

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461099

研究課題名(和文) 迷走神経刺激による心筋幹細胞の賦活化を利用した新規心血管再生治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel cardiovascular regenerative therapy by vagal nerve stimulation

研究代表者

李 梅花 (LI, MEIHUA)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：60443496

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、迷走神経刺激による心筋幹細胞賦活を利用した新規心血管再生治療法の可能性を検討した。その結果、早期に介入した迷走神経刺激による急性心筋梗塞ラットの早期致死性不整脈の抑制作用及び早期生存率の劇的改善作用、著明な抗炎症・抗心筋繊維化作用、心筋梗塞面積の縮小作用、及び心臓リモデリングの抑制効果を明らかにした。これらの治療効果が迷走神経刺激による心筋幹細胞の増殖・分化誘導の促進作用が関与する可能性を示唆した。これらの研究結果から迷走神経刺激による心筋幹細胞の賦活を利用した新規心血管再生治療法は、今後臨床の急性心筋梗塞・慢性心不全治療に新たな治療効果を得られることが期待できると予測する。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that vagal stimulation (VS) prevented the cardiac remodeling and death in post-myocardial infarction rats. However, the precise mechanisms of cardiac protection by VS have not been fully elucidated. To develop a novel cardiovascular regeneration therapy, this study examined that effects of VS on cardiovascular regeneration and cardiac remodeling in acute myocardial infarction (AMI) rats. We investigated that VS promotes cardiovascular regeneration through activation of endogenous cardiac stem cells (CSCs) and prevents cardiac remodeling and dysfunction in AMI rats. The preservation of cardiac function by VS in AMI rats may be mediated partly improve myocardial salvage and reduce myocardial infarct size by cardiovascular regeneration through activation of endogenous CSCs, suggesting that VS approach may be a novel cardiovascular regeneration therapy for post AMI and chronic heart failure patients.

研究分野：医歯薬学

 キーワード：迷走神経刺激 急性心筋梗塞 慢性心不全 心臓リモデリング 心血管新生 心筋幹細胞 増殖・分化
 炎症・アポトシス

1. 研究開始当初の背景

急性冠疾患群の生存率の劇的改善とともに心不全患者は増加傾向にあり、慢性心不全患者の治療はその重要性を増している。特に、重症心不全患者の予後は、内科的薬物療法の進歩、補助循環装置を含めた外科的治療法の発達にもかかわらず不良であり、2年間の生存率は約50%とされている。心臓移植は根治的治療であるが、心不全の患者数の多さや高齢化に伴う患者数の増加を考えると、心臓ドナー数の不足は明白であり、心移植に代わる画期的な新しい治療法の確立は急務である。

近年、再生医療は機能不全に至った臓器に対する新しい根治療法としてあらゆる臓器で研究されている。心臓においても、胚性幹細胞、骨髄間葉系幹細胞・造血幹細胞・骨格筋芽細胞などの組織幹細胞、心臓幹細胞、iPS細胞による再生医療が意欲的に研究されており、一部の組織幹細胞による細胞移植治療では臨床応用も進みつつある。しかしながら、機序に不明な点が多いこと、必ずしも治療効果が一定でないこと、胚性幹細胞に関する倫理面での問題、副作用としての不整脈発生の可能性など解決すべき問題は多い。また、移植細胞の生着率はきわめて低く、大多数の細胞は数時間単位で局所より消失し、十分な量の心筋と血管細胞を再生する方法は確立されていない。最近の自家骨髄間葉系幹細胞の移植治療の臨床治験と自家心臓幹細胞の移植治療の臨床治験の結果も、これらの細胞移植治療の安全性と可能性を示しているが、治療効果が十分ではないことを示唆している。再生医療の最先端治療法として、iPS細胞から得られた心筋細胞シートによる治療も報告されているが、その効果と長期安全性については引き続き慎重に検討すべきである。

