

平成 29 年 9 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19366

研究課題名(和文)心房細動の発症におけるNamt役割の解明

研究課題名(英文)The role of Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Namt) in atrial fibrillation

研究代表者

許 東洙 (XU, DongZhu)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：20616651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、哺乳類における全身性の代謝・老化の制御機構、あるいはメタボリック症候群の発症機序の一つとして、全身性NAD合成系の一つである細胞内・外型nicotinamide phosphoribosyltransferase (iNamt, eNamt)が注目されている。Namt欠損マウスは、高脂肪食の摂取と同様メタボリックシンドローム類似の病態を惹起し、心臓で構造的リモデリングを進行させ、Caハンドリング異常によって電気的リモデリングの進行に影響を与え、心房細動が起こりやすい基質の形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In electrophysiological study, Namt^{+/-} showed increased AF inducibility (80.0% in Namt^{+/-}+ND, 44.0% in Namt^{+/+}+ND, p<0.05) and duration compared to Namt^{+/+}, and HFD accelerated longer duration than ND (15.21±5.75 in Namt^{+/-}+HFD, 8.83±3.33 in Namt^{+/-}+ND, 6.17±2.66 in Namt^{+/+}+HFD, 3.39±1.07 in Namt^{+/+}+ND, p<0.05). There was no significant difference in fibrotic area between all group. The gene and protein expression levels of Namt in the atria were decreased by half in the Namt^{+/-}, and further decreased in Namt^{+/-}+HFD. The gene expression levels of calcium handling-related molecules Ryr2 and Atp2a2 were decreased in Namt^{+/-} compared to those of Namt^{+/+}. These findings suggested that genetic reduction of Namt increased AF inducibility and duration partially through modulating calcium handling pathway without obvious structural alterations.

研究分野：循環器病態

キーワード：心房細動 肥満 Namt カルシウムハンドリング

1. 研究開始当初の背景

心房細動は臨床上もっとも頻度の高い不整脈で、加齢とともに増加し、現在日本で約 100 万人の患者がいると指定される。近年の疫学研究で、高血圧と並んで肥満が重要な危険因子であることが明らかとなったが、肥満が心房細動を惹起するメカニズムに関しては不明な部分が多い。本研究は、肥満における心房リモデリングに、全身性 NAD⁺合成と代謝・老化・寿命制御で重要な補酵素であるニコチンアミド・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(Nampt)が鍵分子として関与し、細胞内・外型 Nampt (iNampt・eNampt))の発現・活性の増加がエネルギー代謝や炎症、カルシウム調節機構に変化をもたらすことで心房細動の起こりやすい基質が形成されているという仮説を立証し、さらにその知見に基づいた心房細動の新たな予防的治療法の開発を目指して計画した。

心房細動は、『メタボリックシンドローム』などを背景にもたらされる生活習慣病と考えられる。メタボリックシンドロームの病態形成において蓄積した脂肪細胞自体が種々の炎症性アディポサイトカインを過剰再生し、マクロファージを始めとした炎症細胞の浸潤を誘導する。その結果、慢性炎症が引き起こされ、糖尿病や高血圧などの病態に深く関与している。多くの疫学研究により、加齢、器質的心疾患、高血圧、糖尿病が心房細動発症の重要な危険因子であることが知られてお

り、近年の研究ではメタボリックシンドロームが重要な危険因子であることが確立されている。大規模な日本人コホートを対象にした我々の疫学調査でも、男性、女性、若年者、高齢者いずれにおいても、body mass index(BMI)が心房細動発症の独立した危険因子であった。また、我々の肥満ラットによる心房細動誘発実験では、肥満ラットは心房細動の誘発率と誘発された心房細動の持続時間が有意に長く、心房有効不応期が有意に短縮していることが判明され、肥満は心房細動発症の重要な危険因子であると同時に、重要な治療ターゲットになりうると考えられる。

2. 研究の目的

近年、哺乳類における全身性の代謝・老化の制御機構、あるいはメタボリック症候群の発症機序の一つとして、全身性 NAD 合成系の一つである細胞内・外型 nicotinamide phosphoribosyltransferase (iNampt, eNampt)が注目されている。Nampt は、炎症誘発性サイトカインであると同時にニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド (NAD) 合成に重要な酵素である。細胞内型 iNampt は細胞内 NAD レベルを維持することで、細胞寿命・ストレス抵抗・代謝調整などの関連酵素の活性を制御する。一方、細胞外型 Nampt(eNampt)は、炎症誘導性アディポカイン、サイトカインおよび成長因子として作用することが明らかになっている。最近 eNampt は内臓脂肪組織より

