慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ストレスに起因する脳心連関の分子機構の解明
Sub Title	Elucidation of molecular mechanism of stress-induced cardiomyopathy through brain-heart interaction.
Author	福田, 恵一(Fukuda, Keiichi) 荒井, 隆秀(Arai, Takahide) 金澤, 英明(Kanazawa, Hideaki) 助川, 博章(Sukegawa, Hiroaki) 田部井, 亮太(Tabei, Ryota) 宗形, 昌儒(Munakata, Masahito)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	精神的ストレスが原因となるたこつぼ心筋症の発症メカニズムは不明とされている。我々はモデル動物を用いて心尖部を支配する心臓交感神経中枢の同定を行い, その領域でアストロサイトによって活性化されるCcl2の発現上昇を確認した。また, Ccl2は交感神経中枢を活性化し, さらに星状神経節と心臓交感神経におけるNPYの発現を上昇させていた。一方でNPYはβ受容体刺激をブロックする陰性変力作用を有しており, Ccl2を脳内に投与することで心機能障害を引き起こすこと, さらにはNPYの発現を阻害することで心機能障害を回避できることを見出した。これらの知見より, たこつぼ心筋症の分子生物学的な発症メカニズムを解明した。 Major emotional stress may induce stress cardiomyopathy (SC), although the precise molecular mechanisms remain unclear. Using an animal model of SC, we first located the central cardiac sympathetic nerves (CSNs) in the hypothalamus innervating the left ventricular (LV) apex, and then investigated the gene expression changes in these regions. We found that chemokine ligand 2 (Ccl2), produced by activated astrocytes, strongly stimulated the central CSNs. The subsequent sympathetic activation upregulated neuropeptide Y (NPY) expression in both the stellate ganglion (SG) and CSNs. NPY in turn had a negative inotropic effect and strongly blocked □-adrenergic stimulation. Thus, administration of Ccl2 into the central neurons evoked SC and increased NPY at the SG. Moreover, siRNA downregulation of NPY in the SG completely abrogated the induced SC. Overall, our results provide to explain how emotional stress affects molecular signals in the brain, leading to LV apical ballooning.
Notes	研究種目 : 挑戦的萌芽研究 研究期間 : 2013 ~ 2014 課題番号 : 25670395 研究分野 : 医歯薬学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25670395seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２７　年　　５　月　２８　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　挑戦的萌芽研究
研究期間：　2013～2014
課題番号：　２５６７０３９５

研究課題名（和文）ストレスに起因する脳心連関の分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism of stress-induced cardiomyopathy through brain-heart interaction.

研究代表者

福田　恵一（Fukuda, Keiichi）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：２０１９９２２７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：精神的ストレスが原因となるたこつぼ心筋症の発症メカニズムは不明とされている。我々はモデル動物を用いて心尖部を支配する心臓交感神経中枢の同定を行い、その領域でアストロサイトによって活性化されるCcl2の発現上昇を確認した。また、Ccl2は交感神経中枢を活性化し、さらに星状神経節と心臓交感神経におけるNPYの発現を上昇させていた。一方でNPYはβ受容体刺激をブロックする陰性変力作用を有しており、Ccl2を脳内に投与することで心機能障害を引き起こすこと、さらにはNPYの発現を阻害することで心機能障害を回避できることを見出した。これらの知見より、たこつぼ心筋症の分子生物学的な発症メカニズムを解明した。

研究成果の概要（英文）：Major emotional stress may induce stress cardiomyopathy (SC), although the precise molecular mechanisms remain unclear. Using an animal model of SC, we first located the central cardiac sympathetic nerves (CSNs) in the hypothalamus innervating the left ventricular (LV) apex, and then investigated the gene expression changes in these regions. We found that chemokine ligand 2 (Ccl2), produced by activated astrocytes, strongly stimulated the central CSNs. The subsequent sympathetic activation upregulated neuropeptide Y (NPY) expression in both the stellate ganglion (SG) and CSNs. NPY in turn had a negative inotropic effect and strongly blocked -adrenergic stimulation. Thus, administration of Ccl2 into the central neurons evoked SC and increased NPY at the SG. Moreover, siRNA downregulation of NPY in the SG completely abrogated the induced SC. Overall, our results provide to explain how emotional stress affects molecular signals in the brain, leading to LV apical ballooning.

