

## 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5月20日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591138

研究課題名（和文） 左心不全ラットの脳における神経内分泌学的研究

研究課題名（英文） Neuroendocrinological study in the brain of model rats with left ventricular heart failure

研究代表者

宮田 市郎 (MIYATA ICHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10200180

研究成果の概要（和文）：本研究によりストレス関連ペプチドである Urocortin-2,-3(以下 Ucn-2,-3) は血中レベルにおいて左心負荷の鋭敏なマーカーになり得ることが判明した。さらに、慢性的な左心負荷という酸化ストレスが Ucn-2,-3 を介して脳内で慢性炎症を惹起するとともに、サイトカインシグナルの負の制御機構にも作用する可能性が示唆された。また、左心負荷により Ucn-3 は Nesfatin-1 とは independent な機序でエネルギー代謝にも影響を及ぼすことが推測される。

研究成果の概要（英文）：Our results indicate that Ucn-2 and Ucn-3 can be sensitive markers for left ventricular heart loading, and endogenous Ucn-2 and Ucn-3 through CRF-R2 are critical molecular mediators of the physiological response to heart failure in the central nervous system as well as in the heart. Taken together, our data suggest that left ventricular heart loading induces the increase of inflammatory cytokines such as IL-6, and affects the negative feedback system of cytokine signalings in the brain. Furthermore, it is speculated that Ucn-3 may play an important role in the energy homeostasis through the different pathway from Nesfatin-1 under condition of left ventricular heart failure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
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：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：左心負荷モデルラット、Urocortin-2、Urocortin-3、TNF $\alpha$ 、IL-6、SOCS-3、c-fos、Nesfatin-1

### 1. 研究開始当初の背景

近年心臓も内分泌器官の一つと考えられ、心血管系内分泌学という新しい研究分野が確立されつつある。心臓での作用を有する内分泌活性ペプチドとしては Renin, Angiotensin, Aldosterone, ANP, BNP などがあげられるが、1995年に発見された CRF 関連ペプチドである Urocortin (Vaughan J, et al. Nature 1995; 378: 287-292.) もその心臓での受容体である CRF-R2 に結合し、cAMP 産生活性を介して強い強心作用を発揮することが示されている。更に Urocortin の isoform で心臓に発現している Urocortin-1 および 2 は ANP や BNP と同様に左心不全では血清レベルでも増加が認められる。このように中枢神経系で発現するホルモンが心血管系にも生理的作用を有することが明らかとなってきた。そこで我々は逆の観点から Urocortin やその受容体である CRF-R2 などに着目し、左心不全状態の脳内における神経内分泌学的研究を 2~3 年間で行う予定である。すなわち、本研究では外科的に左心不全ラットを作成し、ラット脳における種々のストレス関連ペプチドやそれらの受容体の発現動態を多角的に解析することにより、心不全という慢性的なストレス状況下での脳内に認められる神経内分泌学的な特徴を明らかにしていく。中枢神経系で発現するストレス関連ペプチドやそれらの受容体に焦点をあて心不全における脳内の神経内分泌学的な検討を行った報告はまだ国内・国外ともになされていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

“心不全の際に脳内でどのような変化が起きているのか”についてはいまのところヒトでもラットでも明らかにされていない。本研究では外科的に左心不全ラットを作成し、ラット脳における種々のストレス関連ペプチドやそれらの受容体の発現動態を多角的に解析することにより、心不全という慢性的なストレス負荷が生じている状況下での脳内に起きている神経内分泌学的な変化を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

【研究計画・方法】概要は以下の通りである。4~5 週齢の Sprague-Dawley (SD) ラット (250~300g) に対して下行大動脈絞扼術を施行し、左心不全のモデルラット(以下 Ao-banding) を作成する。コントロールとして Sham-operated rat も作成する。手術して 4 週間後に断頭により sacrifice し、脳を摘出後 frontal cortex, striatum, hippocampus, septum, amygdala, thalamus, hypothalamus, cerebellum, pituitary gland の 9 つの部位を切り出し、一部の脳より切片標本も作成する。次に分割された脳の各部位より

total RNA を抽出して、real-time PCR を行い、Urocortin-1,-2,-3 (以下 Ucn-1,-2,-3), CRF-R1,-R2, TNF $\alpha$ , IL-6, SOCS-3 (Suppressor of cytokine signaling-3), c-fos, Nesfatin-1 の mRNA の発現量を定量化し、コントロールと比較検討する。更に左心不全ラットの脳の凍結切片を用いて *in situ hybridization* を行い、Urocortin-2, -3, CRF-R2 の発現を解析する。また、視床下部を中心に Nesfatin-1 の発現動態を *in situ hybridization* にても検討する。

