

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01642

研究課題名(和文) 選択的除神経法による運動昇圧反射メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of the exercise pressor reflex using a selective chemical denervation method.

研究代表者

土持 裕胤 (Tsuchimochi, Hirotugu)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：60379948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：運動時の循環調節に重要な運動昇圧反射は骨格筋を支配する感覚神経が重要な役割を担っているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究では骨格筋を支配する感覚神経を選択的に除神経することで、除神経された神経と運動時循環応答の関係を解析した。カプサイシンの慢性全身または坐骨神経内投与によるTRPV1チャネル発現神経の脱感作/除神経は運動時の心拍数応答を減弱させた。血圧応答は影響を受けなかった。他方、坐骨神経内IB4陽性神経の選択的除神経は運動時の心拍・血圧応答に影響を及ぼさなかった。最後に、運動昇圧反射メカニズム解明を目指し、ラット運動時の心筋収縮力や心拍出量計測技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：Although a certain class of sensory nerves which innervate skeletal muscles are thought to play an important role for cardiovascular adaptation during exercise, its real role and the precise mechanism have still unknown. Then the roles of a specific muscle afferent nerves for the cardiovascular response to exercise was examined by a selective chemical denervation technique. Desensitization/denervation of TRPV1-expressing neurons by chronic systemic or sciatic nerve-specific local administration of capsaicin or a potent TRPV1 agonist attenuated tachycardic response during exercise, while pressor response to exercise was not affected. On the other hand, selective denervation of the IB4 positive nerve in the sciatic nerve did not affect tachycardic / pressor response during exercise. Lastly, a new technique has been developed to measure cardiac contractility and pump function during exercise in rats, which will contribute to the understanding of the role of the exercise pressor reflex.

研究分野：Exercise Physiology

キーワード：exercise muscle afferents cardiac function blood pressure TRPV1

### 1. 研究開始当初の背景

運動時には運動強度に応じて心臓・血管機能が素早く調節される。この循環調節に重要なメカニズムとして活動筋由来のフィードバック制御である運動昇圧反射（筋機械受容器反射と筋代謝受容器反射）が知られている。これらの反射に関わる感覚神経として、細い有髄神経である Group III 神経が筋機械受容器反射を、無髄神経である Group IV 神経が筋代謝受容器反射の機能発現に関与している、と考えられてきた(1-2)。運動昇圧反射の研究は主にこれら機械刺激および化学刺激を受容するイオンチャネルや受容体を薬理的に阻害し、阻害前後の運動昇圧反射（主に血圧、心拍数、交感神経活動の変化）を比較する事であった(3-7)。しかしながら、感覚神経は各々が多様なイオンチャネルや受容体を発現しているため、一つのイオンチャネルまたは受容体を阻害しても、それがその神経の興奮性を抑制させるとは限らない。事実、近年、同一グループに分類される神経内でも刺激への応答特性が異なる事が報告されており、感覚神経の新たな機能的分類が必要であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、運動昇圧反射に関わる可能性のある特定のイオンチャネル/受容体を発現する感覚神経のみを神経毒を用いて選択的に除神経することで、どのタイプの神経が運動時の心臓・循環調節にどのように関わっているのかを調べる事を目的とした。運動昇圧反射に関わる Group III および Group IV 神経は、その神経伝導速度と軸索の太さで分類されているが、これらはさらに isolectin B4 (IB4) 陽性細胞と陰性細胞に大別でき、IB4 陰性細胞は TRPV1 チャネルを発現することが報告されているため、本研究ではこの2分類に焦点を当てて実験を行った。

### 3. 研究の方法

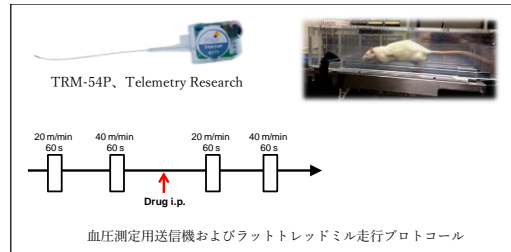
#### ① TRPV1 チャネル発現神経 (IB4 陰性神経) の機能評価実験

##### 【全身投与実験】

TRPV1 チャネル発現神経は TRPV1 チャネルアゴニストにより脱感作（刺激に応じにくくなる）され、高濃度のアゴニスト投与で神経細胞死が誘導されることが報告されている。そこで、TRPV1 チャネル発現神経の脱感作/除神経の影響を調べた。

