

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08504

研究課題名（和文）急性心筋梗塞に対する再灌流後迷走神経刺激による梗塞巣縮小効果の機序解明と最適化

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism and optimization of the infarct size reduction effect of vagus nerve stimulation after reperfusion in acute myocardial infarction

研究代表者

稲垣 正司（Inagaki, Masashi）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・客員研究員

研究者番号：80359273

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）：本研究では、急性心筋梗塞に対する新しい治療法として再灌流後の短期的迷走神経刺激治療を確立して臨床応用に結び付けるために、迷走神経刺激による抗炎症作用・抗アポトーシス効果に着目した治療機序の検討と、有効性・安全性の両視点からの最適な神経刺激条件の検討を行った。迷走神経刺激治療は、心筋梗塞後の炎症性マクロファージの浸潤とアポトーシスを抑制した。3日間の神経刺激は梗塞サイズを縮小した。24時間の神経刺激では有意な梗塞サイズ縮小効果は認められなかった。心拍数を10%低下させる刺激強度と心拍数を5%低下させる刺激強度の間には、梗塞サイズ縮小効果に有意な差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全の患者数およびコストは世界的に増加の一途をたどっている（心不全パンデミック）。心不全患者の基礎疾患は心筋梗塞などの冠動脈疾患が最も多いことが報告されており、心筋梗塞後の心不全発症を防止する治療法の開発は急務である。急性心筋梗塞の再灌流障害や初期リモデリングを抑制して梗塞サイズを縮小するために様々な薬剤や遺伝子導入療法・再生医療が研究されてきたが、有効な治療法は確立されておらず、心筋梗塞後の心不全発症を十分に抑制できていない。このような状況に対して、「経皮経管的に行う短期的迷走神経刺激による急性心筋梗塞サイズの縮小」という新規治療法の確立は、心不全患者数の低減に大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established short-term vagus nerve stimulation therapy after reperfusion as a new treatment for acute myocardial infarction and aimed to link it to clinical application. We investigated (1) the therapeutic mechanism focusing on the anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of vagus nerve stimulation, and (2) the optimal nerve stimulation conditions from the standpoints of both efficacy and safety.

(1) Vagus nerve stimulation therapy suppressed the infiltration of inflammatory macrophages, and suppressed apoptosis after myocardial infarction.

(2) Nerve stimulation for three days reduced infarct size. No significant effect on infarct size reduction was observed with nerve stimulation for 24 hours. No significant difference was observed in the effect on infarct size reduction between stimulation intensities that reduced heart rate by 10% and those that reduced heart rate by 5%.

研究分野：循環器内科学

キーワード：臨床心臓病学 心筋梗塞 迷走神経 心不全

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化、肥満の増加、各種心疾患の治療の進歩に伴い、心不全の患者数およびコストは増加の一途をたどっている(心不全パンデミック)。また、心不全患者の予後は、遮断薬・ACE阻害薬・ARBなどの内科的薬物療法、補助循環装置を含めた外科的治療法の発達にもかかわらず、依然として不良である。近年では再生医療による治療が精力的に研究されているが、確立されるには至っていない。心不全患者増加の一因は、急性心筋梗塞に対する治療の進歩により救命率が改善した一方で、救命された患者の約30%がその後心不全を発症することにある。したがって、心筋梗塞後の心不全発症を防止する治療法の開発は極めて重要な課題である。心筋梗塞後の心不全の発症には梗塞サイズが密接に関係しており、急性心筋梗塞の再灌流障害や初期リモデリングを抑制して梗塞サイズを縮小するために様々な薬剤や遺伝子導入療法・再生医療が研究されてきた。しかしながら、有効な治療法は確立されておらず、心筋梗塞後の心不全発症を十分に抑制できていない。

一方、急性心筋梗塞時(虚血中)の迷走神経刺激が、不整脈の発生を抑制し、心負荷の軽減や側副血行路の血流増加、抗炎症作用などを介して心筋を保護し梗塞サイズを縮小することが1970年代から報告されている。しかしながら、虚血中に神経刺激を行うためには、心筋梗塞発症後の救急搬送中(救急車内)から神経刺激を開始しなければならず、現状では実施は不可能である。また、病院到着後から神経刺激を開始するとした場合も、虚血中(再灌流治療の前)に迷走神経刺激を行うことは再灌流治療の開始を遅らせることにつながる。急性心筋梗塞に対して病院到着後可及的速やかに再灌流治療を行うことが各国の診療ガイドラインで推奨されている現在では、標準的治療を逸脱することになるため、治療法として現実的ではない。このように実臨床で行われる治療シナリオに適合しないことに加えて、迷走神経を刺激する簡便な方法がなかったこともあり、急性心筋梗塞に対する迷走神経刺激治療は1970年代以降現在までの間に実臨床には応用されてこなかった。

