

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461059

研究課題名(和文) 非神経性コリン作動系を基軸とした心筋梗塞病態の包括的理解とその非侵襲的制御

研究課題名(英文) A comprehensive understanding of the role of a non-neuronal cholinergic system in the pathology of myocardial infarction

研究代表者

有川 幹彦 (ARIKAWA, MIKIHICO)

高知大学・教育研究部自然科学系・准教授

研究者番号：20432817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心線維芽細胞内コリン作動系の生物学的意義と重要性、心筋梗塞病態への関与を明らかにするために、心筋梗塞モデルマウスを作製し、その急性期における心臓内コリン作動系の分子動態、および心線維芽細胞の挙動を追った。その結果、心線維芽細胞はアセチルコリン(ACh)合成系、分解系、輸送系、および受容系など、コリン作動系に関わる要素を発現していること、心筋梗塞後に心臓内ACh濃度が上昇すること、そしてその上昇は、梗塞領域における心線維芽細胞由来のACh合成酵素(ChAT)発現量増加によりもたらされること、および梗塞巣内心線維芽細胞数の増加に起因するものであることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Cardiac fibroblasts (cFb) play an important role in structural and functional remodeling of the heart after myocardial infarction (MI). In the present study, we investigated the hypothesis that cFb possess the cholinergic system by which the cFb contribute to the cardioprotection through the release of acetylcholine (ACh). In vitro study showed that the cultured cFb isolated from adult mouse heart express ACh synthesis and degradation enzymes, ACh transporters, and various types of ACh receptors. In vivo immunohistochemical study showed that ChAT signals were co-localized with cFb markers, indicating that cFb express ChAT in the heart. Moreover, westernblot analysis showed that the expression of cFb ChAT was increased in only infarcted myocardium after the MI, resulted in the increase of cardiac ACh content. In conclusion, cFb produce ACh in infarcted myocardium after the MI, which may contribute to the cardioprotection during the post infarct cardiac remodeling process.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生体機能利用 心機能保護 アセチルコリン 非神経性コリン作動系 心筋梗塞

1. 研究開始当初の背景

現代の高齢化社会において、死因第二位とされる虚血性心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、心臓迷走神経活動の活性化による心不全病態改善効果を新たに見出した。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心臓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。一般に、心室筋に対する迷走神経支配は疎であり、心臓ポンプ機能に対する作用は軽微とされている。したがって、心臓迷走神経刺激と心機能保護作用との間には今なお Missing Link が存在している。

我々は、心筋細胞が非神経性コリン作動系 (non-neuronal cardiac cholinergic system) を有し、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を明らかにした。これらの新しい知見は上述の Missing Link を埋める糸口となり得る。

これらの研究結果を受け、様々な心疾患の病態における副交感神経活動の役割とその意義、および副交感神経活動の活性化による内在性 ACh を介した心筋保護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

虚血性心疾患、特に心筋梗塞は、幅広い重症度の病態を含み、医療技術や治療法が大きく進歩した現代においてもなお生命予後の悪い重篤な疾患である。心筋梗塞の病態は、正常および虚血環境下にある心筋細胞によってのみならず、浸潤してきた炎症性細胞や増殖した繊維芽細胞の生理活動を介して制御されている。したがって、心筋梗塞の効果的な治療には、その病態について細胞種を越えた包括的理解が必要不可欠であり、その制御機構の破綻こそが心疾患の重篤化に至るといふ仮説のもとに、新規治療標的の探索と新規治療法の開発が急務である。

本研究では、副交感神経活動の活性化によってもたらされる虚血性心不全病態改善作用において、非神経性コリン作動系の関与とその重要性を明らかにするために、心筋細胞における ACh 誘導性のストレス防御機構、炎症性細胞に対する ACh の抗炎症作用、および心繊維芽細胞による組織癒着化における ACh の影響について検証し、非神経性コリン作動系を標的とした虚血性心疾患に対する新規薬物治療法開発のためのエビデンスの獲得を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、副交感神経活動がもたらす虚血性心疾患に対する病態改善作用を、心臓が持つ抗ストレス反応の内在性 ACh による増強として説明すること、さらには、その分子メカニズムにおける非神経性コリン作動系の関わりと、新規薬物治療標的としての可能性を探ることを目的とした。そこで、各種心筋組織構成細胞の初代培養系において、細胞活動に対する ACh の直接効果と、心不全病態を模倣した培養環境下における ACh の細胞機能への影響を明らかにする。さらには、培養細胞での実験で得られた非神経性コリン作動系の働きを疾患モデルにおいて再現し、その病態を評価することによって、心筋梗塞治療における非神経性コリン作動系活性化の重要性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) マウス心筋由来の線維芽細胞初代培養系において、RT-PCR によるコリン作動系構成要素の発現解析を行ったところ、ACh 合成系、分解系、輸送系、および受容系に関わる多くの要素を発現していることが分かった。このことは、心線維芽細胞が ACh を介した生理機能に関わっている可能性を示している。

