

様 式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19394

研究課題名(和文) 心房細動の発生と心房リモデリングへのヒストン脱アセチル化酵素6の関与

研究課題名(英文) Involvement of histone deacetylase 6 in the inducing of atrial fibrillation and atrial remodeling

研究代表者

松下 尚子 (Matsushita, Naoko)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：30740625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心房細動の発生にヒストン脱アセチル化酵素6(HDAC6)の活性化が関与しているかについて検討した。Non-transgenic(NTG)マウスと比較して心筋細胞特異的活性化型HDAC6過剰発現(HDAC6 active-TG)マウスでは、電氣的左心房高頻度刺激により5分以上持続する心房細動の発生が有意に増加した。またHDAC6 active-TGマウスの心房筋におけるインターロイキン-18のmRNAの発現増加、コネクシン43の細胞外側への分布変化を認めた。これらより、HDAC6の活性化が慢性炎症やコネクシン43分布異常に関与して心房細動発生させている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined roles of histone deacetylase 6 (HDAC6) activation in the induction of atrial fibrillation (AF). Atrial electrical burst pacing (S1S1 = 20-30 msec) for 30 sec significantly increased the frequency of sustained AF induction (lasting more than 5 minutes) in HDAC6 active transgenic (TG) (HDAC6 active-TG) mice compared with non-transgenic (NTG) mice. The mRNA expression of interleukin-18 was increased in HDAC6 active-TG mouse atria compared with NTG mouse atria. Moreover, heterogeneous distribution of connexin43 was observed in HDAC6 active-TG mouse atria but not in NTG mouse atria. The increased interleukin-18 gene expression and changes in connexin43 distribution in atria may play important roles in the HDAC6 activation-induced AF.

研究分野：循環器

キーワード：HDAC6 心房細動 connexin43 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

心房細動は、臨床的に最も頻度の高い頻脈性不整脈であり、近年、高血圧症での慢性的心臓圧負荷による心臓リモデリングが、その発生に重要であることも解ってきている。一方、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)が遺伝子の転写制御において重要な役割を果たす他、心肥大や心臓の線維化を引き起こすこと、HDAC 抑制薬が、慢性的心臓圧負荷によって引き起こされる心肥大を抑制することが報告されている。さらに、現在同定されている11種類 HDAC のうち、HDAC6 の活性化が心房細動による心房リモデリングや心房細動の進行に関与していることが、近年報告された。しかし、心房細動の発生に HDAC6 の活性化が関与しているかどうかについては、わかっていない (図 1 参照)。

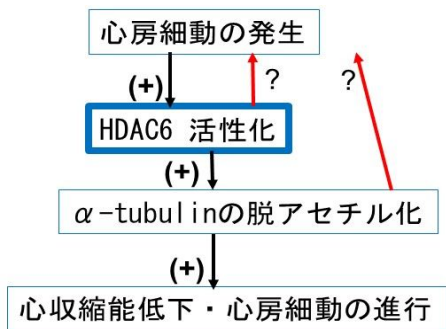


図 1. HDAC6 と心房細動発生の関係

2. 研究の目的

申請者らは、予備実験で活性化 HDAC6 を心臓に過剰発現した HDAC6 active-TG マウスが、左心房高頻度電気刺激による心房細動を高頻度に誘発する結果を得ている。今回の研究では、慢性的心臓圧負荷によって誘発される心房リモデリングと心房細動の発生における HDAC6 の関与とその機序について検討することを目的とする。さらに HDAC6 active-TG マウスで引き起こされる心房細動の機序について検討する。

3. 研究の方法

(1) Non-transgenic (NTG) マウス、HDAC6 active-TG マウス、心筋細胞特異的 dominant-negative HDAC6 過剰発現トランスジェニック (HDAC6-DNTG) マウスを用い、麻酔下に大動脈縮窄術 (TAC) を施行した群と非施行群を作製して、大動脈縮窄術施行の1週間後に体表面心電図の測定と心房細動の発生を各群で比較検討する。また食道からの電氣的左心房高頻度 (S1S1= 20 ミリ秒：30秒間) ペーシングにより5分以上持続する心房細動 (Sustained AF) の発生頻度を検討する。

(図 2 参照)

