

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670112

研究課題名(和文)骨格筋分子基盤への介入による心不全の交感神経活性化の制御

研究課題名(英文) Can skeletal muscle be a therapeutic target for treatment of autonomic dysfunction in heart failure?

研究代表者

木場 智史 (Koba, Satoshi)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：40565743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、「心不全における交感神経活性化に対して骨格筋が医療標的となり得る」の仮説の検証であった。まず、ラット覚醒下において筋放電と交感神経活動を同時に記録する実験系の構築に取り組んだ。ケーブルが接触しあうことによってノイズが発生する問題を解決できず、同時記録系を断念した。ラットすくみ行動時の交感神経活性は心不全で過剰であることを示唆するデータを得た。この過剰な交感神経活性は、抗酸化化合物であるテンプルを静脈内投与しても変化しなかった。末梢よりも中枢が、心不全ラットのすくみ行動時における過剰な交感神経活性の要因であることを示唆する。本研究結果は上記仮説を支持するものではなかった。

研究成果の概要(英文)：We attempted to quantitatively examine the relationship between activation of skeletal muscle and sympathetic nerves under the conscious state. We only succeeded in measuring either sympathetic nerve activity or electromyogram in conscious rats because of noise artifacts inevitable when simultaneously measured. In the experiment with measurements of rat arterial pressure and heart rate, intravenous infusion of Tempol, an antioxidant chemical, did not have effects to modulate cardiovascular responses in association with freezing behavior in rats. This observation suggested that central, rather than peripheral, factors played a dominant role in producing excessive sympathoexcitation seen in association with freezing behavior in conscious rats with heart failure. The data did not support the hypothesis that skeletal muscle can be a therapeutic target for treatment of autonomic dysfunction in heart failure.

研究分野：自律神経生理学

キーワード：心不全 自律神経 骨格筋 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

世界規模で心疾患患者が増え続けており、医療に対する経済的負担も増し続けている。心不全の予後は悪く、現存の医療で対処できない症状も多い。新しい医療の創出は急務である。心不全の慢性的交感神経活性化は予後の増悪因子であり、医療標的である。交感神経活性化に対する新規心疾患医療の創出が必要である。

骨格筋は運動などの行動時の交感神経調節に役割を果たす。骨格筋が収縮すると、その機械的な刺激と代謝産物による化学的な刺激とによって筋感覚神経が発火して脊髄上位の循環中枢が刺激され、反射的に交感神経活動(SNA)が増加する(活動筋反射)。心不全では活動筋反射機能が異常である。申請者は、除脳ラットの骨格筋を収縮させた際の反射性 SNA 応答が、心不全で過剰になることを発見していた(PMID 17965282)。そしてこの応答を過剰にする要因は骨格筋中の酸化ストレスが筋収縮に対する筋感覚神経の感受性を亢進させることであり(PMID 19723775)、その酸化ストレスの要因は骨格筋細胞中の活性酸素産生に関連する分子基盤の変化である(PMID 23086992)ことを明らかにしていた。これらの研究成果から、「心不全骨格筋中の酸化ストレスの要因である分子基盤に介入することで、活動筋反射機能が改変されて、交感神経活性化が抑制される。」という医療方策が可能であると考えられた。

ただしこの方策は、「除脳」下という限定的な生体条件で得られた実験結果を根拠にしている。「除脳」下と異なって全ての神経回路が保たれた「覚醒」下で、この方策が心不全個体の交感神経活性化を抑制できるかは不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は「心不全における交感神経活性化に対して骨格筋が医療標的となり得る」との仮説を、ラットを用いた基礎生理実験から検証することであった。そのためには、ラット覚醒下において骨格筋が活動している際の筋放電と交感神経活動とを同時に記録する実験系が必要であった。そして、行動時に様々な神経入力を受けて決定される交感神経活動値から収縮骨格筋による要素を抽出して記述する数理解析が必要であった。本研究ではまず、筋放電と交感神経活動の電気信号を有線で記録する実験系の構築に取り組んだ。

