

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790780

研究課題名(和文) 移植心における内因性心臓交感神経刺激細胞の生理機能の解析とヒト移植心への臨床応用

研究課題名(英文) Analysis of physiological functions and translational researches of Intrinsic Cardiac Adrenergic Cell in transplanted hearts

研究代表者

田村 雄一 (TAMURA, YUICHI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：00468498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では内因性心臓交感神経刺激細胞が神経堤由来であることを、P0-Cre x Floxed-GFP のダブルトランスジェニックマウスを用いて明らかにした。また *in vivo* での検討において内因性心臓交感神経刺激細胞への増殖・分化を促進する因子が NGF であることを同定した。さらに移植マウスにおいて収縮力および心拍数増加が内因性心臓交感神経刺激細胞の発達と相関することを確認した。

研究成果の概要(英文)：We identified the Intrinsic Cardiac Adrenergic Cell (ICA cell) are derived from neural crest by analyzing P0-Cre x Floxed-GFP transgenic mice. We found a promoting factor for the proliferation and differentiation into ICA cell as NGF. And we confirmed the contraction and heart rate of transplanted hearts were affected with the development of ICA cell.

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：分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

従来移植された心臓においては交感神経支配が途絶し、交感神経による修飾をうけることはないと考えられてきた。しかし実際の臨床においては、運動やカテコールアミン投与による刺激によって心拍数や心拍出量に変化することが知られており、除神経された交感神経を補完する役割を担う機構があることが予想されていた。また Frank M. NEJM 345(10) 731-738 らの報告によれば、心臓移植後の患者においてPETを用いて組織中のカテコールアミンの取り込みを評価したところ、取り込みが多い群が優位に運動耐容能が優れ予後が良いということが示されている。しかしその詳細な生理学的メカニズムに関しては明らかにされていなかった。

一方かねてより交感神経が未発達な胎生期においては内因性心臓交感神経刺激細胞が胎児心臓の拍動を司ることが知られており、交感神経系とは異なる形で内因性の交感神経刺激機構が作用していることが知られていた。内因性心臓交感神経刺激細胞の特徴は小型で核を有し未成熟な神経突起を有する一方、カテコールアミンの吸収・合成・分泌能をもつというものであり、胎児の心臓内では交感神経のネットワークが未成熟な段階できわめて重要な役割を果たしている。しかし内因性心臓交感神経刺激細胞は出生後も一部残存しているものの、その起源や生理学的作用に関しては全く解明されていなかった。そこで本研究では出生後も交感神経が障害されるといふ心臓にとっての危機的状況が起こった際には、一種の”赤ちゃん帰り”機構として内因性心臓交感神経刺激細胞が再活性化し、失われた交感神経系の作用を代替/補完するのではないかという仮説のもと、研究を開始した。

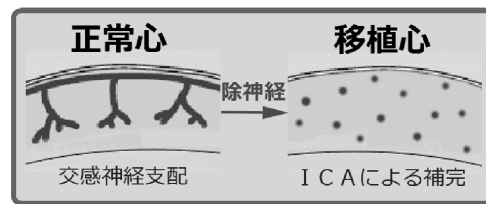
2. 研究の目的

心臓は交感神経幹由来の交感神経支配を受けて脈拍の調節などを行っているが、心臓移植後の神経が一旦除神経された後の神経再編に関してのメカニズムは明らかではない。これまでの研究で胎生期の心臓発生段階での交感神経刺激を司る内因性心臓交感神経刺激細胞(Intrinsic Cardiac Adrenergic Cell: ICA cell)が出生後も心臓内に残存し心臓移植時に増殖することがわかった。そこで本研究では中枢由来の交感神経支配が途絶えた移植心臓において、内因性心臓交感神経刺激細胞が補完的に交感神経作用を担うことを動物モデルで生理学的に明らかにすると共に、ヒトにおいても同現象が起こっていることを明らかにし心臓移植患者の予後改善に結びつける。

3. 研究の方法

(1)概要

本研究では動物実験では心臓移植モデルマウスを用いて、内因性心臓交感神経刺激細胞が増殖・分化して交感神経作用を補完することが生理学的意義を持つことを解明する。具体的な手法としてはPETなどの心臓における交感神経活性を評価する画像検査を行うと共に、心電図・心エコー及びランゲンドルフ還流心臓モデルを用いて内因性心臓交感神経刺激細胞が生理学的にも有効な作用を持つことを示す。さらに *in vitro* で解明された内因性心臓交感神経刺激細胞の増殖・分化に関わる因子をトランスジェニックマウスを用いて *in vivo* でも確認する。また心臓移植患者への臨床応用を目指しヒトの移植心臓における検討も行う。



