

## 圧負荷心肥大モデルにおける心・脳コミュニケーションによる 食塩感受性獲得と圧反射不全機序の解明

廣岡 良隆, 柴田 理紗, 彌永 武史

九州大学循環器病未来医療研究センター先端循環制御学部門

**概要** 高血圧性心疾患は心収縮力が保たれた心不全の基礎疾患として多く、交感神経活性化が深く関わっている。我々は、圧負荷心肥大マウスを用いた研究により食塩感受性が生じることを示し、心臓交感神経求心路反射刺激の活性化が脳内炎症性変化を介していることを示唆する成績を報告してきた。本研究では、この圧負荷心肥大モデルにおいて心臓交感神経求心路の受容体である TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) と脳内で圧受容器からのシグナルを最初に感知する延髄孤束核 (NTS; nucleus tractus solitarius) の BDNF (brain derived neurotrophic factor) の発現を検討し、心臓・脳コミュニケーションの機序としての役割を調べた。

10 週齢雄性 C57BL/6J マウスを用いて実験を行った。腎動脈上部で大動脈を縮窄し、圧負荷モデルを作成した。心臓での TRPV1 発現と脳内 NTS の BDNF 発現を Western blot 法で解析した。圧負荷 8 週後心肥大が確立した時点で Sham 群と比べて有意に心臓 TRPV1 と脳内 NTS の BDNF の発現増加を認めた。また、カプサイシンを含ませたパッチを心膜表面へ貼付し TRPV1 刺激した際の昇圧反応も増強した。さらに、resiniferatoxin (RTX) を含ませたパッチを心膜表面へ貼付し TRPV1 を脱感作しておくことで圧負荷心肥大の程度が抑制された。加えて、TRPV1 ノックアウトマウスで圧負荷モデルを作成すると心肥大進行が顕著に抑制された。その時、脳内 NTS の BDNF 発現も減少していた。以上の成績は、圧負荷心肥大では心臓 TRPV1 刺激を介した交感神経活性化反射機構と圧受容器反射機能に重要な脳内 NTS の BDNF 発現がリンクしていることを示唆する。

### 1. 研究背景および目的

高血圧性心疾患による心不全発症は心収縮機能が保たれた心不全 (heart failure with preserved ejection fraction; HFpEF) の基礎疾患として多く、高齢化社会を迎えた現代では今後ますます増加することが推定される<sup>1,2)</sup>。高血圧が持続すると圧負荷による後負荷増大は適応現象として心肥大を生じる。周知のとおり心肥大は予後を規定する独立した因子であるため十分な降圧治療を行い心肥大の進行から拡張機能不全さらに非代償期への移行を防ぐことは極めて重要である。心肥大のどこで適応から破綻への変化が生じているか、どのような機序によるものかは明らかではない。すでに我々は圧負荷心肥大モデルにおいて食塩感受性が生じ交感神経活性化を介して心不全に至る機序の解明を行ってきた<sup>3-8)</sup>。具体的には、脳内独

自の鉱質コルチコイド受容体 (mineralocorticoid receptor; MR) やそれとリンクする上皮型ナトリウムチャネル (epithelial sodium channels; ENaCs) の活性化の重要性を報告した。また、脈絡叢における MR/ENaCs の活性化がナトリウムを血液中から脳内へ移行させ、視床下部に存在する MR 活性化を介した炎症性変化によって交感神経活性化を生じることを明らかにしてきた。

本研究では、Heart-Brain Communication としての心臓交感神経求心路 (cardiac sympathetic afferent; CSA) に着目した。この求心路を介した反射経路は、元々は急性心筋虚血で交感神経活性化を生じることから見出されたものであるが、近年、慢性心不全や高血圧のような長期的な交感神経活性化に関わる病態での重要性が着目されている<sup>9-12)</sup>。この求心神経は transient receptor potential

vanilloid (TRPV) 1 発現神経が中心的な役割を果たす。一方、高血圧・心不全では動脈圧受容器反射機能が低下しており予後と相関していることが知られている。動脈圧受容器からの入力を最初に受けるのは脳内延髄孤束核(NTS)である。この部位では brain derived neurotrophic factor (BDNF) の発現が圧受容器刺激によって変化することが報告されている。したがって、本研究では、CSA 活性化が心臓の TRPV1 刺激を介して脳内 NTS の BDNF 発現とリンクして圧受容器反射機能低下に関わっているか否かを明らかにし、Heart-Brain Communication の形成を担っているかについて研究を行った。

