

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 23 年 6 月 20 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650213

研究課題名（和文） 中枢神経を標的にした心不全致死病態の治療に関する基礎研究

研究課題名（英文） Fundamental study on developing heart failure treatment targeting the central nervous system.

研究代表者

白井 幹康 (SHIRAI MIKIYASU)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：70162758

研究成果の概要（和文）：独自の心臓マイクロダイアリシス法で拡張型心筋症モデルマウスの心臓副交感神経（心臓保護作用を有する）の活動を計測した結果、中枢のアドレナリン受容体を介した副交感神経応答が、野生型マウスに比べ、有意に減弱していた。中枢を介した自律神経調節作用を持つグレリンを拡張型心筋症マウスに1ヶ月間皮下注射すると、心臓副交感神経活動の亢進と交感神経活動の抑制と同時に、心筋線維化の抑制と心臓収縮機能の改善が得られ、2ヶ月齢での致死率は50%から5%に低下した。グレリンは急性心筋梗塞モデルラットでも心臓交感神経活動を抑制し、心臓収縮機能と致死率の改善をもたらした。

研究成果の概要（英文）：Cardiac parasympathetic activity, which has a cardioprotective effect, was assessed in a mouse model of dilated cardiomyopathy (DCM) using a microdialysis technique. We found that the adrenergic mechanism for controlling cardiac parasympathetic activity was suppressed at the central nervous system level. Percutaneous ghrelin injection for one month augmented cardiac parasympathetic activity and attenuated sympathetic activity and then improved myocardial remodeling and contractility, reducing the high mortality rate associated with DCM. One dose of ghrelin prevented the acute and sustained increase in cardiac sympathetic tone after myocardial infarction and then reduced the high mortality rate attributable to sudden heart failure in the rat.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：心不全、心筋梗塞、拡張型心筋症、心臓自律神経活動、心臓マイクロダイアリシス、心拍変動、グレリン

1. 研究開始当初の背景

私共のグループは、家族性拡張型心筋症 (DCM) 患者で見つかった心筋トロポニンTのアミノ酸残基K210をコードする三つの塩基対を欠失した突然変異を内在性ゲノム遺伝子に導入したノックインマウス (Circ Res

101:185-194,2007) に対して、選択性と脂溶性の異なる3種類のβアドレナリン受容体拮抗薬 (βアンタゴニスト) の効果を検討し、脂溶性 (中枢への移行性が良い) かつ選択的β₁アンタゴニストであるメトプロロールのみが、不整脈や心臓リモデリングを有意に抑

制し、生命予後を改善することを報告した (Cardiovasc Res 84: 64-71, 2009)。さらに、 α_2 アゴニスト (Pflugers Arch 454: 29-39, 2007) の中枢作用による心拍調節・心臓保護作用についても明らかにしてきた。

しかし、中枢性作用薬の心臓への自律神経作用に関する直接的なエビデンスを捉えるには、薬剤が、1) 心臓交感及び副交感神経活動をどの程度変化させるのか、同時に、2) 心筋収縮能、心拍リズム及び冠微小循環をどの程度改善するのかを調べる必要があった。

2. 研究の目的

小動物心不全モデルにおいて、不整脈・突然死や心臓収縮・拡張不全などの致死性病態の発生と中枢神経を介した心臓自律神経活動制御の関係を *in vivo* 解析できる方法を開発・応用し、病態の神経性機序の解明及び中枢神経作用薬の評価・開発することを目的とした。

