

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11日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790709

研究課題名（和文） 心不全の発症進展機序としての脳内グリア細胞異常の解明

研究課題名（英文） Glial cell dysfunction in the pathogenesis of heart failure

研究代表者

岸 拓弥 (KISHI TAKUYA)

九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：70423514

研究成果の概要（和文）：

慢性心不全の病態において重要な交感神経系活性化の原因として、脳延髄にある交感神経活動中枢で増加する酸化ストレスの重要性をこれまで報告してきたが、今回の研究により、酸化ストレスの下流として、ミクログリアにおける Toll-like receptor4 が活性化して炎症性機転が働き、脳組織の 70% を占め神経細胞保護作用を有するアストロサイトのアポトーシスにより神経細胞の活動が活性化していることが慢性心不全に置ける交感神経活性化機序に深く関与していることを心不全モデルラットで明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We have demonstrated that oxidative stress in the cardiovascular center of the brainstem contributes to the sympathetic hyperactivity in the pathogenesis of chronic heart failure. In the present study, we have novel new findings, following that the activation of inflammatory cascade mediated by toll-like receptor 4 in the microglia causes sympathetic hyperactivity via apoptosis of astrocyte, which has a protective effect for neuron, in the cardiovascular center of the brainstem of heart failure model rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
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：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心不全、交感神経活動、グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全は、内服薬の種類や非薬物療法の進歩にも関わらず、5年生存率が50%弱と依然として予後不良の疾患である。慢性心不全の病態の進展・予後を改善するためには、

過剰な交感神経系活性化が生じる機序を明らかにし、適切なレベルにコントロールすることが重要であるが、現状はβ遮断薬による治療しかなく、心不全における交感神経系活性化の原因に対する治療はなされていない

のが現状である。交感神経活動を規定しているのは脳延髄心血管中枢であり、応募者はこれまで、脳延髄心血管中枢における酸化ストレスが交感神経活動を活性化し、高血圧の原因となっている可能性を報告してきた (Kishi T, et al. *Circulation* 2004)。同様に、慢性心不全における交感神経系活性化の機序としての「脳内異常」は極めて重要であると考えられる。しかし、心不全における「心・腎」連関は多くの研究が行われている一方で、「脳・心・腎・血管」連関という観点での研究はほとんどない。

神経細胞活動は、神経細胞そのもののみならず、グリア細胞と呼ばれる神経細胞の保持や絶縁・脳血管関門を構成しているアストロサイトおよびマクロファージの役割をしているミクログリアが重要な役割をしている。慢性心不全において重要な増悪因子である各種サイトカインは本来なら脳血管関門やアストロサイトにより脳神経細胞には直接波及しないが、慢性心不全では neuro-vascular coupling 異常が生じていて、脳内に到達したサイトカインによるアストロサイト障害がさらに neuro-vascular coupling 異常や神経細胞の過剰な活動を引き起こしている可能性が考えられる。さらに、神経系におけるサイトカインを介した反応は、Toll-like receptor (TLR) と呼ばれる免疫を制御している受容体が重要であり、特に TLR4 が key であるとされている。すなわち、脳内 TLR4 の異常を介したグリア細胞異常が、慢性心不全における交感神経系の過剰な活性化の脳内機序の key pathway であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、心不全の病態において重要な交感神経系活性化の原因として、脳血管関門の構成や神経細胞保護の役割をしているアストロサイトと脳におけるマクロファージの役割をしているミクログリアからなるグリアでの炎症に着目し、その原因として、neurovascular coupling 異常に加え、ミクログリアにおける TLR4 異常を介したアストロサイトにおけるアポトーシスの関与を明らかにすることが目的であった。

3. 研究の方法

(1)慢性心不全モデルは coronary ligation による心筋梗塞心不全モデルラット (虚血性心疾患による心不全) を用いた。検討する脳内

部位は、心血管中枢である頭側延髄腹外側野 (RVLM) を中心に、大脳・小脳・中脳・延髄で行った。第1段階:慢性心不全状態におけるニューロンとグリア細胞の検討 (研究目的1)、第2段階:慢性心不全状態におけるミクログリアでの炎症性反応の異常およびアストロサイトでのアポトーシスの検討 (研究目的2)、第3段階:脳内 TLR4 を標的とした心不全治療の検討 (研究目的3) の段階に分けて実験を遂行した。