雄 Wistar ラット (n = 9, 10-14 weeks old, BW 250-350g, Japan SLC) にイソフルラン麻酔下であらかじめ血圧送信機 (TRM-54P、Telemetry Research 社) を留置した。数日の回復期間後、ラットにトレッドミル走を行わせ、その際の心拍数 (HR) および血圧 (MAP) 応答を計測した。コントロールデータ取得後、イソフルラン麻酔下で TRPV1 チャネルアゴニストである Capsaicin (2 mg/kg ip) を投与し

た。麻酔から回復後、再びトレッドミル走を行わせ、HR と MAP を計測し、その応答を比較した。同様に、同じく TRP チャネルの非特異的アンタゴニストであるルテニウムレッド (RR: 5 mg/kg ip)、強力且つ特異的なアゴニストである RTX (300 µg/kg ip)、および TRPV1 チャネルの強力且つ特異的なアンタゴニストである IRTX (300 µg/kg ip) または



SB366791 (3 mg/kg ip) の投与前後で運動時の HR と MAP を計測し、比較した。

#### 【坐骨神経内投与実験】

全身投与実験と同様、雄 Wistar ラットにイソフルラン麻酔下であらかじめ血圧送信機を留置した。数日の回復期間後、ラットにトレッドミル走を行わせ、その際の心拍数 (HR) および血圧 (MAP) 応答を計測した。コントロールデータ取得後、イソフルラン麻酔下で TRPV1 チャネルの強力且つ特異的なアゴニストである RTX (200 µg/kg ip) を両側の坐骨神経内へ微量注入し、の投与前後で運動時の HR と MAP を計測し、比較した。

#### ② IB4 陽性神経の機能評価実験

IB4 陽性神経の除神経には、ターゲットトキシンである IB4-Saporin を用いた。Saporin は極微量で細胞死を引き起こすタンパク質性毒素であり、IB4-Saporin は IB4 陽性細胞特異的に細胞死を引き起こす。

##### 【坐骨神経内投与実験】

雄 Wistar ラットをイソフルラン麻酔し、両側の坐骨神経を露出させた。一方の坐骨神経束に IB4-Saporin (IT-10, フナコシ) 400 µg/mL を 5 micro L 微量注入し (除神経側)、他方には Goat IgG-Saporin (IT-19, フナコシ) を同じく 400 µg/mL 濃度で 5 micro L 微量注入した (対照側)。皮膚を縫合し、鎮痛剤および抗生物質を投与した。3 週間の回復期間の後、ラットをイソフルラン麻酔し、挿管後、人工呼吸器にて呼吸を管理した。右内頸静脈および右総頸動脈にカテーテルを留置し、そ

それぞれ投薬用および血圧測定用とした。脳定位固定装置にて頭部、脊椎、骨盤、および足関節を固定した後、中脳上丘前縁で除脳した。除脳後速やかにイソフルラン濃度を停止した。除脳後30-60分の回復時間の後、それぞれの坐骨神経束を露出させ、それぞれの神経束を最大上刺激 (duration 0.75 ms, frequency 20または40 Hz, 100V, 30 s) し、その際のHRおよびMAP応答を左右で比較した。なお、IB4-Saporinの全身投与実験は糞尿からのIB4-Saporinによる汚染の問題から、行わなかった。

### ③ 運動昇圧反射メカニズム解明に向けた、無麻酔ラット心機能計測法の開発

運動昇圧反射時の心機能を、HRだけでなく一回拍出量や心拍出量、心筋収縮力、心室拡張能等を計測することで、運動昇圧反射の役割をこれまでとは異なる視点から評価することに繋がると考えた。

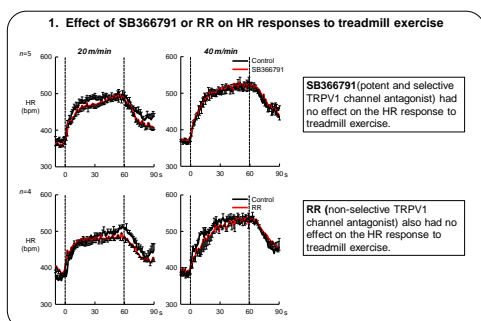
一回拍出量計測のために、二型糖尿病モデルの雄 Goto-Kakizaki ラットをイソフルラン麻酔下で挿管後、人工呼吸器にて呼吸管理を行った。正中で開胸し、上行大動脈へ血流計プローブ(トランソニック社製)を留置した。

