

## 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5月1日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590283

研究課題名（和文） 心筋細胞内アセチルコリン産生系のエネルギー代謝調節と病態への関与の可能性

研究課題名（英文） Involvement of a non-neuronal cardiac cholinergic system in energy metabolism and pathophysiological situations

研究代表者

柿沼 由彦（KAKINUMA YOSHIHIKO）

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：40233944

研究成果の概要（和文）：我々は、これまで古典的な心臓に対する副交感神経系の生理学的機能に対して、我々は生化学的・分子生物学的・細胞生物学的に解析を進め、副交感神経系の神経終末から放出される ACh に、抗不整脈作用・抗アポトーシス作用・虚血耐性獲得機構活性化・血管新生促進作用という新規機能を見出し、さらに心筋細胞が ACh を産生してこれらの作用を担っていることも世界で初めて報告した。本研究では、この心筋細胞 ACh 産生系にはエネルギー代謝を抑制し細胞を余分なエネルギー消費から守り、細胞を保護すること、またこの心筋細胞 ACh 産生系を活性化させることで病態改善、病態進行抑制の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have so far reported novel effects of parasympathetic nerve system-derived ACh in the cardiovascular system. Recently it has been reported that a cholinergic system is composed of a classical parasympathetic nerve system and a non-neuronal cholinergic system. The classical parasympathetic nerve system plays a role in inhibiting a function of sympathetic nerve system, i.e., decreasing of heart rate and cardiac contraction. In contrast, the non-neuronal cholinergic system means that ACh is synthesized by a cell at its local site, and a non-neuronal cardiac cholinergic system is that one cardiomyocytes synthesizes ACh independently from the classical parasympathetic nerve system. Novel functions of ACh other than modulating sympathetic nerve, which we have identified, includes anti-arrhythmogenic effects, anti-apoptotic effects, hypoxia tolerance effects and angiogenesis accelerating effects. It is expected that those effects are also regulated by the non-neuronal cardiac cholinergic system. In the current study, we have revealed that this system plays a role in negatively regulating cellular energy metabolism, preventing cells from overshooting oxygen consumption leading to cell protection, and that this system is upregulated by pharmacological intervention and some manipulation other than drugs. Taken together, these results raise a possibility that this system can be a therapeutic target and a tool to profoundly understand a pathophysiology of cardiovascular diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：心血管・血液・アセチルコリン

### 1. 研究開始当初の背景

これまで研究代表者は、迷走神経（副交感神経系）刺激が心筋梗塞後心不全ラットの生存率を改善するメカニズムの研究の中で、

- 1) ACh による抗不整脈作用 (Circulation 2005, J Pharmacol Sci 2006, FEBS lett 2007)
- 2) ACh による PI3K/Akt/HIF-1 $\alpha$  生存シグナルを介した虚血耐性獲得 (FEBS lett 2005)
- 3) ACh による血管新生促進作用 (J Physiol Sci 2006) などを明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

しかし、この ACh の由来は本当に迷走神経のみからであるのかという疑問が生まれた。というのも、迷走神経は確かに心房レベルでその分布は豊富であるが、心室レベルの分布は非常に疎な分布を示すという解剖学的特徴を持っているからである。特にヒトや齧歯類ではそうであることが報告されている。迷走神経の刺激による心臓リモデリング抑制効果は、したがって単に心拍数を減少させるという効果のみでは説明がつかないことが予想される。そこで、外からの ACh 刺激により心筋細胞自らが ACh を産生するのではないかとこの心筋細胞 ACh 産生系がどのようなメカニズムで病態に関連するかを検討するのが、本研究の目的である。

### 3. 4. 研究の方法およびその成果

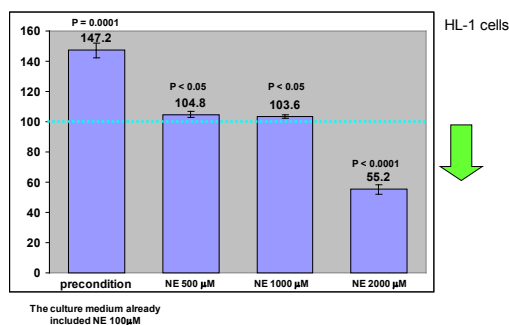
【結果①】非神経性細胞内 ACh 産生系の機能的意義としては、エネルギー代謝（酸素消費量）を抑制し、その結果細胞内 ATP 含量を増加させることが明らかとなった。一方でこれは MTT 活性を低下させることを反映した。