近年の研究により、長い間終末分化型の臓器と見られた心臓にごくわずかながら自己増殖能をもった心筋幹/前駆体細胞が存在し、心筋梗塞や心不全の病態において心筋細胞の自己複製を行っていることが確認され、心筋幹/前駆体細胞による再生療法が注目されている。特に、最新の研究により、哺乳類がこれまで考えられていたよりも高い再生

能力を保持していることが示唆された。安全性および倫理的観点からは、再生医療の手段として内在性幹細胞を賦活化して失われた機能を再生させることが理想的である。しかしながら、この内在性心筋幹細胞の絶対数、増殖能力、分化効率は低く、これらの内在性心筋幹細胞をいかに増殖・分化させるかが大きな課題となっている。現在、心筋局所・冠動脈に様々な成長因子を注入する方法や甲状腺ホルモン増加等で内在性心筋幹細胞の増殖能力と分化効率を増加させるが心筋再生能力は依然として低く、心機能改善までの心臓修復には届いていないのが現状である。

一方、これまでの臨床及び基礎研究の結果から、進行する心不全は心臓だけの異常ではなく、循環調節系の異常に伴う迷走神経活動の低下や交感神経活動の亢進が心不全の予後を規定する重要な因子であることが明らかとなっている。研究代表者らの研究グループでは、異常な循環調節系に人工的に介入することで心不全の進行や重症化を阻止する治療方法を開発してきた。これまでに、急性心筋梗塞ラットでの迷走神経刺激による著明な抗不整脈効果や、慢性心不全ラットモデルにおいて迷走神経刺激によって心臓リモデリングの進展が抑制され、治療開始20週後の生存率が50%から86%に劇的に改善することを報告した。最近、研究代表者らは重症心不全ラットにアセチルコリンエステラーゼ阻害薬(ドネベジル)を経口投与して、薬理的に迷走神経刺激状態を作る治療実験を行った。その結果、ドネベジル投与によって心臓リモデリングが抑制され、長期生存率が著明に改善することを報告した。この成績は、同じ重症心不全ラットにおいて現在臨床で標準的薬物療法として用いられている遮断薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬/アンジオテンシンII受容体拮抗薬投与による予後改善効果を著明に上回るものであった。これらの治療効果の機序として、迷走神経刺激による心負荷の軽減以外に、迷走神経刺激による心血管新生作用や抗アポトーシス効果、ギャップ結合のリモデリング抑制作用の関与が推測されているが、詳細は不明である。一方、最近の

研究によって、副交感神経系は、様々な病態において免疫・炎症反応の調節に重要な役割を果たすことや、肝臓・肺・脳神経などではムスカリン受容体を介してPI3K-Akt経路を活性化させ幹/前駆体細胞の増殖に関与していることが報告されている。また、PI3K-Akt経路の活性化が心臓においても心筋幹/前駆体細胞の増殖や分化に重要な役割を果たすことが明らかとなって来ている。

これらの背景から、我々は、迷走神経刺激による心筋梗塞・心不全治療効果にPI3K-Akt経路の活性化による内在性心筋再生が関与しているのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究では、心筋梗塞・心不全の新しい治療法として、自律神経系への介入による生体内在性再生能力の賦活化を利用した心血管再生治療法を確立するために、心筋梗塞・虚血性心疾患病態モデルにおいて、迷走神経刺激による内在性心筋幹/前駆体細胞の増殖・分化誘導に対する影響を中心に、抗炎症・抗アポトーシス効果、心臓リモデリング、長期生存率等におよぼす影響を詳細に検討することによって、迷走神経刺激による心血管再生と治療効果との関係を明確に評価する。最終的には、臨床応用を目指して、大動物の虚血再灌流モデルにおいて最適な迷走神経刺激方法を検討し、他の治療法との組み合わせによる新規心血管再生治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 8週令のオスSDラットを用いた。1.5%ハロセン麻酔下に、ラットの腹部皮下に心電図テレメトリ装置を植え込み、頸部右迷走神経に自作したステンレスワイヤ電極を装着して植込み式遠隔制御刺激装置と接続し、PC制御による迷走神経刺激を可能にした。1週間後麻酔下に、増殖した細胞のBrdUラベル化のために、背中にosmotic minipumpを埋め込んでBrdUを持続投与した(10 μ g/day/g)。その後開胸し、左冠状動脈を結紮して急性心筋梗塞を作成した。迷走神経刺激治療群(VS)と非治療群(SS)に無作為に振り分けて、迷走神経刺激治療を心筋梗塞作成1時間後から4週間行った。迷走神経の電気刺激方法は、PC制御

