

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790640

研究課題名(和文) 虚血による心臓の痛みに関わる心臓知覚神経へのASIC3の関与

研究課題名(英文) Involvement of ASIC3 in rat model of isoproterenol induced ischemic cardiac pain

研究代表者

山口 豪 (YAMAGUCHI, TAKESHI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：60532182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Isoによる心臓痛にASIC3が関与することを明らかにすることを目的とした。虚血の評価は血清CK-MB、心電図、組織学的解析を用いた。疼痛の評価はIso、モルヒネ(Mor)、ASICs非特異的拮抗薬アミロライド(Ami, 30 mg/kg)による行動変化と脊髄後角のc-Fos発現を解析した。CK-MBは有意な上昇はみられず、心電図は特徴的波形がみられた。組織学的には炎症と虚血による低酸素を示した。Iso投与により特異的行動・c-Fos発現はいずれも上昇するが、MorやAmiの前投与によっていずれも有意に減少した。よってIsoによる心臓痛にはASIC3を含むASICsが関与することが示された。

研究成果の概要(英文)：【Aim】We characterized Isoproterenol(Iso)-induced myocardial ischemia in rat to clarify the involvement of acid-sensing ion channel (ASIC) 3 in ischemic cardiac pain. 【Methods】Male SD rats were injected with 50 mg/kg of Iso subcutaneously. The behavioral changes and c-Fos expression in intra-spinal cord neurons after Iso-injection were analyzed. Furthermore, effects of morphine (Mor, 1 mg/kg) and ASICs antagonist amiloride (Ami, 30 mg/kg) on behavioral changes and c-fos expression were examined. 【Results】Rats showed characteristic behaviors after Iso-injection. The rats lay on their side or back with their head extended. Iso group expressed more c-Fos in intra-spinal cord neurons compared to control group significantly. Mor and Ami significantly reduced the characteristic behaviors and the c-Fos expression respectively. 【Conclusion】These results suggest that ASICs were involved in Iso-induced ischemic cardiac pain.

研究分野：境界医学・疼痛学

キーワード：心虚血 心臓痛 イソプロテレノール 行動解析 心電図 虚血性心疾患 ASIC 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内外の研究動向
近年、酸感受性イオンチャネル ASIC3 (Acid-sensing ion channel 3) が心臓の知覚に重要であるという報告がなされている¹⁾。特に虚血時に生成される乳酸を侵害刺激として受容し、虚血時の心臓の痛み=狭心痛を引き起こす受容体として注目されている。ASIC3 は知覚神経に発現しており、pH6.7~7.3 の比較的狭い pH 域で活性化されることが分かっている²⁾。心臓において酸感受性イオンチャネルについては TRPV1³⁾ が心筋層の心外膜側に発現していること⁴⁾が報告されているが、心臓における ASIC3 受容体の分布や病態時の形態学的変化については明らかでない。

(2) Isoproterenol (Iso) 心虚血モデル
応募者のこれまでの研究成果・着想に至った経緯や今後の展開内容
応募者は今まで心臓刺激伝導系の形態と不整脈との関連について研究してきた。心筋梗塞による知覚神経刺激は、自律神経を介して不整脈の発症に関与することが報告されており⁴⁾、梗塞に伴う心臓の痛みの知覚メカニズムに興味をもっていた。しかし、梗塞の痛みの受容メカニズムには不明な点が多い。そこで、モデル動物での心臓の痛みの評価法の確立、虚血性心疾患の痛み関連因子を明らかにすることを計画した。

2. 研究の目的

本研究では心臓痛の定量的解析に有用な動物モデルを確立し、心臓侵害刺激の受容に関与する機能分子、とくに ASIC3 に着目して、その発現量や分布、虚血による変化を解析することで、心臓痛の分子メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) モデルの作成

雄性 SD ラット(200-400 g)に 50 mg/kg の Iso を皮下投与した。対照群には 50 mg/kg の生理食塩水 (Sal) を皮下投与した (Sal 投与群)。

(2) 薬効評価

ペントバルビタール深麻酔下 (50 mg/kg、腹腔内投与) にて心電計を装着し、また大腿動脈にてカニューレションを行った。Iso 投与前後で血圧と心拍数を測定した。心電図は虚血の評価に用いた。

(3) 虚血の評価

生理食塩水 (Sal) および Iso 投与後 90 min、6 h、24 h 後に採血を行い、心筋梗塞のマーカーである血清 CK-MB を測定した。また、Sal および Iso 投与 90 min、6 h、24 h、48 h 後に 4 % PFA にて還流固定を行い、パラフィン包埋切片に Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。さらに、組織の低酸素を検出できる Hypoxyprobe-1 を Iso 投与前に腹腔内投与し、Iso 投与 90 min 後に還流固定を行い、虚血状態を免疫組織学的に評価した。

