiomyopathy. 査読あり、 Heart and Vessels 26, 2011, 321-337  
DOI: 10.1007/s00380-010-0070-8
2. 上山敬司, 仙波恵美子 中枢自律神経系 分子精神医学 11, 2011, 8-13
3. 上山敬司 視床下部視交叉上核の神経回路 査読あり、自律神経 48, 2011, 120-121
4. 上山敬司 たこつぼ心筋症の基礎・病態 心臓 42, 2010, 426-430.
5. Akashi YJ, Nef HM, Möllmann H, Ueyama T Stress cardiomyopathy. 査読あり、Annu Rev Med 61, 2010, 271-86  
DOI:10.1146/annurev.med.041908.191750
6. 川辺哲也, 上山敬司, 鶴尾吉宏, 羽野卓三 圧受容体反射に及ぼすストレス関連ペプチドの影響 査読あり、自律神経 47, 2010, 221-225
7. 森本恵子, 上山敬司 精神性ストレス時の循環反応に対するエストロゲンの抑制作用と酸化ストレスの関与 査読あり、自律神経 47, 2010, 321-327
8. 上山敬司 視床下部視交叉上核から自律神経系への神経回路 循環器内科 68, 2010, 434-440.
9. 上山敬司, 仙波恵美子 辺縁系と自律神経系 臨床神経 50, 2010, 1003-106  
<http://dx.doi.org/10.5692/clinicalneuro.50.1003>
10. Unuma K, Shintani-Ishida K, Tsushima K, Shimosawa T, Ueyama T, Kuwahara M, Yoshida K Connexin-43 Redistribution and Gap Junction Activation During Forced Restraint Protects Against Sudden Arrhythmic Death in Rats. 査読あり Circ J 74, 2010, 1087-1095.  
<http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-09-1019>
11. Unuma K, Kaori Shintani-Ishida K, Yahagi N, Tsushima K, Shimosawa T, Ueyama T, Yoshida K Restraint Stress Induces Connexin-43 Translocation via  $\alpha$ -Adrenoceptors in Rat Heart. 査読あり、Circ J 74, 2010, 2693-2701  
<http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-10-0529>
12. 上山敬司 情動的ストレスによる、心血管系での酸化的ストレス応答 心身医学 5, 2010, 879-884

13. 上山敬司, 石蔵文信 たこつぼ心筋症とその動物モデル 心身医学 49, 2009, 869-874
14. 上山敬司 自律神経の中樞神経回路の解析 自律神経 46, 2009, 147-155
15. 上山敬司, 鶴尾吉宏 たこつぼ心筋症モデルにおける、ヘムオキシゲナーゼの増加 査読あり、自律神経 46, 2009, 558-560
16. 上山敬司 たこつぼ型心筋症の機序-動物実験からの新規視点 循環器科 66, 2009, 229-236
17. Ueyama T, Kawabe T, Hano T, Tsuruo Y, Ueda K, Ichinose M, Kimura H, Yoshida K Up-regulation of hemeoxygenase 1 in an animal model of takotsubo cardiomyopathy. 査読あり、Circ J 73, 2009, 1141-1146  
<http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-08-0988>
18. Ueda K, Ueyama T, Oka M, Ito T, Tsuruo Y, Ichinose M Polaprezinc (zinc L-carnosine) is a potent inducer of anti-oxidative stress enzyme, heme oxygenase (HO) 1-a new mechanism of gastric mucosal protection. 査読あり J Pharma Sci 110, 2009, 285-294  
<http://dx.doi.org/10.1254/jphs.09056FP>

[学会発表] (計 16 件)

1. Ueyama T Cardiac and vascular molecular responses in emotional stress-induced acute heart failure. The Tenth Symposium on Catecholamines and other Neurotransmitters in Stress, Smolenice Castle, Slovakia, June 25-30, 2011
2. 上山敬司, 山本悠太、伊藤隆雄、鶴尾