3. 研究の方法

オス Sprague-Dawley ラット(8-10 週齢)を実験に用いた。ラットを気化麻酔(イソフラレン)し、動脈圧、心電図、筋電図、腎(あるいは腰部)交感神経活動を覚醒下で記録するためのカテーテル・電極を体内に留置した。動脈圧測定のために、7 cm のポリエチレンチューブ(PE10)を 70 cm のポリビニールチュー

ブ(PV32)を結合させて作成したカテーテルを、尾動脈内に留置した。カテーテル内にはヘパリン含有生理食塩水を充填した。内頸静脈内に薬物の静脈注入のためのカテーテルを留置した。心電図測定のために、2 芯シールドケーブルの陽極を剣状突起に、陰極を胸骨柄に固定した。筋電図測定のために、2 芯シールドケーブルの電極を僧帽筋あるいは腓腹筋内に固定した。これらのカテーテル・ケーブルは、皮下を経由した後に頭頂部から外に出された。ラットから記録される生体信号は、トランスデューサやアンプを介してアナログ信号化・増幅された後、AD コンバータを介してパソコンハードディスク内に収集された。術後 3 日以上回復期間を置いてから、生体信号収集実験を行った。骨格筋収縮を伴うすくみ行動は体動が少ないことから、安定した生体信号記録が可能であると見込み、最初に、健常ラットにおけるすくみ行動時の生体信号を記録する実験を行った。ラットのすくみ行動を、90 dB のホワイトノイズ音を 5 分間曝露することによって誘発した。

先行研究(PMID 19723775)に倣い、ラット左冠動脈を結紮することで心筋梗塞を誘発した。心筋梗塞後 6 週以上経ってから、心エコーを行い、左心径短縮率が 30%以下の個体を心不全ラットとして実験に用いた。

4. 研究成果

覚醒・健常ラットにおける筋電図・交感神経活動の同時記録系の構築に取り組んだ。残念ながら、筋電図・交感神経活動を同時に記録できなかった。その理由は、覚醒ラットが動くとそのそれぞれの電気信号を伝えるケーブルが物理的に触れ合うことにより、ノイズが頻繁に生じたからであった。そこで筋電図記録のケーブルを交感神経活動記録のケーブルと接触しない位置(頭頂より尾側に約 2 cm の位置でケーブルを皮膚下から露出)でラットに固定したところ、ラットがそのケーブルを損傷した。これらの結果を受けて筋電図と交感神経活動の同時記録を断念し、それぞれを別々に記録することとした。

健常ラットにおけるすくみ運動時の腎交感神経活動(RSNA)および僧帽筋(EMGt)・腓腹筋(EMGg)からの筋放電を、それぞれ別々に、記録した。すくみ行動中には持続した RSNA の増加が観察された。また、筋放電、特に EMGg の増加も確認された。しかし RSNA 増加と異なり、EMGg の増加は一過性のものであり、すくみ運動開始時のみに検出された。以上の結果から、すくみ行動中の筋電反応と交感神経反応との間には有意な相関性が推定されず、現時点では覚醒下における筋感覚神経による交感神経調節能を定量的に評価する段階まで実験を進めることをできなかった。代替的に以下に示す実験を遂行した。

次に、健常ラット(N=12)と心不全ラット(N=21)のすくみ行動時の血圧、心拍数、および RSNA の応答を比較した。RSNA の記録は N

数が十分でなく(健常 N=3, 心不全 N=3), また記録できた RSNA 応答も個体差が大きかったため, 血圧および心拍数の結果のみを記述する. すくみ行動時の血圧変化には群間には差がなかった一方で, 徐脈応答は健常ラットよりも心不全ラットで有意に大きかった. この結果から, すくみ行動時の交感神経賦活は心不全で過剰になることが示唆された.

