

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07287

研究課題名(和文) 心臓神経叢ネットワークにおけるブラジキニンの役割解明

研究課題名(英文) Excitatory effect of bradykinin on intracardiac neurons

研究代表者

石橋 仁 (Ishibashi, Hitoshi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：50311874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心臓周囲に存在する神経叢におけるブラジキニンの役割について、ラット心臓神経叢標本にパッチクランプ法を適用して研究を遂行した。その結果、ブラジキニンがTRPCチャンネルを活性化して膜電位を脱分極させるとともにKCNQ型カリウムチャンネルを抑制することによって活動電位の発火頻度を上昇させることが明らかとなった。本研究で得られた知見は心臓機能を制御する副交感神経系に関するものであり、自律神経系による心臓機能制御機構の解明や不整脈発生の機序解明に向けた今後の研究に有益な情報になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳や脊髄における神経ネットワークの機能に関しては膨大な量の研究が行われてきた。一方、心臓周囲の心臓神経叢ネットワークの機能に関しては、これまでほとんど研究が行われておらずその機能は不明であった。本研究の開始直前、研究代表者は、ブラジキニンが心臓神経叢ネットワークを興奮させることを発見した。本研究はそのメカニズムを解明するものであり、本研究の結果から、ブラジキニンがTRPCチャンネルを活性化するとともにKCNQ型のカリウムチャンネルを抑制することがわかった。本研究の成果は、今後の不整脈治療や新規薬物の開発に有益な情報となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The heart receives sympathetic and parasympathetic innervation through the intrinsic cardiac nervous system. In the present study, the effect of bradykinin on the intracardiac ganglion neurons isolated from rats was investigated using patch-clamp technique. Application of bradykinin depolarized the membrane, accompanied by repetitive firing of action potentials. The present study also revealed that bradykinin activated calcium-permeable non-selective cation channels and reduced the amplitude of KCNQ-type potassium currents.

It is known that a number of patients experience bradycardia after myocardial infarction or during coronary occlusion. Such conditions are responsible for sudden cardiac death. Kinins including bradykinin are generated and released during myocardial ischemia, and this can perpetuate further ischemic damage. Thus, activation of intracardiac neurons by bradykinin could play an important role in such cases of bradycardia.

研究分野：神経生理学

キーワード：生理学 神経科学 心臓神経節 ブラジキニン

1. 研究開始当初の背景

副交感神経系は臓器の近くで神経節を形成して節後ニューロンがその臓器を支配する。この節後ニューロンは、節前線維から放出されるアセチルコリン (Ach) による情報を受け取って、それを支配臓器に伝えるだけの単純な役割しか有していないと考えられてきた。しかし、近年、この副交感神経節にはさまざまな入力もあることが解剖学的研究から示され、単に中枢からの情報を伝達するだけの場ではなく、周囲からの情報を統合して支配臓器を制御していることが明らかになってきた。

我が国では年間約 6 万人、実に 1 日約 160 人もの人が心臓突然死している。この心臓突然死の大部分は不整脈によって生じると考えられているが、未だ不整脈の完全な治療法は開発されていない。一方、不整脈に関しては従来から自律神経系の異常が関与すると考えられている。心臓を支配する副交感神経系 (迷走神経) に関しては、心臓表面で神経節を形成するとともに、この神経節から伸びる節後線維とその他の外来神経が、神経叢ネットワークを形成して心臓機能を制御している。実際、2018 年 4 月に出版された総説においても、心臓表面の副交感神経ネットワークが「little brain」と称されていることが紹介されており、その機能解明が進むことを期待している (Ashton et al, 2018)。すなわち、従来から腸に存在する神経叢については独立して腸の機能を制御していることが知られていた様に、心臓神経叢も中枢からの交感神経・副交感神経の影響は受けるものの、独立して心臓機能を制御できる可能性が示唆されている。一方、これまでに、脳・脊髄における神経ネットワーク機能に関しては膨大な数の研究が行われてきているが、心臓神経叢に関する生理学的研究はほとんど行われておらず、その機能的役割は全く解明されていないと言っても過言ではない。

ブラジキニンとは、9 個のアミノ酸から構成されるペプチドで、組織損傷等により血漿カリクレインが活性化されることにより作られる。ブラジキニンは、発痛物質として有名であるが、心拍数減少や血圧低下作用など循環器系に対する作用も有する (Alhenc-Gelas et al, 2011)。アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 等の生体内酵素によって分解されるので、ブラジキニンの生体内での寿命は短い。興味深いことに、高血圧治療で用いられる ACE 阻害薬によって心拍数が減少することがあるが、これには心臓組織へのブラジキニンの蓄積と心臓を支配する副交感神経系の関与が示唆されている。しかし、ブラジキニンの心臓神経叢ネットワークに対する作用は全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