3. 研究の方法

小動物の心臓自律神経活動の *in vivo* モニタリング法として以下の a~c を用いた。

a. 心臓マイクロダアリス法

私共は、本法で採取された透析液ノルエピネフリンおよびアセチルコリン (ACh) の濃度が心臓副交感神経活動を反映していることを、麻酔下ネコで明らかにしてきた (Am J Physiol 261:H1643-H1647, 1991; 266:H854-H860, 1994)。本研究では、この方法をマウス心臓に応用できるように改良した (文献 4)。ダアリスプローブ (貫通型) は自作した。半透膜部分には、腎透析に用いられる人工腎臓から半透膜中空糸 (外径 0.31 mm, 内径 0.20 mm, PAN-1200, 500,00-mol wt cutoff, 旭化成) を用いた。

b. 心臓交感神経活動電位の計測法

麻酔下ラットの左第 1 肋間を開胸後、左星状神経節から心臓に至る神経束を剥離し、その中枢側切断端より、プラチナ双極電極を用いて心臓交感神経活動電位を記録した。活動電位は、差動増幅器およびバンドパスフィルター (100~1000 Hz) を通した後、全波整流し、時定数 0.02 sec で RC 積分した (文献 6)。

c. 心拍変動時系列のスペクトル解析

心電図送信器 (米国 DSI 社製) を麻酔下マウスに埋め込み、覚醒 5 日後から心電図の継続的計測を約 1 ヶ月間行った。beat by beat (不整脈など) の解析及び心拍の日内変動の解析をデータ取得解析システム HEM (仏国ノトコード社製) を用いて行った。また、同

解析システムで、RR インタバルのリアルタイム周波数解析 (高速フーリエ変換) を行い、心臓交感・副交感神経活動を推定した。

麻酔下マウスにおいて冠動脈ネットワークの形態・機能を画像解析するための放射光高解像度微小血管造影法を開発・応用した。実験は SPring-8 (BL28B2) で行った。放射光単色 X 線 (33.2 keV) を高速シャッターによりパルス幅が 1~2 msec のパルス X 線として照射し、動きのある血管をストロボ画像化することで、鮮明な血管像を得ることを可能にした。撮影カメラとして 1 インチ X 線サチコンカメラ (空間分解能 7 μ m) を用いた。造影剤注入用カテーテルを総頸動脈から大動脈弁直上まで挿入・固定した (文献 1)。

心臓収縮機能は、麻酔下で、心エコー法と左心室圧-容積関係を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) DCM モデルマウスにおいて心臓副交感神経の役割を解明する目的で、心臓マイクロダアリス法によるマウス心臓副交感神経活動の評価法を初めて開発した。麻酔下マウス左心室にダアリスプローブを埋め込み、エゼリンを含むリンゲル液で 10 分間灌流、10 分間で 20 マイクロリターの灌流液を回収し、HPLC で ACh の濃度を計測した。頸部迷走神経の電気刺激に対し、正比例型の刺激-応答曲線が得られ、マウス心臓副交感神経機能評価での本法の有用性が検証できた (文献 4)。

そこで、DCM マウスと野生型マウスで心臓副交感神経機能を比較した。DCM マウスの末梢心臓副交感神経調節機構 (頸部迷走神経の電気刺激に対する心筋での ACh 放出機構) については、野生型と比較して、有意差はなかった。しかし、中枢の α_2 アドレナリン受容体刺激 (medetomidine) に対する心臓副交感神経応答 (ACh 放出) は、DCM のほうが有意に減弱していた。ACh の心臓保護作用を考慮すると、本研究での DCM マウスにおける中枢性 ACh 放出機構の障害の発見は、中枢をターゲットとした DCM 治療法の開発の重要性を示している。

(2) DCM モデルマウスに対するグレリン (150 μ g/kg/day, 4 週齢から 4 週間皮下注射) の効果を検討した。その結果、致死的不整脈および心臓線維化の減少により、致死率は約 50% から 5% に改善した。同時に、心拍変動時系列のスペクトル解析から、グレリン注射は、HF 成分の増大、LF/HF 成分の減少を引

き起こすことが分かった。以上より、グレリンは、心臓交感神経活動の低下および心臓副交感神経活動の増大を引き起こし、心臓保護的に作用する可能性が示唆された。今後、心臓マイクロダイアリス法を用いた心臓自律神経活動計測による直接的証明が重要と考えられた。