### 2. 研究の目的

研究代表者は、「心筋梗塞後の初期リモデリングおよび不整脈に対する一時的迷走神経刺激治療法の開発(基盤研究C:平成24~26年度)」および「急性心筋梗塞に対する再灌流後短期的迷走神経刺激治療法の確立(基盤研究C:平成27~29年度)」において、大・小動物の虚血再灌流モデルを用いて、再灌流治療終了後から3日間の短期的迷走神経刺激によって、梗塞サイズ縮小などの初期リモデリング抑制効果・心室性不整脈抑制効果が得られ、4週間における心機能が改善することを明らかにした。また、同時に、経皮経静脈的に安定して迷走神経刺激を行う装置を試作してきた。

しかしながら、再灌流後の短期的迷走神経刺激による初期リモデリング抑制効果の機序については詳細が不明であり、臨床応用に際しては、治療効果の機序を明確にすることが強く望まれる。また、これらの研究では単一の刺激条件で神経刺激が行われており、有害事象の発生を防ぎながら迷走神経刺激の治療効果を最大にする最適な刺激条件は明らかでない。

本研究では、「急性心筋梗塞に対する再灌流後の短期的迷走神経刺激治療法」を確立して臨床応用に結び付けるために、迷走神経刺激による抗炎症効果・抗アポトーシス効果等に着目した治療効果の機序解明を行った。また、有効性・安全性の両視点から最適な刺激条件を検討した。

### 3. 研究の方法

ウサギの心筋梗塞モデルを用いて、迷走神経刺激治療の効果を検討した。日本白ウサギにイソフルラン麻酔下に右頸部迷走神経に神経刺激電極の植込みを行った。7日後に、イソフルラン麻酔下に左側開胸を行い、心嚢を切開して心臓を露出させた。冠動脈回旋枝を4-0プロリン糸で結紮し30分後に再灌流を行い、心筋梗塞(虚血再灌流)モデルとした。結紮した位置にプロリン糸を残して閉胸した。

#### (1) 迷走神経刺激治療による抗炎症作用・抗アポトーシス効果の検討

コントロール群(無治療)および治療群(パルス幅0.1ms、20Hz矩形波、心拍数を10%低下させる強度で10sec ON/50sec OFFの間欠刺激を3日間実施)について、心筋梗塞作成4日後、7日後、2週間後の心臓標本を作製した。心筋梗塞4日後、7日後の組織標本を用いて、免疫組織化学的方法により、迷走神経刺激が心筋梗塞後のM1型マクロファージ(炎症性)およびM2型マクロファージ(抗炎症性)の動態に及ぼす影響を検討した。ウサギを免疫原として作製された抗体試薬はほとんどなく、ウサギに対する交差性が報告されている試薬も極めて少ないため、ラットまたはヒトに対して交差性が報告されている複数の会社の抗体試薬を試用して、使用可能な試薬の選別を行った。選別の結果、M1型+M2型マクロファージのマーカーとしてabcam社のanti-F4/80抗体、M1型マクロファージのマーカーとしてabcam社のanti-CD86抗体、M2型マクロファージのマーカーとしてabcam社のanti-CD163抗体を用いて、三重染色を行った。

