

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790858

研究課題名(和文) 副交感神経活動による抗炎症作用の分子機序解明と大動脈瘤の非侵襲的制圧への応用

研究課題名(英文) Molecular mechanism of anti-inflammatory properties of parasympathetic nervous system and its application in pharmacotherapy of abdominal aortic aneurysm

研究代表者

有川 幹彦 (ARIKAWA, MIKIHICO)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：20432817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：副交感神経活動の活性化による抗炎症作用の分子機序を明らかにするために、マクロファージ細胞株において、内毒素刺激により惹起される炎症反応に対するドネペジル(ACh分解酵素阻害剤)の効果を検討した。その結果、ドネペジルはLPS誘導性のNF- κ B核移行を抑制することにより抗炎症作用を示すことが明らかになった。AChや別種のACh分解酵素阻害剤では同様の効果が認められなかったことから、ドネペジルの抗炎症作用は本剤特異的であることが示唆された。in vivo系においては、塩化カルシウム誘発性の腹部大動脈瘤モデルが再現性に乏しく、ドネペジルの抗炎症作用を評価でき得るモデルの作成にまで至らなかった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the effect of donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, on the endotoxin-induced inflammation in macrophage cells. As results, donepezil reduced the expression and secretion of pro-inflammatory cytokines by attenuating the LPS-induced nuclear translocation of NF- κ B. Neither acetylcholine nor other acetylcholinesterase inhibitors reproduced the anti-inflammatory action of donepezil, indicating that donepezil directly affects cells via a mechanism which is independent of its pharmacological property of acetylcholinesterase inhibition.

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：生体機能利用 心機能保護 コリンエステラーゼ阻害剤 アセチルコリン

1. 研究開始当初の背景

現代の高齢化社会における心血管疾患の治療法開発および予防対策は、循環器領域の基礎・臨床研究における重要克服課題のひとつである。申請者が所属する研究グループでは、これまでに、迷走神経活動の活性化による心不全病態改善効果を見出した。後に行われた臨床試験においても、心不全患者に対する長期間の迷走神経刺激の安全性と有効性が示された。しかしながら、その作用機序は未だ明らかにされていない。

近年、炎症性細胞からのサイトカイン産生の制御機構として、アセチルコリン (ACh) を介した副交感神経活動の抗炎症反応経路 (cholinergic anti-inflammatory pathway) の存在が提唱された。さらには免疫関連細胞を含む多くの非神経性細胞において、細胞内 ACh 産生系 (non-neuronal cholinergic system) が確認され、産生・遊離された ACh が自己または近傍の細胞機能を変化させることが明らかになった。

これらの研究結果を受け、様々な循環器疾患の病態、特に病因性炎症反応における副交感神経活動の役割とその意義および作用機序を分子レベルで明らかにし、将来的な臨床医学への応用を見据えて、副交感神経系への直接介入による心血管疾患に対する新規治療法の開発が期待され、それを目標とした基礎研究の遂行と成功が必要とされる。

2. 研究の目的

大動脈瘤は、慢性炎症によって血管壁の局所的脆弱化が進行し破裂により死に至る。本邦における罹患率は増加傾向にあり、病因と発症機序が未だ不明の重篤な疾患である。現在のところ、人工血管置換やステント内挿などの外科的処置以外に有効な治療法はなく予後が悪い。したがって、動脈瘤形成の予防、瘤径拡大速度の遅延、瘤破裂リスクの低減、および成長瘤の萎縮を目的とした、低侵襲性あるいは非外科的な新規治療法の開発が急務である。加えて、動脈瘤形成に関わる重要因子の特定、その因子の分子動態と病態への寄与など、動脈瘤発症機序の解明のために取り組むべき課題は多い。

本研究では、副交感神経系への直接介入による大動脈瘤に対する内科的薬物治療法の開発を達成目標に掲げ、大動脈瘤病態における ACh の炎症性細胞に対する抗炎症作用、および大動脈血管の構造的・機能的リモデリングに対する制御機構を解明し、副交感神経活動がもたらす心血管疾患の病態改善作用のメカニズムを分子レベルで理解することを旨とする。

3. 研究の方法

ドネペジルはコリンエステラーゼ阻害剤であり、生体内で ACh の分解を抑制して内在性 ACh レベルの上昇を引き起こす。本研究では、副交感神経活動がもたらす心血管疾患に

対する病態改善効果の分子メカニズムを ACh の抗炎症作用として説明すること、さらには、ドネペジルの動脈瘤に対する新規薬物治療戦略としての可能性を探ることを目的として、以下の実験を計画した。

(1) In vitro 実験：マクロファージに対するドネペジルの効果

マクロファージ細胞株 (Raw 264.7) を 37 °C にて培養する。ACh またはドネペジル処理後、内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) による炎症刺激を行い、培養上清と細胞のサンプリングを行う。培養上清または細胞における各種サイトカインの定量解析を行う。

