

内在性非神経性コリン作動系賦活法の探索とその効果機序の解明

《研究の概要》

非神経性心臓内コリン作動系というシステムは、これまでの自律神経系に属する副交感神経系のシステムとは別に、それとは独立して、神経系ではない細胞において自らアセチルコリン (ACh) を産生するシステムのことである。本研究代表者は、心筋細胞自らが ACh を産生しそれを分泌すること、そしてその生理機能が心臓生理機能において必要不可欠であることを 2009 年に報告し、a non-neuronal cardiac cholinergic system (NNCCS) という概念を提唱した。このシステムはこれまで知られてきた心筋細胞生理機能の根幹を担うものであり、このシステムを欠失した心筋細胞ではその生理的機能維持に障害が惹起されることも報告してきた。

このシステムを賦活化・活性化させる方法については、これまで心臓における NNCCS の存在自体が知られていなかったこともあり、まったく不明であった。一方われわれは、非薬剤性ツールにより NNCCS を活性化させる具体的方法として阻血再灌流と呼ばれる方法をこれまで見出してきたが、それに関する詳細なプロトコル条件の検討は行っていなかった。そこで本研究においては、第一にマウスを用いて NNCCS 活性化のための適当なプロトコルを検討すること、そして NNCCS が活性化されることによってどのようなメリットが心臓において発揮されるかについて検討した。その結果、NNCCS のキータゲットとなる choline acetyltransferase (ChAT) および心臓 ACh 産生能には至適なプロトコルが存在し、その時に最も ACh 産生能が活性化されることが明らかになった。そしてこの活性化が心臓で惹起されると、心筋での糖取り込みが亢進し、よりミトコンドリア機能に依存しない代謝が活性化することが明らかとなった。また、これをヒトへ応用しその効果を検討することを目標として、阻血再灌流のプロトコルの改変が可能で、その条件での処置が自動的に可能なプロトタイプ機器を試作し、その効果を検討したところ、臨まれる効果が認められた。以上より、NNCCS に対して、非薬物学的理学療法的手法を用いた介入の可能性が示唆された。そこでは、至適条件下の心臓代謝調節への影響が本方法のメカニズムの一つであり、具体的には心臓エネルギー基質指向性を変化させることで、ミトコンドリア機能を回避させることが主要効果の一つであると示唆された。

また ChAT 発現調節に関する機構解析の一つとして、microRNA の関与を考えその候補 microRNA を絞り、心臓での発現パターンとの逆相関およびその強制発現系での ChAT 蛋白のノックダウンが明らかとなり、ChAT の新たな調節機構への microRNA の関与が明らかとなり、心臓内 NNCCS の発現変動という新たな調節系の可能性が示唆された。

柿沼 由彦	日本医科大学大学院 生体統御科学 教授	研究統括
根本 崇宏	日本医科大学大学院 生体統御科学 准教授	ChAT 発現調節変動に関する解析・プロトコル条件検討
洲鎌 秀永	日本医科大学大学院 生体統御科学 講師	本処置法の情報経路の検討・プロトコル条件検討
大畠 久幸	日本医科大学大学院 生体統御科学 講師	本処置法の情報経路の検討・プロトコル条件検討
眞野 あすか	日本医科大学大学院 生体統御科学 講師	心臓 ACh 測定・プロトコル条件検討

研究報告

I. 研究目的

研究代表者らは、これまで a non-neuronal cholinergic system (NNCCS) という一つの細胞から ACh を産生するシステムが、心筋細胞にも存在することを報告してきた (FEBS J 2009)。その後複数の研究施設からも独立して同様の報告がなされ、心筋細胞内での ACh 産生系システムの存在はほぼ確定された。その過程で見いだされてきたこの NNCCS (近年では a non-neuronal ACh (NNA) と呼ばれている) の心筋細胞における生理機能としては以下のとおりである。