(2)慢性心不全状態におけるニューロン・アストロサイト・ミクログリアの数・形態・機能的異常の検討と Blood-brain barrier の状態の検討として、心筋梗塞心不全モデルラットを用いた。ニューロン・アストロサイト・ミクログリアの数・形態的な異常の検討には免疫組織学的検討を行った。心不全によるニューロンの活動性の変化の検討には脳スライス切片を用いたマルチニューロンレコーディングを用いた。Blood-brain barrier の状態の検討 (アストロサイトの機能不全の検討) には脳脊髄液中の血漿タンパク濃度や脳組織中の TNF- α 濃度測定を行った。

TLR4 の dominant-negative 遺伝子や *in vivo* siRNA 導入 (*Am J Pathol* 2006;168:1619-1630, *Mol Immunol* 2009;46:2876-2884) を行って RVLM 局所での TLR4 の loss of function を行ったラットにおいて、上記検討項目の異常が改善し、かつ心不全が改善するかどうかを検討する。

(3)慢性心不全状態におけるミクログリアでの TLR4 から NF- κ B を介した炎症性反応の異常およびアストロサイトでのアポトーシスの検討を心筋梗塞心不全モデルラットで行った。なお、心エコーやカテーテルによる圧測定により心不全となっていることを確認した。TLR4 の心不全脳内ミクログリアにおける変化は免疫組織学的検討・western blotting および RT-PCR・DNA チップを用いたマイクロアレイに加え、セカンドメッセンジャーである MyD88・NF- κ B・炎症性サイトカインも検討した。また、TLR4 の *in vivo* siRNA 導入を行って RVLM 局所での TLR4 の loss of function を行ったラットにおいて心不全を作成した場合に、ミクログリアでの TLR4 を介した炎症機転およびアストロサイトでのアポトーシスが改善し、心不全が改善するかどうかを検討した。

(4)脳内 TLR4 を標的とした心不全治療の検討として、脳内 TLR4 ノックアウトマウスを Cre/Lox P システムを用いて作成した。脳内

TLR4 をノックアウトしたマウスを用いて心筋梗塞心不全モデルを作成した場合および TLR4 の dominant-negative 遺伝子や *in vivo* siRNA 導入を RVLM 局所に対して行って RVLM 局所での TLR4 の loss of function を行った場合の交感神経活動の変化、生命予後や心臓・腎臓での変化を検討する。

(5)最終的には、TLR4 の異常を modify することで、血中の炎症性サイトカインが高くても、neurovascular coupling 異常としての BBB 破綻の改善と脳内の炎症性変化改善により活性酸素種の過剰な増加が抑制されて、交感神経系の安定、生存率改善を確認する。また、既存の心不全治療薬（レニンアンジオテンシン系阻害薬やβ遮断薬、スタチン系薬剤）が脳内グリア細胞異常を改善する作用を有するかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1)心筋梗塞心不全ラットの脳内各部位において、ニューロンよりもマイクログリア細胞が増加していること・アストロサイトがアポトーシスにより減少していることを明らかにした。この結果は、RVLM においても同様であった。尿中カテコールアミン排泄量が増加していることからこのモデルでは交感神経活動が亢進していることは従来の報告と同様であるが、延髄脳スライス標本を用いたニューロン活動も亢進していた。

(2) 心筋梗塞心不全ラットの RVLM において、TLR4 およびそのセカンドメッセンジャーである MyD88 がウエスタンブロッティングによるタンパクレベルの発現および RT-PCR による mRNA レベルの発現・DNA チップによるマイクロアレイでの解析で DNA 発現のいずれも亢進していることが明らかとなった。さらに、炎症の指標である NFκB も活性化していることを確認できた。

(3)心筋梗塞心不全モデルラットの RVLM 局所に *in vivo* TLR4-SiRNA 導入を行い、慢性的に RVLM 局所での TLR4 活性を抑制できることを確認した。また、その結果として RVLM 局所での炎症性機転が抑制されることを確認した。