研究分野：　医歯薬学

キーワード：　ストレス　脳　サイトカイン　脳心連関　炎症　臓器連関

１．研究開始当初の背景

たこつぼ型心筋症は 1990 年に広島市民病院の佐藤らにより最初に報告された疾患である。多くは精神的ストレスを契機に起こる疾患で，閉経後の中年女性に多く発症する。胸痛を主症状とし心筋梗塞と類似した心電図変化を呈するが冠動脈造影検査では冠動脈に狭窄は無く，左室造影検査にて心尖部が無収縮，逆に心基部が過収縮となっており，あたかも「たこつぼ」様の特徴的な造影所見を認める疾患である。

最初の症例報告から四半世紀が経過しているにも関らず，その発症メカニズムに関して未だ実証されたものはない。本症では急性期に心尖部で MIBG（ノルエピネフリンのアナログ）の取り込みが低下するという特徴的な検査所見が知られており，発症には心臓交感神経が病態に深く関与しているとされる。しかし、その交感神経がどう作用しているのか、なぜ心尖部の心筋だけが障害され、心基部の心筋の過収縮が発症するのか等の問題は解決されておらず、原因不明のままである。このため、特異的な治療法、予防法がなく、大きな問題となっている。

また、ストレスを契機に発症するという特徴を有していることを合わせて考えると，脳心連関といった多臓器を包括した病態解明が必要と考えられ、斬新な発想による研究が望まれていた。

２．研究の目的

我々は本症の分子機序を解明するため、本症の独自の動物モデルを作出し、これを用いて交感神経中枢で起きている現象、交感神経節後線維で起きている現象、心臓で起きている現象のすべてを解明し、本症の病態解明、治療法の標的を発見することを目的とした。

３．研究の方法

（１）モデル動物の作成

吸入麻酔下のラット／マウスにピロカルピン（副交感神経刺激薬）を投与することで痙攣を起こし、たこつぼ心筋症モデルを確立する。また、マウス・ラット専用の心エコー（Vevo）の多心拍重ね合わせの slow motion 画像モデルを用いることにより、非侵襲的に上質の心エコーの動画画像を利用し、たこつぼ心筋症の客観性の高い評価法を確立する。

（２）左室心尖部を支配する交感神経中枢の同定

偽狂犬病ウイルスは狂犬病ウイルス類似の性質を有し、隣接する神経から神経にシナプスを越えて感染が伝搬する性質を有し、神経経路の解析に使用される。本研究ではこのウイルスを利用し、左室心尖部を支配する交感神経の中枢経路を解析する。

（３）交感神経中枢部のトランスクリプトーム解析

交感神経の中枢である視床下部傍室核、背内側核（PVN：paraventricular nucleus）の部分の微小サンプリングを行い、DNA マイクロアレイを用いて、同部位での遺伝子発現変化を網羅的に解析した。たこつぼ型心筋症モデル動物の PVN において免疫細胞がどのような動態を示すかを免疫組織染色およびフローサイトメトリーを用いて詳細に解析した。

（４）定位脳手術による液性因子注入によるたこつぼ心筋症の誘導、および受容体阻害薬によるたこつぼ心筋症発症頻度の検討

gain-of-function の実験としてこれらの細胞および液性因子を脳定位手術にて投与し、たこつぼ型心筋症が再現できるか否かを検討した。さらに、loss-of-function の実験としてその免疫細胞の拮抗薬もしくは液性因子の阻害薬を前投与した上で、脳定位投与すると、たこつぼ型心筋症が予防できるか否かに関しても検討をした

（５）たこつぼ心筋症モデルにおける星状神経節の観察

末梢の星状神経節においてどのような変

化が生じているかについて、たこつぼ心筋症モデルラットと対照ラットの左星状神経節を採取し、DNA マイクロアレイを用いて、同部位での遺伝子発現変化を網羅的に解析した。さらに、本検討で発現上昇が観察された物質の関与を、動物モデルへの投与、および受容体拮抗薬の投与による心機能解析を行った。

４．研究成果

（１）モデル動物の確立

ラットにピロカルピン（副交感神経刺激薬）を投与することで痙攣を起こし、2 時間後に心電図および超音波にて心臓を観察した。痙攣後の心電図では著名な ST 上昇が認められた。超音波では左室心尖部が無収縮となっており、たこつぼ様の壁運動を呈していることが明らかになった。痙攣は 2 時間後にジアゼパム（抗痙攣薬）により停止させ、12 時間後に再度心電図と超音波で観察した。すると心電図では ST が基線に戻り、超音波で観察すると心尖部の壁運動が完全に回復していた。これらの結果より、痙攣モデルはたこつぼ型心筋症の臨床像を非常によく模倣しているといえる。

（２）左室心尖部を支配する交感神経中枢の同定

偽狂犬病ウイルス（緑色で染色）は左室心尖部、交感神経節後神経、左側の星状神経節を介し、延髄、扁桃体、視床下部へと伝播していた。これより左室心尖部を支配する交感神経中枢が同定可能となった。

（３）たこつぼ型心筋症モデル動物の中枢における変化

炎症に関与する遺伝子群がたこつぼ型心筋症モデルにおいて軒並み上昇変化していることを突き止めた。さらに免疫細胞に関しては、古典的な T 細胞や B 細胞はそれほど増加していないものの、マクロファージや NK/NKT 細胞が中枢で増加していることが明らかとなった。特にマクロファージが分泌する MCP-1（CCL2）といった液性因子が非常に増加していることが明らかとなった。