また、sacrifice の時には血液も採取し、各種キットを用いて心血管系ホルモンやストレス関連ホルモンの血清中の濃度を測定。Ao-banding 群と control 群において変化が認められるか否かを検討する。

【平成 22 年度】

#### I. 心不全ラットの作成および実験に用いる試料の調整

1. 4~5 週齢の Sprague-Dawley (SD) ラット (250~300g) を 10 匹購入し、以下に示す方法にて下行大動脈絞扼術を施行し、左心不全のモデルラット (Ao-banding) を作成する。

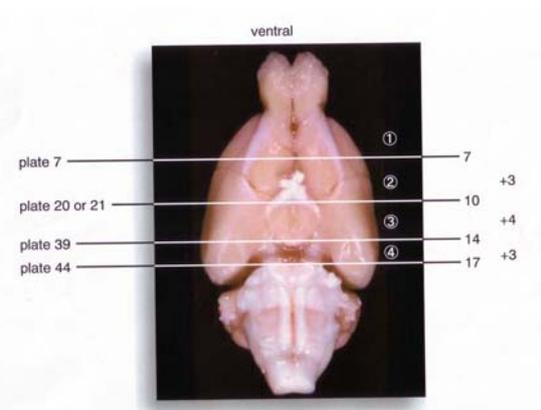
2. SD ラットに対して Pentobarbital 50 mg/kg を腹腔内投与し麻酔導入を行う。その後、20G のアンギオ針で気管内挿管を行い、Harvard 社製の小動物人工呼吸器で呼吸管理を行う。必要に応じて維持麻酔に Isoflurane 1~3% を投与する。右側開胸で左肺を上方に牽引して下行大動脈を同定する。周囲の組織を剥離し、20G のニードルを針を軸に 5-0 ナイロンを用いて下行大動脈を絞扼する。閉胸後に十分な自発呼吸が得られたところで抜管を行う。術後に抗生物質 ABPC 200 mg/kg ip と鎮痛薬 Buprenorphine 0.05 mg/kg ip を行う。抜管後、呼吸状態が安定しない場合は酸素投与を適宜行う。



3. 左心不全の評価：左心負荷の評価は血中 ANP, BNP, NT-pro BNP の測定、マイクロカテーテルによる左心室の収縮終末期圧測定および心エコーで行う。

4. 左心負荷が十分に出現してきた段階で(4週間後)、ラットを断頭によりsacrificeする。

5. ラットの脳分割：断頭後直ちにラットの全脳を摘出し、10匹のうち8匹の脳からは rodent brain matrix、厚さ0.15 mm の razor とリングピンセットを用いて frontal cortex, striatum, hippocampus, septum, amygdala, thalamus, hypothalamus, cerebellum, pituitary gland の9つの部位を切り出し、各々を液体窒素を用いて凍結後-80℃で保存する。残りの2匹の全脳は16時間固定し、10% sucrose を含む0.1M リン酸buffer で凍結保護した後、30μm の厚さにスライスして切片標本を作成し、-20℃で凍結保存する。



6. また、4～5週齢のSDラット10匹をコントロール用として別に購入し、Sham operationを行う。4週間後に断頭によるsacrificeを行い、直ちに脳を摘出し、5匹に関しては更にfrontal cortex, striatum, hippocampus, septum, amygdala, thalamus, hypothalamus, cerebellum, pituitary gland の9つの部位を切り出して各々を-80℃で凍結保存する。残り2匹の全脳は16時間固定し、10% sucroseを含む0.1M リン酸bufferで凍結保護した後、30μm の厚さにスライスして切片標本を作成し、-20℃で凍結保存する。これらの試料は今回の検討のコントロールとして使用する。