- ①心筋細胞酸素消費に対して抑制的に作用する。したがって、ミトコンドリアに対して恒常的にその機能の異常亢進をさせないように作用する。
- ②NNCCS 機能の欠失によりノルエピネフリンによる細胞死が促進されることから、ノルエピネフリン細胞毒性に対する耐性機構獲得作用を有する。
- ③細胞間相互作用を促進させ、ギャップ結合機能を維持する。
- ④虚血耐性機構獲得作用を有する。
- ⑤細胞内エネルギー基質指向性をより糖代謝に傾かせる。

以上の *in vitro* によって明らかにされた NNCCS の機能は、その後の心臓特異的 ChAT トランスジェニックマウス (ChAT tg) の作製とその機能解析により、すべて *in vivo* においても反映されていることが、われわれの研究で明らかとなった。こうして、NNCCS の生理学的機能およびその意義は、けっして少なくなく、むしろ予想以上に重要で、かつ副交感神経系または迷走神経の効果とされていたものが実は NNCCS に依存するものであることが示唆されてきた。

以上をふまえて、この NNCCS に対して介入しその機能を人為的に活性化することが可能かどうか、また活性化させることでどのようなメリットが病的環境において認められるかという点についてさらに検討を行ってきた。この介入方法には薬理的介入方法と、非薬理的介入方法の二つが考えられた。前者においては、これまでわれわれはアセチルコリンエステラーゼ阻害薬の一つであるドネペジルが、そのエステラーゼ阻害効果に加えて

ACh 合成能を活性化させること、すなわち NNCCS を活性化させることを報告した。しかも NNCCS の活性化は、ムスカリン受容体を発現している心筋細胞などでは、その受容体アゴニストによる **positive feedback** 機構により ACh 産生能が調節されていること、つまり ACh-induced ACh という様式によることが明らかになった。一方、この薬剤は認知症に使用されるものであり、一般の非認知症の対象群に対して使用することは困難なため、非薬物的アプローチの方法が検討された。その中の一つとして阻血再灌流 (IR) がその方法として可能性があることをわれわれは見出してきた (PLoS ONE 2012)。しかし、その方法におけるプロトコールが最適であるかどうかは不明であるため、本研究の目的は以下のとおりとした。

- ① IR よりもっとも効率的な NNCCS の活性化 (ACh 産生能) の至適プロトコールを検討する。
- ② IR による心筋細胞内代謝学的変化・影響を検討する。
- ③ ChAT 発現について microRNA を介した調節機構の有無を検討する。
- ④ ヒト IR を介した副交感神経系介入の可否についての予備的検討を行う。

II. 研究計画及び材料と方法

1) 阻血再灌流

成獣オス C57BL6 マウス (12-16 週齢) をペントバルビタール腹腔内投与により麻酔し (30 mg/kg/dose)、背臥位の状態で固定する。マウス左大腿部全周囲をその皮膚の外から絹糸にて縛り阻血した。この時、阻血側足底部の皮膚色が変化することを確認した。阻血後再灌流を必ず行い、これを 1 サイクルとしたときのサイクル数と、阻血時間のみを可変とし、還流時間は 3 分と固定した。この後のプロトコールを以下のように設定した。① 阻血時間の条件は、3 分・6 分・10 分の 3 種類を選択した。② 阻血再灌流サイクル数は、1 回・3 回・5 回の 3 種類を選択した。

本理学的処置法による NNCCS の活性化の指標は、阻血再灌流後 20-24 時間以内の心臓心室筋 (心房筋は切除により除外) における ChAT 蛋白質発現量の処置前からの増加量とし、その増加分が相対的に多いものを適当なプロトコールとした。本処置後の *de novo* 蛋白質合成への影響を評価するため、処置後 20-24 時間後のサンプリングとした。

心房は迷走神経終末が豊富にあるため、心房及び心室基部を削除し、心尖部寄りの全心室の約 2/3 で組織重量 100 mg をサンプルとした。このサンプルから蛋白を抽出しウェスタンブロット法にて ChAT および internal control としての α -tubulin 蛋白質発現量を評価した。