分泌されることが報告され、II型糖尿病や肥満において血中濃度が上昇することも報告されている。Namptのノックアウトマウスは、インスリンの分泌不全を起こすのに対して Nampt の反応産物である NMN を投与すると、グルコース耐糖能の改善効果を示すことが報告され、NAD 合成系および Nampt が細胞の正常な働きに重要な役割を担っていることが示唆されている。しかし、心房細動の発症と心房細動の起こりやすい基質形成に Nampt が関わっているという報告は今までされてない。我々はこの Nampt に着目し、肥満を含めたメタボリック症候群および高齢者に心房細動が起こりやすくなる機序の一つに、この Nampt が関与しているという仮説のもと、本研究を計画した。

本研究では、高脂肪食動物モデルおよび心臓特異的 Nampt 遺伝子組み換えマウスを用いて、心臓での Nampt の過剰発現が炎症および酸化ストレスによる構造的リモデリング進行と Ca ハンドリング異常などによる電氣的リモデリングの進行にも影響を与え、心房細動が起こりやすい基質の形成に重要な役割を果たすことを証明し、またその分子生物学機序を明らかにする。最後にその機序に基づいた新たな治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) . 肥満モデル動物の作成と *in vivo* の電気生理検査

ヘテロの Nampt 欠損マウス (Nampt^{+/-}) (5 週齢) とその同腹子である (Nampt^{+/+}) を対照群とし、それぞれ高脂肪食群 (HFD) と通常食群 (ND) にわけ、Nampt^{+/+}+ND, Nampt^{+/+}+HFD, Nampt^{+/-}+ND そして Nampt^{+/-}+HFD と 4 群に分けた。8 週間後、13 週齢で体重測定および小動物用 CT にて内臓脂肪量・心外膜周囲脂肪量を評価する。また心エコーにて左心機能や左房径を評価した。次に、経頸静脈的に電極カテーテルを心房に挿入し、電気生理検査と心房細動誘発実験を実施した。心房細動の誘発率・心房細動の持続時間、心房有効不応期などを *in vivo* で測定した。マウス用テレメトリー心電図を装着し、覚醒下での自然発生的な期外収縮や心房細動の発生を記録した。

(2) . 心房における遺伝子・タンパク発現

Nampt タンパクと遺伝子発現、その構成要因である Sirtuin-1 および関連因子である PPAR- γ など、また不整脈の要因であるカルシウム調節関連因子 (RyR、Seraca, phospholamban, L 型カルシウムチャンネル) の遺伝子発現・タンパクの発現・リン酸化の程度を解析。

(3) . 病理組織評価

心房組織の病理切片にて、心筋組織の繊維化・炎症程度を評価。免疫染色でカルシウム関連タンパクの分布の評価。

(4) . 心筋細胞のカルシウムイメージング

通常食・高脂肪食マウスから心房筋を単離し、蛍光カルシウム指示

薬 Flou-4 で染色しカルシウムスパークおよびカルシウムウェーブを解析した。

4 . 研究成果

肥満などメタボリックシンドロームは、動脈硬化を始めとする心血管疾患の最大の危険因子と考えられ、重要な治療ターゲットである。しかし、肥満などのメタボリックシンドロームが心房細動の危険因子であるという認識は近年ようやく明らかになった知見であり、どのような機序によって不整脈に至るか十分に明らかになっていない。さらに最近、心外膜周囲脂肪の体積が心房細動患者で有意に増加しており、心房細動発症に関与している可能性が報告されている。しかしながら、肥満が心房リモデリングにどのように関わっているか十分に明らかになっていない。

本研究では、心房細動の重要な危険因子である『加齢』と『肥満』に共通した鍵分子として最近注目されている Nampt が心房細動の発症に深く関与しており、その分子生物学的発症機序について解明し、心房細動の新たなアップストリーム治療戦略の確立を目指す。