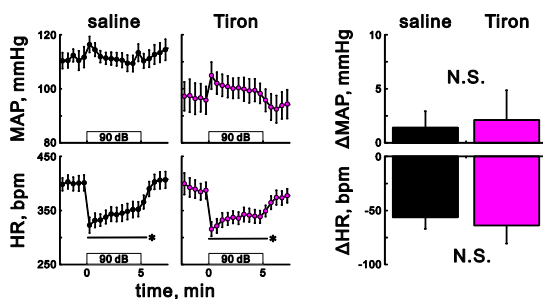
さらに, 心不全ラットにおけるすくみ行動時の交感神経賦活は骨格筋に抗酸化処置を行うことで抑制されるかについて検討した. そのパイロット実験として, 全身性に抗酸化化合物であるテンポールを静脈内投与したところ(N=4), 心不全ラットのすくみ行動時の血圧変化および徐脈応答にテンポール投与の影響は見られなかった. この結果から, たとえ抗酸化処置を骨格筋循環のみに行っても, すくみ行動時の血圧応答は影響されないものと考えられた.

以上の結果から, 「心不全における交感神経活性化に対して骨格筋が医療標的となり得る」との仮説は支持されなかった. しかし, 当初の研究計画にあった「覚醒ラットの生体信号の記録系」が本研究の遂行に十分であるクオリティで構築されたならば, この仮説を再検証する余地は十分に残されていると考えられる. 記録系の構築が不首尾に終わった理由はノイズの発生にあり, ノイズ発生の理由は生体信号記録ケーブル同士が物理的に接触することにある. テレメトリを用いた無線での生体記録が, この問題を解決するキーとなるかもしれない.

テレメトリを用いた無線での生体信号記録は, その系の高価さのため, 本科研費の予算では行えるものではなかった. そこで研究代表者は心不全ラットのすくみ行動時における過剰な徐脈反応の生成メカニズムに興味を持った. 上記の実験結果から, 心不全のストレス性自律生理反応の異常は, 末梢(骨格筋)よりも中枢に要因があると考え, その中枢メカニズムを調査した. まず, すくみ行動時の徐脈反応は交感神経性か副交感神経性かを明らかにした. 覚醒・健常ラットのすくみ行動時の徐脈反応は, メトロプロロールを事前に静脈内投与しても影響されないが, アトロピンを事前に静脈内投与することで消滅した(N=7). この結果から, すくみ行動時の徐脈反応は副交感神経性であることが示唆された. 次にすくみ行動時の徐脈反応を生成する中枢部位を探索した. 覚醒・健常ラットのすくみ行動時の徐脈反応は, 中脳中心灰白質(PAG)の背側野にムシモール(GABA-A受容体のアゴニスト)を局所注入しても影響されない(N=7)が, PAGの腹外側野・外側野に注入すると抑制された(N=8). この結果から, すくみ行動時の徐脈反応はPAGの腹外側野の活性化がすくみ行動時の徐脈反応の要因であることが示唆された. さらに, すくみ行動時の徐脈反応を生成する中枢経路を探索した. 心臓副交感神経の発射部位である延髄疑

核に逆行性神経トレーサであるコレラ毒素サブユニットbを局所注入した後, すくみ行動を誘発した. 神経活性のマーカである Fos タンパクとCTbとの共陽性細胞は, PAG 腹外側野・外側野で多く見られた. この結果から, PAG 腹外側野・外側野から延髄疑核への直接投射がすくみ行動時に活性化することが示唆された. これらの結果をまとめると, すくみ行動時にはPAG 腹外側野・外側野から延髄疑核への直接投射が活性化することで心臓副交感神経が刺激され, 結果として徐脈反応が起こると推察された.

心不全では骨格筋だけでなく脳内でも酸化ストレスが亢進する. 心不全PAGの酸化ストレス亢進が過剰な徐脈反応生成の要因かもしれない. そこで, 心不全ラットのすくみ行動時の徐脈反応に対するタイロン(テンポールと同様に抗酸化化合物)のPAG 腹外側野・外側野への局所注入の影響を検討した(N=8). タイロンの事前注入は, 徐脈反応に影響しなかった(図). この結果から, 心不全PAGの酸化ストレス亢進が過剰な徐脈反応の要因ではないことが示唆された.



図

本研究開始当初の研究計画に対する結果をまとめると以下である.