(3) ラットの左冠動脈前下行枝結紮による急性心梗塞モデルでは、梗塞直後から心臓交感神経活動電位は増大し始め、6時間後には～100%増大した(麻酔下での観察)。しかし、梗塞直後にグレリン(150 μg/kg)を単回皮下注射すると、この活動増大は完全に抑制された。同時に、重篤な不整脈による死亡率は～70%から～30%に低下した。グレリン皮下注射の心臓副交感神経活動への影響を心臓マイクロダイアリス法で調べたが、心筋間質 ACh 濃度に変化はなかった。しかし、グレリンを脳室内に投与すると ACh 濃度は有意に上昇することが分かった。

ラットに同様の急性心筋梗塞を引き起こした後覚醒させ、2週間飼育後に麻酔下で心臓交感神経の活動電位を計測した。交感神経活動は、対照と比べ、～102%増大していた。しかし、梗塞直後にグレリン(150 μg/kg)を単回皮下注射すると、この活動増大は完全に抑制された。同時に、梗塞2週間後の心臓リモデリングの有意な抑制(ANP, BNP, collagen I & III の mRNA 発現の減少)と心収縮機能の有意な改善(駆出率 28%から43%へ、左心室拡張期末圧 6 mmHg から 3 mmHg へ改善)が得られ、死亡率は～50%から～25%に低下した(文献6)。

グレリンは迷走神経の求心性線維末端にある成長ホルモン分泌促進因子受容体を介して成長ホルモン分泌と摂食の情報を延髄孤束核に伝えることが分っているが、今回の皮下注射での心臓交感神経活動に対する特異的な抑制効果の情報伝達機構は今後の研究課題である。特に、心筋梗塞発症直後のグレリンの単回投与が梗塞2週間後の心臓交感神経活動増大を完全に抑制した機構は、グレリンの体内での代謝・分解を考えると、上記の迷走神経求心路を介した神経反射だけでは説明困難で、グレリンの中枢に対する直接的な抗炎症効果なども考える必要があるかもしれない。

(4) DCM モデルマウスの冠微小循環の in vivo 評価を目指して、麻酔下マウスの冠動脈ネットワークの可視化を、放射光微小血管造影法を用いて行った。図 1A,B に示したよう

に、高速拍動の心臓(心拍数が約 500 拍/分)であっても、冠動脈の本管から 50 μm 径の細動脈までが鮮明に観察できた。また、心臓副交感神経活動増大を模擬した ACh 投与に対して、冠動脈ネットワークの広い範囲で拡張応答が検出できた。さらに、右心室から肺細動脈までの観察と肺の循環時間の計測も可能となった(文献1)。

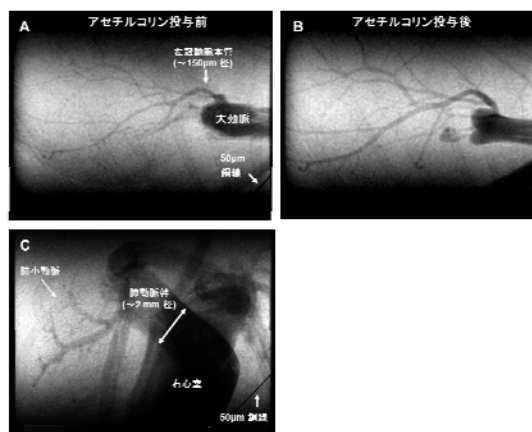


図 1 麻酔下のマウスで可視化した冠動脈(A,B)と右心室から肺動脈(C)。

冠動脈が本管から細動脈(～50 μm 径)まで、心臓全体に渡って一望できた(A)。血管内皮から血管拡張性物質を放出させるアセチルコリンを投与すると、広範囲の血管枝が拡張した(B)。右心室から肺動脈幹、さらに肺小動脈まで連続した観察もできた。

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 14 件)

(1) Shirai M, Schwenke DO, Tsuchimochi H, Umetani K, Yagi N, Pearson JT. Synchrotron radiation imaging for advancing our understanding of cardiovascular function. *Circ. Res.* (査読有) 112(1): 209–221, 2013. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.111.300096. Review.