この細胞内 ChAT ノックダウン細胞を HEK293 細胞および HL-1 細胞を用いて ChAT ノックダウン用 miR RNAi vector を用いて作製し (stable transformant)、その酸素消費量と ATP 含有量、MTT 活性を比較した。また H9c2 細胞を ChAT 抑制薬で処理しても同様の結果となり、細胞種を超えた普遍的な機能を細胞内 ACh 産生系は持つことが明らかとなった。

【結果②】心筋細胞におけるこの系はノルエピネフリンによる細胞死を抑制する機能として重要であることが明らかとなった。

ChAT ノックダウン心筋細胞とノルエピネフリンの共存下での細胞死への影響を、コントロール細胞と比較検討した (下図)。

The ratio of cell viability of ChAT KO cells to negative control cells is evaluated by a MTT activity ratio.



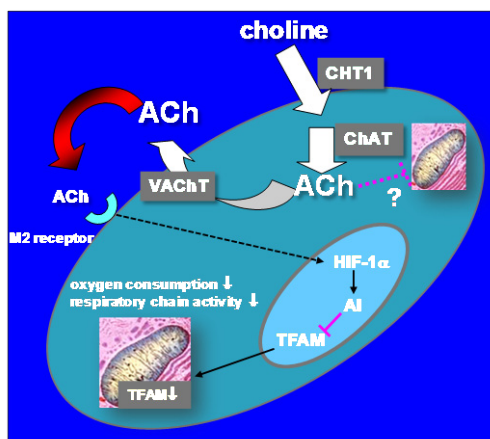
【結果③】細胞内 ACh 産生系は、細胞間コミュニケーション（細胞間接着）機能に必須であることが明らかとなった。

ChAT ノックダウン心筋細胞では、コントロール細胞と比較して、ギャップ結合構成蛋白である Cx43 の蛋白発現と細胞間でのギャップ結合の形成が抑制された。

またこれは形態学的評価だけの結果ではなく、機能的評価（ギャップ結合機能の評価）を LY 色素を用いて行ったところ、その色素の心筋細胞間輸送は明らかに ChAT ノックダウン細胞において抑制されていたことから明らかとなった。

【結果④】細胞内 ChAT 産生系を賦活化させる薬剤としてドネペジルを見出し、この薬剤はラット心筋梗塞モデルに対して心臓保護的に働き、また下肢虚血モデルにおいてはその血管新生促進効果を発揮することが明らかとなった。

このドネペジルには ACh 同様 HIF-1 $\alpha$  誘導作用があり、この転写因子である HIF-1 $\alpha$  によって正に調節される下流遺伝子群の中には、核に局在し、ミトコンドリア転写因子 (TFAM) 自体の転写を負に調節する apoptosis inhibitor が存在することが明らかとなった。このことは、細胞内 ACh 産生系がエネルギー代謝質質の変換に深く関与することを示唆するものである (下図)。



## 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 12 件)

- ① Kakinuma Y, Okada S, Nogami M, Sano S, Kumon Y. Systemic inflammation impairs cardiac glucose uptake. *Int J Cardiol* 154;2012, 203-204. (査読有)
- ② Morita T, Kakinuma Y, Kurabayashi A, Fujieda M, Sato T, Shuin T, Furihata M, Wakiguchi H. Conditional VHL gene deletion activates a local NO-VEGF axis in a balanced manner reinforcing resistance to endothelium-targeted glomerulonephropathy. *Nephrol Dial Transpl* 26;2011, 4023-4031. (査読有)
- ③ Arikawa M, Kakinuma Y, Handa T, Yamasaki F, Sato T. Donepezil, Anti-Alzheimer's Disease Drug, Prevents Cardiac Rupture during Acute Phase of Myocardial Infarction in Mice. *PLoS One*. 6;2011, e20629. (査読有)
- ④ 柿沼由彦 アセチルコリンの pleiotropic action から心筋内アセチルコリン産生系まで 自律神経 *48;2011, 173-175. (査読無)*
- ⑤ Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Yamasaki F, Sato T. Differential regulation of TNF receptors by vagal nerve stimulation protects heart against acute ischemic injury. *J Mol Cell Cardiol* 49;2010, 234-244. (査読有)
- ⑥ Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Sato T. Engineered heart tissue: a novel tool to study the ischemic changes of the

heart in vitro. *PLoS One*. 5;2010, e9275. (査読有)