(4) 行動解析

Iso によって体幹を伸ばしたり、手足の伸ばして横たえるなどの特異的行動が報告されており⁵⁾、Iso による行動変化を解析するため、Iso 投与前後のラットの行動をビデオカメラにて撮影した。また、1 mg/kg の Morphine (Mor) を Iso 投与 30 min 前に前投与したうえで Iso を投与し、特異的行動の変化を解析した。対照群では 1 mg/kg の Sal を 30 min 前に前投与したうえで Iso を投与した (Sal+Iso 投与群)。さらに、ASIC3 の非特異的拮抗薬である Amiloride (Ami、30 mg/kg) を Iso 投与 30 min 前に前投与したうえで Iso 投与し、特異的行動の変化を解析した。対照群では 30 mg/kg の DMSO を 30 min 前に前投与したうえで Iso を投与した (DMSO+Iso 投与群)。

(5) 組織学的解析

Iso 投与前後における脊髄後角ニューロンでの c-Fos 発現の変化を免疫組織化学染色を用いて解析した。脊髄は心臓の知覚への関与が報告⁶⁾されている T2 と、その前後 3 つの高さの脊髄 (C7~T5) を用いた。また、1 mg/kg の Mor を前投与したうえで Iso を投与し、c-Fos 発現の変化を解析した。さらに、30 mg/kg の Ami を前投与したうえで Iso 投与し、c-Fos 発現の変化を解析した。各対照群は (4) 行動解析・と同じとする。

4. 研究成果

(1) モデル作成

雄性 SD ラットに 50 mg/kg の Iso および Sal を投与したところ、途中薬物投与による死亡例はなかった。

(2) 薬効評価

Iso 投与 1 min 後には有意な血圧の低下がみられ、心拍数は増加傾向を示し、時間とともに回復した。

(3) 虚血の評価

血清 CK-MB はいずれの時間でも有意な変化は見られなかった。HE 染色では 90 min、6 h 後には変化がみられなかったが、24 h および 48 h 後には心筋層内に炎症性細胞の浸潤がみられた。心電図では Hiramatsu ら⁷⁾が報告しているように、S 波がマイナスの電位方向に大きく低下する心虚血時特有の波形がみられた。Hypoxyprobe-1 をもちいたところ、左室心筋では心内膜から心筋層の半分くらいの範囲で陽性反応がみられた。右室心筋では反応がみられたが、ごくわずかであった。

(4) 行動解析

Iso 投与後、体幹を伸ばしたまま横たえたり、手足を投げ出して横たえるといった特異的行動がみられた。この特異的行動は Iso 投与 5 分後位からみられはじめ、投与 15~30 分後が最も頻度が多く、その後徐々に回数が減少していった。対照群 (Sal 投与群) ではそのような特異的行動はみられなかった。次に、1 mg/kg の Mor を前投与したうえで Iso を投与すると、この特異的行動は対照群 (Sal+Iso

投与群)と比較して有意に減少していた。さらに、30 mg/kg の Ami を投与したうえで Iso を投与すると、この特異的行動は対照群 (DMSO+Iso 投与群)と比較して有意に減少していた。

(5)組織学的解析

Iso 投与後における脊髄後角ニューロンでの c-Fos 発現は対照群 (Sal 群)と比較して有意に増加した。一方、1 mg/kg の Mor を前投与したうえで Iso を投与すると、この c-Fos 発現細胞数は対照群 (Sal+Iso 投与群)と比較して有意に減少していた。さらに、30 mg/kg の Ami を投与したうえで Iso を投与すると、c-Fos 陽性細胞数は対照群 (DMSO+Iso 投与群)と比較して有意に減少していた。

<引用文献>

- 1) Sutherland SP, Benson CJ, Adelman JP, et al. Acid-sensing ion channel 3 matches the acid-gated current in cardiac ischemia-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98; 711-716, 2001
- 2) Yagi J, Wenk HN, Naves LA, et al. Sustained currents through ASIC3 ion channels at the modest pH changes that occur during myocardial ischemia. *Circ Res.* 99; 501-509, 2006
- 3) Zahner MR, Li DP, Chen SR, et al. Cardiac vanilloid receptor 1-expressing afferent nerves and their role in the cardiogenic sympathetic reflex in rats. *J Physiol.* 551; 515-523, 2003
- 4) Thames MD, Minisi AJ. Reflex responses to myocardial ischemia and reperfusion. Role of prostaglandins. *Circulation.* 80; 1878-1885, 1989
- 5) Rona G, Chappel CI, Balazs T, et al. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol.* 67; 443-455, 1959
- 6) Albutaihi IA, DeJongste MJ, Ter Horst GJ. An integrated study of heart pain and behavior in freely moving rats (using fos as a marker for neuronal activation). *Neurosignals.* 13; 207-226, 2004
- 7) Hiramatsu Y, Izumi A, Tezuka T, et al. Antagonizing substances obtained from whale heart extract to vasopressin induced myocardial hypoxia. *Jpn J Pharmacol.* 20; 313-324, 1970