移植心臓における内因性心臓交感神経刺激細胞の作用(概念図)

(2)詳細な研究方法1: マウス移植心臓モデルを用いた解析

本研究では心臓移植モデルマウスを作製し、移植後1~4週の時点での移植心臓における交感神経活性を観察する。すでに前述の通り移植心臓では除神経後に内因性心臓交感神経刺激細胞が増加していることを組織学的に明らかにしたので、本研究においては移植心臓内で増加している細胞が生理的な交感神経活性を保持していることをより詳細に検討するため、以下の研究内容を計画している

移植心臓内におけるカテコールアミンの生合成を生化学的(クロマトグラフィー法を用いる)およびRNA発現レベルで解析する

MIBG ラジオアイソトープ検査を行い移植心臓内でノルエピネフリンの代謝が行われていることを確認する(MIBGを用いた研究はすでに富士フイルムR Iファーマ株式会社との共同研究の実績があり(Kimura Circ Res. 2007 Jun 22;100(12):1755-64))、予備実験も終了しており、移植前のコントロールと比較して、移植後に次第に交感神経活性が再賦活化されていることが観察されている。

交感神経刺激性の薬剤投与下での心エコーや心電図およびランゲンドルフ還流心臓モデルによる解析を行い内因性心臓交感神経刺激細胞が移植心臓において生理学的作用を果たしていることを明らかにする。

(3) 詳細な研究方法 2：内因性心臓交感神経刺激細胞の増殖・分化誘導因子の解析

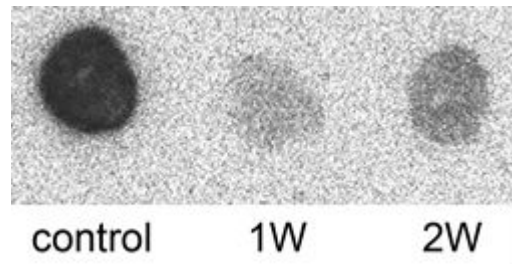
本研究では内因性心臓交感神経刺激細胞の生理学的活性を解析すると同時に、増殖・分化を促進する因子に関する検討も行う。すでに *in vitro* の系で心臓内の神経堤由来細胞を分離した上で培養すると、内因性心臓交感神経刺激細胞に分化することは実証している。そこでさらに本研究では神経堤由来細胞からの分化・増殖をより効率的に促す物質の同定を行う。我々はその有力な候補として神経増殖因子(Nerve Growth Factor: NGF)に着目しており、内因性心臓交感神経刺激細胞が NGF の修飾を受けると有意に増殖・分化することを *in vitro*/*in vivo* の双方で示すことを計画している。すでに移植心では NGF の活性が増加していることは確認しているため、*in vitro* においては添加することで内因性心臓交感神経刺激細胞への分化が高率に促進される因子を同定するとともに、移植モデルマウスにおいても NGF の投与により移植心内において内因性心臓交感神経刺激細胞が増加することを確認する。これにより内因性心臓交感神経刺激細胞がどのような刺激を受け、どのようなメカニズムで交感神経系を補完するように働き始めるかが明らかとなるため、ヒトの移植心に対する治療としての臨床応用の重要な端緒となることが期待できる。

4. 研究成果

まず心臓移植モデルマウスを作製し、移植後 1～4 週の時点での移植心における交感神経活性を観察した。先行研究で移植心では除神経後に内因性心臓交感神経刺激細胞が増加していることは組織学的に明らかであったため、本研究においては移植心内で増加している細胞が生理的な交感神経活性を保持していることを以下の方法でより詳細に検討した。