## II. 心血管系ホルモンおよびストレス関連ホルモンの血清レベルでの動態変化

下行大動脈絞扼術の術前および sacrificeする直前にSDラット(10匹)の外頸静脈より採血を行い、血清BNP, Corticosterone, Crh, Ucn-1, -2, -3 濃度をそれぞれ EIA kit を用いて測定する。Control群でも同様に測定を行い、両群における血中レベルでの動態変化を検討する。

【平成23年度以降】

## III. 体重増加量と食餌摂取量

Ao-banding群とcontrol群において、手術からsacrificeまでの期間の1日あたりの体重増加量(g/day)と食餌摂取量(g/day)も算出し、比較検討を行う。

## IV. 左心負荷ラットの脳における神経内分泌学的検討

### 1. Real-time PCR 解析

Ao-banding群およびcontrol群の分割された脳の各部位よりRNA 抽出キットを用いてtotal RNA を抽出する。これらのtotal RNA からcDNA を合成した後、Crh, Ucn-1, -2, -3, CRF-R1, CRF-R2, TNFα, IL-6, SOCS-3, c-fos, Nesfatin-1におけるそれぞれ特異的な一組の primer を用いてreal-time PCR を行い、それぞれのmRNAの発現量を定量化する。control群と比較することにより、脳の各部位で左心負荷による発現量の増減を評価する。

### 2. In situ hybridization 解析

Ao-bandingラットおよびcontrolラットの脳の凍結切片を用いてin situ hybridization を行い、Ucn-2, -3, CRF-R2, IL-6, SOCS-3, c-fosのmRNA の発現を解析し、脳の各部位で変化が認められるかどうか検討する。その際、Ucn-2, -3, CRF-R2, IL-6, SOCS-3, c-fosに特異的なsense, antisenseのcRNA probeをDIG RNA Labeling kit を用いて作成後、凍結切片とhibridization を行い、シグナルはDIG Nucleic Acid Detection kit を用いて検出し、顕微鏡にて確認する。また、視床下部(特に室傍核(PVN)、視索上核(SON)、弓状核(ARC))における摂食抑制因子Nesfatin-1の発現に関して、in situ hybridization を行い、control群と差が認められるか比較検討する。

## 4. 研究成果

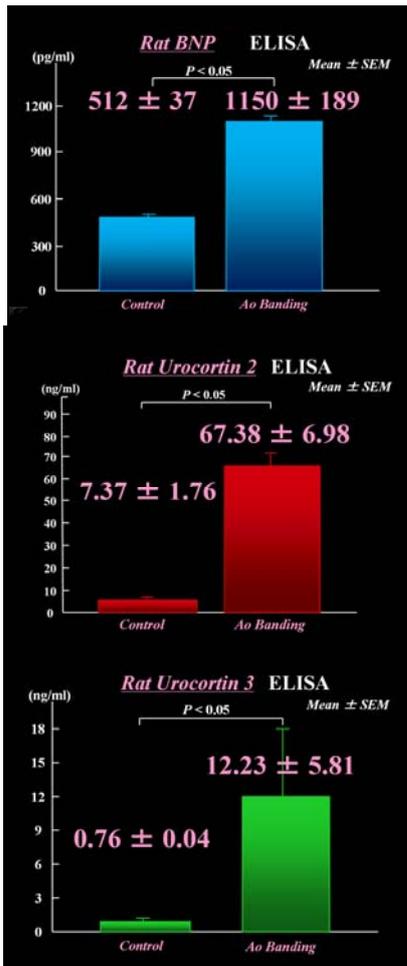
今回の研究にて以下の結果が得られた。

### (1) 心臓カテーテル検査結果

Sacrifice する前に麻酔下で心臓カテーテル検査を行い、両群ラットの左室収縮終末期圧を測定したところ、Ao-banding 群は205.3±8.1/11.3±0.7 mmHg、control 群は110.7±5.2/8.0±1.2 mmHgであった。よって、Ao-banding では十分な左心負荷の生じていることが証明された。

### (2) 心血管系ホルモンおよびストレス関連ペプチドの血清レベルでの動態変化

Ao-banding により血清 BNP, Ucn-2, Ucn-3 濃度の有意な上昇が認められた。特に Ucn-2, Ucn-3 濃度は、control 群と比べ著明に増加していた。しかし、血清 Corticosterone, Crh, Ucn-1 濃度は両群において有意な変化は認められなかった。