- (1) 当初計画した実験系の構築が困難であったことから, 様々な神経入力を受けて決定される交感神経活動値から収縮骨格筋による要素を抽出して記述する数理解析を行うまでに至らなかった.
- (2) 実験系を計画通りに構築できなかった理由は, 有線での生体電気信号がノイズを発生させる要因であり, 安定した神経活動・筋放電の同時記録ができなかったことにあった(どちらか単独ならば可能であった). 無線での記録系が, 覚醒ラットでの生体信号収集に必要と考えられた.
- (3) 血圧・心拍数のみで交感神経活性の評価を行ったところ, 心不全ラットのすくみ行動時の過剰な交感神経活性は, 骨格筋を含む末梢側の要因よりも中枢側の要因が大きいことが示された.
- (4) 心不全ラットの中脳中心灰白質の酸化ストレスは, すくみ行動時の過剰な交感神経活性の要因ではないことが示された.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Koba S., Inoue R, Watanabe T. Role played by periaqueductal gray neurons in parasympathetically mediated fear bradycardia in conscious rats. *Physiol Rep*, in press. 査読有
2. Koba S. Central command: brain control of the circulation during exercise. *自律神経学会雑誌* 54(2), 印刷中. 査読有
3. 井上峻, 木場智史, 渡邊達生. ホワイトノイズ音曝露によって発現上昇するラット脳内 Fos タンパク質の観察. *米子医誌 J Yonago Med Ass* 66, 47-51, 2015. 査読有
4. Koba S. Exercise pressor reflex in health and diseases: Animal studies. *J Phys Fit Sport Med* 4(2): 151-160, 2015. 査読有
5. Koba S., Hisatome I, Watanabe T. Central command dysfunction in rats with heart failure is mediated by brain oxidative stress and normalized by exercise training. *J Physiol* 592(17): 3917-31, 2014. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 木場智史. 心不全における運動時交感神経調節の異常と酸化ストレス. 第 93 回日本生理学会大会. 札幌コンベンションセンター(札幌市). 2016 年 3 月 22-24 日.
2. 加藤百音, 木場智史, 井上峻, 渡邊達生. ラット中脳中心灰白質から延髄吻側腹外側野への遠心性投射の構造解析. 第 93 回日本生理学会大会. 札幌コンベンションセンター(札幌市). 2016 年 3 月 22-24 日.
3. 花井映里, 木場智史, 渡邊達生. ラット視床下部室傍核内において運動により活性化する細胞群に地域差は生じるか. 第 93 回日本生理学会大会. 札幌コンベンションセンター(札幌市). 2016 年 3 月 22-24 日.
4. 木場智史. セントラルコマンド: 運動時の循環系の中枢制御. 第 68 回日本自律神経学会総会. ウィンク愛知(名古屋市). 2015 年 10 月 29-30 日.
5. Koba S. Central command regulation of sympathetic nerve activity in health and heart failure. The 11th WORLD CONGRESS of the International Society for ADAPTIVE MEDICINE (ISAM 2015). 米子コンベンションセンター(米子市). 2015 年 5 月 27-30 日.
6. Koba S., Inoue R, Watanabe T. c-Fos expression in rat periaqueductal gray

induced by white noise sound exposure. *Experimental Biology* 2015. 米国ボストン. 2015 年 3 月 28 日-4 月 1 日.

7. Koba S., Hisatome I, Watanabe T. Oxidative stress in the lateral/ventrolateral periaqueductal gray does not play a role in evoking abnormal fear bradycardia in rats with heart failure. 第 92 回日本生理学会大会. 神戸国際会議場(神戸市). 2015 年 3 月 21-23 日.
8. 木場智史, 井上峻, 渡邊達生. ホワイトノイズ音曝露時のラット心拍数調節における中脳中心灰白質の役割. 第 66 回日本生理学会中国四国地方会. 情報通信交流館 e-トピア・かがわ(高松市). 2014 年 11 月 1-2 日.

〔その他〕

ホームページ等

http://researchmap.jp/satoshi_koba/?lang=japanese

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木場 智史 (KOBA SATOSHI)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号: 40565743