- 吉宏 Signal transduction from limbic brain to the heart in the emotinal stress-induced acute heart failure 第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会 2011.3.28-39, (誌上発表) 横浜
3. 上山敬司 たこつぼ心筋症動物モデルにおいて、心血管系に発現する遺伝子群の網羅的解析 第52回日本心身医学会総会. 2011.6.9 横浜
4. Kawabe T, Ueyama T, Tsuruo Y, Hano T Attenuation of cardiovascular responses to endomorphin-2 microinjections into the nucleus tractus solitarius of the spontaneously hypertensive rat. 23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Vancouver, Canada. 9.26-30, 2010.
5. 上山敬司, 仙波恵美子 辺縁系(特に扁桃体)と自律神経. 第51回日本神経学会総会. 2010.5.22 東京
6. 上山敬司 視床下部視交叉上核から自律神経系への神経回路. 第63回日本自律神経学会総会 2010.10.22-23 横浜
7. 上山敬司, 川辺哲也, 羽野卓三, 吉田謙一 Cardiac gene profiles in an animal model of Takotsubo cardiomyopathy. 第74回日本循環器学会総会.2010.3.21 京都
8. 上山敬司, 伊藤隆雄、鶴尾吉宏 情動的ストレスによる、cyclooxygenase-2 の増加 第115回日本解剖学会総会.2010.3.27 盛岡
9. 上山敬司 情動的ストレスによる、心血管系の細胞での酸化的ストレス応答 第51回日本心身医学会総会. 2010.6.27 仙台
10. 上山敬司, 山本悠太、川邊哲也, 羽野卓

- 三、伊藤隆雄、鶴尾吉宏、吉田謙一 た  
こつぼ心筋症動物モデルにおいて、心  
血管系に発現する遺伝子群の網羅的  
解析 第 63 回日本自律神経学会総会.  
2010.10.22 横浜
11. Ueda K, Ueyama T, Tamai H, Arii K,  
Yanaoka K, Ito T, Tsuruo Y, Oka M,  
Ichinose M Polaprezinc as a potent  
inducer of anti-oxidative stress enzyme,  
heme oxygenase 1. Digestive Disease  
Week 2009, 5. 31-6. 5, Chicago, USA
12. Omura Y, Hata T, Hara Y, Takamata A,  
Ueyama T, Morimoto K Effects of  
estrogen on stress-induced activation of  
nitric oxide producing neurons in  
paraventricular hypothalamic neurons of  
rats. The 36th Congress of the  
International Union of Physiological  
Sciences. 2009, 7.27-8.1, Kyoto, Japan.
13. 石蔵文信、上山敬司 Preventive  
effects of estrogen and beta blocker on  
stress-induced cardiac dysfunction in an  
experimental rat model. 第 73 回日本循  
環器学会総会.2009.3.20 大阪
14. 上山敬司, 川辺哲也,羽野卓三, 吉田  
謙一 Up-regulation of cyclooxygenase  
2 in an Animal Model of Takotsubo  
Cardiomyopathy. 第 73 回日本循環器  
学会総会.2009.3.21 大阪
15. 上山敬司、伊藤隆雄、鶴尾吉宏 情動  
的ストレスにより、心血管系の細胞で  
酸化ストレスが起こる。第 50 回日  
本組織細胞化学学会総会 2009.9.26 大  
津
16. 上山敬司、鶴尾吉宏、川辺哲也、羽野  
卓三 たこつぼ心筋症モデルにおけ  
る、サイクロオキシゲナーゼの増加。  
第 62 回日本自律神経学会総会

2009.11.5 和歌山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上山 敬司 (TAKASHI UEYAMA)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50264875

### (2) 研究分担者

川邊 哲也 (TETSUYA KAWABE)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：60508034

木村 博子 (HIROKO KIMURA)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：0053299

鶴尾 吉宏 (YOSHIHIRO TSURUO)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

1. 研究者番号：90274449