

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590251

研究課題名（和文）細胞内コリン産生系の薬理的修飾による血管新生の可能性と  
その機序の解析研究課題名（英文）How angiogenesis is regulated by pharmacological intervention of the  
intracellular cholinergic system?

研究代表者

柿沼 由彦 (KAKINUMA YOSHIHIKO)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：40233944

研究成果の概要：

アセチルコリン（ACh）には、血管内皮細胞に対してムスカリン受容体およびニコチン受容体の両者を通して、血管新生に関わるシグナル伝達系、たとえば PI3K/Akt 系の活性化、その後の非低酸素下での HIF-1 $\alpha$  の蛋白レベルの上昇、VEGF の発現誘導、結果として *in vitro* での血管新生促進作用が存在することを証明した。この効果を acetylcholinesterase inhibitor である donepezil を用いて、マウス下肢虚血モデルを用いて検討した。donepezil の投与量を低容量（ヒトの場合と同程度）と高容量で比較しても、両者において血管新生促進作用が認められた。いずれも、虚血による下肢筋肉萎縮を抑制し、下肢血液還流を保持し、結果として皮膚温の低下も抑制した。病理学的には、donepezil により毛細血管の密度が増加し、VEGF 陽性の血管内皮細胞の数も顕著に増加した。donepezil の詳細な作用機序については、acetylcholinesterase inhibitor としての作用と、inhibitor 以外のものとが考えられた。

交付額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000 |
| 2008 年度 | 1,500,000 | 450,000   | 1,950,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：循環

## 1. 研究開始当初の背景

心不全は、日本の死亡統計における死因の上位を占めており、その患者数も高齢化に伴い増加の一途を辿っている。 $\beta$  受容体遮断薬、ACEI（アンギオテンシン変換酵素阻害剤）、ARB（アンギオテンシン II 受容体拮抗薬）の

心不全に対する目覚ましい薬物療法の進歩はあるものの、しかし、それでもなお心不全の進行および心室細動・心室頻拍などの致死性不整脈による突然死の克服はまだまだ完全ではない。心不全の予後決定因子として、交感神経系亢進状態の心不全病態への寄与は多

く報告されてきた。しかし、一方副交感神経系（迷走神経）の心不全への進行に対する研究については、心筋細胞レベルも含めこれまでまったく明らかではなかった。我々の研究によって副交感神経系への直接介入が、これまでの治療法にない画期的な効果を及ぼすことを明らかにしてきた。

以下に示す。

(1) ACh は gap junction 蛋白コネキシン 43 のリン酸化を調節した(J Pharmacol Sci 2006)。

(2) ACh は蛋白分解系を抑制し、低酸素による Cx43 の蛋白量減少を抑制し、機能を保持させた。

(3) ACh は低酸素下の gap junction 機能低下を改善し細胞間物質移動を促進させた。ラット心筋梗塞後致死性不整脈の発生率も抑制した (Circulation 2005)。

(4) ACh は PI3K/Akt を活性化し、非低酸素下でも虚血耐性に重要な HIF-1 $\alpha$  を誘導させ低酸素による細胞死を抑制した。ACh はその過程でミトコンドリア膜電位を保持しミトコンドリア経路アポトーシス活性化を抑制した (FEBS letters 2005)。

(5) (4) の効果は、ACh 情報伝達物質である NO によっても同様に認められ、NO が autocrine / paracrine 的に心筋細胞での VEGF を産生させ、この VEGF は心筋細胞外で血管新生を促進させた (J Physiol Sci 2006)。

そこでこれまでの我々の研究結果に基づいて、既知の副交感神経系作用とは別のメカニズムを想定し、循環器疾患の病態における新たな副交感神経系の役割、意義を再構築するため、特に将来的な臨床医学への応用という部分にテーマをしばり下記に示す。

## 2. 研究の目的

(1) ACh の血管新生促進作用の有無、その分子メカニズムを解明し、臨床応用の可能性をさぐる。

ACh は心筋 muscarinic receptor  $\cdot$  NO を介して通常酸素濃度下で、hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  の蛋白発現を誘導（正確には分解抑制）することが明らかとなった。つまり我々の基礎研究結果によって、まさに ACh には新しい血管新生促進作用が存在する可能性が示唆された。したがって、ACh による血管新生作用が実際に存在するか否かを、培養系または動物実験系で証明し臨床応用の可能性を探ることが本研究の第一の目的である。

