

## 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25年 6月20日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590799

研究課題名（和文）迷走神経刺激による心血管再生療法の開発

研究課題名（英文）Vagal stimulation, a novel therapeutic approach for cardiovascular regeneration

研究代表者

李 梅花 (LI MEIHUA)

独立行政法人国立循環器病センター・研究所・特任研究員

研究者番号：60443496

研究成果の概要（和文）：急性心筋梗塞・心不全の新しい治療法—迷走神経刺激による心血管再生療法の可能性を検討した。急性心筋梗塞の早期に迷走神経刺激を行うことによって、早期生存率の改善、著明な抗炎症・抗アポトーシス効果、心臓リモデリングの抑制効果が認められた。これらの治療効果には、迷走神経刺激による心臓内在性心筋幹/前駆細胞の増殖・分化誘導の促進作用が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated that vagal stimulation (VS) prevented the cardiac remodeling and death in post-myocardial infarction rats. However, the precise mechanisms of cardiac protection by VS have not been fully elucidated. To develop a novel cardiovascular regeneration therapy with vagal stimulation (VS), this study examined the role of VS on activation of endogenous cardiac stem cells (CSCs) after acute myocardial infarction. The results suggested that the preservation of cardiac function by VS in AMI rats maybe mediated partly by activation of CSCs and induction of angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
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・循環器内科学

キーワード：急性心筋梗塞、慢性心不全、迷走神経刺激、心血管新生、心臓リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

急性冠疾患の生存率の改善とともに心不全患者は増加傾向にあり、慢性心不全患者の治療が重要になっている。特に、重症心不全患者の予後は、内科的薬物療法の進歩、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不良であり、2年間の生存率は約50%とされている。心臓移植は根治的治療であるが、ドナー不足は明白であり、心移植に代わる治療法の確立は急務である。

近年、再生医療は機能不全に至った臓器に対する新しい根治療法としてあらゆる臓器で研究されている。心臓においても、胚性幹細胞、骨髄間葉系幹細胞・造血幹細胞・骨格筋芽細胞などの組織幹細胞、心臓内幹細胞による再生医療が意欲的に研究されており、一部の組織幹細胞による細胞移植治療ですでに臨床応用も進みつつある。しかしながら、機序に不明な点が多いこと、必ずしも治療効果が一定でないこと、胚性幹細胞に関する倫理面での問題、副作用としての不整脈発生の可能性など解決すべき問題は多い。特に、細胞移植による再生治療においては移植細胞の生着率が非常に低く、十分な数の心筋と血管細胞の両者を再生する方法は確立されていない。また、最近の研究により長い間終末分化型の臓器と見られた成熟心臓の中にもごくわずかながら自己増殖能をもった心筋幹/前駆細胞が存在し、急性心筋梗塞や心不全病態等の心筋損傷時に心筋細胞の自己複製を行っていることが確認され、心臓内心筋幹/前駆細胞による再生療法が注目されている。しかし、この内在性心筋幹細胞の絶対数、増殖能力、分化効率は非常に低く、これらの内在性心筋幹細胞をいかに増殖・分化させるかが大きな課題となっている。

一方、これまでの臨床および基礎研究結果から、進行する心不全は心臓だけの疾患ではなく、循環調節系の異常に伴う迷走神経活動の低下や交感神経活動の亢進が心不全の予後を規定する重要な因子であることが明らかとなっている。そこで、我々は異常な循環調節系に人工的に介入することで心不全の進行や重症化を阻止する迷走神経刺激の治療方法を開発してきた。これまでに、迷走神経刺激による急性心筋梗塞ラットでの著明な抗不整脈効果や、ラット慢性心不全モデルにおいて迷走神経刺激を行うことによって

心臓リモデリングの進展が抑制され、心不全死および突然死が劇的に減少して心筋梗塞20週後の生存率が50%から86%に改善することを報告した。さらに、迷走神経の電気刺激によって心筋梗塞ラットにおける骨髄間葉系幹細胞の移植治療効果が向上することも報告した。これらの心筋梗塞・心不全治療効果の機序として、迷走神経刺激による心負荷の軽減以外に、迷走神経刺激による血管新生作用や抗アポトーシス効果、ギャップ結合のリモデリング抑制作用が関与していることが推測されているが、詳細は不明である。最近の研究によって、副交感神経系は、様々な病態において免疫・炎症反応の調節に重要な役割を果たすことや、肝臓や肺、脳神経などではムスカリン受容体を介してPI3キナーゼ/Akt経路を活性化させ幹/前駆細胞の増殖に関与していることが報告されている。また、PI3キナーゼ/Akt経路の活性化が心臓においても心筋幹/前駆細胞の増殖や分化に重要な役割を果たすことが明らかとなって来ている。