心筋梗塞2週間後の組織標本を用いて、迷走神経刺激が心筋梗塞後に梗塞部位周辺の残存心

筋に生じるアポトーシスに及ぼす影響を TUNEL 染色 (Merck 社 In Situ Apoptosis Detection Kit) によって検討した。

#### (2) 最適刺激条件の検討

迷走神経刺激の刺激条件が有効性に及ぼす影響を検討するため、迷走神経の刺激条件 (電流強度: 3 段階、パルス幅: 3 段階、周波数: 3 段階、トレイン持続時間: 2 段階、再灌流から刺激開始までの間隔: 2 段階、刺激期間: 2 段階) を実験計画法 (直交表) に基づいて変更する計画で実験を開始した。しかしながら、生体に負荷される刺激強度は電流強度・パルス幅・周波数以外に電極と神経の接触が大きく影響し、電極と神経の接触はコントロールできない因子であるため、電流強度・パルス幅・周波数の変更では実質的刺激強度を段階的に変化させることが困難であることが明らかとなった。このため、迷走神経刺激はパルス幅 0.1ms、20Hz 矩形波で 10sec ON/50sec OFF の間欠刺激で行い、神経刺激強度については、刺激電流のみを変化させ、心拍数を 10% 低下させる強度と 5% 低下させる強度について検討することとした。また、再灌流から刺激開始までの間隔を 30 分と 60 分で検討することを予定していたが、臨床現場では 30 分以内に刺激を開始することが可能であり、あえて 60 分後から開始することは実臨床にそぐわないとの判断から、再灌流から刺激開始までの間隔は 30 分に固定することとした。

再灌流後に無作為に、コントロール群 (無治療) 治療群 (心拍数が 10% 低下する刺激強度で 72 時間治療) 治療群 (心拍数が 10% 低下する刺激強度で 24 時間治療) 治療群 (心拍数が 5% 低下する刺激強度で 72 時間治療) に振り分けた。14 日後に、心臓超音波検査で心機能を評価した後に心臓を摘出した。プロリン糸を結紮位置で再び結紮し、大動脈からインクを灌流した後、心室を 4mm 厚にスライスして TTC 染色を行い、リスク領域及び梗塞領域を評価した。

軽症心筋梗塞モデルを対象として迷走神経刺激の治療効果を検討するために、虚血時間を 20 分とした心筋梗塞モデルで、コントロール群 (無治療) 治療群 (心拍数が 10% 低下する刺激強度で 72 時間治療) に振り分けて、14 日後に、心臓超音波検査で心機能を評価し、TTC 染色によりリスク領域及び梗塞領域を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 迷走神経刺激治療による抗炎症作用・抗アポトーシス効果の検討

迷走神経刺激治療による梗塞部位に集積するマクロファージ数の変化を検討するために、40 倍で梗塞部位を観察し、1 視野にマクロファージの占める面積を計測した。迷走神経刺激治療により、4 日後の標本ではマクロファージの占める面積が減少する傾向にあり (コントロール群: 1957 $\mu$ m<sup>2</sup>、治療群: 1162 $\mu$ m<sup>2</sup>)、7 日後の標本ではマクロファージの占める面積は有意に減少した (コントロール群: 2466 $\mu$ m<sup>2</sup>、治療群: 1443 $\mu$ m<sup>2</sup>)。迷走神経刺激が梗塞巣に集積する M1 型と M2 型マクロファージの構成比に及ぼす影響を検討するために、M1 型マクロファージの面積と M2 型マクロファージの面積の比を計算した (M1 型マクロファージの面積/M2 型マクロファージの面積)。4 日後の標本では、M2 型マクロファージが少なく、比較検討に至らなかった。7 日後の標本では、迷走神経刺激治療により M1 型/M2 型の比は減少し、相対的に M2 型マクロファージが有意に増加した (コントロール群: 0.244、治療群: 0.142)。迷走神経刺激治療により、心筋梗塞 4 日後および 7 日後の梗塞巣ではマクロファージの浸潤が減少しており、7 日後の梗塞巣ではより M2 型マクロファージが浸潤していた。これは、迷走神経刺激治療により梗塞巣の炎症が抑制されより早期に梗塞巣の修復が行われる可能性を示していると考えられた。

20 倍で梗塞部位周辺を観察し、各視野で TUNEL 陽性細胞数を計測した。迷走神経刺激治療により、梗塞部位周辺の TUNEL 陽性細胞数は有意に減少した (コントロール群: 318.9、治療群: 98.4)。迷走神経刺激により心筋梗塞 2 週間後の梗塞部位周辺に発生するアポトーシスが減少していることが示唆された。

#### (2) 最適刺激条件の検討

##### 30 分虚血モデルでの検討

心臓超音波検査での左室内径短縮率は、コントロール群: 25.5% (平均)、治療群: 32.2%、治療群: 23.2%、治療群: 26.5% と、治療群 で大きい傾向にあったが、各群間に有意差を認めなかった。左室拡張末期径は、コントロール群: 13.8mm (平均)、治療群: 12.9mm、治療群: 13.6mm、治療群: 13.1mm と、治療群 で小さい傾向にあったが、各群間に有意差を認めなかった。病理標本でのリスク領域/左室は、各群間に差を認めず、各群ではほぼ同じ大きさの虚血領域が作られていた。梗塞領域/リスク領域は、コントロール群: 43.9% (平均)、治療群: 27.4%、治療群: 31.8%、治療群: 22.7% と、治療群 I、治療群 で有意に小さかった。神経刺激の刺激期間を 3 日から 1 日に短縮すると治療効果が減弱することが推測された。一方、心拍数低下率を指標とした神経刺激強度は 5% 程度の心拍低下効果を維持していれば、治療効果は大きく減弱することはない可能性が推測された。

