

## 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 6 月 5 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790226

研究課題名（和文）心不全における活動筋反射:アンジオテンシン II・酸化ストレスの役割

研究課題名（英文） Muscle reflex in heart failure: role for angiotensin II and oxidative stress

研究代表者

木場 智史 (KOBA SATOSHI)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：40565743

研究成果の概要（和文）：

アンジオテンシン(Ang)II の増加が骨格筋中に酸化ストレスをもたらし、それが活動骨格筋による交感神経刺激反射(活動筋反射)を過剰にするとの仮説を検証した。ラットに2週間継続して、AngII を皮下投与した。AngII ラットの活動筋反射応答は、Sham 対照群の応答よりも有意に大きかった。この過剰な活動筋反射応答はスーパーオキシドディスムターゼの模擬化合物であるテンプルを後肢循環中に動脈内投与することで抑制された。また、AngII ラット骨格筋中で、活性酸素およびNADPH酸化酵素の一つであるgp91phoxは増加していた。これらの結果は、上記の仮説を支持するものであった。

研究成果の概要（英文）：

The present study was conducted to test the hypothesis that increased renin-angiotensin system activity in cardiovascular disease including heart failure induces oxidative stress in skeletal muscle, thereby exaggerating the muscle reflex. Rats were implanted with an osmotic-pump containing angiotensin II (AngII) for 14 days. In the AngII-treated rats, the muscle reflex responses (renal sympathetic nerve activity and pressor responses to hindlimb skeletal muscle contraction) were significantly larger than those in the sham-control rats. Tempol, a superoxide dismutase mimetic, reduced the muscle reflex responses in the AngII rats, but not in the sham rats. In skeletal muscle of the AngII rats, increased superoxide and upregulated gp91phox, a NADPH oxidase subunit, were observed. These results in total support our hypothesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：活性酸素 運動 循環器疾患

## 1. 研究開始当初の背景

運動時に循環中枢を刺激して交感神経活動を増加させる神経性入力として、中枢から

の運動指令(セントラルコマンド)と活動筋反射とがある。セントラルコマンドとは、運動発現の意思に伴って大脳皮質より惹起し、運動系および自律神経系を調節する神経信

号である。活動筋反射とは、筋収縮によって産生される代謝産物と筋収縮に伴う機械的な刺激が筋求心性神経線維(III, IV 群)を発火させることで惹起する神経信号である。筋収縮によって、III 群線維が主に機械的な刺激によって発火し(筋機械受容器反射)、IV 群線維が主に代謝産物による刺激によって発火する(筋代謝受容器反射)。活動筋反射に関する経路は、収縮骨格筋、筋求心性神経、脊髄後根神経節、延髄循環中枢、そして交感神経系である。近年、心不全では活動筋反射が増強され、過剰な運動時交感神経活動に貢献することが指摘されている。心不全患者および心不全動物モデルを用いた実験で収集されたデータから、心不全では、筋代謝受容器ではなく筋機械受容器の感受性が向上することで、活動筋反射が過剰となることが明らかにされつつある。ただし、筋収縮にตอบสนองする筋機械受容器の感受性を向上させる機序は不明な点が多い。

研究代表者の木場は、活動筋反射刺激に対する交感神経応答をラットで計測する実験系を世界で唯一構築し、健常体・病理的状态における活動筋反射の生理的役割を調査する研究を進めている。心不全ラットモデルを用い、筋収縮に対する反射性交感神経応答は心不全で増強することを示す直接証拠を2008年に報告した。また、心不全での筋機械受容器の感受化には酸化ストレスが一因であることを示すデータを2009年に報告した。しかし、活動筋反射を修飾するスーパーオキシドの調節機構は理解されていない。

心不全では、レニン・アンジオテンシン(Ang)・アルドステロン系(RAAS)が亢進する。頸動脈洞から惹起して交感神経活動を増加させる化学受容器反射(例：低酸素刺激に対する反射)は、心不全で増強されて過剰な交感神経賦活に貢献することが先行研究で報告されている。健常ウサギに Ang II を投与することで低酸素に対する化学受容器反射応答が増加し、心不全ウサギに AngII 受容体タイプ1阻害剤を投与することで化学受容器反射応答が抑制されることが報告されている。この結果から、心不全で増加する Ang II が心不全での化学受容器反射を増強する一要因であることを示唆される。また、頸動脈洞近傍での AngII 受容体タイプ1が Ang II によって刺激されると、NADPH 酸化酵素の活性が向上してスーパーオキシドの産生がより増加し、さらに、スーパーオキシドが頸動脈洞求心神経の電位依存性カリウムチャネルを抑制することで心不全での化学受容器反射を増強するという機序が推察されている。頸動脈洞化学受容器反射に関するこれらの知見と機序は、心不全における活動筋反射の機序解明に応用できる可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「循環器疾患での RAAS の亢進が骨格筋中の NADPH 酸化酵素を刺激して酸化ストレスをもたらす、それが活動筋反射を過剰にする」との仮説を検証することであった。