研究代表者は、ブラジキニンが、A) 心臓表面に存在する神経節ニューロンを興奮させること、B) 節前線維から心臓神経節ニューロンへの Ach 伝達を増強すること、を発見した。しかし、これらのメカニズムやその生理学的意義はまったく不明であった。そこで、本研究では、ブラジキニンの心臓神経叢ネットワークへの作用とそのメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

実験にはラットから摘出した心臓神経叢を用いた。実験の多くは幼若期ラット (生後 2 ~ 3 週齢) を用いたが、発達変化に関しては成熟ラットも用いた。なお、低濃度のニュートラルレッドを用いることにより神経叢だけを染色して可視化することが可能であることがわかっているため、この可視化法を用いて標本作製の効率を改善した。

心臓神経叢の機能に対するブラジキニンの影響は、電気生理学的手法 (主にパッチクランプ法) を用いて検討した。必要に応じて、RT-PCR 法や免疫染色法を用いて、ブラジキニンの応答に影響を与える分子について検討を行った。

4. 研究成果

心臓神経叢から急性単離した神経細胞にパッチクランプ法を適用して、膜電流固定下にブラジキニンを投与したところ、脱分極が生じて繰り返し活動電位が発生した (図 1)。ブラジキニンを洗浄すると膜電位は静止電位に戻った。ブラジキニンを繰り返し投与したところ、2 度目のブラジキニン投与では脱分極応答が著明に減少した。1 度目のブラジキニン応答を指標に、ブラジキニンの濃度 応答関係を調べたところ、50% 効果濃度 (EC_{50}) は、1.2 nM であった。

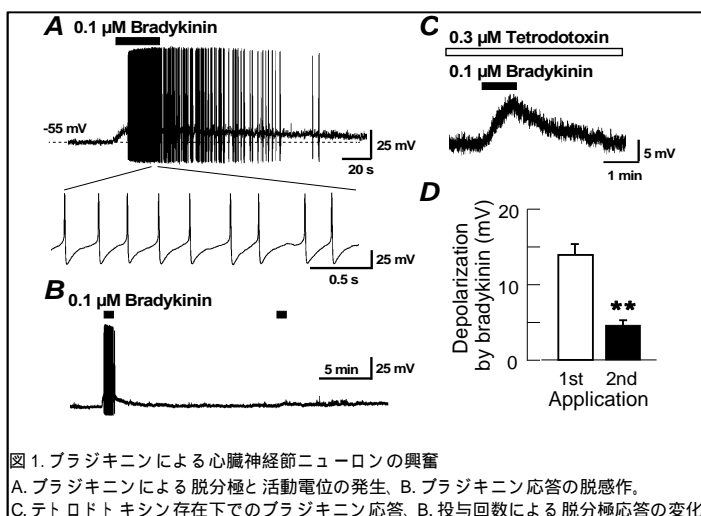


図 1. ブラジキニンによる心臓神経節ニューロンの興奮

A. ブラジキニンによる脱分極と活動電位の発生。B. ブラジキニン応答の脱感作。C. テトロドトキシン存在下でのブラジキニン応答。D. 投与回数による脱分極応答の変化。

次に膜電位固定下（保持電位 -60mV）でブラジキニンの脱分極応答のメカニズムを検討した。正常な細胞外液中では、ブラジキニンは小さな内向き電流を誘発した。この内向き電流はナトリウムイオンを除去した細胞外液中では抑制されていたが、細胞外液中からカルシウムイオンを除去した溶液中では大きな内向き電流が誘発された。この結果は、ブラジキニンが Ca^{2+} 透過性の陽イオンチャネルを活性化していることを示唆しており、これまでに他の神経細胞や筋肉細胞などで報告された transient receptor potential canonical channel (TRPC チャネル)の性質と類似していた。そこで、心臓神経節ニューロンの TRPC チャネルの発現について RT-PCR 法を用いて検討することにした。図 2 にその結果を示す。心臓神経節ニューロンには TRPC1、TRPC3、TRPC6 と TRPC7 が発現していると考えられた。これらの TRPC チャネルは、ヘテロマーを形成して機能することが知られていることから、ブラジキニンによる心臓神経節ニューロンの興奮には TRPC チャネルが関与していることが明らかとなった。