収縮・拡張機能評価のために、雄 Wistar ラットをイソフルラン麻酔下で挿管後、人工呼吸器にて呼吸管理を行った。血圧測定用テレメトリー送信機 (TRM-54P) の本体を腹腔内へ留置した。左開胸後、圧センサー部分を、横隔膜を貫通させた後に左心室内へ刺入し、固定した。閉胸し、鎮痛剤および抗生物質投与後、麻酔から回復させた。

## 4. 研究成果

### 1. トレッドミル走行時のHRおよびMAP応答に対するSB366791およびルテニウムレッド(RR)投与の影響

運動によるTRPV1チャネル活性化が運動昇圧反射を引き起こすのであれば、TRPV1チャネル阻害剤の投与により運動昇圧反射が抑制されるはずである。しかしながらSB366791およびRRのどちらも運動昇圧反射(HRおよびMAP応答)に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、運動昇圧反射はTRPV1チャネルの活性化による神経の興奮の結果もたら



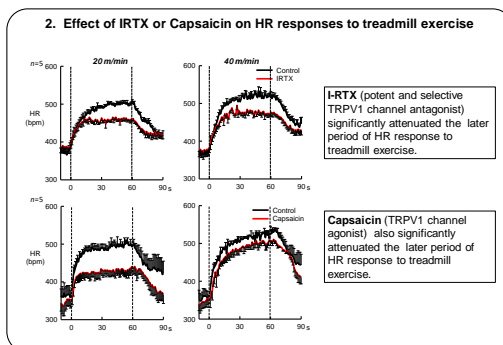
された訳ではない、と推察された。

これは先行研究の結果と一見矛盾する。先行研究では IRTX による TRPV1 チャネルの阻害が運動昇圧反射を抑制することを示した(8-9)。

この矛盾を説明するために、IRTXの投与実験を行った。

### 2. トレッドミル走行時のHRおよびMAP応答に対するIRTXおよびCapsaicin投与の影響

運動によるTRPV1チャネル活性化自体が運動昇圧反射を引き起こす訳ではない、と考えられるが、運動時のTRPV1チャネル発現神経の興奮が運動昇圧反射に関与する可能性は残されていた。そこで、TRPV1チャネルの強力かつ選択的アンタゴニストであると同時に投与時にはアゴニスト作用を有するIRTXを投与した。その結果、IRTX投与はトレッドミル運動時のHR応答を著しく減弱させた。



IRTXも先に述べたSB366791も共にTRPV1チャネルアンタゴニストでありながら異なる結果が得られたことから、IRTXの効果はアンタゴニストとしてではなくアゴニストとしての効果であろう、と考えた。TRPV1チャネル活性化に伴うTRPV1チャネル発現神経の脱感作または細胞死が運動昇圧反射抑制の原因である可能性が高い。そこで、TRPV1チャネルのアゴニストであるCapsaicinを投与した。その結果、CapsaicinはIRTX同様、運動昇圧反射のHR成分を有意に減弱させた。

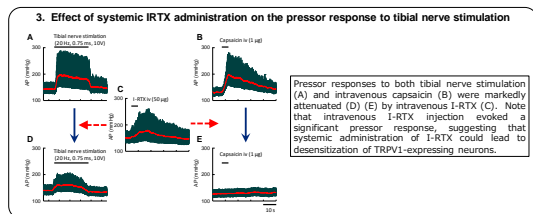
これらの結果から、運動時にはTRPV1チャネルそのものではなく、TRPV1チャネル発現神経上に発現している何らかのイオンチャネルまたは受容体が刺激された結果としてTRPV1チャネル発現神経の興奮が起こり、運動昇圧反射、特にHRの増加がもたらされるものと考えられる。

### 3. 除脳・無麻酔ラットへの脛骨神経電気刺激またはCapsaicinの下肢動脈内投与刺激による運動昇圧反射に対する全身性IRTX投与の影響

上記実験結果はトレッドミル走時のHRおよびMAP応答であるため、フィードフォワード制御であるセントラルコマンドも運動時の

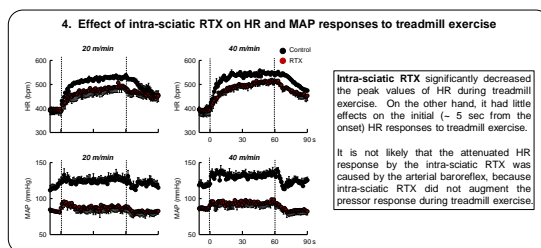


循環調節に関与していた可能性がある。つまり、TRPV1 チャンネル発現神経の脱感作による運動時 HR 応答の減弱がセントラルコマンド発現に関わる神経の脱感作によるものである可能性は否定できない。そこで、セントラルコマンドの影響を除外するために除脳・無麻酔標本を用い、脛骨神経の電気刺激もしくは下肢動脈への Capsaicin 投与を行うことで興奮させる神経を下腿領域に局限し、運動昇圧反射に対して TRPV1 チャンネル発現神経脱感作の影響を調べた。