## 3. 研究の方法

オス Sprague-Dawley ラット(8-10 週齢)を実験に用いた。ラットをイソフルレンで麻酔し、薬物を皮下投与するために浸透圧ミニポンプ(アルゼット, 1002)を設置した。14日間、Ang II が 150 ng/kg/min あるいは 450 ng/kg/min の濃度で継続して投与された(Ang II 150 群, Ang II 450 群)。また、Ang II を投与しないシャム手術を行ったラットも作成した(Sham 群, 健常対照群)。ミニポンプ設置手術14日後、活動筋反射応答を観察する実験を行った。ラットをイソフルレンで麻酔し、呼吸を確保するために気道に挿管した。左頸動脈および左外頸静脈に動脈圧測定および薬物投与のためにカテーテルを挿入した。左腎神経に二極性電極を設置し、腎交感神経活動を計測した。Mid-collicular level で除脳を行った。除脳手術後直ちに酸素を用いた人工呼吸を負荷した。除脳後90分以上の回復期間をとった後、骨格筋収縮に対する反射性の腎交感神経応答および循環応答、すなわち活動筋反射応答を観察した。活動筋反射を刺激するために、2つのプロトコルを採用した。一つ目のプロトコルは、除脳ラットの前根神経(L4-5)を電気刺激(40 Hz, 1 ms 間隔, 1.2 倍運動閾値)することで左後肢骨格筋を30秒間持続的に収縮させるものであった。二つ目のプロトコルは、左後肢骨格筋を1分間間欠的(1秒—4秒の収縮—弛緩)に収縮させるものであった。前者の刺激は筋代謝受容器・機械受容器の両方を刺激するものである一方で、二つ目の刺激は筋機械受容器を刺激するものである。次に腸骨動脈内に設置したカテーテルから、テンポール(10 mg)を左後肢循環中に動脈内投与した。テンポール投与から20-30分後に、活動筋反射応答を再び観察した。

動脈圧レベル維持における AngII タイプ1受容体の役割を検討するために、除脳ラットにおいてロサルタン(10 mg/kg)を静脈内投与した際の動脈圧をラット群間で比較した。

活動筋反射応答観察実験の後、下腿三頭筋を摘出し、その組織を $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。これらの凍結組織は、RT-PCR 実験およびウェスタンブロット実験による gp91phox(NADPH 酸化酵素のサブユニットの一つ)の発現量評価に用いられた。

テンポールを投与していない別動物群で、下腿三頭筋を摘出し、その組織を $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。これらの凍結組織は、ジヒドロエチジウム染色実験による酸化ストレスの程度評価に用いられた。

#### 4. 研究成果

14日後、Ang II 450群での安静時動脈圧は、Sham群およびAng II 150群と比較して、有意に高かった。心拍数、腎交感神経活動に、群間の差はなかった。

30秒間の持続的な後肢骨格筋収縮によって、腎交感神経活動および動脈圧は増加した。ラット群間で活動筋反射応答を比較したところ、Ang II 450群での活動筋反射応答は、Sham群およびAng II 150群よりも有意に( $P < 0.05$ )大きかった(図1)。また、Ang II 450群では活動筋反射応答がテンポールによって抑制された一方で、Sham群およびAng II 150群ではテンポールの影響はなかった(図1)。

1分間の間欠的な後肢骨格筋収縮によって、腎交感神経活動は筋張力の発生に同期して増加した。ラット群間で活動筋反射応答を比較したところ、Ang II 450群での活動筋反射応答は、Sham群およびAng II 150群よりも有意に( $P < 0.05$ )大きかった(図2)。また、Ang