##### 軽症 (20 分虚血) モデルでの検討

心臓超音波検査での左室内径短縮率は、コントロール群: 28.3% (平均)、治療群: 22.9% と両群間に有意差を認めなかった。左室拡張末期径は、コントロール群: 12.8mm (平均)、治療群: 12.8mm と両群間に有意差を認めなかった。病理標本でのリスク領域/左室は両群間に有意差を認めなかった。梗塞領域/リスク領域は、コントロール群: 13.5% (平均)、治療群: 14.8% と両群間に有意差を認めなかった。発症後短時間で再灌流を得ることができ梗塞サイズの小さい軽症例では本治療により得られる利益はあまりないと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Meihua Li, Can Zheng, Toru Kawada, Kazunori Uemura, Masashi Inagaki, Keita Saku, Masaru Sugimachi	4. 巻 72
2. 論文標題 Early donepezil monotherapy or combination with metoprolol significantly prevents subsequent chronic heart failure in rats with reperfused myocardial infarction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-022-00836-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, Akiyama T, Sugimachi M	4. 巻 35
2. 論文標題 Impact of peripheral 7-nicotinic acetylcholine receptors on cardioprotective effects of donepezil in chronic heart failure rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cardiovasc Drugs Ther.	6. 最初と最後の頁 877-888
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10557-020-07062-1	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 Li Meihua, Zheng Can, Kawada Toru, Inagaki Masashi, Uemura Kazunori, Akiyama Tsuyoshi, Sugimachi Masaru	4. 巻 -
2. 論文標題 Impact of Peripheral 7-Nicotinic Acetylcholine Receptors on Cardioprotective Effects of Donepezil in Chronic Heart Failure Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cardiovascular Drugs and Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10557-020-07062-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, Sugimachi M.	4. 巻 70
2. 論文標題 Intracerebroventricular infusion of donepezil prevents cardiac remodeling and improves the prognosis of chronic heart failure rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Physiol Sci.	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-020-00739-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, Sugimachi M.
2. 発表標題 Oral Administration of Donepezil Markedly Prevents the Progression of Chronic Heart Failure in Renal Artery Stenosis-Induced Hypertensive Rats.
3. 学会等名 ESC 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Li M, Zheng C, Kawada T, Uemura K, Inagaki M, Hayama Y, Nishikawa T, Sugimachi M.
2. 発表標題 Donepezil Markedly Attenuates the Progression of Cardiac/Renal Remodeling in Rats with Renal Artery Stenosis-Induced Hypertension.
3. 学会等名 JCS 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Li M, Zheng C, Kawada T, Uemura K, Hayama Y, Nishikawa T, Inagaki M, Sugimachi M.
2. 発表標題 Development of a Chronic Heart Failure Model by Renal Artery Stenosis-Induced Hypertension in Rats.
3. 学会等名 JCS 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Li M, Zheng C, Kawada T, Uemura K, Inagaki M, Sugimachi M.
2. 発表標題 Donepezil Treatment Prevents the Progression of Chronic Heart Failure and Improves the Prognosis in Spontaneously Hypertensive Rats with Myocardial Infarction.
3. 学会等名 第97回日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李 梅花、稲垣 正司、鄭 燦、川田 徹、上村 和紀、杉町 勝
2. 発表標題 迷走神経刺激は心筋梗塞ラットにおける間葉系幹細胞移植の治療効果を増強する
3. 学会等名 第58回生体医工学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 C. Zheng, M. Li, K. Uemura, T. Kawada, M. Inagaki, M. Sugimachi
2. 発表標題 Chronic vagal nerve stimulation suppress thirst through decreasing vasopressin secretion in the rats with chronic heart failure
3. 学会等名 ESC Asia
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
研究分担者	杉町 勝  (Suhimachi Masaru)  (40250261)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員   (84404)	
研究分担者	李 梅花  (Li Meihua)  (60443496)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員   (84404)	

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
---------	---------