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 4件)

1. Yoshimura A, Yamaguchi T, Kawazato H, et al (2人省略). Immuno-histochemistry and three-dimensional architecture of the

intermediate filaments in Purkinje cells in mammalian hearts. *Med Mol Morphol.* 査読有り, 47; 233-9, 2014

2. Hayashi K, Ozaki N, Yamaguchi T, et al (11人省略, 13番目). Involvement of NGF in the rat model of persistent muscle pain associated with taut band. *J Pain.* 査読有り, 12; 1059-68. 2011

3. Yi SQ, Li J, Yamaguchi T, et al (4人省略). Immunolocalization of the PP family and its receptors in the gastrointestinal tract of house musk shrew, *Suncus murinus*. *Neuro Endocrinol Lett.* 査読有り, 32; 212-219. 2011

4. Kusunoki M, Misumi J, Yamaguchi T, et al (5人省略, 7番目). Long-term administration of the fungus toxin, sterigmatocystin, induces intestinal metaplasia and increases the proliferative activity of PCNA, p53, and MDM2 in the gastric mucosa of aged Mongolian gerbils. *Environ Health Prev Med.* 査読有り, 16; 224-31, 2011

[学会発表](計 10件)

1. Yamaguchi Takeshi, Hori Kiyomi, Kozakai Yu, Yi Shuangqin, Ozaki Noriyuki, Involvement of ASICs in isoproterenol induced ischemic cardiac pain rat model. 第120回日本解剖学会全国学術集会・第92回日本生理学会大会、2015年3月23日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

2. 山口豪、堀紀代美、小酒井友、白石昌武、中村恒夫、易勤、尾崎紀之、Isoproterenol 投与による心臓痛モデルラットにおける心電図について、第29回日本心電学会・第31回日本不整脈学会合同学術集会、2014年7月25日、ザ・プリンスパークタワー東京(東京都・港区)

3. 山口豪、堀紀代美、小酒井友、Aye Aye Mon、中村恒夫、白石昌武、易勤、尾崎紀之、Isoproterenol 投与による虚血性心臓痛における ASICs の関与の検討、第36回日本疼痛学会、2014年6月21日、KKR ホテル大阪(大阪府・大阪市)

4. 山口豪、堀紀代美、小酒井友、白石昌武、中村恒夫、易勤、尾崎紀之、行動ならびに c-Fos 発現の変化を指標とした Isoproterenol 投与による虚血性心臓痛モデルの有用性の検討、第73回日本解剖学会中部支部学術集会、2013年10月6日、山梨大学甲府キャンパス(山梨県・甲府市)

5. 山口豪、堀紀代美、小酒井友、中村恒夫、白石昌武、易勤、尾崎紀之、イソプロテレノール投与による虚血性心筋傷害疼痛モデルの有用性の検討、コ・メディカル形態機能学会第12回学術集会、2013年9月14日、広島国際大学(広島県・東広島市)

6. 山口豪、易勤、堀紀代美、白石昌武、中村恒夫、尾崎紀之、Isoproterenol 虚血性心筋傷害モデルにおける行動学的ならびに脊髄後角ニューロンにおける c-fos 発現の変化、

第 118 回日本解剖学会全国学術集会、2013 年 3 月 29 日、かがわ国際会議場（香川県・高松市）

7 . Shuang-Qin Yi , Tuneo Nakamura , Yoshitake Shiraishi , Takeshi Yamaguchi , Kiyomi Hori, Noriyuki Ozaki , The direct neural connections between gall bladder and duodenum, the sphincter of Oddi in Suncus murinus , 1st Congress of Asian Association of Clinical Anatomy(AsACA) 2012 年 11 月 , 釜山（韓国）

8 . 山口豪、尾崎紀之、島田達生、心電図の理解に必要な形態学的知識（オーガナイズドセッション）第 28 回心電情報処理ワークショップ、2012 年 10 月 28 日、熱海後楽園ホテル（静岡県・熱海市）

9 . Kozakai Y , Hayashi K , Yi S-Q , Hori K , Yamaguchi T , Ozaki N , Involvements of CRF and NGF in animal models of stress-induced Functional Dyspepsia , 15th World Congress of Pain (IASP) , 2012 年 8 月 , ミラノ（イタリア）

10 . Hori K , Hayashi K , Sugiura Y , Yi S-Q , Yamaguchi T , Ozaki N , P2X3,2/3and ASICs plays a key role in muscle hyperalgesia and intermittent claudication in a new rat model of peripheral arterial disease , 15th World Congress of Pain (IASP) , 2012 年 8 月 , ミラノ（イタリア）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山口 豪（YAMAGUCHI TAKESHI）

金沢大学・医学系・助教
研究者番号：60532182

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：