2) 心室筋内 ACh 測定

これまでのわれわれの報告とほぼ同じ測定システムにより、心室筋内 ACh 量は測定された。心尖部寄り心室筋約 2/3 を全心室筋より採取するとほぼ組織重量が 100 mg になり、これを ACh 測定用溶解液 1 mL に入れ、マイクロポリトロンにてホモジネートする。ACh 測定用溶解液の組成は以下のとおりである。0.1 M PCA、0.1 mM physostigmine、0.1 mM EDTA、0.1% SDS、 10^{-8} M IPHC (isopropylhomocholine)。ホモジネート後遠心し、その上清中 pH

をアルカリ性 (pH 6 以上に保つ) に調節するため、1M KHCO₃ を添加した。Millipore 分離用カラムにそのサンプル 600 μL をロードさせて遠心し最終サンプルとし、その 10 μL を HPLC 測定に用いた。

HPLC システムの構成は以下のとおりである。HPLC はエイコム社 HTEC-500 を用い、このシステムはポンプ・白金電極の化学検出器で構成され、分離カラム (AC-Gel) の前後に、プレカラム (CH-Gel) と酵素カラム (AC-Enzymepack II) が接続された。移動相のバッファ組成は 50 mM KHCO₃、300 mg/L sodium 1-decanesulfonate、50 mg/L EDTA、流速は 0.15 mL/分である。

3) 心室筋 ATP 含量の測定

組織内 ATP 量の測定には、アプロサイエンス社 (徳島) のキットを用いた。ACh 測定において用いたサンプルと同様の採取方法で得られた心室筋を、ホモジネート用抽出液内で処理する。一定量のルシフェラーゼおよびルシフェリン存在下でサンプルを添加し、そのルシフェラーゼ活性を示す発光度を測定し、既知の ATP 濃度とルシフェラーゼ活性度から計算される検量線から、組織内 ATP 濃度を評価した。

4) 蛋白発現解析

阻血再灌流後約 20-24 時間後の、心尖部寄りの心室のうちその 2/3 を心室サンプルとして用いた。蛋白抽出液 1 mL 内でホモジネートし、遠心後その上清を用いて蛋白定量後、サンプルバッファとともに処理した。泳動時は各ウェル間での蛋白量を等量とし、これを内部標準抗体 α -tubulin および CBB 染色にて各ウェルで差がないことを確認した。心臓での蛋白発現量を評価するために以下の抗体を用いた。

抗 ChAT 抗体 (1:1000; Millipore, Billerica, Massachusetts, USA), 抗 Sirt6 抗体 (1:1000; Novus Biologicals LLC, Littleton, Colorado, USA), 抗 PDK4 抗体 (1:1000; Novus) and 抗 α -tubulin 抗体 (1:1000; Lab Vision, Fremont, California, USA). HRP 付二次抗体での反応の後、検出はミリポア社の Luminata Crescendo を用いた。

5) microRNA による心臓 ChAT 発現に関する関与

心臓心室筋における ChAT 蛋白発現に対して、その特異的 microRNA の関与の可能性を検討するため、マウス ChAT mRNA における候補 microRNA を、データベース TargetScan を用いて検索した。その結果 miR345 および miR466 が候補として考えられた。各 miR の mRNA 遺に対する遺伝子発現パターンを定量 RT-PCR によって、ChAT mRNA 発現パターンと比較した。また、各 miRNA 発現ベクターを用意しアトラクテン (QUIAGEN) を用いて ChAT 蛋白を発現しているマウス由来細胞セルライン Neuro2A (IFO50081)、SV skin fibroblast (JCRB1207)へ遺伝子導入し、その後遺伝子導入の有無の細胞より蛋白を抽出し Western blot 法により ChAT 蛋白発現量を比較検討した。

Neuro2A 細胞培養は EMEM (非必須アミノ酸含有)・10% FBS、SV fibroblast 細胞培養は DMEM・10%FBS にて通常細胞と同様に培養を行った。