ニコチン性またはムスカリン性 ACh 受容体拮抗薬存在下で、ACh およびドネペジルの抗炎症作用を評価する。

(2) In vivo 実験：マウス腹部大動脈瘤モデルに対するドネペジルの効果

麻酔下のマウスに対して塩化カルシウム誘発性の腹部大動脈瘤作成処置を行う。閉腹後、ドネペジル投与群と非投与群に分ける。

以下の点について実験群間で比較する。

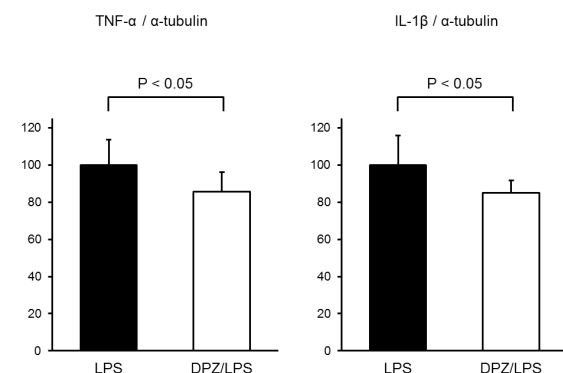
- 1) ドネペジルの血行動態に及ぼす影響の有無、
- 2) 一定期間経過後の大動脈外径、内径、および瘤壁厚、
- 3) 瘤壁における炎症反応の程度および浸潤細胞組成、
- 4) 各種サイトカインの発現量

4. 研究成果

(1) マクロファージに対するドネペジルの効果

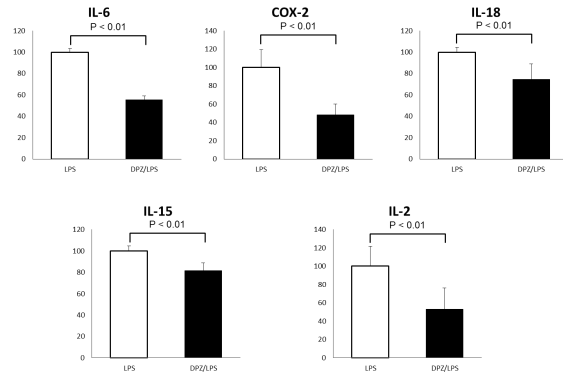
ドネペジル (donepezil, DPZ) は LPS 誘発性の tumor necrosis factor- (TNF-) と interleukin-1 (IL-1) の発現量増加を有意に抑制した (図 1)。

図 1. Western blot によるサイトカイン発現量の解析



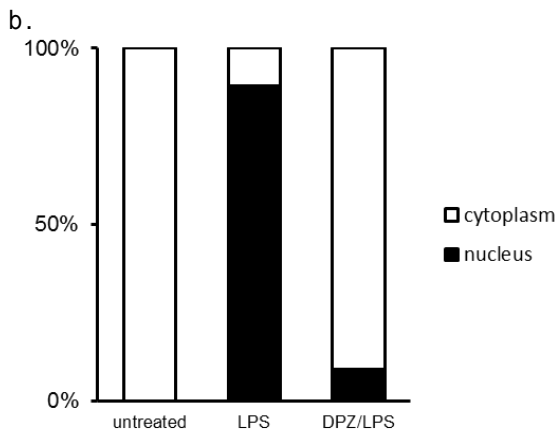
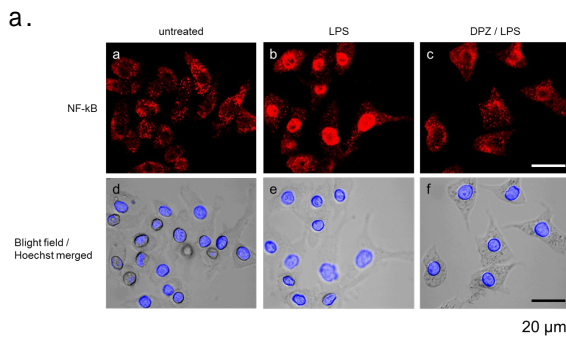
ドネペジルは LPS 誘発性の炎症性サイトカイン (IL-6, cyclooxygenase-2 (COX-2), IL-18, IL-15, および IL-2) の mRNA 発現量増加を有意に抑制した (図 2)。

図 2. RT-PCR によるサイトカイン発現量の解析



ドネペジルは LPS 誘発性の nuclear factor- κ B (NF- κ B) の核移行を抑制した (図 3a)。LPS 刺激群においては 90% の細胞で NF- κ B の核移行が見られたのに対し、ドネペジル処理群では NF- κ B の核移行は 10% の細胞に見られるにとどまった。