- ⑦ Kakinuma Y, Furihata M, Akiyama T, Arikawa M, Handa T, Katare RG, Sato T. Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, promotes angiogenesis in an ischemic hindlimb model. *J Mol Cell Cardiol* 48;2010, 680-693. (査読有)
- ⑧ Kakinuma Y, Akiyama T, Sato T. Cholinceptive and cholinergic properties of cardiomyocytes involving an amplification mechanism for vagal efferent effects in sparsely innervated ventricular myocardium. *FEBS J* 276;2009, 5111-5125. (査読有)
- ⑨ Handa T, Katare RG, Kakinuma Y, Arikawa M, Ando M, Sasaguri S, Yamasaki F, Sato T. Anti-Alzheimer's drug, donepezil, markedly improves long-term survival after chronic heart failure in mice. *J Card Fail* 15;2009, 805-811. (査読有)
- ⑩ Katare GR, Kakinuma Y, Arikawa M, Yamasaki F, Sato T. Chronic intermittent fasting improves the survival following large myocardial ischemia by activation of BDNF/VEGF/PI3K signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* 46;2009, 405-412. (査読有)
- ⑪ Katare GR, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Handa T, Yamasaki F, Sato T. Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of opening of mitochondrial permeability transition pore independent of the bradycardiac effect. *J Thorac Cardiovasc Surgery* 137;2009, 223-231. (査読有)
- ⑫ 半田武巳、Katare GR、柿沼由彦、有川幹彦、安藤元規、山崎文靖、佐藤隆幸、篠栗志朗 Donepezil を使用した容量負荷心不全マウスにおける心機能改善効果、生存率改善効果の検討 *心臓* 41;2009, 115-123. (査読無)

[学会発表] (計 23 件)

- ① Kakinuma Y, Akiyama T, Sato T. A non-neuronal cardiac cholinergic system (nCCS) in cardiomyocytes plays a role in suppressing overshooting energy metabolism 第 89 回日本生理学会大会 長野県松本市文化会館 長野 3/29 (29-31), 2012
- ② Arikawa M, Kakinuma Y, Noguchi T, Sato

- T. Donepezil prevents cardiac rupture during acute phase of myocardial infarction in mice  
第 89 回日本生理学会大会 長野県松本市文化会館 長野 3/30 (29-31), 2012
- ③ 柿沼由彦 トピックス 2 非薬物的自律神経介入治療の最前線 Cholinceptive Cholinergic Properties of Cardiomyocytes: Amplification Mechanism for Vagal Efferent Effects. 第 76 回日本循環器学会学術総会 福岡国際会議場 福岡 3/16 (16-18), 2012
- ④ Arikawa M, Kakinuma Y, Noguchi T, Yamasaki F, Satoh T. Donepezil, an Acetylcholinesterase Inhibitor, Prevents Cardiac Rupture during Acute Phase of Myocardial Infarction in Mice. 第 76 回日本循環器学会学術総会 福岡国際会議場 福岡 3/17 (16-18), 2012
- ⑤ Sakamoto S, Higuchi T, Kakinuma Y, Kai S, Todaka H, Yagyu K, Obata E, Morisawa K, Fukushima A, Tsuda M, Taniguchi T Molecular mechanisms of muscular abnormality in transgenic mice overexpressing NF90, a dsRNA binding protein. 16<sup>th</sup> Annual Meeting of the RNA Society, Kyoto, Japan. June 14-18, 2011
- ⑥ Morita T, Kakinuma Y, Kurabayashi A, Fujieda M, Sato T, Shuin T, Furihata M, Wakiguchi H. Conditional VHL gene deletion activates a local NO-VEGF axis in a balanced fashion to reinforce resistance to endothelium-targeted glomerulonephropathy. 11<sup>th</sup> Asian Congress of Pediatric Nephrology 2011, Fukuoka, Japan. June 2-4, 2011
- ⑦ Arikawa M, Kakinuma Y, Noguchi T, Sato T. Acetylcholinesterase Inhibitor Donepezil in Treatment of Myocardial Ischemia and Heart Failure. ISAN/AAS2011 (Satellite Meeting) Rio de Janeiro, Brasil, Sept 18, 2011
- ⑧ Kubo T, Kitaoka H, Kakinuma Y, Satoh T, Doi Y. Beneficial Effects of Donepezil, an Acetylcholinesterase Inhibitor, on Heart Failure 第 75 回日本循環器学会学術総会 パシフィコ横浜 神奈川 8/3-4, 2011
- ⑨ Morita T, Kakinuma Y, Kurabayashi A, Fujieda M, Sato T, Shuin T, Furihata M, Wakiguchi H. Conditional VHL gene deletion activates a local NO-VEGF axis in a balanced fashion to reinforce resistance to endothelium-targeted glomerulonephropathy. 第 46 回日本小児腎臓病学会学術集会 福岡国際会議場 福岡 6/2-4, 2011
- ⑩ 有川幹彦, 柿沼由彦, 野口達哉, 佐藤隆幸 ドネペジルは、マウス心筋梗塞モデルにおいて、マクロファージ MMP-9 の産生を抑制することにより急性期心破裂の危険率を低減する 第 12 回 Neurocardiology Workshop 東京ステーションコンファレンス 東京都 7/30, 2011
- ⑪ 柿沼由彦, 秋山 剛, 有川幹彦, 岡崎佳代, 佐藤隆幸 心筋細胞内アセチルコリン産生系の生物学的意義 第 63 回日本生理学会中国四国地方会 広島大学 10/22, 2011
- ⑫ 有川幹彦, 柿沼由彦, 野口達哉, 佐藤隆幸 ドネペジルはマウス心筋梗塞モデルにおいて、マクロファージ MMP-9 産生を抑制し急性期心破裂の危険率を低減する 第 63 回日本生理学会中国四国地方会 広島大学 10/23, 2011
- ⑬ Arikawa M, Kakinuma Y, Yamasaki F, Sato T. Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, reduces the risk of left ventricular free wall rupture during an acute phase of myocardial infarction by attenuating macrophage matrix metalloproteinase-9. 19<sup>th</sup> International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society, Fukuoka, Japan. Sept. 23-26, 2010
- ⑭ Kakinuma Y, Sato T. The new era of therapeutic modalities against heart failure, focusing on pharmacological intervention of the cardiovascular cholinergic system. 19<sup>th</sup> International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society, Fukuoka, Japan. Sept. 23-26, 2010
- ⑮ Ed Yellin Award Lecture Kakinuma Y, Akiyama T, Arikawa M, Sato T. Effects of a non-neuronal cholinergic system equipped for cardiomyocytes, as a molecular brake, on overshooting cardiac energy metabolism. 19<sup>th</sup> International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society, Fukuoka, Japan. Sept. 23-26, 2010
- ⑯ 柿沼由彦 アセチルコリンの pleiotrophic action から心筋内アセチルコリン産生系まで 第 63 回日本自律神経学会総会 ワークピア横浜 10/22-23, 2010