## 2. 研究方法

実験には以前の報告にあるように大動脈の腎動脈分岐上部において腹部大動脈バンディングを施行し心臓に圧負荷をかけるマウスを用いて実験を行った。このマウスは食塩感受性を有することをこれまでの研究で報告している。

### 2. 1 圧負荷マウスにおける心肥大の経時的変化

10 週令 C57BL/6J マウスの腹部大動脈をバンディング (AB 群) して 2 週ごとに心肥大の経時的変化を心エコー法によって観察した。対照としてシャム手術群 (Sham 群) を用いた。

### 2. 2 圧負荷マウスにおける TRPV1 の発現

上記マウスの心筋組織から Western blot 法を用いて TRPV1 の発現を調べた。

### 2. 3 TRPV1 刺激による昇圧反応の観察

TRPV1 発現変化に伴い機能的にも TRPV1 刺激に対する昇圧反応が変化しているか否かについて capsaicin を含んだパッチを心臓表面に貼付して調べた。

### 2. 4 脳内 NTS における BDNF の発現

脳内 NTS における BDNF 発現を Western blot 法を用いて調べ AB 群と Sham 群で比較検討した。

### 2. 5 心臓交感神経求心路除神経の効果

超強力な capsaicin アナログで TRPV1 を発現する求心神経の脱感作を生じ除神経作用がある resiniferatoxin (RTX) 含有フィルターを新表面へ貼付し、圧負荷による心肥大形成の経時的変化を観察した。

### 2. 6 TRPV1 ノックアウトマウスにおける AB による心肥大の経時的観察および脳内 NTS における BDNF 発現の比較

TRPV1 ノックアウトマウスを用いてバンディングによる心肥大の経時的変化が wild type と比べ異なるかどうかを調べた。また、脳内 NTS の BDNF の発現が異なるかについても調べた。

## 3. 研究結果

### 3. 1 圧負荷マウスにおける心肥大の経時的変化

腹部大動脈バンディングによる圧負荷 (AB 群) によって経時的に心肥大を生じた (図 1)。予備実験によって 12 週間後まで観察したが心肥大の進行は止まりむしろ心収縮力低下が生じてくるため、8 週間後までの観察期間をその