III. 研究成果

① 阻血再灌流はその施行後 24 時間以内で心室筋 ChAT 蛋白発現を増加させる

心室筋での ChAT 蛋白発現量をマーカーとして、さまざまなプロトコール条件から至適条件を検討した。まずは、阻血回数を 1 回すなわち 1 サイクルに固定し、阻血時間のみを 3 分・6 分・10 分の 3 通りに変化させ、心室筋 ChAT 蛋白発現量を比較したところ、 α -tubulin 蛋白発現に有意差なくとも、3 分・6 分の阻血時間では優位に心室内 ChAT 蛋白発現が増加した。しかし、10 分の阻血ではむしろ蛋白発現は減少していた。一方、3 分と 6 分において有意差は認められなかったが、6 分（処置なしのコントロールにおける発現量を 100% とした場合 $120.0 \pm 2.9\%$ 、 $P < 0.05$ ）よりもむしろ 3 分（ $133.9 \pm 1.8\%$ 、 $P < 0.05$ ）において ChAT 蛋白発現量がより多い傾向であった。

このことは、阻血時間が長いほど心室 ChAT 発現量が増加するとは限らず、むしろ至適時間内において（3 分）、ChAT 発現増加の最大効果が得られるということが示唆された。

さらには、阻血再灌流の繰り返すサイクル数を 1 サイクル・3 サイクル・5 サイクルと条件を変化させ、その時の心室筋 ChAT 発現量を各条件下において検討した（再灌流時間はいずれも 3 分間と固定）。したがって、プロトコールについては以下のような条件を比較した。すなわち 3 分阻血 3 分再灌流を 1 サイクルとしてこれを 3 サイクルまたは 5 サイクルというプロトコール、また 6 分阻血 3 分再灌流を 1 サイクルとしてこれを 3 サイクルである。この条件下では、心室内 ChAT 蛋白発現について 3 サイクル行った 3 分の阻血再灌流（ $139.2 \pm 0.4\%$ ）では 5 サイクルのそれ（ $78.9 \pm 1.7\%$ ）と比べるとよりその発現量が有意に増加していた。また、3 分および 6 分の阻血を 3 サイクル行った場合（ $139.2 \pm 0.4\%$ 、 $P < 0.05$; $131.1 \pm 0.2\%$ 、 $P < 0.05$ ）では、どちらも心室筋 ChAT 蛋白発現量は増大したが、互いに有意差は認められなかった。

以上のことから、サイクル数に関してはその数を増やせば増やすほど心室での ChAT 蛋白発現量は必ずしも増加せず、5 サイクルよりはむしろ 3 サイクルの方がより効果的であることが示唆された。では 1 サイクルと 3 サイクルでの比較ではどうかというと、これには有意差は認められず、少なくとも、3 分阻血再灌流を 1 または 3 サイクル行うことが至適条件の一つであることが示唆された。また、1 サイクルの 6 分阻血の場合、1 サイクル 3 分阻血よりも心室筋 ChAT 蛋白発現量は少ない傾向があったものの、これを 3 サイクルに増加させると 1 サイクルよりも発現量は増加した。

したがって、心室筋 ChAT 蛋白発現量をマーカーとした場合の至適阻血再灌流プロトコールの候補として、3 分阻血再灌流 1 サイクルまたは 3 サイクル、さらに 6 分阻血再灌流 1 サイクルが考えられた。

② 阻血再灌流は心臓内（特に心室筋）ACh 含量を増加させる

①における心室筋 ChAT 蛋白発現量増加が阻血再灌流によって惹起されたことが、実際に心室筋での ACh 産生量に反映されるか否かについて検討した。そのために、①で特に

ChAT 発現量が有意に増大したプロトコル条件を用いて、プロトコル施行後 24 時間以内の心室心筋 ACh 含有量を測定し、阻血再灌流を行わないコントロールの心臓での ACh 含量と比較した。3 分阻血再灌流 3 サイクルにおける心室筋 100 mg (1 mL ACh 測定液内) の ACh 含有濃度は $14.2 \pm 2.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ ($P < 0.05$) であった。この濃度は処置なしコントロール ACh 含有濃度 $8.3 \pm 0.9 \times 10^{-8} \text{ M}$ と比べると有意に増加していた。一方、3 分 1 サイクルまたは 6 分 3 サイクルでは、心室内 ACh 含有濃度はそれぞれ $12.0 \pm 1.3 \times 10^{-8} \text{ M}$ および $14.0 \pm 2.2 \times 10^{-8} \text{ M}$ であり増加傾向のみ示しており、有意差はなかった。