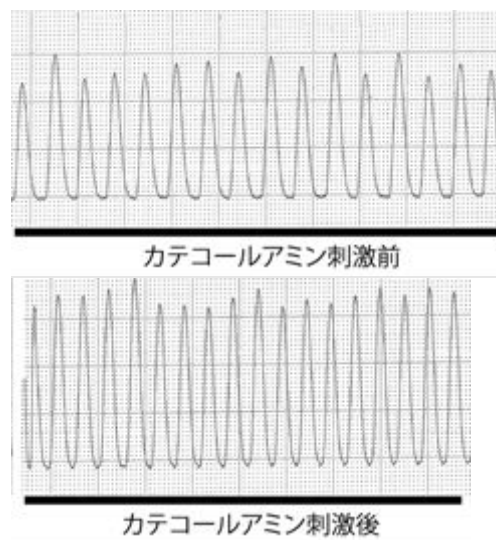
(1)移植心臓内におけるカテコールアミンの生合成を生化学的(クロマトグラフィー法を用いる)および RNA 発現レベルで解析したところ、移植後の心臓では経時的にカテコールアミンの生合成が増加していることが、合成酵素の RNA 発現レベルおよびカテコールアミンの組織中の濃度の検討から明らかになった。

(2)MIBG ラジオアイソトープ検査を行い、移植心臓内でノルエピネフリンの代謝が行われていることも確認された。このことから、移植後に次第に交感神経活性・再取り込み能が再賦活化されていることが示唆された。



図：移植心における交感神経作用の再活性化

(3)交感神経刺激性の薬剤投与下での心エコーや心電図およびランゲンドルフ還流心モデルによる解析を行い内因性心臓交感神経刺激細胞が移植心において生理学的作用を果たしていることを明らかにすることができた。



図：内因性心臓交感神経刺激細胞よりカテコールアミンの分泌を促す刺激により移植心の心拍数・拍出量が増加する

(4)内因性心臓交感神経刺激細胞の増殖・分化誘導因子の解析

本研究では内因性心臓交感神経刺激細胞の生理学的活性を解析すると同時に、増殖・分化を促進する因子に関する検討も行った。*in vitro* の系で心臓内の神経堤由来細胞を分離した上で培養すると、内因性心臓交感神経刺激細胞に分化することは実証していたので、さらに神経堤由来細胞からの分化・増殖をより効率的に促す物質の同定を行った。スクリーニングの結果、その有力な候補として神経増殖因子(Nerve Growth Factor: NGF)を同定した。内因性心臓交感神経刺激細胞が NGF の修飾を受けると有意に増殖・分化することを *in vitro*/*in vivo* の双方で示す事を行った。

移植心では NGF の活性が増加していることを確認した

in vitro においては NGF 添加することで内

因性心臓交感神経刺激細胞への分化が高率に促進される事を確認した

移植モデルマウスにおいても NGF の投与により移植心内において内因性心臓交感神経刺激細胞が増加することを確認した。

(5)本研究の与える影響

本研究は従来解明されていなかった2つの事柄を新規に解明した点で非常に独創的である。すなわち

モデル動物およびヒトの移植心で交感神経ネットワーク障害時に交感神経作用を補完する役割を果たしているのは内因性心臓交感神経刺激細胞(ICA cell)である

内因性心臓交感神経刺激細胞を賦活化させることで心移植患者の QOL と予後の改善をもたらす研究に臨床応用できる研究である

の2点である。いずれもこれまでの知見では解明・実現されておらず、この2つの事柄を明らかにすることは世界初の試みである。心臓移植は非代償性の心筋障害の患者にとって唯一の治療法である一方、非常にコストのかかる治療法でもある。そこで移植された心臓が有効に作用し、移植患者の運動耐容能や Quality of Life ならびに予後を改善する手法をみつけることができれば、その臨床的側面への効果は計り知れない。本研究は除神経された移植後の心臓における交感神経作用を内因性心臓交感神経刺激細胞が担うという補完システムを明らかにすることで、将来的には心臓移植患者の予後を改善する治療法に応用できると考えられる。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 田村雄一、Neural Crest-Derived Resident Cardiac Cells Contribute to the Restoration of Adrenergic Function of Transplanted Heart in Rodent、第 77 回日本循環器学会学術集会 (JCS2013)、2013 年 3 月 15 日 (金)、横浜

2. 田村雄一、Neural Crest-Derived Resident Cardiac Cells Contribute to the Restoration of Adrenergic Function of Transplanted Heart in Rodent、米国心臓病学会議(AHA 2012)、2012 年 11 月 6 日、Los Angeles, USA

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 雄一 (TAMURA YUICHI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：00468498