により1分間に10秒のみの間欠刺激で平均心拍数を10~20%低下させるように設定した(0.1~0.13mA、パルス幅0.2ms、刺激頻度20Hz)。治療を行う4週間の間、連続的に計測した心拍数と不整脈の発生頻度を2群間で比較検討する。また、心筋梗塞作成前、心筋梗塞3日後、心筋梗塞14日後、治療終了後に心エコー検査を行い、心機能を経時的に測定し、2群間で比較検討する。4週間の治療終了後、1.5%ハロセン麻酔下に、心臓カテーテル検査を行い、左心室圧、右房圧、心拍出量を測定する。また、コンダクタンス法による左心室容積計測と左心室圧計測を同時に行い、下大静脈に挿入したバルーンカテによって心臓前負荷を変化させ、左心室エラストランスを評価する。ラットを安楽死させる前に採血し、血中の脳性ナトリウムペプチド(BNP)、カテコラミン等の神経液性因子の分析を行う。安楽死後に心臓を摘出し、心臓重量を測定する。以上の結果から迷走神経刺激による心臓リモデリング・心機能に及ぼす効果を評価する。また、日常計測した心拍数と心電図の分析より不整脈の発生頻度も評価した。

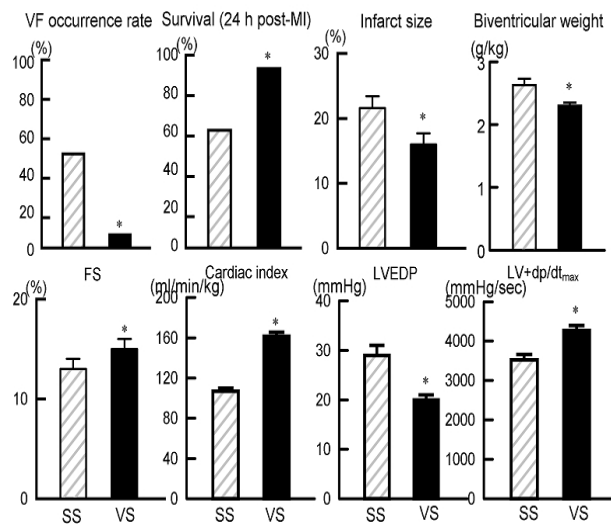
(2) マッソン・トリクローム染色により心筋梗塞巣の大きさを評価し、定量的に心筋繊維化評価を行う。一部のラットでは、経時的な心筋変化を評価するために、迷走神経刺激治療群と非治療群で、8時間・3日・4週間に、ラットの心臓を直接固定して、心筋幹/前駆体細胞の増殖、心筋細胞や血管構成細胞への分化誘導を評価する。免疫組織化学的方法により、心筋幹/前駆体細胞表面抗原(c-kit)、心筋・血管細胞の初期転写因子、心筋および血管特異的蛋白を染色し、BrdU-bandingされた細胞およびKi67陽性細胞を同定する。さらに、RT-PCRで心筋内の心血管初期転写因子のmRNAのレベルを検討する。また、PI3K活性、Aktやリン酸化Aktの測定により、迷走神経刺激によるPI3K-Akt経路の活性化について検討する。