(2) 心臓における ACh の由来は迷走神経終末のみか、心筋細胞による局所産生系の可能性をさぐる。

迷走神経の心臓の支配領域について、免疫組織学的研究によりその分布密度は心房レベルの刺激伝導系で高く、一方心室レベルでは交感神経終末と比較して著しくその密度が低いことがわかったため(左心室心筋へ作用する迷走神経終末は非常に疎)、迷走神経刺激の心筋梗塞後リモデリング抑制効果 (Circulation 2004) は、速やかに分解される ACh の由来が神経のみでは説明が困難である。したがってこの効果の想定されるメカニズムとしては、迷走神経由来の ACh に加え神経以外(たとえば心筋細胞や血管内皮細胞など)から産生され(非中枢神経系)その産生部位近傍ではたらく(局所性)ACh の存在の可能性を我々は考えた。以上から、迷走神経以外の末梢組織(非中枢神経系)において(局所性)ACh 産生系が心筋細胞にも存在する可能性について我々は考え、そこで心筋細胞内コリン作動系を証明し、その制御機構を解明することが第二の本研究目的である。

## 3. 研究の方法

(1) ACh の血管新生促進作用についての検討

個体におけるコリン作動系の血管新生促進作用効果の検討

ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)における ACh 情報伝達経路および血管新生促進因子産生亢進の検討

ACh による tube formation 形成能の検討評価

(2) 細胞内 ACh 合成系の検討(末梢組織としての骨格筋、心筋での ACh 合成系の存在有無の検討)

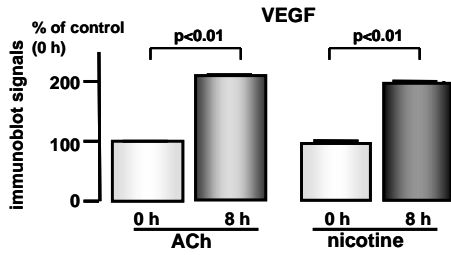
ACh 産生系の各種構成蛋白の存在を確認する。

ACh 産生系が実際に機能しているか否かを確認するため、細胞内 ACh 濃度を測定しその変化を検討する。

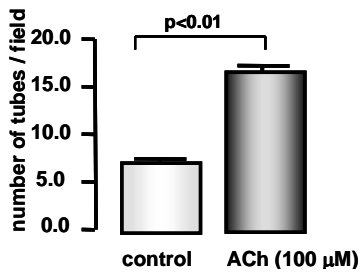
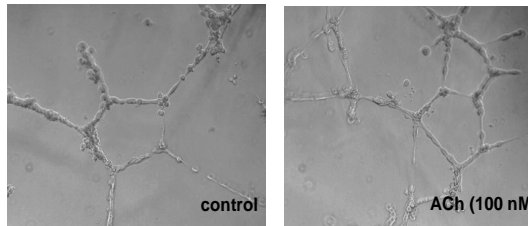
ACh 産生系の調節機構について検討する。

## 4. 研究成果

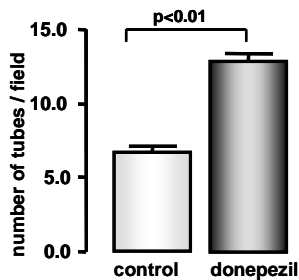
(1) ACh はニコチン同様、血管内皮細胞(HUVECs)に作用し、VEGF の発現を上昇させる。



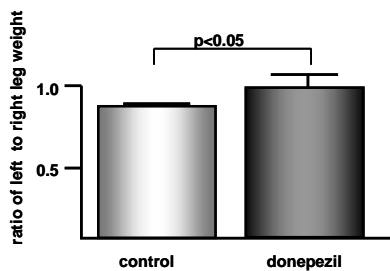
(2) 加えて、in vitro angiogenesis の指標である tube formation を、ACh は促進させる。



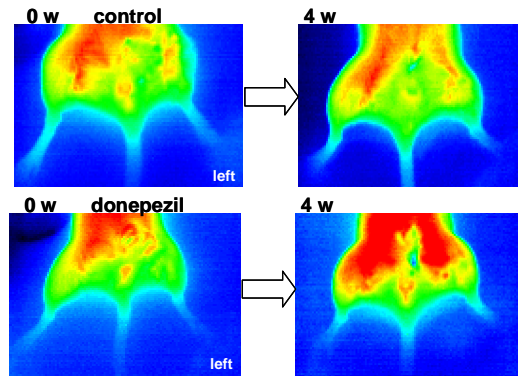
(3) acetylcholinesterase inhibitor donepezil は、ACh とは時間経過が異なるが tube formation を促進させる。