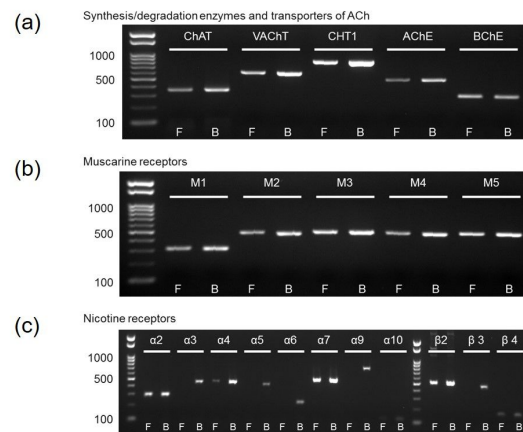


図1. RT-PCR による心線維芽細胞におけるコリン作動系構成要素の発現解析。(a) ACh 合成、分解、輸送系。(b and c) ACh 受容系。

(2) HPLC により心筋内 ACh 含有量を解析したところ、コントロール (sham) は $3.38 \pm 0.55 \times 10^{-8}$ M であるのに対し、心筋梗塞モデルの術後1日目の心筋 (myocardial infarction 1 day, MI1D) では $5.23 \pm 1.38 \times 10^{-8}$ M と有意に増加していた。

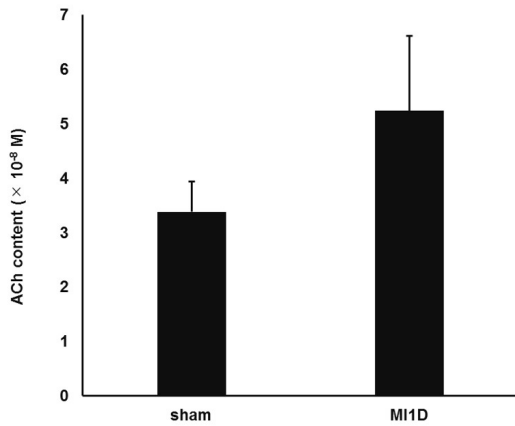


図2 .マウス心筋内ACh含有量のHPLC解析。sham, コントロール。MI1D, 心筋梗塞モデル術後1日目。

(3) マウス心筋梗塞モデルにおける心筋内腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) の発現量は、コントロール (sham) に比べて、術後1~3日目の心筋 (MI1-3D) において有意に増加していた。このことは、心筋梗塞モデルが正しく作成されていることを示している。

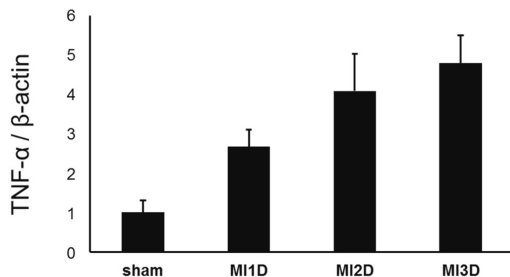


図3 . Western blot による心筋内 TNF- α 発現量解析。sham, コントロール。MI1-3D, 心筋梗塞モデル術後1-3日目。 β -actin はインターナルコントロールを示す。

(4) マウス心筋梗塞モデルにおける心筋内アセチルコリン合成酵素 (choline acetyltransferase, ChAT) の発現量は、コントロール (sham) では検出できないほどに少なかったのに対して、術後1~3日目の心筋 (MI1-3D) においては時間経過とともに有意に増加していた。これにより、心筋梗塞モデルにおける心筋内 ACh 含有量の増加 (実験2) を説明できる。

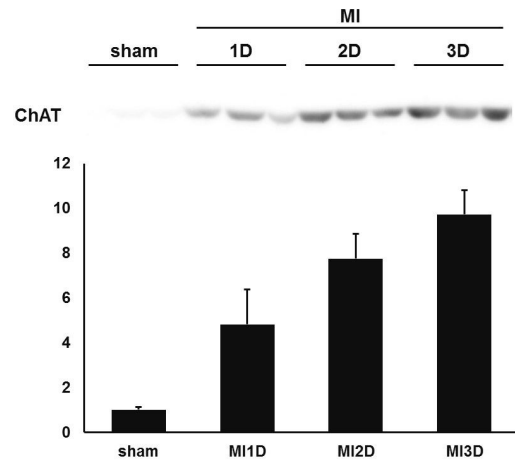


図4 . Western blot によるマウス心筋梗塞モデルにおける心筋内 ChAT 発現量解析。sham, コントロール。MI1-3D, 心筋梗塞モデル術後1-3日目。