これらの背景から、我々は、迷走神経刺激による心筋梗塞・心不全治療効果は、心負荷の軽減以外に免疫・炎症反応の調節やPI3キナーゼ/Akt経路の活性化による心筋組織の再生に関与しているのではないかと着想した。

## 2. 研究の目的

(1) 迷走神経刺激による急性心筋梗塞・心不全の治療法を確立するために、急性心筋梗塞後心不全ラットにおいて迷走神経刺激が早期生存率・心臓リモデリングに及ぼす治療効果を検討した。

(2) 迷走神経刺激による心血管再生の可能性を評価するために、迷走神経刺激による急性心筋梗塞ラットに対する抗炎症・抗アポトーシス、内在性心筋幹/前駆細胞の増殖・分

化誘導など評価した。

### 3. 研究の方法

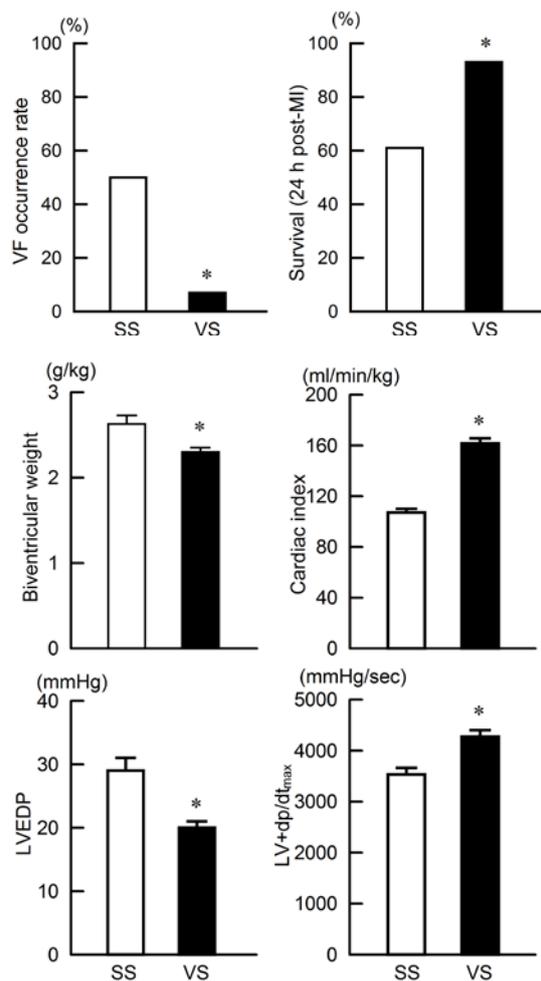
(1) 8週令のオス SD ラットを用いた。1.5% ハロセン麻酔下に、ラットの腹部皮下に心電図テレメトリ装置を植え込み、頸部右迷走神経に自作したステンレスワイヤ電極を装着して植込み式遠隔制御刺激装置と接続し、PC制御による迷走神経刺激を可能にした。1週間後麻酔下に、増殖した細胞の BrdU ラベル化のために、背中に osmotic minipump を埋め込んで BrdU を持続投与した ( $10 \mu\text{g/day/g}$ )。その後開胸し、左冠状動脈を結紮して急性心筋梗塞を作成した。迷走神経刺激治療群 (VS) と非治療群 (SS) に無作為に振り分けて、迷走神経刺激治療を心筋梗塞作成1時間後から4週間行った。迷走神経の電気刺激方法は、PC制御により1分間に10秒のみの間欠刺激で平均心拍数を10~20%低下させるように設定した ( $0.1\sim 0.13\text{mA}$ 、パルス幅  $0.2\text{ms}$ 、刺激頻度  $20\text{Hz}$ )。治療を行う4週間の間、リアルタイムに心拍数と心電図を連続記録してコンピュータに保存し、経過中の心拍数・不整脈の発生頻度を評価した。治療終了後、麻酔下に、右房圧、心拍出量等急性血行動態を測定した。ラットを安楽死させる前に採血し、血中の脳性ナトリウムペプチド (BNP)、カテコラミンの分析を行った。安楽死後に心臓を摘出し、心重量を測定した。