以上より、本阻血再灌流プロトコルにおいて確実に心室筋内 ACh が増加した至適プロトコルは 3 分阻血再灌流 3 サイクルと結論づけられた。

③ 阻血再灌流は心室筋 ATP 含量を増加させる

至適プロトコルにおいてのみ阻血再灌流が、心臓内での ChAT を誘導させ、その結果として ACh 産生を増加させることが示唆されたが、それではこの時その他に心室筋内で生じている変化を検討するため、心室筋内 ATP 含量を測定し各プロトコル間で比較検討した。これまでのわれわれの先行研究が示唆しているように、ACh 産生量を増加させる条件、すなわち 3 分阻血再灌流 1 サイクル ($2.06 \pm 0.14 \mu\text{mol/g}$ 組織重量、 $P < 0.05$)、6 分 1 サイクル ($2.36 \pm 0.08 \mu\text{mol/g}$ $\mu\text{mol/g}$ 組織重量、 $P < 0.05$)、3 分 3 サイクル ($2.13 \pm 0.19 \mu\text{mol/g}$ 組織重量 vs. $1.52 \pm 0.11 \mu\text{mol/g}$ 組織重量 (処置なしコントロール)) を行った 24 時間以内の心臓において、いずれも心室筋内 ATP 含量は処置なしコントロールと比較して有意に増加していた。

以上より、阻血再灌流後、その直後の急性期ではなくむしろ亜急性期である 20-24 時間経過した後に、心室内 ATP 含量が少なくとも処置なしの場合と比べて約 1.5 倍増加する変化が心臓において起きていると言える。この発生機序については、これまでのわれわれの先行研究から類推すると、以下の二通りの可能性が考えられる。すなわち

- 1 阻血再灌流による心臓心室筋における ATP 消費の抑制
- 2 阻血再灌流による ATP 産生系の増加

以上の二つである。これまでの我々の先行研究においては、この二つのうち (1) の可能性を示唆していた。なぜならば、細胞内 ACh 産生系である NNCCS をノックダウンさせた細胞 (すなわち ChAT ノックダウン細胞) では、酸素消費量が増加し、一方で細胞内 ATP 含量が有意に減少すること、逆に M2 受容体を発現した細胞へ ACh 処理を行うと、酸素消費量は低下するという互いに相反する変化を見出していたからである (PLoS ONE 2012)。

④ 阻血再灌流は心室筋心筋細胞でのエネルギー関連因子蛋白発現に影響を及ぼす

さらにこの可能性を支持するデータを得るために、阻血再灌流後 20-24 時間後の同じ心室筋をサンプルとし、その心筋細胞内のエネルギー代謝に関与するいくつかの因子についてその蛋白発現量を検討した。具体的な因子としては、Sirt6 および PDK4 に注目した。Sirt6 は長寿遺伝子と呼ばれる sirtuin 遺伝子ファミリーの一つであり、心臓において高発現し

ている。この Sirt6 の発現が増加する時には、細胞内でのエネルギー的飢餓状態が起こっていることを示唆するとされている。また PDK (pyruvate dehydrogenase kinase) 4 は、pyruvate dehydrogenase (PDH) を抑制するリン酸化酵素であり、これが少ないほど pyruvate から TCA サイクルへ代謝物の流入が増加することを表すとされている。そこで、この2つの蛋白発現を阻血再灌流の前後で比較検討したところ、3分阻血再灌流を3サイクル行った場合において Sirt6 蛋白の発現増加と、PDK4 の著明な発現低下が認められた。3分または6分阻血再灌流1サイクルにおいても同じ傾向の反応は認められたが、3分3サイクルが最も効果的であった。

このことは、まさしく阻血再灌流という処置が24時間にわたって、心臓心室筋があたかもエネルギー的に飢餓状態に陥ったかのような反応を惹起させたことで、糖利用を積極的に行おうとしている心筋反応の可能性を示唆している。このような心筋反応様式では、先の③における反応のうち、2の可能性が示唆された。