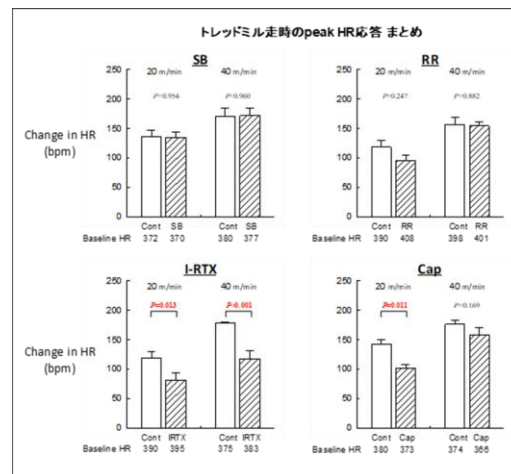
その結果、まず、脛骨神経の電気刺激は MAP を増大させたが、IRTX の静脈内投与 (50 µg) により、その昇圧応答は著しく減弱した。注目すべき点は、IRTX は TRPV1 チャンネルアンタゴニストであるにもかかわらず投与時に著しい昇圧応答を引き起こした点である。これは IRTX が TRPV1 チャンネルに対してアゴニスト作用を持つことを示している。また、下肢動脈内への Capsaicin 投与は MAP を増大させたが、この昇圧応答は IRTX により消失した。このような完全な抑制効果は、IRTX による TRPV1 チャンネルのアゴニスト効果とアンタゴニスト効果の両方の結果であると考えられた。

4. トレッドミル運動時の HR および MAP 応答に対する RTX の坐骨神経内投与の影響  
上記実験結果はすべて TRPV1 チャンネルアゴニストおよびアンタゴニストを全身性に投与しており、中枢神経系への影響は否定できない。そこで、RTX を坐骨神経内へ限局的に注入することで、坐骨神経に含まれる TRPV1 チャンネル発現神経にのみ脱感作を引き起こした。



その結果、坐骨神経内 RTX 投与はトレッドミル運動に対する HR 応答を減弱させた。一方、MAP に対しては安静時 MAP を低下させたが、昇圧応答に対しては影響を及ぼさなかった。この結果から、坐骨神経内の TRPV1 チャンネル発現神経が運動時の HR 応答に関与している可能性が示された。トレッドミル運動時には下肢のみならず上肢や体幹の筋も活動して

いるにも関わらず、坐骨神経内の TRPV1 チャンネル発現神経のみの脱感作 (抑制) が HR 応答を顕著に低下させたことから、運動時の運動昇圧反射メカニズムに対して下肢骨格筋を支配する感覚神経の役割が大きい事が示唆された。

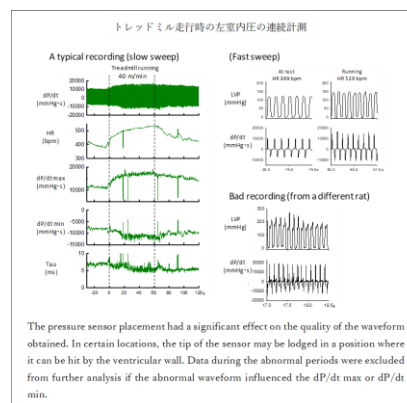


## ② IB4 陽性神経の機能評価実験

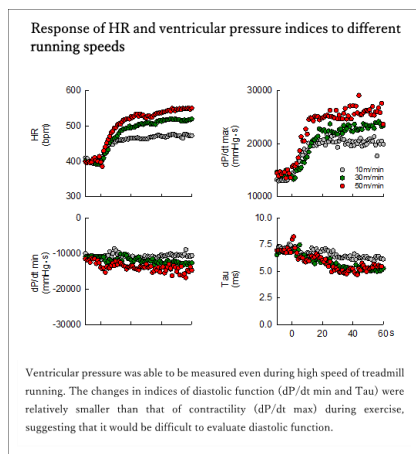
坐骨神経の電気刺激に対する HR および MAP 応答が、IB4-Saporin による坐骨神経内 IB4 陽性神経の除神経によってどのように影響を受けるのかを調べた。その結果、坐骨神経内 IB4 陽性神経の除神経は坐骨神経刺激に対する MAP および HR 応答に影響を及ぼさなかった。