(2) 4週間の治療終了後、麻酔下に摘出した心臓を免疫組織化学的方法により検討した。細胞表面抗原 (c-kit, Sca-1)、心筋・血管細胞の初期転写因子、心筋・血管細胞特異的タンパクを染色し、BrdU-bindingされた細胞および Ki67 陽性細胞を同定することにより、心筋幹/前駆細胞の増殖・分化誘導を評価した。また、血管密度の定量的評価により血管新生について検討し、TNF- $\alpha$ 、IL-6 や MIP-2 から迷走神経刺激の抗炎症作用を評価

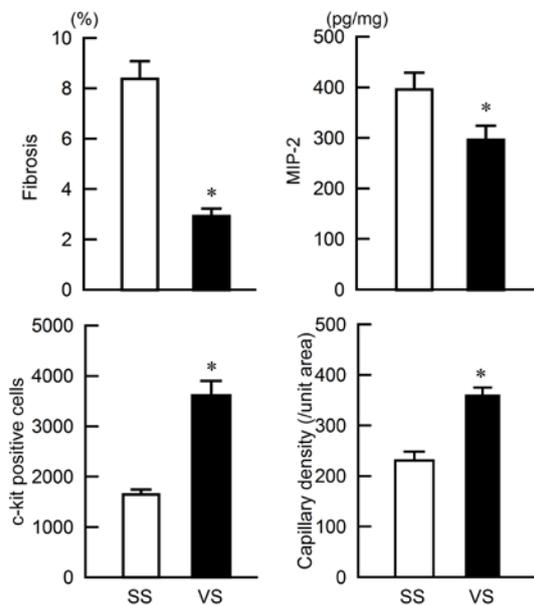
した。

### 4. 研究結果

(1) 迷走神経刺激は心筋梗塞ラットの致死性不整脈を抑制し、心筋梗塞ラットの24時間以内の死亡率を有意に低下させた。4週間後、心臓リモデリング・心機能の各指標は SS 群に比べて VS 群で有意に改善された (下図)。また、VS 群では SS 群に比べて、心不全の重症度を反映する血中ノルエピネフリン ( $542 \pm 181$  vs.  $2366 \pm 831$  pg/ml,  $p < 0.05$ ) と BNP ( $368 \pm 9$  vs.  $413 \pm 19$  pg/ml,  $p < 0.01$ ) も有意に低かった。これらの結果から、心筋梗塞急性期から開始した迷走神経の慢性電気刺激は24時間以内の致死性不整脈による死亡率を低下させ、心臓リモデリングを抑制し、心機能を改善することが明らかになった。



(2) 迷走神経刺激は心臓内の血管新生を促進し、心筋の繊維化を有意に抑制した。また、迷走神経刺激による抗炎症効果も示された。さらに、迷走神経刺激による内因性心筋幹／前駆細胞(c-kit+)の増加が示された(下図)。以上の結果から、心筋梗塞後迷走神経刺激による治療効果に、迷走神経刺激による内因性心血管再生が関与する可能性が示唆された。今後、心筋幹／前駆細胞の培養細胞実験によって、迷走神経刺激による心血管再生の機序を明らかにし、迷走神経刺激による心血管再生療法の基盤を確立する予定である。



##### 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 6 件)

1. Kawada T, Li M, Shimizu S, Kamiya A, Uemura K, Turner MJ, Mizuno M, Sugimachi M. High-frequency dominant depression of peripheral vagal control of heart rate in rats with chronic heart failure *Acta Physiol (Oxf)*. 査読有. 2013 Mar;207(3):494-502.
2. Kawada T, Shimizu S, Li M, Kamiya A,

Uemura K, Sata Y, Yamamoto H, Sugimachi M. Contrasting effects of moderate vagal stimulation on heart rate and carotid sinus baroreflex-mediated sympathetic arterial pressure regulation in rats. *Life Sci*. 査読有. 2011;89:498-503.