一方、心筋組織内のTNF- α 、IL-6、MIPの測定結果から心筋局所の炎症反応を評価し、p53、Caspase-3及びTUNEL法の定性定量結果より心筋のアポトーシスを評価する。

そして、*in vitro*の研究では、成熟ラット心臓から細胞表面抗原 c-kit 陽性細胞(CSCs)を抽出・培養する。迷走神経終末から放出されるアセチルコリン (ACh) が心筋幹細胞の増殖・分化に及ぼす影響を明らかにするために、培養液に ACh を加え、その影響を検討する。また、回収した培養液の TNF- α 、IL-6 や MIP の測定結果から ACh 刺激による抗炎症作用を評価する。

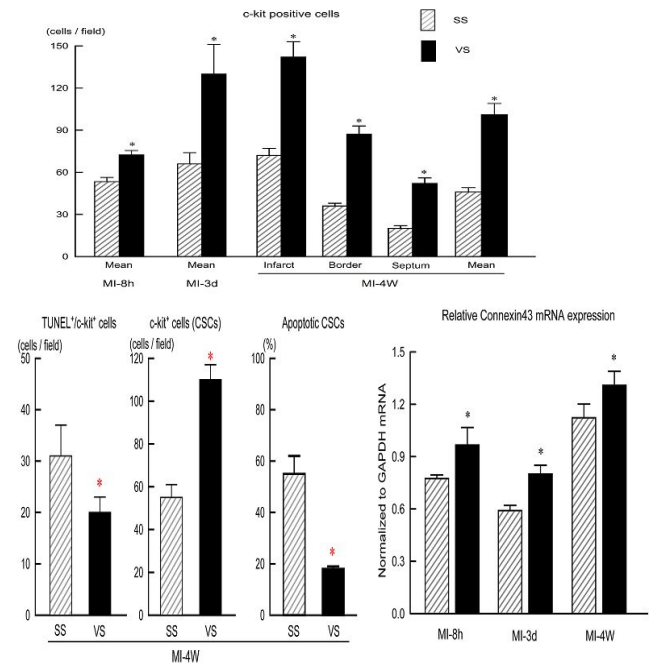
4. 研究成果

(1)心筋梗塞後早期から開始した迷走神経刺激の慢性電気刺激は 24 時間以内の心筋梗塞ラットの致死性不整脈の発生頻度を抑制し、心筋梗塞ラットの 24 時間以内の死亡率を有意に低下させた。これらの心保護作用で 4 週間後、心筋梗塞面積・心臓リモデリング・心機能の各指標は VS 群で有意に改善することが明らかになった(下図)。また、VS 群では SS 群に比べて、心不全の重症度を反映する血中ノルエピネフリンと BNP も有意に低くさせた。また心筋組織内の MIP-2 を有意に低下することから、迷走神経刺激による抗炎症作用も示した。



(2)迷走神経刺激は心臓内の血管新生を促進し、心筋の繊維化を有意に抑制した。さらに、迷走神経刺激による内因性心筋幹/前駆細胞 (c-kit+) の増加が示され、また c-kit+の細胞のアポト-シスを有意に抑制し、時間とともに、Connexin 43 の mRNA の発現を有意に増加した(下図)。以上の結果から、心筋梗塞後迷走神経刺激による治療効果

に、迷走神経刺激による内因性心血管再生が関与する可能性が示唆された。今後、心筋幹/前駆細胞の培養細胞実験によって、迷走神経刺激による心血管再生の機序をより詳細に明らかにし、迷走神経刺激による心血管再生療法の基盤を確立する予定である。



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 8 件)

1. Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, Sugimachi M. Adding the acetylcholinesterase inhibitor, donepezil, to losartan treatment markedly improves long-term survival in rats with chronic heart failure. 査読有 Eur J Heart Fail. 2014 Oct;16(10):1056-65.
2. Kawada T, Li M, Zheng C, Shimizu S, Uemura K, Turner MJ, Yamamoto H, Sugimachi M. Chronic vagal nerve stimulation improves baroreflex neural arc function in heart failure rats. 査読有 J Appl Physiol. 2014 May;116(10):1308-14.
3. Uemura K, Inagaki M, Zheng C, Li M, Kawada T, Sugimachi M. A novel technique to predict pulmonary capillary wedge pressure utilizing central venous pressure and tissue Doppler tricuspid/mitral annular velocities. 査読有 Heart Vessels. 2015 Jul;30(4):516-26.