(5) マウス心筋梗塞モデルにおける心筋内 ChAT の発現は、コントロール (sham) に比べて、術後1~3日目の心筋 (MI1-3D) において有意に増加していたが (実験4) その増加は梗塞部位 (infarct zone, IZ) に限られ、非梗塞部位 (non-infarct zone, NIZ) では見られなかった。また、ChAT は心室筋 (mouse ventricle) 由来ではなく心線維芽細胞 (mouse cFb) 由来であることが分かった。このことは、心線維芽細胞がもつコリン作動系が心筋梗塞病態に関与していることを示している。

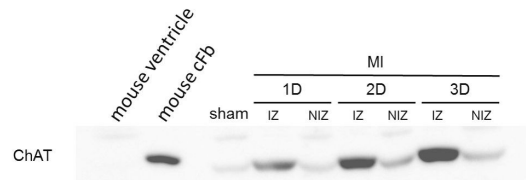


図5 . Western blot によるマウス心筋梗塞モデルにおける心筋内 ChAT 発現量解析。mouse ventricle, マウス心室筋。mouse cFb, マウス心線維芽細胞。sham, コントロール。MI1-3D, 心筋梗塞モデル術後1-3日目。IZ, 梗塞部位。NIZ, 非梗塞部位。

(6) 平滑筋アクチン (alpha smooth muscle actin, α SM actin) は線維芽細胞マーカーである。マウス心筋梗塞モデルにおける心筋内 α SM actin 発現量は、コントロール (sham) に比べて、術後1~3日目の心筋 (MI1-3D) において有意に増加していた。このことは、梗塞領域に常駐している線維芽細胞が分裂・増殖したか、あるいは梗塞領域に浸潤してきたことを示している。

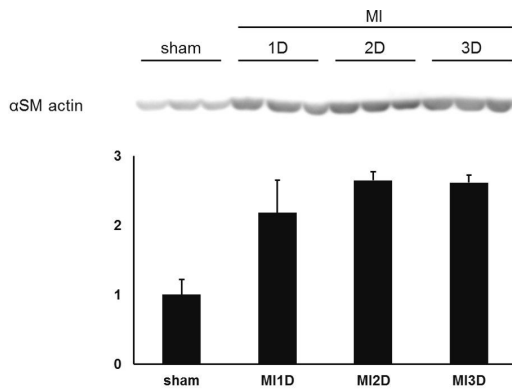


図6 .Western blot によるマウス心筋梗塞モデルにおける心筋内 α SM actin 発現量解析。sham, コントロール。MI1-3D, 心筋梗塞モデル術後 1-3 日目。

(7) マウス心筋梗塞モデルにおける心筋内 α SM actin の発現は、コントロール (sham) に比べて、術後 1 ~ 3 日目の心筋 (MI1-3D) において有意に増加していたが (実験 6) その増加は梗塞部位 (IZ) に限られ、非梗塞部位 (NIZ) では見られなかった。また、 α SM actin の発現は心室筋 (mouse ventricle) にも認められたが、これは心線維芽細胞 (mouse cFb) 由来であると考えられた。



図7 .Western blot によるマウス心筋梗塞モデルにおける心筋内 α SM actin 発現量解析。mouse ventricle, マウス心室筋。mouse cFb, マウス心線維芽細胞。sham, コントロール。MI1-3D, 心筋梗塞モデル術後 1-3 日目。IZ, 梗塞部位。NIZ, 非梗塞部位。

(8) 免疫組織化学的解析により、心筋内 ChAT と α SM actin の局在は、コントロール (sham) においては心筋線維の間に点在するように認められ、心筋梗塞モデル術後 3 日目 (MI3D) においては、梗塞領域にのみ密集するように認められた。これは実験 (5) と実験 (7) の結果を反映している。