## ③ 運動昇圧反射メカニズム解明に向けた、無麻酔ラット心機能計測法の開発

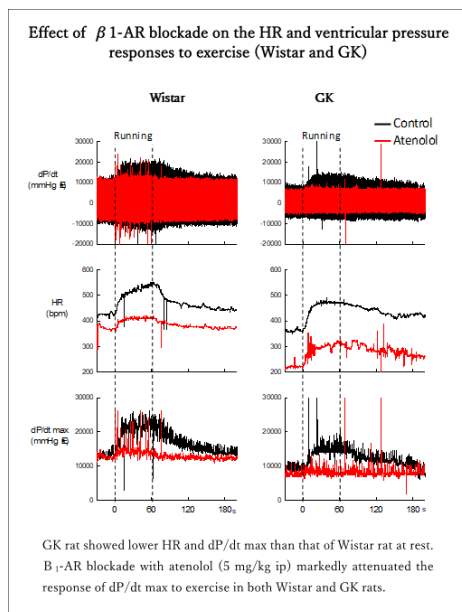
血圧送信機のカテーテルを左心室内へ留置することにより、無麻酔ラットの左心室圧を連続測定可能となった。本研究で用いた血圧計測装置 (TRM54P) はカテ先マンノメータタイプであり応答周波数が高く、従来の gel 充填タイプカテーテルでは正確に計測できなかった心室内圧変化を正確に計測可能となった。したがって、左室圧収縮・拡張能の指標である、dP/dt をより正確に算出可能となった。この送信機を留置したラットをトレッドミル上で走らせることで、左心室圧、dP/dt max、dP/dt min、拡張能の指標である Tau、そして HR の連続測定に成功した。



留置したカテーテルの位置によっては、安静時または運動時にカテ先が心室内壁に接触し、アーチファクトが入ることがあった。したがって、データ解析の際はアーチファクトの有無を必ず確認する必要がある。次に、走行速度の違いが左室内圧変化に及ぼす影響を解析した。収縮力の指標である  $dp/dt \max$  および HR は走行速度依存的な応答を示した。他方、拡張能の指標とされる  $dp/dt \min$  や  $\tau$  は走行速度の違いに対する変化があまり大きくなかった。

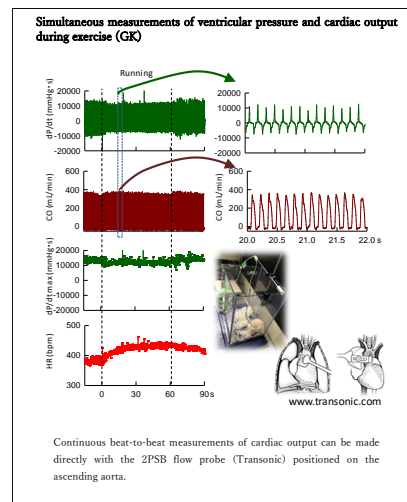


$\beta 1$  アドレナリン受容体遮断薬である Atenolol 投与により、安静時および走行時の  $dp/dt \max$  が著しく減弱した。

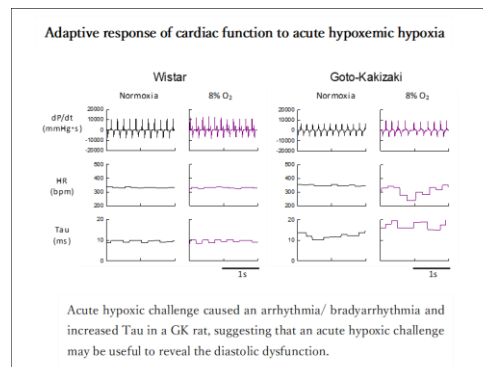


これまで、無麻酔ラットの一回拍出量や心拍出量と血圧の同時計測は可能であったが、心室圧と心拍出量の同時計測は試みられていなかった。本研究において、あらかじめ圧送信機を留置済みの Goto-Kakizaki ラットに対して血流計測用プローブを留置することで、一回拍出量および心拍出量の計測を試みた。

本研究により、世界で初めて、安静時のみならず運動時の心機能を HR だけでなく、心室内圧変化や収縮・拡張能と心臓ポンプ機能併せて評価可能となった。今後、運動昇圧反射が心臓に対してどのような調節を行っているのかをより詳細に解析可能となった。