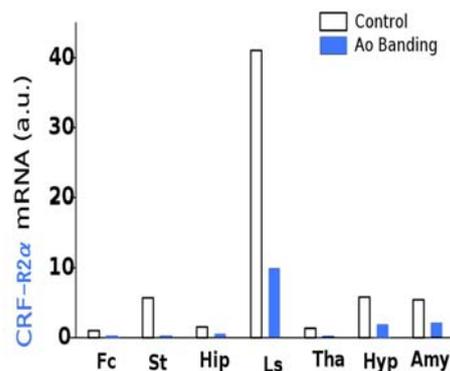
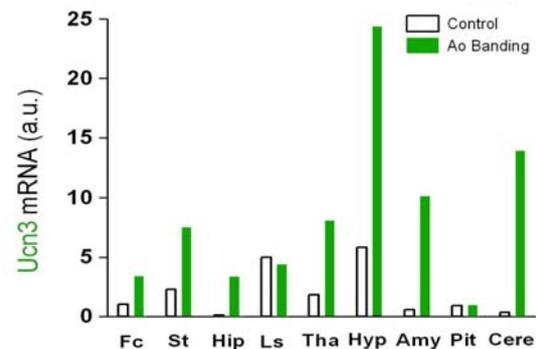
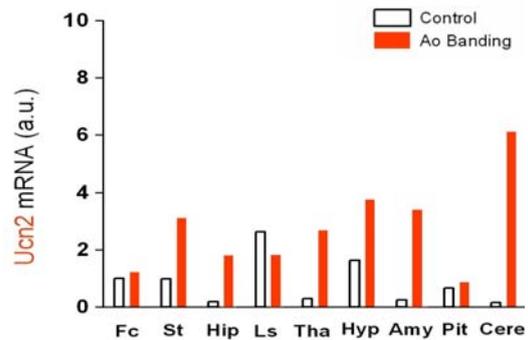
### (3) 体重増加量と食餌摂取量

体重増加量に関しては、Ao-banding 群と control 群の間では  $3.73 \pm 0.78$  (g/day) vs  $5.81 \pm 0.49$  (g/day) と、Ao-banding 群の方が有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。しかし、食餌摂取量に関しては  $20.12 \pm 1.54$  (g/day) vs  $22.28 \pm 0.51$  (g/day) であり、両群に有意差は認められなかった。

### (4) 左心負荷ラットの脳におけるストレス関連ペプチドとその受容体の発現動態 (real-time PCR 解析)

Ucn-2 mRNA の発現量は線条体、海馬、視床、扁桃体、小脳で、Ucn-3 mRNA の発現量は前頭皮質、線条体、海馬、視床、視床下部、扁桃体、小脳において Ao-banding の方が control 群に比し著明に増加しており、両者のパターンは類似していた。さらに脳以外では心臓、腎臓、副腎においても Ao-banding 群の Ucn-2 および Ucn-3 mRNA の発現量は control 群に比べ著明に増加していた。しかし、Ucn-2 と Ucn-3 双方の主な受容体である CRF-R2 に関しては、前頭皮質、線条体、中隔、視床、

