

令和元年6月15日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05045

研究課題名(和文) 自然発症心室性不整脈突然死モデルマウスの分子生理学的機序の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of spontaneous sudden cardiac death model mouse due to ventricular arrhythmia

研究代表者

青沼 和隆 (Aonuma, Kazutaka)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：10375488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ランダム点突然変異を起こしたマウスライブラリーから見出された遺伝性を有する心室性不整脈による突然死モデルの病態の解明および治療薬のスクリーニングを行った。このマウスは自然発症の心室性期外収縮二段脈や二方向性心室頻拍を呈し、生後1年以内に心臓突然死を認め、カテコラミン誘発性多形性心室頻拍に類似したモデルであった。変異型cDNA発現細胞のカルシウム動態解析では、カルシウム漏出およびカルシウム振動の頻度の増加を認めた。また、化合物ライブラリーのスクリーニングにより、カルシウム動態の改善および不整脈抑制効果が期待できる化合物を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療薬の開発にとって、マウス疾患モデルの開発とその機序の解明は非常に重要である。本研究では遺伝性心室性不整脈および突然死の有力なモデルマウスを確立し、それを用いて心室性不整脈の発症機序を解明したことが学術的意義の一つである。さらにこのモデルを用いて、不整脈を抑制できる新たな化合物を同定したことによって、今後心室性不整脈に対する新たな治療薬の開発に繋がるものと考えられる。本研究成果をもとに、さらに心室性不整脈による心臓突然死の機序の解明が進み、病態に応じた治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the pathophysiology of heritable spontaneous sudden cardiac death model that found among mouse library with random mutations. This murine model exhibited bigeminy ventricular extrasystoles and bidirectional ventricular tachycardia, and developed juvenile sudden cardiac death, similar to patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. The analyses of intracellular calcium dynamics using mutant-type or wild-type cDNA-transfected HEK293 cells showed increased calcium leakage and enhanced calcium oscillation. A promising compound was identified by screening of compound library using cDNA-transfected cells. Further research using this model is expected to provide novel insights into heritable ventricular tachyarrhythmia and sudden cardiac death, and development of novel therapeutic strategies for it.

研究分野：循環器内科

キーワード：不整脈 突然死 遺伝性 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

心臓突然死は日本で年間約7万例発生しており、原因疾患として冠動脈疾患と並んで最も重要なものは心室細動などの心室性不整脈である。心室細動は主に心筋梗塞や心筋症などの器質的心疾患に伴って生じるが、器質的心疾患のない遺伝性不整脈疾患、いわゆるプライマリー不整脈疾患(チャネル病)が心臓突然死の約10~15%で認められ、特に若年者の心臓突然死の原因として非常に重要である。このような不整脈疾患として、QT延長症候群、ブルガダ症候群、早期再分極症候群、カテコラミン感受性多型性心室頻拍(CPVT)などが挙げられる。近年、遺伝性不整脈疾患の診断法・治療法が進歩し、AED (Automated External Defibrillator)の普及や救命救急体制の整備など、心臓突然死の予防対策も進んできている。しかしながら、心室性不整脈による心臓突然死に至るプロセスには自律神経機能やホルモンの変動など、多くの不確定因子が関与しており、心室性不整脈による突然死発生の分子メカニズムは十分に明らかになっておらず、心臓突然死の治療法・予防法は十分に確立したとはいえない。

ヒト疾患の病態の解明や治療法の開発にとって、マウス疾患モデルは非常に有用である。多くの遺伝性疾患は点突然変異により引き起こされるため、ランダム点突然変異マウスライブラリーはヒトの様々な遺伝性疾患を反映した集合体と考えられる。申請者らはランダム点突然変異を起こした7000匹以上のマウスライブラリーに対して、心機能・形態・心臓刺激伝導能を指標に大規模かつ網羅的な *in vivo* スクリーニングを行い、それらの中で遺伝性を有する自然発症による心室性不整脈を有する個体を見出した。このモデルの分子生物学的・病態生理学的機序を明らかにし、化合物スクリーニングを行うことによって、新たな病態の解明と治療法の開発に繋がるのではないかと期待された。