(2) Jenkins MJ, Pearson JT, Schwenke DO, Edgley AJ, Sonobe T, Fujii Y, Ishibashi-Ueda H, Kelly DJ, Yagi N, Shirai M. Myosin heads are displaced from actin filaments in the in situ beating rat heart in early diabetes. *Biophys. J.* (査読有) 104(5): 1065–1072, 2013. DOI: 10.1016/j.bpj.2013.01.037.

(3) Shirai M, Beard M, Pearson JT, Sonobe T, Tsuchimochi H, Fujii Y, Gray E, Umetani K, Schwenke DO. Impaired pulmonary blood flow distribution in congestive heart failure assessed using synchrotron radiation microangiography. *J. Synchrotron Radiat.* (査読有) 20(Pt3): 441-448, 2013. DOI: 10.1107/S0909049513007413.

(4) Zhan DY, Du CK, Akiyama T, Sonobe T, Tsuchimochi H, Shimizu S, Kawada T, Shirai M. In vivo monitoring of acetylcholine release from cardiac vagal nerve endings in anesthetized mice. *Auton. Neurosci.* (査読有) 176(1-2): 91-94, 2013. DOI: 10.1016/j.autneu.2013.02.014.

(5) Jenkins MJ, Edgley AJ, Sonobe T, Umetani K, Schwenke DO, Fujii Y, Brown RD, Kelly DJ, Shirai M, Pearson JT. Dynamic synchrotron imaging of diabetic rat coronary microcirculation in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (査読有) 32(2): 370-377, 2012. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.237172.

(6) Schwenke DO, Tokudome T, Kishimoto I, Horio T, Cragg PA, Shirai M and Kangawa K. One dose of ghrelin prevents the acute and sustained increase in cardiac sympathetic tone after myocardial infarction. *Endocrinology* (査読有) 153(5): 2436-2443, 2012. DOI: 10.1210/en.2011-2057.

(7) Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sata Y, Mizuno M, Kamiya A, Shishido T, Inagaki M, Shirai M, Sano S, Sugimachi M. Medetomidine, an α 2-adrenergic agonist, activates cardiac vagal nerve through modulation of baroreflex control. *Circ. J.* (査読有) 76: 152-159, 2012.

(8) Kawada T, Akiyama T, Shimizu S, Kamiya A, Uemura K, Sata Y, Shirai M, Sugimachi M. Central vagal activation by alpha(2)-adrenergic stimulation is impaired in spontaneously hypertensive Rats. *Acta Physiol.* (査読有) 206: 72-79, 2012. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2012.02439.x.

(9) Sonobe T, Akiyama T, Du CK, Zhan DY, Shirai M. Contribution of serotonin uptake and degradation to myocardial interstitial serotonin levels during ischaemia-reperfusion in rabbits. *Acta*

Physiol. (査読有) 207: 260-268, 2012. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2012.02461.x.

(10) Schwenke DO, Pearson JT, Sonobe T, Ishibashi-Ueda H, Shimouchi A, Kangawa K, Umetani K, Shirai M. Role of Rho kinase signaling and endothelial dysfunction in modulating blood flow distribution in pulmonary hypertension. *J. Appl. Physiol.* (査読有) 110: 901-908, 2011. DOI: 10.1152/jappphysiol.01318.2010.

(11) Sonobe T, Schwenke DO, Pearson JT, Yoshimoto M, Fujii Y, Umetani K, Shirai M. Imaging of the closed-chest mouse pulmonary circulation using synchrotron radiation microangiography. *J. Appl. Physiol.* (査読有) 111: 75-80, 2011. DOI: 10.1152/jappphysiol.00205.2011.