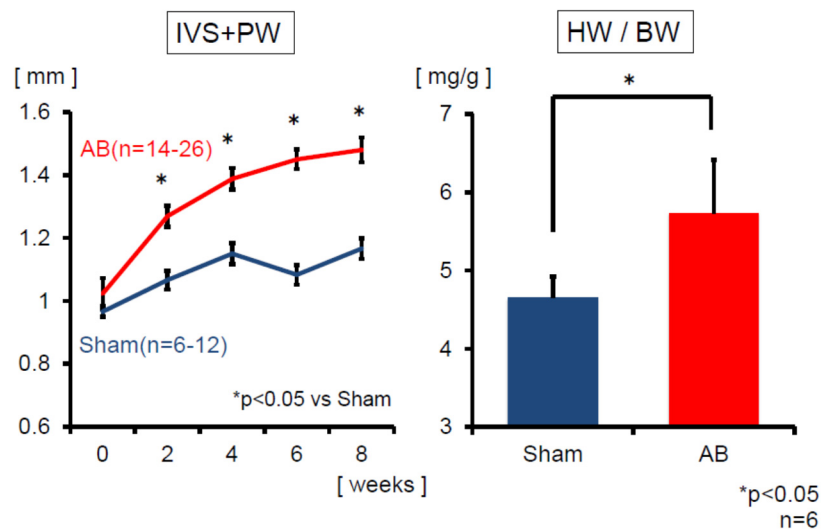


図1 Aortic banding 群で左室壁肥大

後の研究の観察時点とした。

### 3.2 圧負荷マウスにおける TRPV1 の発現

心臓 TRPV1 発現は AB 群で Sham 群に比べ有意に増加していた(図 2)。

### 3.3 TRPV1 刺激による昇圧反応の観察

Capsaicin 含有パッチを心表面に貼付した際の昇圧反応は AB 群で Sham 群に比べ有意に増強していた(図 3)。

### 3.4 脳内 NTS における BDNF の発現

脳内 NTS における BDNF 発現は AB 群で Sham 群に比べ有意に増加していた(図 4)。

### 3.5 心臓交感神経求心路除神経の効果

RTX により心臓 TRPV1 除神経を行うと心肥大が抑制された(図 5)。

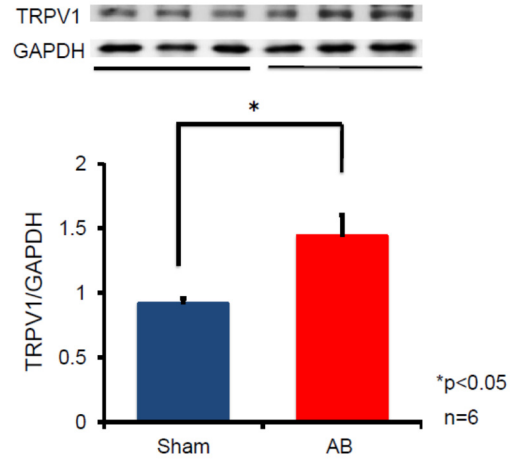


図2 Aortic banding 群で心臓 TRPV1 発現増加

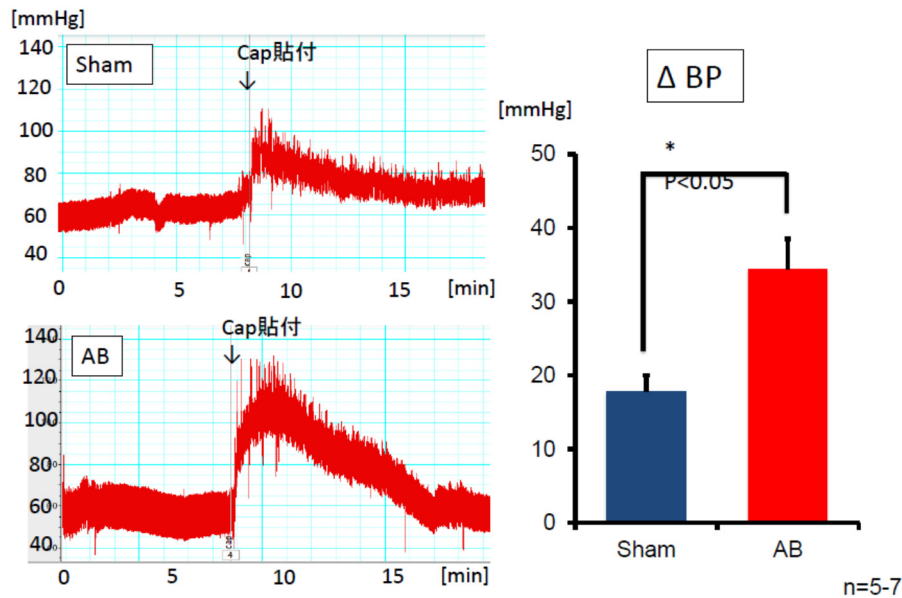


図3 AB 群で TRPV1 刺激による昇圧反応亢進

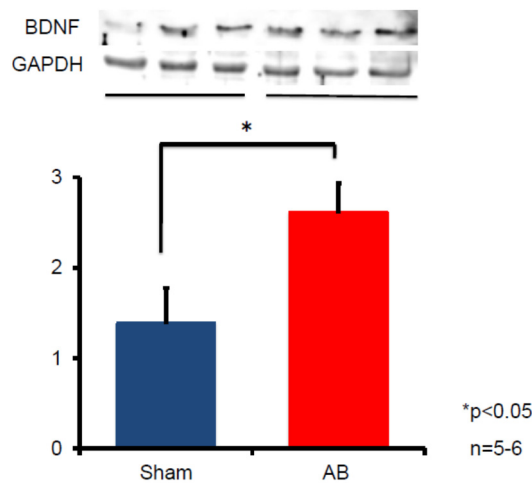


図4 Aortic banding 群で NTS の BDNF 発現増加

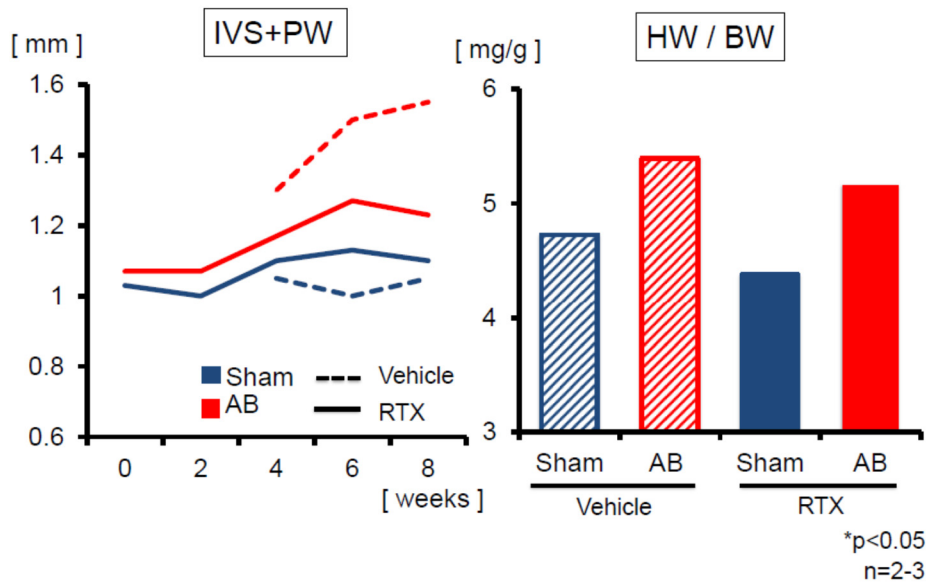


図5 RTX 群で左室壁肥大抑制

### 3. 6 TRPV1 ノックアウトマウスにおける AB による心肥大の経時的観察および脳内 NTS における BDNF 発現の比較

TRPV1 ノックアウトマウスでは大動脈バンディングによる心肥大は有意に抑制されていた(図 6)。心重量増加の程度も抑制されていた。さらに、脳内 NTS における BDNF 発現増加も抑制されていた(図 7)。