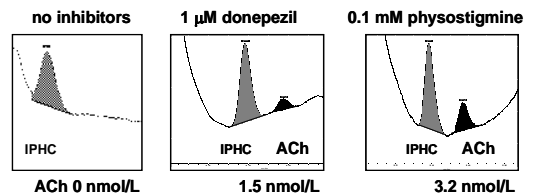
(4) donepezil のマウス下肢虚血モデルに対する作用 (虚血性萎縮抑制作用)



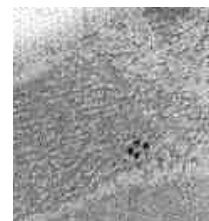
(4) サーモグラフィーによる下肢虚血後の回復経過に対する donepezil の作用



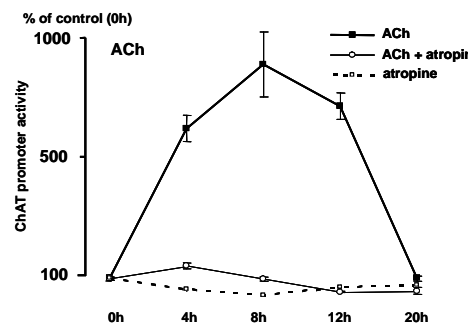
(5) 心筋細胞内 ACh の HPLC による測定 (ラット初代培養系 10 × 10<sup>7</sup> 細胞中の濃度)



(6) 心筋細胞内における VAcT の免疫電顕像 vesicle 様構造に一致して粒子が認められる。



(7) ACh 産生系の調節機構 (ChAT プロモーター領域を用いた解析)



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 5 件)

1.半田 武巳, Katare GR, 柿沼 由彦 有川 幹彦, 安藤 元規, 山崎 文靖, 佐藤 隆幸, 篠栗 志朗

Donepezil を使用した容量負荷心不全マウスにおける心機能改善効果、生存率改善効果の検討

心臓 41(2):115-123, 2009

2.Katare GR, Kakinuma Y, Arikawa M, Yamasaki F, Sato T.

Chronic intermittent fasting improves the survival following large myocardial ischemia by activation of BDNF/VEGF/PI3K signaling pathway.

J Mol Cell Cardiol 46:405-412, 2009

3.Katare GR, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Handa T, Yamasaki F, Sato T.

Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of opening of mitochondrial permeability transition pore independent of the bradycardiac effect

J Thorac Cardiovasc Surgery 137:223-231, 2009

4.Iguchi M, Kakinuma Y, Kurabayashi A, Sato T, Shuin T, Hong S-B, Schmidt LS, Furihata M.

Acute Inactivation of the VHL gene Contributes to Protective Effects of Ischemic Preconditioning in the Mouse Kidney.

Nephron, Nephron Exp Nephrol 110:e82-e90, 2008. 査読有

5.Kakinuma Y, Katare RG, Arikawa M, Muramoto K, Yamasaki F, Sato T.

A HIF-1 $\alpha$ -related gene involved in cell protection from hypoxia by suppression of mitochondrial function.

FEBS Lett 582:332-340, 2008. 査読有

[学会発表](計 16 件)

1.Handa T, Sato T, Kakinuma Y, Arikawa M, Sasaguri S

Donepezil, an Acetylcholinesterase Inhibitor Against Alzheimers Dementia,

Prevents Remodeling in Volume Overload Heart Failure Mice: Local and Central effect of Donepezil.

第 73 回日本循環器学会学術総会 3/20-22, 2009, 大阪

2.Kakinuma Y, Akiyama T, Arikawa M, Handa T, Sato T.

Cardiomyocytes Produces Acetylcholine in Response to Muscarinic Receptor Stimulation: a Possible Mechanism for Amplification of Cardioprotective Effects of Cardiac Vagal Nerve

Circulation 116:II-159(819).

Scientific Session 2008 American Heart Association, Nov.8-12, 2008, New Orleans, Louisiana, USA.

3.Kakinuma Y, Sato T. A HIF-1 $\alpha$ -related gene involved in cell protection from hypoxia by suppression of mitochondrial function. 第 9 回 Neurocardiology Workshop, 7/26, 2008 東京ステーションコンファレンス

4.Arikawa M, Katare R, Kakinuma Y, Handa T, Andoh M, Yamasaki F, Sato T.

Donepezil, Anti-Alzheimer's Disease Drug, Prevented the Progression of Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction.

第 72 回日本循環器学会学術総会 3/28-30, 2008, 福岡国際会議場

5.Handa T, Sato T, Kakinuma Y, Arikawa M.

Donepezil, an Acetylcholinesterase Inhibitor Against Alzheimers Dementia, Prevents Remodeling and Improves Survival in Volume Overload Heart Failure Mice.

