

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2017

課題番号：15KK0330

研究課題名（和文）心房細動の発症におけるNamp1役割の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）The role of Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Namp1) in atrial fibrillation(Fostering Joint International Research)

研究代表者

許 東洙 (XU, DOONGZHU)

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） 11,000,000円

渡航期間： 14ヶ月

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Namp1が注目されている。Namp1欠損マウスは、高脂肪食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るとともに、Caハンドリングに異常による電気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深く関与していることを証明した。

研究成果の概要（英文）：Nicotinamide Phosphoribosyltransferase(Namp1) is a rate-limiting NAD⁺ biosynthetic enzyme known to decrease in adipose tissue of obese and aged rodents and people, Atrial Fibrillation is the most popular arrhythmia in the world and it is highly influenced by the obesity and aging. Namp1^{+/−} mice and high fat diet mice showed increased AF inducibility and increased AF duration time compared to the control group. The mRNA and protein expression of Namp1, Sirt1, ATP2A2, PLN and RYR2 is altered. Conclusion: Namp1 inhibition and high fat diet facilitates AF occurrence and increased induced AF duration by altering calcium handling pathway.

研究分野：循環器内科

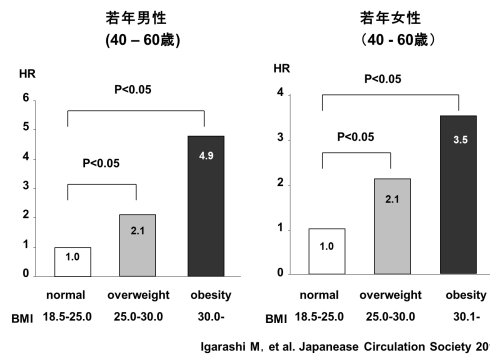
キーワード：心房細動 Namp1 カルシウムハンドリング 肥満 加齢

1. 研究開始当初の背景

心房細動は臨床もっとも頻度の高い不整脈で、加齢とともに増加し、70 歳代の 5%、80 歳代の 10%程度の割合で起こる比較的起こりやすい不整脈である。現在日本国内で約 130 万人の患者がいるとされている。近年の疫学調査研究では、肥満が高血圧と並んで心房細動の発症の重要な危険因子であることが明らかとなっている。しかし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。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、糖尿病など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心房細動発症の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研究でも、男性、女性、若年者、高齢者いずれにおいても Body mass index(BMI)が心房細動の発症の独立した危険因子であることが証明された(図 1)。また、我々の肥満ラットによる心房細動誘発実験では、肥満ラットの心臓で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増加し、心房有効不応期(AERP)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治療ターゲットになり得ると考えられる。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。

図 1. 肥満と心房細動発症リスク



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 Namp1 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 Namp1 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 Namp1 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 Namp1 が関与しているという仮説のもと、本研究を計画した

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 Namp1 欠損マウス(Namp1^{+/-}) (5 週齢)とその同腹子である(Namp1^{+/+})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、Namp1^{+/+}+ND, Namp1^{+/+}+HFD, Namp1^{+/-}+NDそして Namp1^{+/-}+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心房径を評価する。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する。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* で測定する。マウス用テレメトリ心電図を装着し、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する。

(2). 心房における遺伝子・タンパク発現

Namp1 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- α 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する。

(3). 病理組織評価

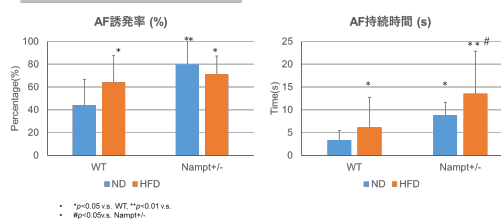
心房組織の病理切片にて、心筋組織の繊維化・炎症程度を評価。免疫染色でカルシウム関連タンパクの分布を評価する。