## 4. 考 察

本研究では、大動脈バンディングによる圧負荷によって心肥大が形成・進行していく過程において心臓求心性交感神経反射に関わる心臓受容器側の TRPV1 の発現が増加していること、脳内で動脈圧受容器反射の求心神経が最初にシナプスを形成する延髄孤束核(NTS)の BDNF の発現が増加していることを示した。その両者がリンクしていることは、TRPV1 を脱感作しておくことと肥大が抑制されること、TRPV1 ノックアウトマウスでは心肥大進行過程を抑制すること、NTS の BDNF 発現増加が抑制されるという知見によって示すことができた。

本研究の結果は、圧負荷心肥大マウスにおいて CSA 活性が心肥大の進展過程に深く関与していることを示している。この反射経路は心臓内へ分布する TRPV1 を介した求心路から中枢を経て心臓交感神経活性化を生じる。CSA 活性が増加していることは心不全の重要な特徴であることが報告されている<sup>9-11)</sup>。本研究により圧負荷心にお

いてもこの経路の活性化が生じて後負荷増大による代償的反応に加えて心肥大進行に関与していることが考えられる。持続した交感神経活性化は心肥大における非代償性変化に繋がる可能性が考えられる。心臓からの情報を脳の視床下部へ伝え心臓へ交感神経出力増強によって心機能悪化へ通じる。我々は心不全では食塩感受性が増強していること、視床下部における炎症性サイトカインを増加させ ENaCs の活性化が生じることも報告してきた<sup>3-7)</sup>。また、昨年度の先行研究では CSA 刺激が食塩感受性増強を伴い視床下部 ENaC を増加させることを示した<sup>8)</sup>。ENaC の活性化は血中から脳内への Na 移行や視床下部での Na 濃度上昇から神経細胞興奮性増強へつながることが考えられる。Leenen らは視床下部 ENaCs の変化から内因性ウアバインの変化、そして AT1R 活性化を介して交感神経出力が増強することを示している<sup>13)</sup>。したがって、CSA 刺激に食塩増加という環境要因が加わることによって MR の活性化の影響が生じることが示唆される。