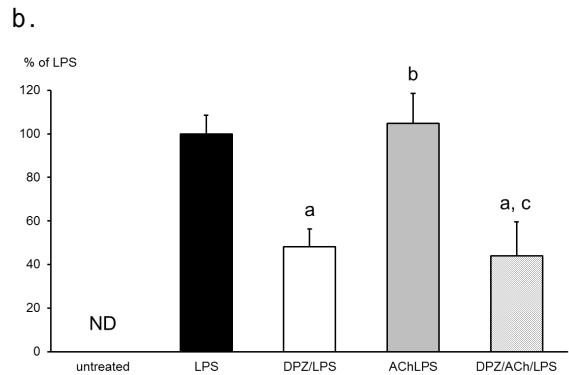
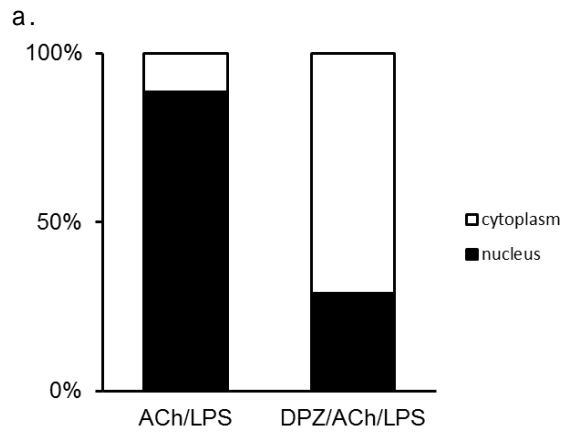
図 3. 蛍光抗体法による NF- κ B 分布の解析



ドネペジルによる NF- κ B の核移行抑制作用は ACh では引き起こされなかった (NF- κ B 核移行細胞の割合、ACh/LPS: 88%, DPZ/ACh/LPS: 29%, 図 4a)。さらには、LPS 誘発性の TNF- α の合成・分泌はドネペジル処理により

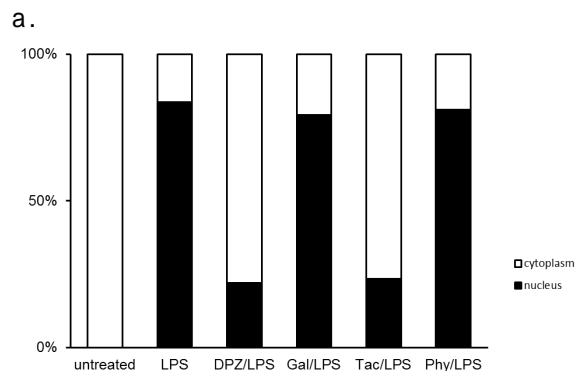
抑制されたが、ACh 処理では抑制されなかった (図 4b)。

図 4. 蛍光抗体法による NF- κ B 分布の解析 (a) と Western blot による TNF- α 合成・分泌量の解析 (b)

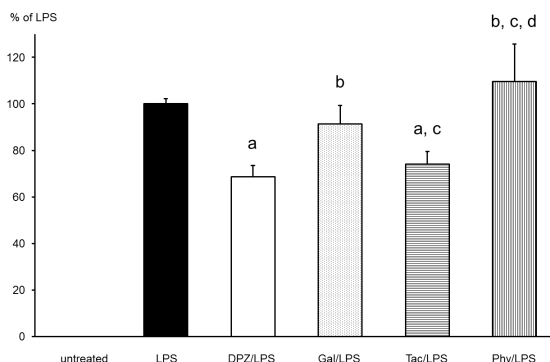


各種コリンエステラーゼ阻害剤の影響を検討した結果、LPS 誘発性の NF- κ B 核移行 (図 5a) および TNF- α の合成・分泌 (図 5b) はドネペジル処理とタクリン (Tac) 処理により抑制されたが、ガラントミン (Gal) やフィズスチグミン (Phy) では抑制されなかった。

図 5. 蛍光抗体法による NF- κ B 分布の解析 (a) と Western blot による TNF- α 合成・分泌量の解析 (b)



b.



(2) マウス腹部大動脈瘤モデルに対するドネペジルの効果

マウス腹部大動脈瘤モデルに対するドネペジルの効果

マウス腹部大動脈瘤モデルに対するドネペジルの効果の短期的・長期的評価を計画したが、塩化カルシウム誘発性の腹部大動脈瘤モデルが再現性に乏しく、ドネペジルの効果を評価でき得るモデルの作成にまで至らなかった。

マウス敗血症モデルに対するドネペジルの効果

盲腸結紮穿孔によるマウス敗血症モデルに対するドネペジルの効果を検討した。その結果、ドネペジル投与群と非投与群において、敗血症モデルマウスの生存率に有意な差は認められなかった。ドネペジルの抗炎症作用は生存率にまで影響を及ぼすほど強力なものではないためと考察される。モデルにおける炎症の程度を軽度調整し、血中の炎症性サイトカイン濃度や腹腔内のマクロファージ数など、ドネペジルの抗炎症作用に対する適切な評価法の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Kakinuma Y, Tsuda M, Okazaki K, Akiyama T, Arikawa M, Noguchi T, Sato T.