4. Kawada T, Li M, Sata Y, Zheng C, Turner MJ, Shimizu S, Sugimachi M. Calibration of baroreflex equilibrium diagram based on exogenous pressor agents in chronic heart failure rats. 査読有 Clin Med Insights Cardiol. 2015 Feb 3;9 (Suppl 1):1-9.
 5. Li M, Inagaki M, Zheng C, Kawada T, Uemura K, Sugimachi M. Early and Chronic Vagal Stimulation Markedly Suppresses Arrhythmic Death and Prevents Cardiac Remodeling in Rats after Acute Myocardial Infarction. 査読有 Transactions of Japanese Society for Medical and Biological Engineering. 2014; 52: O-82-83.
 6. Kawada T, Li M, Zheng C, Sugimachi M. Acute Effects of Vagotomy on baroreflex Equilibrium Diagram in Rats with Chronic Heart Failure. 査読有 Clin Med Insights Cardiol. 2016 Aug 28;10:139-47.
 7. Kawada T, Akiyama T, Li M, Zheng C, Turner MJ, Shirai M, Sugimachi M. Acute arterial baroreflex-mediated changes in plasma catecholamine concentrations in a chronic rat model of myocardial infarction. 査読有 Physiol Rep. 2016 Aug;4(15): pii: e12880,1-14.
 8. Uemura K, Inagaki M, Zheng C, Kawada T, Li M, Fukumitsu M, Sugimachi M. Acute ivabradine treatment reduces heart rate without increasing atrial fibrillation inducibility irrespective of underlying vagal activity in dogs. 査読有 Heart Vessels. 2017 Apr;32(4):484-494.
- (学会発表) (計 17 件)
1. Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, Sugimachi M. Peripheral $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptors Contribute to Cardio-Protective Effects of Central Donepezil Infusion in Chronic Heart Failure Rats. Circulation. 2014; 130: October (AHA 2014).
 2. Li M, Zheng C, Sugimachi M. Novel Therapeutic Approach in Heart Failure: Pharmacological Parasympathetic Activation. BIT's 7th Annual International Congress of Cardiology. 2015.12.招待講演
 3. Zheng C, Li M, Sugimachi M. Augmented Thirst as a Clue for Fluid Management in Chronic Heart Failure. BIT's 7th Annual International Congress of Cardiology. 2015.12.招待講演
 4. Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, Shishido T, Sugimachi M. Central Donepezil Infusion Prevents Progression of Cardiac Remodeling and Dysfunction in Chronic Heart Failure Rats with Extensive Myocardial Infarction. Eur Heart J. 2015; 36:P5453 August (ESC 2015).
 5. Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, T Shishido, Sugimachi M. Contribution of Central Donepezil to Prevention of Cardiac Dysfunction and Improvement of Long-term Survival in Chronic Heart Failure Rats after Myocardial Infarction. Eur Heart J. 2016; 37:P3118 August (ESC 2016).
 6. Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, T Shishido, Sugimachi M. Early Donepezil Administration as a Novel Therapy for Improved Myocardial Salvage after Reperfused Myocardial Infarction. Eur Heart J. 2016; 37:P5617 August (ESC 2016).
 7. Li M, Inagaki M, Zheng C, Kawada T, Uemura K, T Shishido, Sugimachi M. Vagal Stimulation Promotes Cardiovascular Regeneration by Activation of Endogenous Cardiac Stem Cells in Acute Myocardial Infarction Rats. Eur Heart J. 2016; 37:P5248 August (ESC2016).
 8. Zheng C, Li M, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, Sugimachi M. Prognostic significance of thirst augmentation in chronic heart failure rats. Eur Heart J. 2016; 37:P4582 August (ESC 2016).
 9. Zheng C, Li M, Kawada T, Sugimachi M. Drinking behavioral and hemodynamics responses to daily fluid restriction in chronic heart failure rats. Eur Heart J. 2016; 37:P5432 August (ESC 2016).
 10. Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, Shishido T, Sugimachi M. Early Donepezil Treatment is Superior to Metoprolol for Preventing Cardiac Remodeling in Reperfused Myocardial Infarction Rats. The 79th Annual Scientific Meeting of the