心臓求心神経終末における TRPV1 発現増加が圧負荷によって増加し、心肥大進行とリンクしていることは、TRPV1 を心臓側の除神経や TRPV1 ノックアウトマウスにおいて心肥大進行が抑制されることから示唆される。また、本研究の重要な知見として脳内 NTS の BDNF 発現増加と TRPV1 発現が心肥大進行とリンクして変化する点である。BDNF は脳幹部における発現が多いことが NTS における発現と神経活動との関係は報告されている。NTS の神経

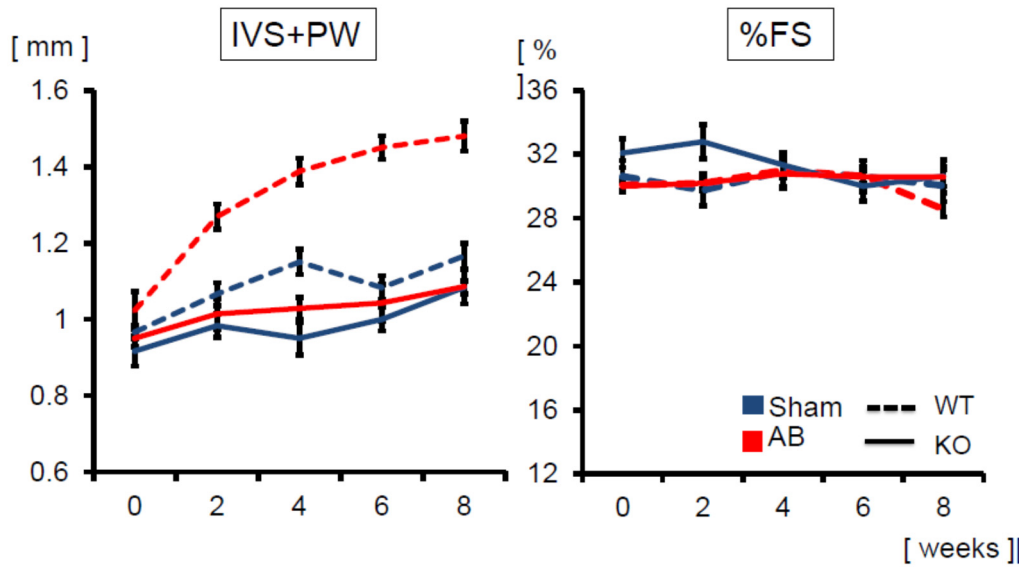


図6 TRPV1-KO で左室壁肥大抑制

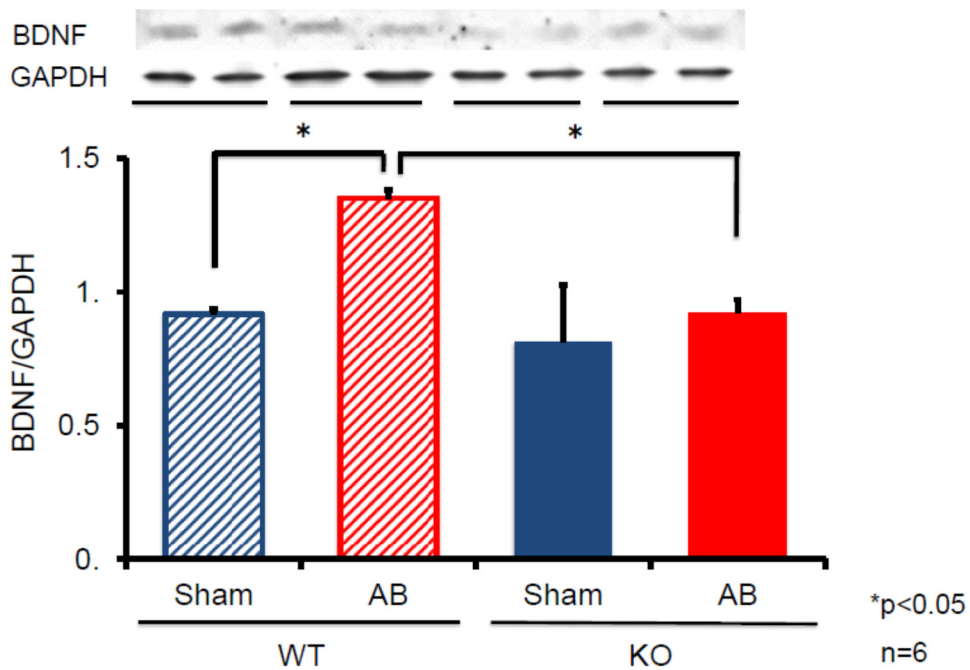


図7 TRPV1-KO で BDNF 発現増加抑制

活動の変化は動脈圧受容器反射機能を変化させる。したがって、我々の観察は TRPV1 の変化が動脈圧受容器反射へ影響していることを強く示唆する。

Capsaicin の効果が TRPV1 に作用して生じたことは先行研究において capsazepine で反応が抑制できたことから明らかである<sup>8)</sup>。また、この反射の経路の重要性は TRPV1