⑤ 阻血再灌流処置による末梢からの情報の途中経路には迷走神経孤束核が関与する

これまでのわれわれの先行研究では、心筋内在性非神経性コリン作動系 (NNCCS) は、ムスカリン受容体を介し positive feedback 調節を受けることを明らかにしている。すなわち、心筋細胞では ACh による刺激によって ACh 産生能つまり NNCCS 機能が亢進するということを示唆している (FEBS J 2009)。そこで、この NNCCS 機能亢進に対して副交感神経の関与する可能性が考えられた。したがって、阻血再灌流処置を行うことで、途中の経路において末梢からの迷走神経求心路を通して、そのシグナルが孤束核等に入ってきているのではという仮説を打ち立てた。この仮説に基づき、c-fos シグナルの免疫組織化学的評価を行った。阻血再灌流後 20-24 時間の延髄組織を採取し、孤束核および迷走神経背側核におけるそのシグナル数を、再灌流しない場合と比較検討した。その結果、阻血再灌流を行った場合には、孤束核および迷走神経背側核両者を含めた c-fos 陽性シグナルの有意な増加が認められた。

心筋内在性非神経性コリン作動系は、本処置により中枢を介して行われていることが示唆された。

⑥ NNCCS の重要な律速酵素である ChAT の遺伝子発現に miRNA が関与する

NNCCS による心臓心室筋での ACh 産生には ChAT が必須であるが、この心室筋での ACh 産生には恒常的な ChAT mRNA の de novo の合成が関与しているのか、それともそれ以外の機構が関与しているのかを確かめるために、まずは心室筋での ChAT mRNA 発現パターンを朝と晩の両者で比較したところ、ChAT mRNA 発現には有意な発現量の差が認められた。この時、TargetScan による ChAT に対する候補 microRNA をデータベースより検索したところ miR345 および miR466 の2つが得られ、そこで、miR345 と miR466 の発現パターンを qRT-PCR で検討したところ、miR345 の発現パターンが ChAT mRNA 発現パターンと相反していたため、miR345 の可能性が示唆された。

次に miR345 の ChAT 蛋白発現に対する抑制性制御を確認するため、CMV プロモーターと eGFP レポーター遺伝子としてもつ miR345 発現ベクターを用意した。これを用いて、Neuro 2A および SV fibroblast (マウス神経細胞および線維芽細胞由来セルライン) に遺伝子導入し ChAT 蛋白発現への影響を検討した。いずれの細胞において、ChAT 蛋白発現は、GFP 遺伝子導入細胞や mock 細胞と比較して、優位にその発現量は減少した。

このことは、少なくとも miR345 は ChAT の遺伝子発現および蛋白発現量を負に調節していることを示唆し、ChAT 発現の変動に対する microRNA による新たな調節系の関与の可能性が認められた。

⑦ 阻血再灌流という理学的処置方法のヒトへの応用を考えた予備実験の試み

マウスを用いた動物実験で得られた結果から、ヒトへの応用を考え、どのような反応が起こりうるかという視点から予備実験を試みた。マウスの結果からは、この処置により次の効果が認められた。

- 1) 処置により de novo での心室筋 ChAT・CHT1 (コリントランスポーター) 蛋白発現が増加し、ACh の産生が増加した。
- 2) 処置により心筋内での長寿遺伝子 Sirt6 蛋白発現が増加し、糖代謝が亢進した。
- 3) この処置の情報伝達はおそらく中枢を介して行われ、心室筋内 ATP 含量は、おそらくその消費が抑制されたことで増加した。

以上の効果をヒトにおいて確かめるとしても、動物モデルのように直接サンプリングはヒトで不可能であるため、上記のうち、その非侵襲的評価が可能な副交感神経系への影響をまず見ることで、本処置による副交感神経系への介入の可能性について評価することとした。そこで、心拍数変動 (HRV) への影響をマーカーとして用いた。

さらに、本処置をどのような対象者においても一律に行うことを可能とするために、本処置のプロトコルをプログラム化し、その過程を全自動で行う機器を試作した。これにより、対象者個々の血圧に応じた外的圧力によって大腿部を圧迫し、かつ圧迫時間とサイクル数を変えられるようになっている。