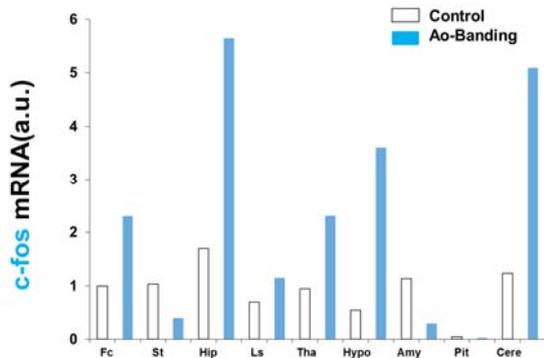
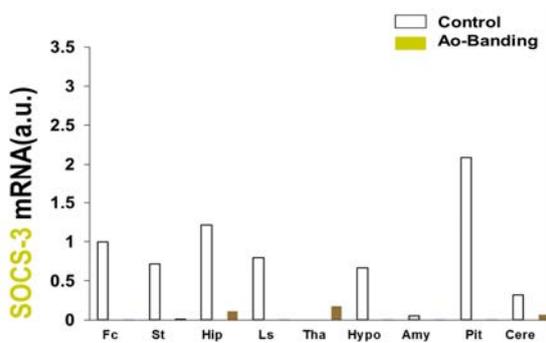
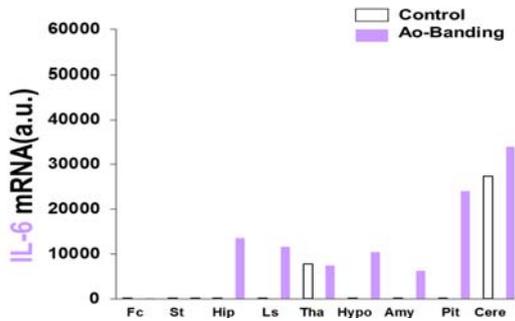
視床下部において Ao-banding の方が control 群に比べ mRNA 発現量は著明に低下しており、down-regulation していることが判明した。一方、Crh と Ucn-1 の mRNA の発現量は脳の 9 部位において Ao-banding 群と control 群の間では有意な差は認められなかった。Crh と Ucn-1 の主な受容体である CRF-R1 の mRNA 発現量に関しても、脳の 9 部位において両群で有意差は認められなかった。



### (5) 左心負荷ラットの脳における炎症性サイトカインの発現動態 (real-time PCR 解析)

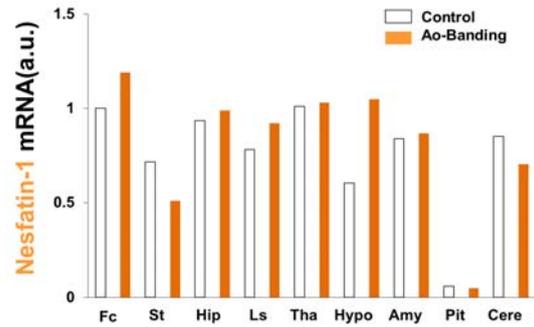
Ao-banding 群では、急性炎症の指標である  $TNF\alpha$  の mRNA 発現量に関しては、脳の各部位において control 群と比較して有意差は認められなかった。一方、慢性炎症で変動する IL-6 の mRNA 発現量は、Ao-banding 群において Ucn-2, -3 と類似し、中隔、海馬、視床下部、扁桃体、下垂体で著明な上昇を認めたが、IL-6

シグナルの抑制系である SOCS-3 は前頭皮質、線条体、海馬、小脳で低下を認めた。さらに IL-6 の third messenger である c-fos の mRNA は、海馬、視床下部、小脳において著明な上昇が認められた。



#### (6) 左心負荷ラットの脳における摂食抑制因子の発現動態 (real-time PCR 解析)

食餌摂取量に関しては Ao-banding 群と control 群の間に有意差は認められなかったが、体重増加量は Ao-banding 群で有意に減少していたことから、中枢性の摂食抑制因子である Nesfatin-1 の mRNA 発現量の検討を行った。しかし、Ao-banding 群と control 群の間には視床下部を中心に脳の各部位において Nesfatin-1 mRNA の発現量に有意差は認められなかった。



以上の結果より、ストレス関連ペプチドである Ucn-2 および Ucn-3 は血中レベルにおいて左心負荷の鋭敏なマーカーになり得ることが判明した。さらに、慢性的な左心負荷という酸化ストレスが Ucn-2,3 を介して脳内で慢性炎症を惹起するとともに、サイトカインシグナルの負の制御機構にも作用する可能性が示唆された。また、左心負荷により Ucn-3 は Nesfatin-1 とは independent な機序でエネルギー代謝にも影響を及ぼすことが推測された。

本研究の結果は左心不全によって惹起される中枢でのストレス応答機構の解明の一助になると考えられる。

#### 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 5 件)

1. 本木隆規、和氣英一、浦島 崇、宮田市郎、東條克能、吉村道博、井田博幸、左心負荷モデルラットにおける脳を中心とした各組織での CRH ファミリーとその受容体の発現動態 「小児内分泌学の進歩 2012」ホルモンと臨床 2013; 59: 1107-1111.