ノックアウトマウスにおける実験で圧負荷による心肥大がかなり抑制されることから強く示唆される。本研究で用いた圧負荷心肥大モデルは食塩感受性を有することは先行研究で示してある<sup>3,4)</sup>。脳と心臓を結びつける要素としては神経性・体液性・細胞性因子がある。食塩感受性増加による交感神経活性化におけるこの仕組みの重要性がわか

れば、何が心臓から脳へ情報を伝え食塩感受性を獲得するのかに関わる機序の解明につながることを期待される。最近、CSA 刺激は不全心において圧・用量曲線へ影響を示すことが報告され、心機能悪化へ影響することが示唆された<sup>14)</sup>。さらに、臓器間情報連関が着目されている中で Heart-Brain Communication を明確に示すこととなり、この経路を介した HFpEF における食塩感受性の重要性と心臓 TRPV1 を標的とした新規治療法の開発につながることを期待される。

## 5. 今後の課題

本研究では動脈圧受容器反射機能を測定するまでには至らなかった。このモデルで覚醒下血圧測定のため頸動脈にテレメトリー送信機を植込むと既に腹部大動脈バンディング手術を加えているため負担が大きいようであった。また、TRPV1 ノックアウトマウスで心内圧の経時的変化がどうであったのかまでは観察できていない。この点も重要であるが手技的に困難である。このモデルにおけるBDNF発現の変化が本当に圧受容器反射機能を変化させるか否かについてもこれからの重要な課題であると考えられる。さらには食塩感受性変化とTRPV1発現との関係も検討を要する。