これを用いてヒトにおける阻血再灌流に対する反応を急性期 (直前と直後) および慢性期 (1日1回の処置でこれを約1週間以上行う) において、血圧・心拍数・心拍変動を比較検討した。急性期においては、本処置の施行前後でその効果は限定的であったが、心拍数の減少は認められた。一方で、慢性期においては心拍変動に対する影響が認められ、本処置により副交感神経系への介入効果の可能性が示唆された。

IV. 考察

NNCCS の存在とそのシステムへの介入の可能性

本研究により、阻血再灌流という理学的方法により心室筋における NNCCS の機能が亢進することが明らかとなった。しかも、それには特異的な条件が存在し、その至適条件下のときにのみ心室筋での ACh 産生量が最大となった。その詳細な機構はまだ解析の途中では

あるが、少なくとも心臓からは遠く離れた四肢に対する理学的方法が、NNCCS を誘導させることが可能となったことで、NNCCS というシステムが心筋細胞に存在するという知見がさらに堅固になった。加えて、NNCCS に対して介入することも可能であることが示唆されたのである。

2009 年に NNCCS という概念を初めて提唱して以来、その心筋における生理学的機能について報告するとともに、その機能亢進方法について検討してきた。その中で、短時間の阻血再灌流および限られたサイクル数の時においてのみ、ACh の心室筋での産生が亢進することが明らかとなった。今回の研究ではさらに、心室筋はこの処置によってそのエネルギー飢餓状態にさらされたごとく、Sirt6 蛋白の発現亢進と PDK4 リン酸化蛋白の低下という特異的な応答を示した。PDK4 蛋白は PDH 酵素を負に調節しており、PDK4 の低下はしたがって PDH 酵素の機能亢進、よって PDH の関わる反応経路の活性化を意味すると考えられた。またこれまでの我々の先行研究により (Cell Physiol Biochem 2014)、ChAT 遺伝子強制発現系において細胞内での ACh 産生系を亢進させると、グルコースの細胞内への取り込みが促進され、さらに低酸素抵抗性になることから (PLoS ONE 2012)、本処置による心筋細胞内応答は、心筋細胞内で NNCCS が亢進したことによる、疑似細胞飢餓状態がその原因と考えられた。

このような状況に置かれた細胞内では、ACh 産生系が酸素消費量を負に調節しているという事実からもわかるように、ATP 消費を抑制させ細胞内 ATP 量を保持し、その結果として心筋細胞内 ATP 含量の増加が認められた。このことは、本処置および NNCCS を介して細胞エネルギー代謝に対して介入することの可能性を示唆している。

ChAT 蛋白発現における microRNA 関与の可能性

マウス心臓心室筋における ChAT 蛋白発現には、時間的にパターンが異なることが本研究結果から示唆された。明暗期に応じて ChAT mRNA 発現量は変化することをわれわれは見出したが、これには単なる de novo mRNA 合成によって影響を受けているのみならず、microRNA の関与も示唆された。特に miR345 mRNA 発現パターンは ChAT の場合と比較すると互いにミラーイメージであり、また miR345 は ChAT 蛋白発現量を減少させており、心室筋における ChAT 蛋白質発現には miR345 の関与の可能性が示唆された。このことは、NNCCS の責任遺伝子発現調節に miR345 が関わること、これによる明暗期での発現調節の可能性も示唆された。しかし、この発現パターンの変動が、心筋にとってどのような生理学的意義をもつのかはまだ不明である。

NNCCS への介入方法のヒトへの応用の可能性

マウスを用いた本研究の結果から、この理学的処置のヒトへの応用により、同じような応答が見られる可能性が示唆された。それでは、この NNCCS が心臓において亢進した場合、その状況下ではどのようなことがその個体および心臓において生じるのであろうか。その一つの答えとして、われわれが作成した心臓心室筋特異的 ChAT トランスジェニックマウスの解析結果がそのヒントとなりうる。野生型マウスと比較してこのマウスは心筋梗塞後の残存心筋量がより多いこと、このマウス由来培養心筋細胞はその代謝が糖代謝に傾いて