- ⑰ 柿沼由彦 心筋細胞内アセチルコリン産生系の生物学的意義 第 11 回 Neurocardiology Workshop 東京ステーションコンファレンス 7/31, 2010
- ⑱ 柿沼由彦 非中枢性細胞内アセチルコリン産生系がもつ多様な生物学的意義について  
第 5 回 旭川医科大学脈管クラスター研究会 旭川医科大学 6/18, 2010
- ⑲ 久保亨、西永正典、柿沼由彦、佐藤隆幸、土居 義典  
塩酸ドネペジル内服による心血管系への影響に関する前向き登録調査研究  
第 11 回 Neurocardiology Workshop 東京ステーションコンファレンス 7/31, 2010
- ⑳ Kakinuma Y, Akiyama T, Arikawa M, Handa T, Sato T. Effects of a non-central and non-neuronal acetylcholine synthesis system equipped for cardiomyocytes, as a molecular brake, on overshooting cardiac energy metabolism.  
第 31 回日本循環制御医学会総会 千里ライフセンター 大阪 5/28-5/29, 2010
- (21) Kakinuma Y, Akiyama T, Arikawa M, Handa T, Sato T. Effects of a non-neuronal acetylcholine synthesis system equipped for cardiomyocytes, as a molecular brake, on overshooting cardiac energy metabolism. 第 74 回日本循環器学会学術総会 京都国際会議場 3/5-7, 2010
- (22) 森田拓、井口みつこ、柿沼由彦、倉林 睦、藤枝幹也、脇口宏、執印太郎、佐藤隆幸、降幡睦夫 VHL 遺伝子不活性化によるマウス虚血再灌流障害の抑制 第 52 回日本腎臓学会学術総会 パシフィコ横浜 6/3-6/5, 2009
- (23) Handa T, Sato T, Kakinuma Y, Arikawa M, Sasaguri S. Donepezil, an Acetylcholinesterase Inhibitor Against Alzheimers Dementia, Prevents Remodeling in Volume-Overload Heart Failure Mice : Local and Central effect of Donepezil. 第 73 回日本循環器学会学術総会 大阪国際会議場 3/20-22, 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柿沼 由彦 (KAKINUMA YOSHIHIKO)  
高知大学・教育研究部医療学系・准教授  
研究者番号：40233944

### (2) 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

有川幹彦 (ARIKAWA MIKIHICO)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号：20432817

野口達哉 (NOGUCHI TATSUYA)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号：50566495  
(H23)

鄭燦 (ZHENG CAN)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号：50443495  
(H21→H22)