## 6. 文献など

- 1) Goyal P, Almarzooq ZI, Horn EM, Karas MG, Sobol I, Swaminathan RV, Feldman DN, Minutello RM, Singh HS, Bergman GW, Wong SC, Kim LK. Characteristics of hospitalizations for heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Med* 129: 635e15-636e26, 2016.
- 2) Tshichihashi-Makaya M, Hamaguchi S, Kinugawa S, Yokota T, Goto D, Yokoshiki H, Kato N, Takeshita A, Tsutsui H and for the JCARE-CARD Investigators. *Circ J* 73: 1893-1900, 2009.
- 3) Ito K, Hirooka Y, Sunagawa K. Acquisition of brain Na sensitivity contributes to salt-induced sympathoexcitation and cardiac dysfunction in mice with pressure overload. *Circ Res* 104: 1004-1011, 2009.
- 4) Ito K, Hirooka Y, Sunagawa K. Blockade of mineralocorticoid receptors improves salt-induced left-ventricular systolic dysfunction through attenuation of enhanced sympathetic drive in mice with pressure overload. *J Hypertens* 28: 1449-1458, 2010.
- 5) Nakagaki T, Hirooka Y, Matsukawa R, Nishihara M, Nakano M, Ito K, Hoka S, Sunagawa K. Activation of mineralocorticoid receptors in the rostral ventrolateral medulla is involved in hypertensive mechanisms in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 35: 470-476, 2012.
- 6) Nakano M, Hirooka Y, Matsukawa R, Ito K, Sunagawa K. Mineralocorticoid receptors/epithelial Na<sup>+</sup> channels in the choroid plexus are involved in hypertensive mechanisms in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 36: 277-284, 2013.
- 7) Ito K, Hirooka Y, Nakano M, Honda N, Matsukawa R, Sunagawa K. Role of hypothalamic angiotensin type 1 receptors in pressure overload-induced mineralocorticoid receptor activation and salt-induced sympathoexcitation. *Hypertens Res* 36: 513-519, 2013.
- 8) Ito K, Hirooka Y, Sunagawa K. Corticosterone-activated mineralocorticoid receptor contributes to salt-induced sympathoexcitation in pressure overload mice. *Clin Exp Hypertens* 2014.
- 9) Gao L, Schultz HD, Patel KP, Zucker IH, Wang W. Augmented input from cardiac sympathetic afferents inhibits baroreflex in rats with heart failure. *Hypertension* 45: 1173-1181, 2012.
- 10) Wang HJ, Wang H, Cornish KG, Rozanski GJ, Zucker IH. Cardiac sympathetic afferent denervation attenuates cardiac remodeling and improves cardiovascular dysfunction in rats with heart failure. *Hypertension* 64: 745-755, 2014.
- 11) Wang W, Schultz HD, Ma R. Cardiac sympathetic afferent sensitivity is enhanced in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277: H812-H817, 1999.
- 12) Xu B, Chen WW, Fan ZD, Han Y, Xiong XQ, Gao XY, Zhu GQ. Response of neurons in paraventricular nucleus to activation of cardiac afferents and acute myocardial ischemia in rats. *Exp Physiol* 96: 295-304, 2011.

- 13) Leenen FH, The central role of the brain aldosterone-“ouabain” pathway in salt-sensitive hypertension. *Biochem Biophys Acta* 1802: 1132-1139, 2010.
- 14) Wang H-J, Rozanski GJ, Zucker JH. Cardiac sympathetic afferent reflex control of cardiac function in normal and chronic heart failure states. *J Physiol* 595: 2519-2534, 2017.

## Elucidation of Mechanisms Involved in Acquisition of Salt Sensitivity and Baroreflex Failure in Pressure Overload Via Heart-Brain Communication

Yoshitaka Hirooka, Risa Shibata, Takeshi Iyonaga

Department of Advanced Cardiovascular Regulation and Therapeutics,  
Center for Disruptive Cardiovascular Medicine, Kyushu University

### Summary

Hypertensive heart disease leads to heart failure associated with sympathetic activation. We have previously shown that pressure overload acquires salt sensitivity and that cardiac sympathetic afferent reflex is enhanced via brain inflammation. In the present study, to determine the mechanism involved in the heart and brain communication, we examined expression levels of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in the heart and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the nucleus tractus (NTS) within the brain in mice with pressure overload. In C57BL/6J mice, we performed aortic banding at upper portion of the abdominal aorta. Western blot analysis was performed to examine protein expression levels of TRPV1 and BDNF. At 8 weeks after aortic banding, we found that expression levels of TRPV1 in the heart and BDNF in the NTS of the brain were increased in mice with aortic banding (AB) compared with mice with sham treatment (Sham). Epicardial application of capsaicin was used to stimulate the cardiac afferents, which caused enhanced the pressor response in AB mice compared with Sham mice. In addition, epicardial application of resiniferatoxin (RTX) attenuated the progression of cardiac hypertrophy in AB mice. Furthermore, in TRPV1 knockout mice, the progression of cardiac hypertrophy was markedly attenuated compared with wild type mice associated with the decreased expression level of BDNF in the NTS of the brain. These results suggest that in mice with pressure overload, cardiac TRPV1 stimulation that causes cardiac sympathetic afferent reflex was closely linked with the BDNF expression in the NTS of the brain which plays a key role in the baroreceptor reflex function.