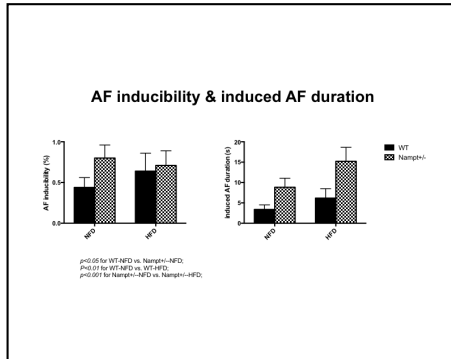
結果；(1) Nampt^{+/-}はその同腹子に比べて心房細動の誘発率と誘発されて心房細動の持続時間が有意に増加した。また、高脂肪食群はそれぞれの通常食群に比べて心房細動の誘発率と誘発されて心房細動の持続時間がさらに有意に増加した。(2) Nampt タンパクと遺伝子発現、その構成要因である Sirtuin-1 および関連因子である

PPAR- γ は Nampt^{+/-}で有意に低下し、高脂肪食投与群ではさらに低下しており、カルシウム調節関連因子 (RyR、Seraca,phospholamban) の遺伝子発現・タンパクの発現も Nampt^{+/-}で有意に低下し、高脂肪食投与群ではさらに低下した。(3) 病理所見では、Nampt は Nampt^{+/-}と高脂肪食投与群で有意に低下を示し、繊維化は有意に増加していた。

(4) 心筋細胞カルシウムイメージングによる解析と 3D マッピングによる心筋 APD、ERP の結果解析は今進行中であり、暫定結果としては Nampt^{+/-}と高脂肪食投与群でカルシウムスパークとカルシウムウェーブが増加を示し、APD、ERP は短縮傾向を示した。

「肥満」・「高齢化」と心房細動がどちらも今後罹患人口の爆発的増加が見込まれる中で、我々の研究は心房細動発症機序の成立阻止や、心房リモデリング軽減のための新しいアップストリーム治療戦略にとることが期待される。

結論；Nampt 欠損マウスは、高脂肪食の摂取と同様メタボリックシンドローム類似の病態を惹起し、心臓で構造的リモデリングを進行させ、Ca ハンドリング異常によって電氣的リモデリングの進行に影響を与え、心房細動が起こりやすい基質の形成に重要な役割を果たすことが示唆された。



5 . 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

Wu AZ, Xu DZ, Yang N, Lin SF, Chen PS, Cala SE, Chen ZH. Phospholamban is concentrated in the nuclear envelope on cardiomyocytes and involved in perinuclear/nuclear calcium handling. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Nov;100:1-8. doi: 10.1016/j.jmcc.2016.09.008. Epub 2016 Sep 15. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

(1) Phospholamban localized nuclear envelope can be phosphorylated to enhance perinuclear calcium uptake and release

DongZhu Xu^{1,2}, Mu Chen^{1,3}, Adonis Z. Wu¹, Shien-Fong Lin^{1,4}, Peng-Sheng Chen¹, Zhenhui Chen¹
¹Krannert Institute of Cardiology, Indiana University, Indianapolis, IN, USA;
²Cardiovascular Division, Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Japan; ³Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China;
⁴National Chiao-Tung University, Hsinchu, Taiwan.

Heart Rhythm 2017 Chicago, USA.
 2017 年 5 月 10 ~ 13 日

(2) Heart Failure
 Re-distributes
 Phospholamban Between
 Nuclear Membranes And
 Sarcoplasmic Reticulum In
 Cardiomyocytes

DongZhu Xu^{1,2}, Mu Chen^{1,3}, Adonis Z. Wu¹, Shien-Fong Lin^{1,4}, Peng-Sheng Chen¹, Zhenhui Chen¹
¹Krannert Institute of Cardiology, Indiana University, Indianapolis, IN, USA;
²Cardiovascular Division, Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Japan; ³Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China;
⁴National Chiao-Tung University, Hsinchu, Taiwan.

Gordon Research Conferences
 2017, Ventura, USA. 2017 年 2 月
 5 日 ~ 10 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

許 東洙 (XU, DongZhu)
 筑波大学 医学医療系 助教
 研究者番号 : 20616651

(2) 研究協力者

(1) Peng-Sheng Chen 教授
 Indiana university Krannert
 institute of Cardiology, USA.
 (2) Zhenhui Chen 准教授
 Indiana university Krannert
 institute of Cardiology, USA.
 (3) 村越 伸行 (Murakoshi,
 Nobuyuki)

筑波大学医学医療系循環器内科 講師