Heart-specific overexpression of choline acetyltransferase gene protects murine heart against ischemia through hypoxia-inducible factor-1-related defense mechanisms.

Journal of the American Heart Association, 18, e004887, 2013. 査読有.
DOI: 10.1161/JAHA.112.004887

Kakinuma Y, Akiyama T, Okazaki K, Arikawa M, Noguchi T, Sato T.

A Non-Neuronal Cardiac Cholinergic System Plays a Protective Role in Myocardium Salvage during Ischemic Results.

PLoS ONE, 7, e50761, 2012. 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pone.0050761

Arikawa M, Kakinuma Y, Handa T, Yam

asaki F, Sato T.

Donepezil, anti-Alzheimer's Disease Drug, Prevents Cardiac Rupture during Acute Phase of Myocardial Infarction in Mice.

PLoS ONE, 6, e20629, 2011. 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pone.0020629

[学会発表](計10件)

柿沼由彦, 津田正之, 岡崎佳代, 秋山剛, 有川幹彦, 野口達哉, 佐藤隆幸. 細胞内コリン作動系制御機構を介した細胞代謝とその病態への影響.

第34回日本循環制御医学会総会, 福井県民ホール, 福井, 2013. 6. 7-8.

Kakinuma Y, Akiyama T, Okazaki K, Arikawa M, Noguchi T, Sato T.

Old knowledge but novel insight to the cardiac non-neuronal cholinergic system-The possible involvement of this system in metabolic intervention to cells-.

第90回日本生理学会大会, タワーホール船越, 東京, 2013. 3.27-29.

Arikawa M, Kakinuma Y, Noguchi T, Sato T.

Donepezil, Therapeutic Acetylcholinesterase Inhibitor, Prevents Progression of Ventricular Dysfunction by Promoting Cardiac Glucose Metabolism in Rat with Chronic Heart Failure.

第90回日本生理学会大会, タワーホール船越, 東京, 2013. 3.27-29.

有川幹彦, 柿沼由彦, 野口達哉, 佐藤隆幸.

ドネペジルは、マウス心筋梗塞モデルにおいて、マクロファージMMP-9を抑制し急性期心破裂の危険率を低減する.

第89回日本生理学会大会, 松本文化会館, 長野, 2012. 3. 29-31.

Arikawa M, Kakinuma Y, Noguchi T, Yamasaki F, Sato T.

Donepezil, an Acetylcholinesterase Inhibitor, Prevents Cardiac Rupture during Acute Phase of Myocardial Infarction in Mice.

第76回日本循環器学会学術集会, 福岡国際会議場, 福岡, 2012. 3. 16-18.

Kakinuma Y, Akiyama T, Arikawa M, Sato T.

Cholinceptive Cholinergic Properties of Cardiomyocytes: Amplification Mechanism for Vagal Efferent Effects.

第76回日本循環器学会学術集会, 福岡国際会議場, 福岡, 2012. 3. 16-18.

有川幹彦, 柿沼由彦, 野口達哉, 佐藤隆幸.

ドネペジルは、マウス心筋梗塞モデルに

において、マクロファージ MMP-9 産生を抑制し急性期心破裂の危険率を低減する。
第 63 回日本生理学会中国四国地方会、
広島大学、広島、2011. 10. 22-23.

柿沼由彦, 秋山 剛, 有川幹彦, 岡崎佳代, 佐藤隆幸.

心筋細胞内アセチルコリン産生系の生物学的意義.

第 63 回日本生理学会中国四国地方会、
広島大学、広島、2011. 10. 22-23.

Arikawa M, Kakinuma Y, Noguchi T, Sato T.

Acetylcholinesterase Inhibitor Donepezil in Treatment of Myocardial Ischemia and Heart Failure.

Joint Meeting 7th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN) / 22nd Symposium of the American Autonomic Society (AAS)-2011 (Satellite Meeting), Atlantic Buzios Convention & Resort, Rio de Janeiro, Brazil, 2011. 9. 12-18.

有川幹彦, 柿沼由彦, 野口達哉, 山崎文靖, 佐藤隆幸.

ドネペジルは、マウス心筋梗塞モデルにおいて、マクロファージ MMP-9 の産生を抑制することにより急性期心破裂の危険率を低減する。

第 12 回 Neurocardiology Workshop, 東京ステーションコンファレンス、東京、2011. 7. 11.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有川 幹彦 (ARIKAWA, Mikihiko)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：20432817