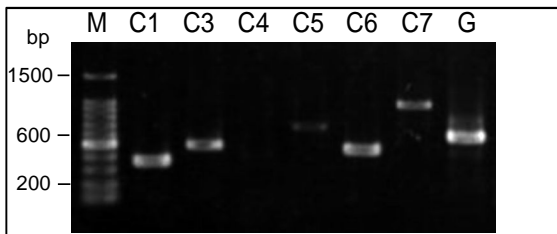


図 2 . TRPC チャネルの発現
心臓神経節ニューロンにおける TRPC1 ~ TRPC7 の発現状況。

ブラジキニン受容体は、G タンパク質を介してホスホリパーゼ C を活性化する (Haley et al, 2000)。ホスホリパーゼ C の活性化は、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出を誘発して細胞内セカンドメッセンジャー系を活性化させる。そこで本研究でも、細胞内 Ca^{2+} 放出の影響を検討したところ、膜透過性の Ca^{2+} キレート薬 (BAPTA-AM) でブラジキニンによる TRPC チャネルの活性化が抑制されたことから、TRPC の活性化に細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出が関与することが明らかとなった。

ホスホリパーゼ C は、細胞膜構成微量リン脂質であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP_2) を加水分解し、

イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP_3) とジアシルグリセロールを産生する酵素である。 PIP_2 は KCNQ 型の K^+ チャネルの活性化に必要であることが知られており、その減少は KCNQ 型 K^+ チャネルの活性減少となる。従って、本研究においても、ブラジキニンが KCNQ 型 K^+ チャネルを抑制しているか検証を行った。図 3 にその結果を示す。KCNQ 型 K^+ チャネルは、-60mV 以上の膜電位で持続的に活性化されることから、実験では保持電位 -20mV から -60mV までの過分極パルスを与えることにより、過分極パルス間に不活性化する電流として測定した。図 3 に示すように、ブラジキニンは、この電流を著明に抑制した。

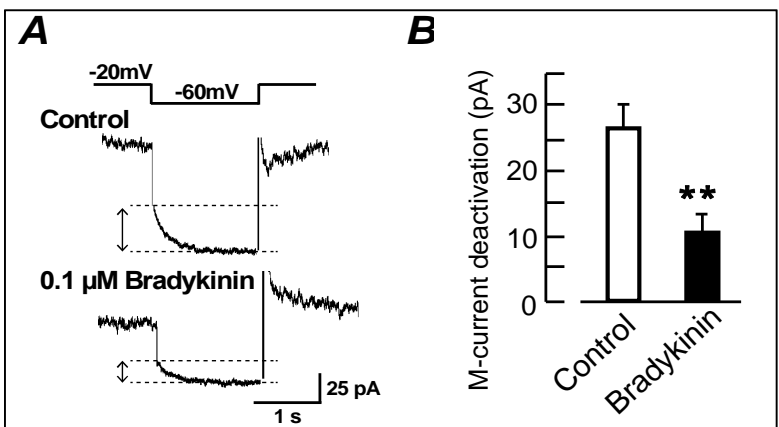


図 3. ブラジキニンによる KCNQ チャネルの抑制
保持電位 -20mV から -60 mV への過分極パルスによって KCNQ チャネル電流の大きさを評価した。ブラジキニンはこのチャネルを抑制することがわかった。

本研究で明らかになったブラジキニンが心臓神経節ニューロンを活性化させるメカニズムを図 4 に示す。以上の結果から、ブラジキニンは TRPC 型のカチオンチャネルを活性化するとともに、KCNQ 型の K^+ チャネルを抑制することがわかった。

KCNQ チャネルの抑制が、脱分極応答に与える影響を検討するため、高濃度カリウム溶液およびニコチン型アセチルコリン受容体を介する脱分極応答に対して、KCNQ チャネル拮抗薬の効果を検討した。膜電流固定下に高濃度カリウム溶液を投与したところ、活動電位が発生したが、KCNQ チャネル抑制剤の XE991 存在下では、その発生頻度が増加した。一方、ニコチンを投与することによって発生する活動電位は、XE991 によって抑制された。この結果は、KCNQ チャネル拮抗薬が、ニコチン型アセチルコリン受容体も抑制することを示唆す

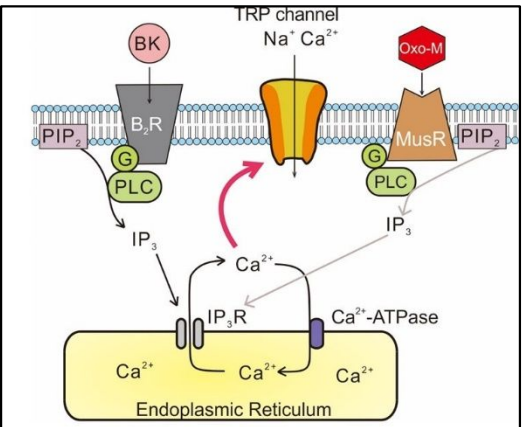


図 4. ブラジキニン応答のメカニズム

る。そこで、この仮説を検証するため、膜電位固定下保持電位-60 mVで、ニコチン誘発電流に対するXE991の効果を検討した。10 μ Mのニコチンによって誘発される電流をXE991は濃度依存的に抑制し、その50%抑制濃度 (IC_{50}) 値は、14 μ Mであった。XE991存在下でニコチンの濃度応答関係を調べたところ、コントロール条件下ではニコチンの EC_{50} 値は 8.7 μ Mであったが、10 μ M XE991存在下では12 μ Mであった。XE991存在下ではニコチン応答の最大値が抑制されていたことから、XE991はニコチン受容体を非競合的に阻害することが明らかとなった。