(4)TLR4-SiRNA の RVLM 局所導入により、心筋梗塞心不全モデルの交感神経活動抑制に加え心エコーで測定した左心機能が改善すること・カテーテルで測定した左室内圧が低下

すること・心臓及び肺重量が低下することを確認した。

(5)心筋梗塞作成前にあらかじめ TLR4-SiRNA を RVLM 局所に導入することにより、心筋梗塞後の交感神経活動上昇・心機能低下・左室内圧上昇の程度が軽くなることも確認した。

(6)アンジオテンシン受容体拮抗薬であるテルミサルタンを心筋梗塞心不全ラットに内服させると、RVLM 内の AT1 受容体阻害による酸化ストレス減少に加え、TLR4・MyD88・NF-κB のいずれも抑制され、交感神経活動の低下と心機能低下の抑制・左室内圧上昇の抑制が認められた。

(7)これらの結果から、脳内特に RVLM における TLR4 による炎症性機転が交感神経活性化を介して心不全の発症進展に置いて重要であり、心不全治療における新たなターゲットになりうるものであると考えられる。

(8)本研究と同じコンセプトで行っている研究は、申請者の知る限り国内外を問わず存在しない。心不全において脳内活性酸素が増えている、その機序が AT1 受容体・NAD(P)H oxidase を介していることは報告されており、我々も交感神経活性型高血圧モデルラットでは脳内活性酸素が増加している、消去酵素の遺伝子導入により活性酸素を低下させると交感神経活動が低下していることを報告した。しかし、その先にアポトーシスや炎症が交感神経活動亢進の原因としてあるのか、炎症性機転が機序として関与しているのか、さらにそれに介入することで心不全の治療となるのかについては、全く報告がない。多臓器不全としての心不全という概念が提唱されているが、あくまでも心臓・腎臓・血管であり、交感神経活動中枢である脳が考慮されておらず極めて不十分な概念である。つまり、交感神経系を制御する脳の役割は検討されるべきである。従って、本研究は極めて独創的であるといえる。本研究で慢性心不全における交感神経活動の過剰な活性化の機序として脳内でも自然免疫制御の key である TLR4 異常が深く関与していること、さらにそれがマイクログリア増加やアストロサイトのアポトーシスによる減少を介して深く関与している可能性が示唆されたことは、「心不全における脳・心・腎・血管連関」という概念を提唱することになり、従来とは異なる標的分子をターゲットとした創薬につながる。

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)

[学会発表] (計5件)

Kishi T, Hirooka Y, Sunagawa K.
Autoimplantation of Astrocytes into the Cardiovascular Center of Brainstem Causes Sympathoinhibition and Decreases the Mortality Rate in Myocardial Infarction-Induced Heart Failure. American Heart Association Scientific Sessions 2011 (平成23年11月15日、オランダ、米国)

Kishi T, Hirooka Y, Sunagawa K.
Autoimplantation of astrocytes into cardiovascular center of brainstem causes sympathoinhibition and decreases the mortality rate in Hypertensive rats. The 81th Annual Scientific Meeting of the American Heart Association (平成22年11月15日、シカゴ、米国)

Kishi T. Autoimplantation of astrocytes into cardiovascular center of brainstem causes sympathoinhibition and decreases the mortality rate in Hypertensive rats. AHA International Lunch Forum (Japan) (平成22年11月15日、オランダ、米国)

Kishi T, Hirooka Y, Sunagawa K. Apoptosis of astrocyte mediated by toll-like receptor 4 in the cardiovascular center causes excessive sympathoexcitation in hypertensive rats. The 81th Annual Scientific Meeting of the American Heart Association (平成22年11月15日、シカゴ、米国)

Kishi T, Hirooka Y, Sunagawa K.
Autoimplantation of astrocytes into cardiovascular center of brainstem causes sympathoinhibition and decreases the mortality rate in Hypertensive rats. The 19th International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society (平成22年9月25日、福岡)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸 拓弥 (KISHI TAKUYA)

九州大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：70423514

研究者番号：

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：