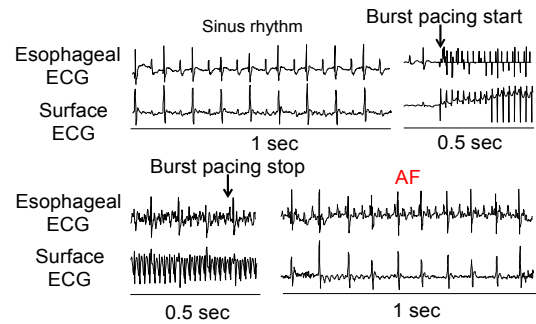


図 2. 電氣的左心房高頻度 (S1S1= 20 ミリ秒：30秒間) ペーシングによる心房細動誘発の典型例

(2) 構造的リモデリングの評価

①H&E 染色により心房筋径を計測する。
②抗-Connexin43 抗体を用いて、心房組織切片の免疫組織染色により、心筋の興奮波伝導に重要な役割を果たす Connexin 43 の空間的分布を検討する。

(3) 炎症性サイトカインの評価

Real time RT-PCR 法を用いた心房組織の各種炎症性サイトカインの mRNA 量を測定する。

4. 研究成果

NTG マウス、HDAC6-DNTG マウスおよび HDAC6 active-TG マウスを用いた TAC 施行マウスにおいては、心房細動の自発発生は認められなかった。電氣的左心房高頻度ペーシングにおいて発生する Sustained AF を検討したところ、HDAC6-DNTG マウスと NTG マウスにおいてはその発生頻度に有意差がなく、慢性的心臓圧負荷において発生する心房細動には HDAC6 が関与していない可能性が示唆された。また TAC 非施行群での電氣的左心房高頻度ペーシングによる心房細動誘発実験では、NTG マウスと比較して、HDAC6 active-TG マウスにおいて有意な心房細動発生頻度の増加が認められ、活性化 HDAC6 の過剰発現が心房細動発生に関与している可能性が示唆された。一方、心電図パラメーターについては、NTG マウスと HDAC6 active-TG マウスで有意な差は認められなかった。(表 1 参照)

Group	P (ms)	PR (ms)	QRS (ms)	QT (ms)	RR (ms)	Sustained AF
NTG	12±1	44±2	14±2	47±5	126±4	2/19
HDAC6 active TG	12±1	42±2	13±2	45±5	151±9	14/24**

表 1. TAC 非施行群における心房細動誘発実験 Sustained AF, 5分以上持続する心房細動

さらに、H&E 染色心房切片で測定した心房径は、NTG マウスと HDAC6 active-TG マウスで有意な差は認めなかった(図 3 参照)。

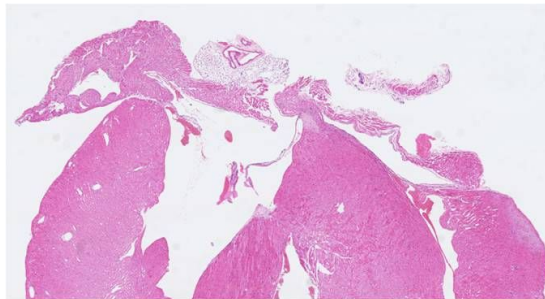


図 3a. HE 染色 NTG マウス

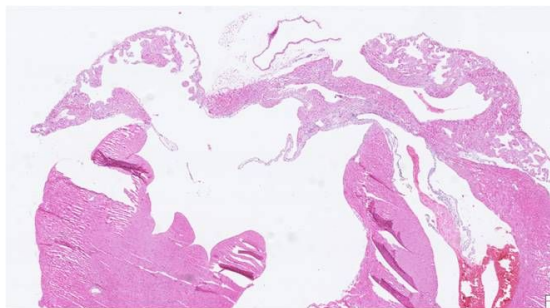


図 3b. HE 染色 HDAC6 active-TG マウス

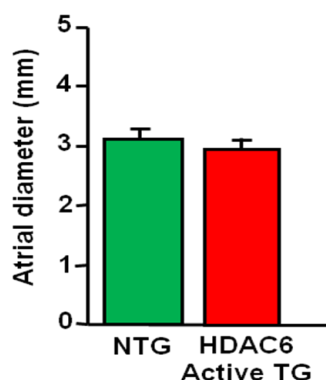


図 3c. 心房径

活性化 HDAC6 の過剰発現が、心房細動発症に関与することが知られている慢性炎症に影響を与えるかについて、real time RT-PCR を用いて炎症性サイトカインの発現を検討した。結果、NTG と比較して HDAC6 active-TG マウス心房では、IL-18 の遺伝子発現が増加していたが、IL-1 β 、IL-6 および