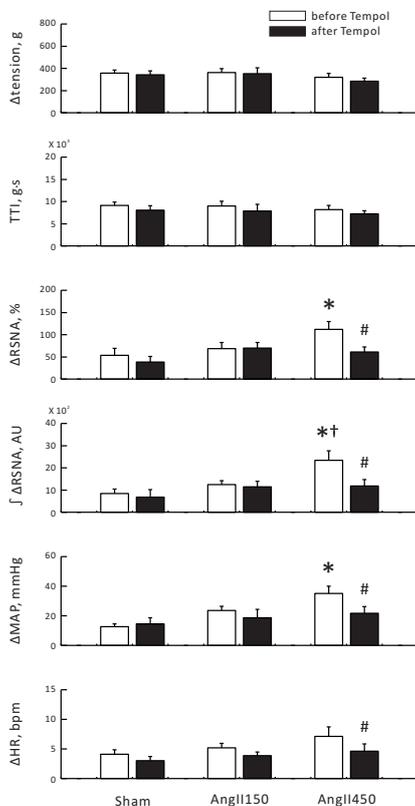


図1

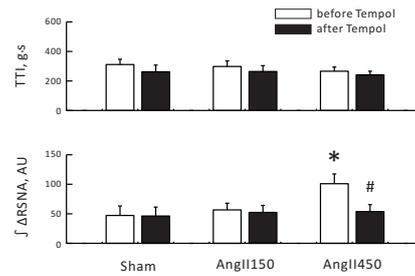


図2

II 450群では活動筋反射応答がテンポールによって抑制された一方で、Sham群およびAng II 150群ではテンポールの影響はなかった(図2)。

Ang II 450ラットにAng IIタイプ1受容体の阻害剤であるロサルタン(10 mg/kg)を静脈内投与したところ、動脈圧が有意に減少した。一方で、ShamおよびAng II 150ラットではロサルタンによる降圧作用が認められなかった。この結果から、Ang II 450群での高血圧状態には、Ang IIによる昇圧作用が寄与することが示唆された。

ジヒドロエチジウム染色実験から、AngII450群での下腿三頭筋中の活性酸素は、

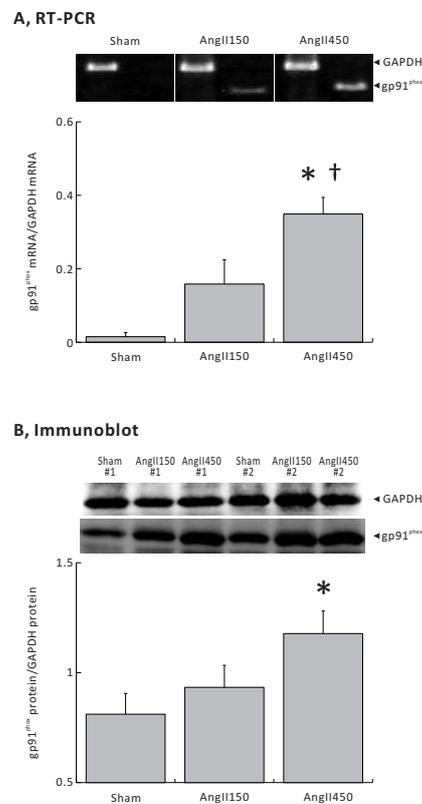


図3

Sham 群よりも多いことが確認された。

RT-PCR 実験およびウェスタンブロット実験から、AngII450 群での下腿三頭筋中の gp91phox の発現量は、Sham 群よりも多いことが確認された(図 3)。

これらの結果から、心不全や高血圧などの循環器疾患での RAAS の亢進は、骨格筋中の NAPDH 酸化酵素を刺激して酸化ストレスをもたらし、それが活動筋反射を過剰にするという機序を推察した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ①. **Koba S, Hayes SG, Sinoway LI.** Transient receptor potential type A1 channel contributes to activation of the muscle reflex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: H201-213, 2011. 査読有.

[学会発表] (計 4 件)

- ①. **Koba S, Watanabe R, Watanabe T.** Oxidative stress mediates the muscle reflex in rats with hypertension induced by chronic infusion of angiotensin II. *Faseb J* 25: 843.18, 米国ワシントン特別区, 2011 年 4 月 9-13 日.
- ②. **Koba S, Watanabe R, Watanabe T.** Oxidative stress exaggerates the muscle reflex in rats with hypertension induced by chronic infusion of angiotensin II. *J Physiol Sci Suppl 61*: S109, 震災のため誌上開催, 2011 年 3 月 28-30 日.
- ③. **木場智史.** 心不全における運動時交感神経調節機構. 第 25 回生体・生理工学シンポジウム論文集 P233-236, 岡山県岡山市, 2010 年 9 月 23-25 日.
- ④. **Koba S, Watanabe T.** Effect of the estrous cycle on the muscle reflex in female rats. *Faseb J* 24: 1b690, 米国アナハイム, 2010 年 4 月 24-28 日.

[図書] (計 1 件)

- ①. **木場智史.** 腎循環. 身体運動と呼吸・循環機能(II-9 章), 真興交易(株), 宮村実晴編集. 印刷中.

[その他]

ホームページ等

- ①. [http://researchmap.jp/satoshi\\_koba](http://researchmap.jp/satoshi_koba)
- ②. <http://www.med.tottori-u.ac.jp/intgphys/6005.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

木場 智史 (KOBA SATOSHI)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号: 40565743