<http://www.igakunosekaisha.com/>

2. Takanori Motoki, Miki Itohisa, Ei-ichi Wake, Takashi Urashima, Ichiro Miyata, Michihiro Yoshimura, Katsuyoshi Tojo and Hiroyuki Ida. Regulation of Gene Expression of CRH-Related Peptides and Their Receptor and Crosstalk with Inflammatory Cytokines in the Brain Caused by Experimental Heart Strain. Endocrine Review 2012; 33(6): SAT-522.

<http://www.endo-society.org/endo2012/audience/media..cfm>

3. Satoru Ikemoto, Ken Sakurai, Yoshihiro Saito, Ichiro Miyata, Noriyuki Katsumata and Hiroyuki Ida. A case of Allgrove Syndrome with a Novel IVS7+1G>A Mutation in the AAAS Gene. Clinical Pediatric Endocrinology 2012;21(1): 11-13.

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/cpe>

4. Takanori Motoki, Ichiro Miyata, Hiroyuki Ida, Michihiro Yoshimura and Katsuyoshi Tojo. Expression of CRH-Related Peptides in the Brain and Heart of Rat Model of Left Ventricular Heart Failure. Endocrine Review 2011; 32(3): P1-365.

<http://www.endo-society.org/endo2011/audience/media.cfm>

5. Erina Ono, Ayako Ozawa, Kaori Matoba, Takanori Motoki, Asako Tajima, Ichiro Miyata, Hiroyuki Ida, Junko Ito and Shozo Yamada. Diagnostic Usefulness of 3 Tesla MRI of the Brain for Cushing's Disease in a Child. Clinical Pediatric Endocrinology 2011; 20(4): 89-93.

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/cpe>

[学会発表] (計7件)

1. 本木隆規, 糸久美紀, 浦島 崇, 宮田市郎, 東條克能, 吉村道博, 井田博幸. 左心負荷モデルラットにおける中枢でのUcnおよび炎症性サイトカインの発現調節とクロストークに関する検討 第46回日本小児内分泌学会 大阪 2012. 9. 27-29.

2. Motoki T, Itohisa M, Wake E, Urashima T, Miyata I, Yoshimura M, Tojo K and Ida H. Regulation of gene expression of CRH-related peptides and their receptor and crosstalk with inflammatory cytokines in the rat brain caused by experimental heart strain. ENDO 2012 Houston, USA 2012. 6. 23-26.

3. 本木隆規, 宮田市郎, 吉村道博, 東條克能. 左心負荷による中枢でのUcn-2,-3とCRF-R2 $\alpha$ 遺伝子の発現調節作用および炎症性サイトカインとのクロストークに関する検討 第85回日本内分泌学会学術総会 名古屋 2012. 4. 19-21.

4. 本木隆規, 糸久美紀, 浦島 崇, 宮田市郎, 東條克能, 吉村道博, 井田博幸. 左心負荷モデルラットにおける脳を中心とした各組織でのCRHファミリーとその受容体の発現動態 第45回日本小児内分泌学会 埼玉 2011. 10. 6-8.

5. Motoki T, Miyata I, Ida H, Yoshimura M, Tojo K. Expression of CRH-related peptides in the brain and heart of model rats with left ventricular heart failure. ENDO 2011 Boston, USA 2011. 6. 4-7.

6. 本木隆規, 宮田市郎, 吉村道博, 東條克能. 左心負荷モデルラットの脳を中心とした各組織におけるUrocortin 1,2,3の発現動態の検討 第84回日本内分泌学会学術総会 神戸 2011. 4. 21-23.

7. 本木隆規, 糸久美紀, 浦島 崇, 宮田市郎, 吉村道博, 東條克能, 井田博幸. 左心負荷モデルラットにおける血清Urocortin濃度 第44回日本小児内分泌学会 大阪 2010. 10. 7-9.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮田 市郎 (MIYATA ICHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10200180

##### (2) 研究分担者

なし

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

浦島 崇 (URASHIMA TAKASHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20338875

##### (4) 研究協力者

本木 隆規 (MOTOKI TAKANORI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：80596263