TNF- α については有意な差は認めなかった(図 4 参照)。

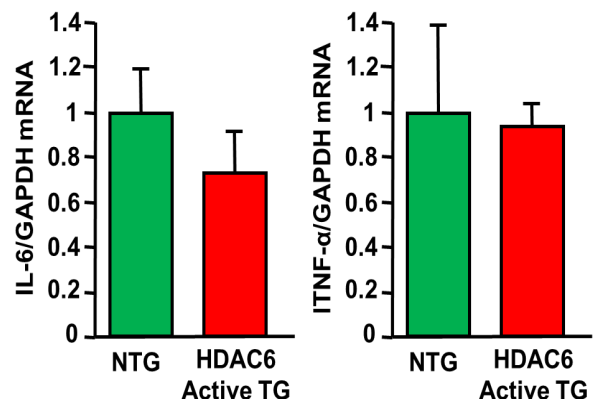
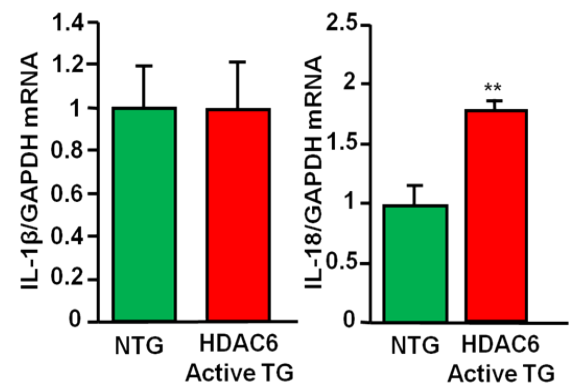


図 4. 炎症性サイトカインの遺伝子発現
IL-1 β , interleukin 1 β ; IL-18, interleukin 18; IL-6, interleukin 6; TNF- α , tumor necrosis factor α

また、活性化 HDAC6 の心房筋における心房細動発症に関与している構造的リモデリングについての評価をおこなうため、HDAC6 active-TG の心房組織切片を作成し、心筋の興奮波伝導において重要な役割をもつ Connexin43 の発現分布について免疫組織学染色を行った。結果、Connexin43 は NTG 心房筋では介在板に多く発現するが、HDAC6 active-TG マウスの心房筋では、介在版以外の心房筋細胞の外側に多く分布している所見が得られた(laterality: 図 5, 6 矢印)。

図 5,6.心房切片の免疫組織染色像

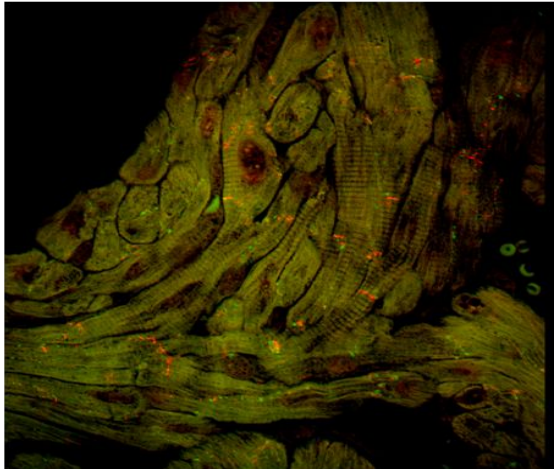


図 5. NTG マウス

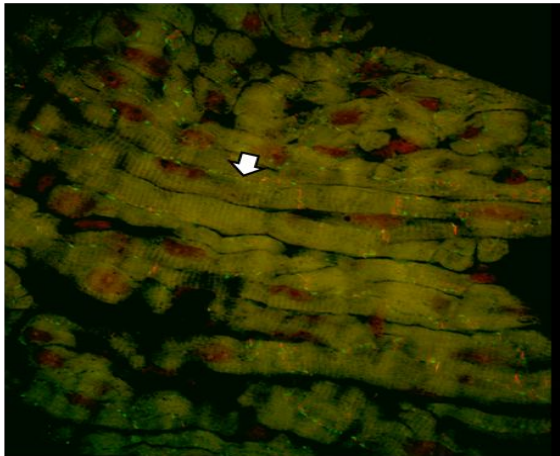


図 6. HDAC6-TG マウス

赤：N-cadherin 緑：Connexin43

これらの結果から、HDAC6 の活性化が心房細動発生における慢性炎症に関与している可能性のほか、connexin43 分布異常に関与しており、また connexin43 分布異常による興奮波伝速度の低下が心房細動の発生に関与している可能性が示唆された。

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)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者名：松下 尚子

発表課題：Chronic HDAC6 activation induces atrial fibrillation in HDAC6 active transgenic mice

学会名：日本循環器学会基礎研究フォーラム
発表年：2018 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 尚子 (Matsushita Naoko)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：30740625