(12) Schwenke DO, Gray EA, Pearson JT, Sonobe T, Ishibashi-Ueda H, Campillo I, Kangawa K, Shirai M. Exogenous ghrelin improves blood flow distribution in pulmonary hypertension-assessed using synchrotron radiation microangiography. *Pflugers Arch-Eur. J. Physiol.* (査読有) 462: 397-406, 2011. DOI: 10.1007/s00424-011-0992-8

(13) Shioyama W, Nakaoka Y, Higuchi K, Minami T, Taniyama Y, Kidoya H, Sonobe T, Hashimoto T, Shirai M, Takakura N, Morishita R, Yamaguchi-Takahara K, Kodama T, Hirano T, Mochizuki N, Komuro I. Docking protein Gab1 is an essential component of postnatal angiogenesis after ischemia via HGF/c-Met signaling. *Circ. Res.* (査読有) 108: 664-675, 2011. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.232223

(14) Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sonobe T, Kamiya A, Shishido T, Tokudome T, Hosoda H, Shirai M, Kangawa K, Sugimachi M. Centrally administered ghrelin activates cardiac vagal nerve in anesthetized rabbits. *Auton. Neurosci.* (査読有) 162: 60-65, 2011. DOI: 10.1016/j.autneu.2011.04.001

〔学会発表〕(計 23 件)

1. 白井幹康、ジェンキンス・マシュー、曾野部崇、藤井豊、土持裕胤、吉本光佐、稲垣薫克、八木直人 初期糖尿病ラットの拍動心臓で検出されたクロスブリッジ形成・解離の異常 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 28 日 東京