(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する。

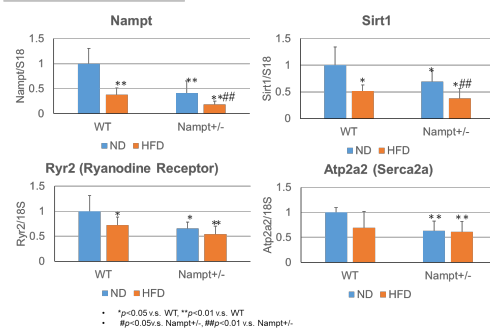
4. 研究成果

図2. 心房細動誘発実験



(1) Namp1^{+/-}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(図2)。

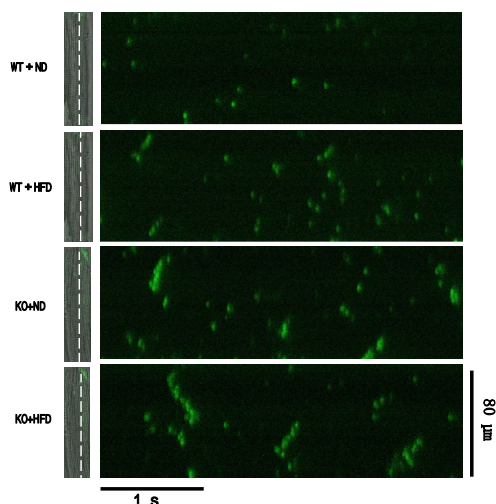
図3. 遺伝子発現



(2) Namp1 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- α は Namp1^{+/-}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 Namp1^{+/-}で有意に低下し、高脂肪食投与群ではさらに低下した(図3)。

(3) 病理所見では、Namp1 は Namp1^{+/-} 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。

図4 . 心房筋カルシウムスパーク



(4) 共焦点顕微鏡による心房筋細胞カルシウムイメージング解析では Namp1^{+/-} マウス心房筋で RyR のカルシウムリークで形成されたカルシウムスパークが有意に増加しており、高脂肪食に摂取によってさらに増加の傾向を示した。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 Namp1^{+/-} 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。

結論 ; Namp1 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。

5 . 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Yin D, Chen M, Yang N, Wu AZ, Xu D, Tsai WC, Yuan Y, Tian Z, Chan YH,

Shen C, Chen Z, Lin SF, Weiss JN, Chen PS and Everett THt.

Role of apamin-sensitive small conductance calcium-activated potassium currents in long-term cardiac memory in rabbits. *Heart rhythm*. 2018 Jan 8. Pii: S1547-5217(18)30016-x. **査読あり**

2. Yin D, Hsieh YC, Tsai WC, Zhi-Yang Wu A, Jiang Z, Chan YH, Xu DZ, Yang N, Shen C, Chen Z, Lin SF, Chen PS, Everett THt. Role of Apamin-Sensitive Calcium-Activated Small-Conductance Potassium Currents on the Mechanisms of Ventricular Fibrillation in Pacing-Induced Failing Rabbit Hearts. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2017;10(2):e004434. **査読あり**

〔学会発表〕(計 4 件)

1. DongZhu Xu, Mu Chen , Adonis Z. Wu, Evangelia Kranias, Shien-Fong Lin, Peng-Sheng Chen, Zhenhui Chen. A Nuclear Pool of Phospholamban in Cardiomyocytes Regulates Nuclear Calcium Cycling Involving Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor The Heart Rhythm Society 's 39th Annual Scientific. Sessions (HRS 2018) Boston, MA, USA. 2008 May.
2. Duo Feng, DongZhu Xu, Murakosi Nobuyuki, Kazuko Tajiri, Taizo Kimura, Akihiko Nogami Kazutaka Aonuma. Namp1 deletion increases the vulnerability of Atrial Fibrillation through altering calcium handling pathway in mice.

- 10th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session (APHRs 2017) YOKOHAMA, JAPAN. 2017 Sept.
3. DongZhu Xu, Mu Chen , Adonis Z. Wu, Shien-Fong Lin, Peng-Sheng Chen, Zhenhui Chen. Phospholamban localized to nuclear envelope can be phosphorylated to enhance perinuclear calcium uptake and release.
The Heart Rhythm Society 's 38th Annual Scientific Sessions (HRS 2017) Chicago, IL, USA. 2017 May
4. DongZhu Xu, Mu Chen , Adonis Z. Wu, Shien-Fong Lin, Peng-Sheng Chen, Zhenhui Chen. Phospholamban modulates perinuclear/nuclear calcium dynamics in cardiomyocytes.
Gorden Research conference 2017 Ventura, USA. 2017 Feb.

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

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

- (1) Peng-Sheng Chen 教授,
Krannert Institute of Cardiology,
Indiana University School of Medicine,
USA.
- (2) Zhenhui Chen 准教授,
Krannert Institute of Cardiology,
Indiana University School of Medicine,
USA.

〔その他の研究協力者〕

村越 伸行 (Murakoshi Nobuyuki)
筑波大学 医学医療系 講師