（４）gain-of-function および loss-of-function

マクロファージが分泌する MCP-1（CCL2）を PVN に投与した後、エコーで左室壁運動を観察すると、左室心尖部の壁運動が低下しており、あたかも、たこつぼ様壁運動を呈することを確認した。

また、免疫細胞の拮抗薬もしくは液性因子の阻害薬を前投与した群ではたこつぼ型心筋症の発症が起こらないことを確認した。さらに我々の開発したたこつぼ型心筋症モデルはマウスにおいても再現できることより、MCP-1 受容体のノックアウトマウスを用いて解析を行った。その結果ノックアウトマウスにおいてはたこつぼ型心筋症が起こらないことも確認した。

（５）NPY の発現がたこつぼ型心筋症モデルの星状神経節において増加していることを、PCR 法および免疫染色法により確認した。続いて、gain-of-function の実験として NPY を星状神経節に microinjection した後、心エコーにて観察したところ、左室はたこつぼ様壁運動を呈していることを確認した。さらに loss-of-function の実験として NPY 受容体の阻害薬を前投与するとたこつぼ型心筋症の発症が抑制されることも確認した。

（６）今後の展望

心臓支配自律神経に対する研究は、これまで生理機能的な研究が先行しており、分子生物学的な研究は世界的に見てもほとんど行われていない。本研究で我々は画期的な手法を用いて、たこつぼ型心筋症の発症メカニズムを解明しつつある。今後、新たな診断法の開発とともに、特異的な治療法の開発に向けて本知見をもとに臨床研究を立案していくことも視野に入れ研究を行っていく予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計１件）

1. Keiichi Fukuda, Hideaki Kanazawa, Yoshiyasu Aizawa, Jeffrey L. Ardell, Kalyanam Shivkumar. CARDIAC INNERVATION AND SUDDEN CARDIAC DEATH, Circ Res. (IF = 11.089) in press（査読あり）DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304679.

〔学会発表〕（計４件）

1. **金澤英明、木村謙介、荒井隆秀、福田恵一、心臓交感神経から心臓病を診る、第 35 回日本循環制御医学会総会、シンポジウム 2、2014 年 7 月 4-5 日、九州大学医学部百年講堂（福岡県福岡市東区）**
2. **金澤英明、木村謙介、荒井隆秀、家田真樹、福田恵一、心不全における心臓交感神経の適応機構、第 87 回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム 14、2014 年 4 月 25 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市博多区）**
3. Masahito Munakata, Hideaki Kanazawa, Kensuke Kimura, Takahide Arai, Hiroaki Sukegawa, Ryota Tabei, Keiichi Fukuda. The Mechanism of Subarachnoid Hemorrhage-induced Cardiac dysfunction. The 30th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section. 2013.6.29., San Diego, California, USA.
4. Hiroaki Sukegawa, Hideaki Kanazawa, Kensuke Kimura, Takahide Arai, Masahito Munakata, Ryota Tabei, Keiichi Fukuda. The Different Effect of Neuropeptide Y on cardiomyocytes with or without Catecholamine. The 30th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section. 2013.6.29., San Diego, California, USA.

〔図書〕（計５件）

1. **金澤英明、福田恵一、第 48 回 河口湖心臓討論会 精神・身体ストレスに対する心臓交感神経の応答、日本医学出版、心臓、Vol.47 No.2、2015 年、Page 277-284.**
2. **金澤英明、木村謙介、荒井隆秀、福田恵一、「シンポジウム２：臓器連関と循環器疾患」心臓交感神経から心臓病を診る、小玉株式会社、循環制御 第35巻 第3号、2014 年、Page 201-202.**
3. **金澤英明、福田恵一 自律神経系の病態と治療『心不全における交感神経系』 中外医学社、臨床神経科学 Clinical Neuroscience、2014 年、Vol.32 No.12, Page 1371-1373.**
4. **木村謙介、金澤英明、福田恵一 『心臓支配交感神経系から心不全の病態を診るー臓器円環による生体恒常性のダイナミクス』 羊土社、実験医学（増刊）2013 Vol.31 No.5 Page140-146.**
5. **金澤英明、家田真樹、福田恵一、『心不全における交感神経の分化転換』、心電図 32(suppl-4)、2012 年、Page 5435-5446.**

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）
○取得状況（計０件）

〔その他〕
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
福田 恵一 （FUKUDA KEIICHI）
慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：20199227

(2)研究分担者
荒井　隆秀　　（ARAI TAKAHIDE）
慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)
研究者番号：00383894

金澤　英明　　（KANAZAWA HIDEAKI）
慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号：40338033

助川　博章　　（SUKEGAWA HIROAKI）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：60535607

田部井　亮太　（TABEI RYOTA）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20573322

宗形　昌儒　（MUNAKATA MASAHITO）
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号：40445284

(3)連携研究者　なし