前述のように、通常ブラジキニンの生体内での寿命は短く、ACEなどの酵素により速やかに不活性化される。一方、高血圧治療で使用されるACE阻害薬によって、ブラジキニンの分解が抑制され、ブラジキニンが組織中に蓄積することが示唆されている。従って、本研究での結果から、ブラジキニンは心臓を支配する副交感神経系節後線維を興奮させ、心臓機能に影響を与えて不整脈の発症原因となっている可能性があるのではないかと考察された。今後さらなる研究を行って、ブラジキニンの心臓神経叢における役割を解明したいと考えている。

< 引用文献 >

- Ashton JL, Burton RAB, Bub G, Smail BH, Montgomery JM. *Front Physiol* 9:240, 2018.
Alhenc-Gelas F, Bouby N, Richer C, Potier L, Roussel R, Marre M. *Curr Pharm Des.* 17:2654-62, 2011.
Haley et al, *J Neurosci.* 20:RC105, 2000.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasaki-Hamada S, Maeno Y, Yabe M, Ishibashi H.	4. 巻 89
2. 論文標題 Neuromedin U modulates neuronal excitability in rat hippocampal slices.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropeptides	6. 最初と最後の頁 102168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.npep.2021.102168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato A, Arichi S, Kojima F, Hayashi T, Ohba T, Cheung DL, Eto K, Narushima M, Murakoshi H, Maruo Y, Kadoya Y, Nabekura J, Ishibashi H	4. 巻 886
2. 論文標題 Histamine depolarizes rat intracardiac ganglion neurons through the activation of TRPC non-selective cation channels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 173536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2020.173536	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogata M, Akita H, Ishibashi H	4. 巻 204
2. 論文標題 Behavioral responses to anxiogenic tasks in young adult rats with neonatal dopamine depletion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiology & Behavior	6. 最初と最後の頁 10-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.physbeh.2019.02.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arichi S, Sasaki-Hamada S, Kadoya Y, Ogata M, Ishibashi H	4. 巻 75
2. 論文標題 Excitatory effect of bradykinin on intrinsic neurons of the rat heart.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropeptides	6. 最初と最後の頁 65-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.npep.2019.04.002	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 石橋 仁、佐藤 彩、有地志帆
2. 発表標題 化学センサーとしての心臓神経節ニューロン～ヒスタミンの興奮作用を中心に～
3. 学会等名 第 251 回 生理学東京談話会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤彩、江藤 圭、石橋 仁
2. 発表標題 ヒスタミンはラット心臓神経節細胞の電位依存性 KCNQ 型 K ⁺ チャネルを抑制する
3. 学会等名 第23回日本ヒスタミン学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒形雅則、江藤 圭、石橋 仁
2. 発表標題 注意欠損多動症モデル動物を用いた糖質制限ケトン体産生食の異常行動改善効果
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱田 幸恵、前野圭徹、矢部瑞紀、石橋 仁
2. 発表標題 Nuromedin Uは海馬 CA3-CA1シナプス伝達を調節する
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒形 雅則, 西川 沙希, 多胡 絵美理, 阿部 郁美, 石橋 仁
2. 発表標題 幼若期ドーパミン神経系傷害は成熟後の慣れた環境下での運動量減少を引き起こす
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川 達也, 江藤 圭, 石橋 仁, 尾崎 紀之, 鍋倉 淳一
2. 発表標題 侵害刺激に対する一次体性感覚野の役割
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋 仁, 有地 志帆, 佐藤 彩
2. 発表標題 さまざまな神経伝達物質による心臓神経節ニューロンの興奮性制御
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Arichi S, Sasaki-Hamada S, Kadoya Y, Ishibashi H
2. 発表標題 Excitatory effect of bradykinin on intrinsic neurons of the rat heart
3. 学会等名 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ogata M, Uta D, Akita H, Ishibashi H
2. 発表標題 Characterization of responses to pain and itch stimuli in adult rats with neonatal dopamine depletion
3. 学会等名 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関