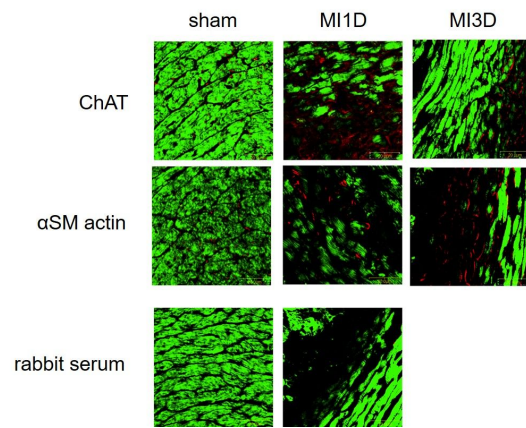


図8 .免疫蛍光抗体法による心筋内 ChAT と α SM actin の局在性の解析。ChAT と α SM actin は、赤色の蛍光シグナル (Alexa 546) にて検出。心筋は、緑色の蛍光シグナル (phalloidin/Alexa 488) にて検出している。sham, コントロール。MI1-3D, 心筋梗塞モデル術後 1-3 日目。rabbit serum は二次抗体のみのネガティブコントロールを示す。

(9) 免疫組織化学的解析により、マウス心筋梗塞モデルにおいて、心筋内 ChAT と α SM actin は術後 3 日目の梗塞領域において共局在していた。このことは、心筋内 ChAT は心線維芽細胞由来であることを直接的に示している。

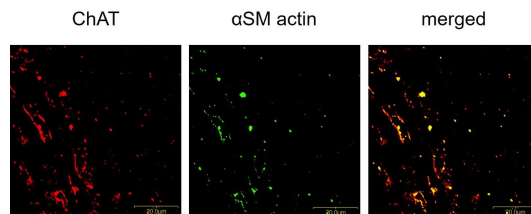


図9 .免疫蛍光抗体法によるマウス心筋梗塞モデル術後 3 日後における心筋内 ChAT (Alexa 546) と α SM actin (Alexa 488) の局在性の解析。ChAT は、赤色の蛍光シグナル (Alexa 546) にて検出。 α SM actin は、緑色の蛍光シグナル (Alexa 488) にて検出している。

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 3 件)

Arikawa M, Kakinuma Y, Noguchi T, Todaka H, Sato T. Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, attenuates LPS-induced inflammatory

response in murine macrophage cell line RAW 264.7 through inhibition of nuclear factor kappa B translocation. Eur J Pharmacol. 2016; 789: 17-26. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.06.053.

Arikawa M, Kakinuma Y, Noguchi T, Sato T. Donepezil, Therapeutic Acetylcholinesterase Inhibitor, Prevents the Progression of Ventricular Dysfunction by Promoting Myocardial Glucose Utilization in Rat Model of Chronic Heart Failure Following Myocardial Infarction. *Cardiol Pharmacol.* 2014; 3: 121. DOI: 10.4172/2329-6607.1000121.

Noguchi T, Kakinuma Y, Arikawa M, Okazaki K, Hoshino E, Iiyama T, Kubo T, Kitaoka H, Doi Y, Sato T. Donepezil Can Improve Ischemic Muscle Atrophy by Activating Angiomyogenic Properties of Satellite Cells. *Circ J.* 2014; 78: 2317-24. doi: 10.1253/circj.CJ-14-0095.

〔学会発表〕(計 5 件)

有川幹彦・柿沼由彦・野口達哉・佐藤隆幸.
抗認知症薬ドネペジルの抗心不全作用について.
第2回ニューロネットワークと循環研究会. ステーションコンファレンス東京, 東京, 2015. 5. 9.

Arikawa M, Kakinuma Y, Noguchi T, Sato T. Donepezil, Therapeutic Acetylcholinesterase Inhibitor, Attenuates LPS-induced Inflammatory Response in Murine Macrophage Cell Line RAW 264.7 through Inhibition of NF- κ B Translocation. The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 大阪国際会議場, 大阪, 2015. 4. 24-26.

有川幹彦・柿沼由彦・野口達哉・佐藤隆幸.
ドネペジルの RAW264.7 マクロファージにおいて、LPS 刺激で誘発される NF- κ B の核移行を抑制することにより抗炎症作用を示す.
第92回日本生理学会大会. 神戸国際会議場, 神戸, 2015. 3. 21-23.

有川幹彦・柿沼由彦・野口達哉・佐藤隆幸.
ドネペジルの RAW264.7 マクロファージにおいて、LPS 刺激で誘発される

NF- κ B の核移行を抑制することにより抗炎症作用を示す.
第66回日本生理学会中国四国地方会. 情報通信交流館 e-とぴあ・かがわ, 香川, 2014. 11. 1-2.

有川幹彦・柿沼由彦・野口達哉・佐藤隆幸.
ドネペジルの心筋梗塞ラットの心筋糖代謝を亢進させることにより心筋保護作用を示す.
第35回日本循環制御医学会. 九州大学医学部百年講堂, 福岡, 2014. 7. 4-5.

6. 研究組織

(1)研究代表者

有川 幹彦 (ARIKAWA, Mikihiko)
高知大学・教育研究部自然科学系・准教授
研究者番号: 20432817