2. 稲垣薫克、土持裕胤、西谷友重、若林繁夫、白井幹康 慢性低酸素により生じる右心室肥大におけるNCS-1の働き 第90回日本生理学会大会 2013年3月28日 東京
3. 戦冬雲、杜成坤、秋山剛、曾野部崇、白井幹康 マウス心臓交感神経終末におけるノルエピネフリン動態の解析—マイクロダイアリシス法を用いて— 第90回日本生理学会大会 2013年3月28日 東京
4. 清水秀二、川田徹、秋山剛、神谷厚範、白井幹康、杉町勝 α 2Aアドレナリン受容体作動薬である Guanfacin は、過度の交感神経抑制なしに心臓迷走神経活動を亢進する 第90回日本生理学会大会 2013年3月28日 東京
5. 峯山直子、吉本光佐、栗津裕子、大西佑美、島津明佳、白井幹康、三木健寿 高血圧自然発症ラットにおける交感神経活動と動脈圧の長期連続計測とその因果関係 第90回日本生理学会大会 2013年3月28日 東京
6. 藤井豊、白井幹康、武輪能明、巽英介、妙中義之 人工心肺中の高酸素吸送は生体の炎症反応を助長する 第90回日本生理学会大会 2013年3月28日 東京
7. 杜成坤、戦冬雲、森本幸生、秋山剛、寒川賢治、白井幹康 拡張型心筋症ノックインマウスに対するグレリンの治療効果 第90回日本生理学会大会 2013年3月28日 東京
8. 土持裕胤、曾野部崇、稲垣薫克、白井幹康 視床下部歩行誘発野の刺激は麻酔下ラットの心筋組織血流量を増加させる 第90回日本生理学会大会 2013年3月29日 東京
9. 水上智恵、下内章人、野瀬和利、谷口健太郎、白井幹康 モノクロタリン肺高血圧症ラットにおける呼気水素と一酸化炭素生成の相互関連 第90回日本生理学会大会 2013年3月29日 東京
10. 吉本光佐、秋山剛、曾野部崇、藤井豊、三木健寿、白井幹康 腎血管性高血圧ラットモデルでの高血圧発症初期における動脈圧と交感神経活動の変化 第90回日本生理学会大会 2013年3月29日 東京
11. 白井幹康 SPring-8放射光画像の心血管機能・再生研究への応用 第11回日本再生医療学会(招待講演) 2012年6月14日 横浜
12. Pearson J, Jenkins M, Edgley AJ, Sonobe T, Schwenke DO, Fujii Y, Kelly D, Yagi N, Shirai M. Early diabetic diastolic dysfunction displaces myosin heads from actin in the beating heart. 24th Meeting of the International Society of Hypertension (invited speech) 2012年10月4日 Sydney (Australia)
13. 白井幹康、ジェンキンス・マシュー、ピアソン・ジェームズ、曾野部崇、藤井豊、土持裕胤、吉本光佐、梅谷啓二 放射光微小血管造影法によるラット糖尿病冠動脈内皮障害の初期病態の検出 第89回日本生理学会大会 2012年3月29日 長野
14. 吉本光佐、曾野部崇、藤井豊、三木健寿、白井幹康 2-kidney, 1-clip Goldblatt (2K1C) 高血圧ラットモデルでの腎臓交感神経活動と動脈圧の変化 第89回日本生理学会大会 2012年3月29日 長野
15. 峯山直子、吉本光佐、大西由美子、白井幹康、三木健寿 ダール食塩感受性ラットの高血圧発症初期における交感神経活動の変化 第89回日本生理学会大会 2012年3月29日 長野
16. 藤井豊、白井幹康、稲盛修二、武輪能明、巽英介、妙中義之 人工灌流時の病態生理学研究のためのラット小型体外循環システムの構築 第89回日本生理学会大会 2012年3月29日 長野
17. 柳田洋、下内章人、曾野部崇、シュエンキ・ダリル、白井幹康 アナフィラキシーショックによるラット門脈の血管収縮応答 第89回日本生理学会大会 2012年3月29日 長野
18. 土持裕胤、曾野部崇、白井幹康 意識下ラットおよびマウスにおける運動時心筋血流の直接計測 第89回日本生理学会大会 2012年3月30日 長野
19. 戦冬雲、杜成坤、秋山剛、曾野部崇、白井幹康 麻酔下マウスにおける心臓迷走神経終末からのアセチルコリン分泌モニタリング—マイクロダイアリシス法を用いて— 第89回日本生理学会大会 2012年3月30日 長野
20. 杜成坤、戦冬雲、秋山剛、曾野部崇、白井幹康 心筋間質 5-HTとモノアミンオキシダーゼによる 5-HIAAの同時モニタリング 第89回日本生理学会大会 2012年3月30日 長野
21. 曾野部崇、秋山剛、杜成坤、戦冬雲、白井幹康 心虚血再灌流時の心筋間質中セロトニン動態—再取り込み・代謝の寄与— 第89回日本生理学会大会 2012年3月30日 長野
22. 白井幹康 放射光X線機能画像の循環器研究への応用 第23回北摂循環器研究会(招待講演) 2011年5月10日 大阪
23. Jenkins M, Shirai M, Edgley AJ, Kelly DJ, Pearson J, Sonobe T, Umetani K, Brown R, Schwenke DO. Rho-kinase inhibition improves localised coronary dysfunction in vivo, in the diabetic microcirculation. European Society of Cardiology Congress 2011年8月27日 Paris (France)

〔図書〕（計1件）

(1) Schwenke DO, Umetani K, and Shirai M. SPring-8 Research Frontiers 2010. 財団法人高輝度光科学研究センター編集 pp 36-37, 2011.

http://www.spring8.or.jp/pdf/en/res_fro/10/036-037.pdf

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/cardiac_physiology/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白井 幹康 (SHIRAI MIKIYASU)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：70162758

(2) 研究分担者

秋山 剛 (AKIYAMA TSUYOSHI)

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：70202554

土持 裕胤 (TSUCHIMOCHI HIROTSUGU)

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：60379948

(3) 連携研究者

杜 成坤 (TO SEIKON)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員

研究者番号：90590646

森本 幸生 (MORIMOTO SATIO)

九州大学医学研究科・助教授

研究者番号：50202362