いること、虚血に対して抵抗性を持つこと、糖取り込みが亢進していることが報告されている (JAHA 2013)。これらの結果から、NNCCS が亢進したモデルとして心臓心室筋特異的 ChAT トランスジェニックマウスを用いた結果から、同様の表現型がヒトにおいても認められる可能性が示唆された。しかし、ヒトにおいてはマウスで用いた手法による解析が不可能であるため、今後、それに替わる評価方法の検索および開発などを待って、できる限りヒトにおける本研究で用いた介入方法の効果およびその作用点について、明らかにしたいと考えている。

特に、下肢を用いた理学的処置を行った場合、どのような感覚情報が中枢性への情報としてトリガーとなるのか、その解明は非常に重要な点であると考えている。というのも、当初、阻血再灌流という名称から想像される、動脈の流量減少による虚血がその情報のトリガーとなるのではと想像されたが、その後の予備実験などから、虚血そのものはトリガーになっていない可能性が示唆されたからである。他の可能性として考えられるのは次の通りである。①皮膚を介した圧迫処置による圧感覚、②静脈鬱滞による血管の圧感覚、③処置自体の発する痛覚、④静脈系阻血再灌流を介した NO の発生、などが考えられ、これらの可能性について検討中である。

V. 研究成果の発表

- [1] **Kakinuma Y**, Noguchi T, Okazaki K, Oikawa S, Iketani M, Kurabayashi A, Furihata M, Sato T. Antimuscle atrophy effect of nicotine targets muscle satellite cells partly through an $\alpha 7$ nicotinic receptor in a murine hindlimb ischemia model. **Transl Res** 2014;164:32-45.
- [2] 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;78:2317-2324.
- [3] Oikawa S, Iketani M, **Kakinuma Y**. A non-neuronal cholinergic system regulates cellular ATP levels to maintain cell viability. **Cell Physiol Biochem** 2014;34:781-789.
- [4] **Kakinuma Y**. A concept of a nonneuronal cardiac cholinergic system. **J Nippon Med Sch** 2014;81:296-297.
- [5] **Kakinuma Y**. Nicotinic and non-nicotinic receptor-mediated mechanisms responsible for anti-atrophy effects in muscle. **Receptors Clin Invest** 2014;1:e286.
- [6] 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

- [7] **Nemoto T, Kakinuma Y**, Shibasaki T. Impaired miR449a-induced downregulation of Crhr1 expression in low-birth-weight rats. **J Endocrinol** 2015;224:195-203.
- [8] **Nemoto T, Kakinuma Y**, Shibasaki T. Restraint-induced glucocorticoid receptor downregulation is dysregulated in high fat diet-fed rats likely from impairment of miR-142-3p expression in the hypothalamus and hippocampus. **Am J Life Sciences** 2015;3:24-30
- [9] Oikawa S, **Mano A**, Iketani M, **Kakinuma Y**. Nicotinic receptor-dependent and -independent effects of galantamine, an acetylcholinesterase inhibitor, on the non-neuronal acetylcholine system in C2C12 cells. **Int Immunopharmacol** (in press) doi:10.1016/j.intimp.2015.04.057.
- [10] **Kakinuma Y**. Future perspectives of a cardiac non-neuronal acetylcholine system targeting cardiovascular diseases as an adjunctive tool for metabolic intervention. **Int Immunopharmacol** (in press) doi:10.1016/j.intimp.2015.05.029.
- [11] Oikawa S, **Mano A**, Takahashi R, **Kakinuma Y**. Remote ischemic preconditioning with a specialized protocol activates the non-neuronal cardiac cholinergic system and increases ATP content in the heart. **Int Immunopharmacol** (in press).
- [12] **Sugama S**, Sekiyama K, Takenouchi T, Hashimoto M, Bruno C, **Kakinuma Y**. Chronic restraint stress triggers the dopaminergic and noradrenergic neurodegeneration via increased oxidative stress: possible role of chronic stress for the onset of Parkinson's disease. **Brain Behav Immun** (under revision)