3. 川田 徹, 李 梅花, 杉町 勝. 動脈圧反射の開ループ解析と心不全への応用. 循環制御. 査読有. 2011;32:139-148.
4. Uemura K, Zheng C, Li M, Kawada T, Sugimachi M. Early short-term vagal nerve stimulation attenuates cardiac remodeling after reperfused myocardial infarction. *J Card Fail*. 査読有 2010 Aug;16(8):689-99.
5. Kawada T, Li M, Kamiya A, Shimizu S, Uemura K, Yamamoto H, Sugimachi M. Open-loop dynamic and static characteristics of the carotid sinus baroreflex in rats with chronic heart failure after myocardial infarction. *J Physiol Sci*. 査読有 2010;60:283-98.
6. 上村 和紀, 李 梅花, 砂川 賢二, 杉町 勝. 心筋梗塞に伴う急性心不全および慢性心不全に対する医工学的アプローチ. 循環器病研究の進歩. 査読有 2010;61-67.

[学会発表] (計 10 件)

1. Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, Shishido T, Sugimachi M. Peripheral but not central blockade of  $\alpha 7$ -Nicotinic acetylcholine receptors attenuates cardio-protective effects of donepezil in chronic heart failure rats. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 15-17 March 2013. Yokohama,

- Japan.
2. 李 梅花、鄭 燦、川田 徹、稲垣正司、上村 和紀、杉町 勝. 心筋梗塞後重症心不全治療における末梢性 $\alpha 7$ -ニコチン性アセチルコリン受容体を介したアセチルコリンエステラーゼ阻害薬（ドネペジル）の心臓保護作用. 日本薬学会第 133 年会 27-30 March 2013. Yokohama, Japan.
  3. Li M, Inagaki M, Zheng C, Kawada T, Uemura K, Sugimachi M. Chronic vagal stimulation promotes cardiac regeneration by activation of endogenous cardiac stem cells in rats after acute myocardial infarction. AHA 2012. 3-7 November 2012. Los Angeles, Calif.
  4. Li M, Zheng C, Inagaki M, Kawada T, Uemura K, Sugimachi M. Contribution of peripheral versus Central  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors to cardio-protective effects of donepezil in chronic heart failure rats. AHA 2012. 3-7 November 2012. Los Angeles, Calif.
  5. 李 梅花、鄭 燦、川田 徹、稲垣正司、上村 和紀、杉町 勝. 末梢性 $\alpha 7$ -ニコチン性アセチルコリン受容体を介したドネペジルの心筋梗塞後重症心不全における心臓保護作用. 第 33 回日本循環制御医学会総会. 2012. 6. 2-3. 栃木、日本.
  6. 李 梅花、鄭 燦、川田 徹、稲垣正司、杉町 勝. アセチルコリンエステラーゼ阻害薬（ドネペジル）とロサルタンの長期併用投与による心筋梗塞後重症心不全ラットの心機能・長期生存率の改善作用. 日本薬学会第 132 年会 28-31 March 2012. Hokaidou, Japan.
  7. Li M, Inagaki M, Zheng C, Kawada T, Uemura K, Shishido T, Sugimachi M. Vagal stimulation markedly suppressed arrhythmic death and prevented cardiac dysfunction in rats after acute myocardial infarction. ESC 2011. 27-31 August 2011; Paris, France.
  8. Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Takaki H, Sugimachi M. Restoration of Vagal Tone by Donepezil, on top of losartan treatment, markedly suppresses ventricular dysfunction and improves long-term survival in chronic heart failure rats. ESC 2011. 27-31 August 2011; Paris, France.
  9. Li M, Inagaki M, Zheng C, Kawada T, Uemura K, Shishido T, Sugimachi M. Vagal stimulation markedly suppressed arrhythmic death and prevented cardiac dysfunction in rats after acute myocardial infarction. 19<sup>th</sup> International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society. 2010. 9. 23-26. Fukuoka, Japan.
  10. 李 梅花、稲垣 正司、鄭 燦、川田 徹、上村 和紀、宍戸 稔聡、杉町 勝. 急性期からの迷走神経の慢性電気刺激は心筋梗塞ラットの致死性不整脈と心臓リモデリングを抑制する. 第 32 回日本循環制御医学会総会. 2010. 5. 28-29. 富山、日本.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 李 梅花 (LI MEIHUA)
- 独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員
- 研究者番号：60443496

(2)研究分担者

稲垣 正司 (INAGAKI MASASHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：80359273

鄭 燦 (ZHENG CAN)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：50443495

(3)連携研究者

川田 徹 (KAWADA TORU)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：30243752

上村和紀 (UEMURA KAZUNORI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：10344350