第 72 回日本循環器学会学術総会 3/28-30, 2008, 福岡国際会議場

6.Kakinuma Y, Katare GR, Arikawa M, Handa T, Yamasaki F, Li M, Zheng C, Sugimachi M, Sato T.

Acetylcholinesterase Inhibitor Against Alzheimer's Dementia, Promotes Angiogenesis in an Ischemic Limb Model of Nicotinic Mice

Circulation 116:II-159(819).

Scientific Session 2007 American Heart Association, Nov. 4-7, 2007, Orlando, Florida, USA

7.Arikawa M, Katare GR, Kakinuma Y, Handa T, Ando M, Yamasaki F, Sato T.

Myocardial Infarction is Prevented by Anti-Alzheimer's Disease Drug, Donepezil

Circulation 116:II-291(1416).  
Scientific Session 2007 American Heart Association, Nov. 4-7, 2007 Orland, Florida, USA

8. Katare GR., Kakinuma Y., Arikawa M, Handa T, Yamasaki F, Sato T.  
Tumor Necrosis Factor Receptor-2 Plays a Critical Role for Induction of Post Ischemic Neovascularization in Mouse Model of Hind Limb Ischemia.  
Circulation 116:II-274(1339).  
Scientific Session 2007 American Heart Association, Nov. 4-7, 2007, Orland, Florida, USA

9. Kuwabara M, Kakinuma Y., Andoh M, Katare R, Yamasaki F, Doi Y, Sato T.  
Nitric Oxide Has Beneficial Effects on Cardiomyocytes by Activation of the Vascular Endothelial Growth Factor.  
第71回日本循環器学会学術総会 3/15-17, 2007, 神戸コンベンションセンター

10. Handa T, Katare R, Kakinuma Y., Arikawa M., Ando M, Sasaguri S, Sato T.  
Cholinesterase Inhibitor Donepezil Improves Ventricular Function of Mice with Non-Ischemic Chronic Heart Failure.  
第71回日本循環器学会学術総会 3/15-17, 2007, 神戸コンベンションセンター

11. Kakinuma Y., Katare R, Arikawa M., Handa T, Andoh M, Li M, Zheng C, Yamasaki F, Sato T.  
Donepezil Promotes Angiogenesis through the Mechanisms Independent of Cholinesterase Inhibition and Nicotinic 7 Receptor.  
第71回日本循環器学会学術総会 3/15-17, 2007, 神戸コンベンションセンター

12. Kakinuma Y., Katare R, Arikawa M., Handa T, Akiyama T, Andoh M, Yamasaki F, Sato T.  
Cardiomyocytes Produce Acetylcholine in Response to Muscarinic Receptor Agonists: a Possible Mechanism for Cardioprotective Effects of Vagal Stimulation on Cardiomyocytes.  
第71回日本循環器学会学術総会 3/15-17, 2007, 神戸コンベンションセンター

13. Katare R, Andoh M, Kakinuma Y., Arikawa M., Handa T, Yamasaki F, Sato T.  
Vagal Nerve Stimulation Protects Heart Against Ischemic Insult through Differential Regulation of Myocardial TNF

Receptor Subtypes. 第71回日本循環器学会学術総会 3/15-17, 2007, 神戸コンベンションセンター

14. Katare R, Kakinuma Y., Andoh M, Arikawa M., Handa T, Sasaguri S, Yamasaki F, Sato T.  
Vagal Nerve Stimulation Salvage the Myocardium Against Reperfusion Injury Through Inhibition of Opening of Mitochondrial Permeability Transition Pore.  
第71回日本循環器学会学術総会 3/15-17, 2007, 神戸コンベンションセンター

15. Arikawa M., Katare R, Kakinuma Y., Andoh M, Handa T, Yamasaki F, Sato T.  
Electrophysiological Approaches to the Mechanism of Arrhythmogenesis in Artificially Arranged Cardiomyocytes.  
第71回日本循環器学会学術総会 3/15-17, 2007, 神戸コンベンションセンター

16. Kakinuma Y., Katare GR, Arikawa M., Handa T, Yamasaki F, Sato T.  
Donepezil Promotes Angiogenesis in an Ischemic Limb Model of Nicotinic  $\alpha 7$  Receptor KO Mice.  
第8回 Neurocardiology Workshop 7/21, 2007, 経団連会館

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柿沼 由彦 (KAKINUMA YOSHIHIKO)  
高知大学 教育研究部医療学系・准教授  
研究者番号: 40233944

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

佐藤 隆幸 (SATO TAKAYUKI)  
高知大学 教育研究部医療学系・教授  
研究者番号: 90205930

有川 幹彦 (ARIKAWA MIKIHICO)  
高知大学 教育研究部医療学系・助教  
研究者番号: 20432817