本研究による無麻酔ラットの心室圧計測は運動昇圧反射の研究のみならず、様々な研究に応用可能である。ラットを 8% 低酸素に急性暴露した際の  $dp/dt$  と  $\tau$  を Wistar ラットと Goto-Kakizaki ラットで比較した場合、Goto-Kakizaki ラットは低酸素負荷に対して拡張能の指標である  $dp/dt \min$  と  $\tau$  の低下が著しく、拡張障害を有することが示された。



以上の結果より、感覚神経を IB4 陽性神経と TRPV1 チャンネル発現神経 (IB4 陰性神経) とに分けて機能評価した結果、TRPV1 チャンネル発現神経 (IB4 陰性神経) の方がより運動昇圧反射に関与することが示唆された。また、先行研究において、TRPV1 チャンネルが運動昇圧反射に関与していることが報告されていたが、その結果の解釈を検証しなおす必要性が示された。これまで運動昇圧反射の本体をイオンチャネルや受容体に限って研究されてきたが、それぞれの神経に様々なイオンチャネルや受容体が発現して、その組み合わせで神経機能が制御されていることを考えると、これまでの研究結果を踏まえつつ、新たな分類方法による神経機能評価が必要であると思われる。

## References

- 1: Kaufman MP, Longhurst JC, Rybicki KJ, Wallach JH, Mitchell JH. Effects of static muscular contraction on impulse activity of groups III and IV afferents in cats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1983 Jul;55(1 Pt 1):105-12.
- 2: Mitchell JH, Kaufman MP, Iwamoto GA. The exercise pressor reflex: its cardiovascular effects, afferent mechanisms, and central pathways. *Annu Rev Physiol.* 1983;45:229-42. Review. 15:587(Pt 4):873-82.
- 3: Tsuchimochi H, Yamauchi K, McCord JL, Kaufman MP. Blockade of acid sensing ion channels attenuates the augmented exercise pressor reflex in rats with chronic femoral artery occlusion. *J Physiol.* 2011 Dec 15;589(Pt 24):6173-89.
- 4: Tsuchimochi H, McCord JL, Leal AK, Kaufman MP. Dorsal root tetrodotoxin-resistant sodium channels do not contribute to the augmented exercise pressor reflex in rats with chronic femoral artery occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Feb;300(2):H652-63.
- 5: Tsuchimochi H, McCord JL, Kaufman MP. Peripheral mu-opioid receptors attenuate the augmented exercise pressor reflex in rats with chronic femoral artery occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 Aug;299(2):H557-65.
- 6: Tsuchimochi H, McCord JL, Hayes SG, Koba S, Kaufman MP. Chronic femoral artery occlusion augments exercise pressor reflex in decerebrated rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 Jul;299(1):H106-13.
- 7: Tsuchimochi H, Hayes SG, McCord JL, Kaufman MP. Both central command and exercise pressor reflex activate cardiac sympathetic nerve activity in decerebrate cats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Apr;296(4):H1157-63.
- 8: Smith SA, Leal AK, Williams MA, Murphy MN, Mitchell JH, Garry MG. The TRPV1 receptor is a mediator of the exercise pressor reflex in rats. *J Physiol.* 2010 Apr 1;588(Pt 7):1179-89.
- 17: Smith SA, Mitchell JH, Naseem RH, Garry MG. Mechanoreflex mediates the exaggerated exercise pressor reflex in heart failure. *Circulation.* 2005 Oct 11;112(15):2293-300.
- 9: Mizuno M, Murphy MN, Mitchell JH, Smith SA. Antagonism of the TRPV1 receptor partially corrects muscle metaboreflex overactivity in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol.* 2011 Dec

15:589(Pt 24):6191-204.

## 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

Tsuchimochi H, Inagaki T, Shirai M. The role of TRPV1-expressing neurons in the control of heart rate during dynamic exercise in rats. *Experimental Biology 2015 (Boston, USA), 2015.*

Tsuchimochi H, Sonobe T, Pearson JT. Sympathetic control of the left ventricular functions during treadmill exercise in conscious rats. 第95回日本生理学会大会(高松市) 2018年3月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
<http://www.ncvc.go.jp/res/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土持 裕胤 (TSUCHIMOCHI, Hirotsugu)  
国立研究開発法人 国立循環器病研究センター・研究所・心臓生理機能部・室長  
研究者番号：60379948

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 研究協力者

( )