- Japanese Circulation Society. 24-26 April 2015. Osaka, Japan.
11. Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, Shishido T, Sugimachi M. Central Donepezil Infusion Prevents Progression of Cardiac Remodeling and Improves Long-term Survival in Chronic Heart Failure Rats with Myocardial Infarction. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 18-20 March 2016. Sendai, Japan.
 12. Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, Shishido T, Sugimachi M. Donepezil but not Metoprolol Improves Myocardial Salvage and Prevents Cardiac Remodeling after Reperfused Myocardial Infarction in Rats. The 81th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 27-29 March 2017. Ishikawa, Japan.
 13. Li M, Zheng C, Kawada T, Inagaki M, Uemura K, Shishido T, Sugimachi M. Donepezil Markedly Prevents the Progression of Cardiac Remodeling and Improves Survival in Spontaneously Hypertensive Rats with Myocardial Infarction. The 81th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 27-29 March 2017. Ishikawa, Japan.
 14. 李 梅花、鄭 燦、川田 徹、稲垣正司、上村 和紀、杉町 勝. ドネベジル中枢投与の心保護における末梢性 7-ニコチン性アセチルコリン受容体の影響. 第 35 回日本循環制御医学会総会. 2014. 7. 5-6. 福岡、日本
 15. 李 梅花、鄭 燦、川田 徹、稲垣 正司、上村 和紀、穴戸 稔聡、杉町 勝. ドネベジルの早期投与による再灌流心筋梗塞ラットにおける心臓リモデリングの抑制作用. 第 36 日本循環制御医学会総会. 2015. 6. 5-6. 福岡、日本
 16. 李 梅花、鄭 燦、川田 徹、稲垣 正司、上村 和紀、穴戸 稔聡、杉町 勝. ドネベジル、メプロロールの早期投与が再灌流心筋梗塞ラットに及ぼす影響. 第 37 日本循環制御医学会総会. 2016. 7.8-9. 東京、日本
 17. 李 梅花、鄭 燦、川田 徹、稲垣 正司、上村 和紀、杉町 勝. ドネベジル中枢投与の心保護作用に

おける末梢性 7-ニコチン性アセチルコリン受容体の役割. 日本薬学会第 135 年会 25-28 March 2015. Kobe, Japan.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 特許出願「心筋梗塞縮小薬」

発明者: 杉町 勝、稲垣 正司、李 梅花、鄭 燦

権利者: 国立研究開発法人国立循環器病研究センター

種類: A61K 31/445

番号: 特願 2015-021526 (P2015-021526)

出願年月日: 2015.2.5

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 梅花 (LI MEIHUA)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター

循環動態制御部・特任研究員

研究者番号: 60443496

(2) 研究分担者

稲垣 正司 (INAGAKI MASASHI)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター

循環動態制御部・室長

研究者番号: 80359273

鄭 燦 (ZHENG CAN)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター

循環動態制御部・特任研究員

研究者番号: 50443495

(3) 連携研究者

川田 徹 (KAWADA TORU)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター

循環動態制御部・室長

研究者番号: 30243752

上村和紀 (UEMURA KAZUNORI)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター

循環動態制御部・室長

研究者番号: 10344350