## 2. 研究の目的

本研究は、ランダム点突然変異を起こしたマウスライブラリーから見出された遺伝性を有する自然発症心室性不整脈による新たな心臓突然死モデルの原因遺伝子の解明、心室性不整脈と心臓突然死発症の機序の解明、および化合物ライブラリーのスクリーニングによる有効な治療法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

本モデルマウスに対してQTLマッピング解析を行い、責任遺伝子座を明らかにし、さらにエクソーム次世代シーケンシングにより原因遺伝子変異を同定した。4~6か月齢の自然発症心室性不整脈による心臓突然死モデルマウスに対して、心機能・心形態を調べるために全身麻酔下で心臓超音波検査を行った。次にテレメトリ-送信機を植込み、数日の回復期の後、覚醒下で持続的に心電図を記録し、不整脈を質的・量的に評価した。原因遺伝子のcDNAをクローニングし、人工的に変異型を作成し、野生型cDNAあるいは変異型cDNAをHEK293細胞へ強制発現させ、カルシウム指示薬を添加し、共焦点蛍光顕微鏡でカルシウム動態を可視的に評価した。心臓を摘出し病理学的に評価し、また、不整脈発症・維持に関わるイオンチャネルやコネキシンなどのタンパクの発現を免疫染色で評価した。変異型cDNA(対照として野生型cDNA)をHEK293細胞に導入し、96ウェルプレートに培養した後、カルシウム指示薬を添加し、既知の抗不整脈薬・受容体遮断薬を含めた化合物ライブラリーを添加し、単一細胞レベルにおける蛍光強度の変化をもとに変異型が示す電気生理学的変化を正常化する化合物を探索した。有意な効果を示した候補化合物をマウスに投与し、*in vivo*での有効性を検証した。

## 4. 研究成果

QTLマッピング解析により責任遺伝子座を確定し、さらに、表現型陽性個体および陰性個体のエクソーム次世代シーケンシングを施行し、特定された責任遺伝子座において遺伝性不整脈マウスの原因遺伝子変異を同定した。心エコーでは野生型と比較し軽度の左室収縮機能低下を認めた。テレメトリー心電図では心室性期外収縮二段脈や二方向性心室頻拍を認め(図1)、生後約6~12か月に自然発症の突然死を認め(図2)、カテコラミン誘発性多形性心室頻拍に類似したモデルであった。変異型および野生型cDNAをHEK293細胞に導入し、細胞内カルシウムシグナルを解析したところ、カルシウム漏出およびカルシウム振動の頻度の増加を認め、カルシウム感受性の増大も認められた。変異型および野生型cDNA発現細胞を用いて、化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、カルシウム漏出を抑制する化合物を同定した。同定した化合物を変異マウスに腹腔内投与し、テレメトリー心電図にて心室性不整脈の抑制効果を評価したところ、1種類の化合物で有意な心室性不整脈の抑制が認められた。

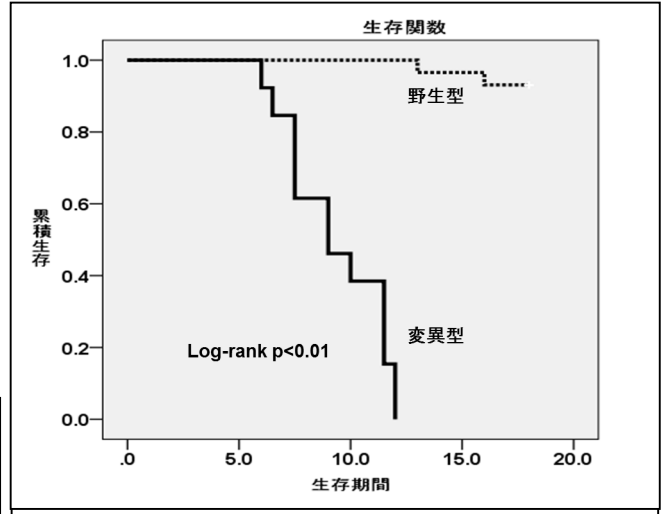
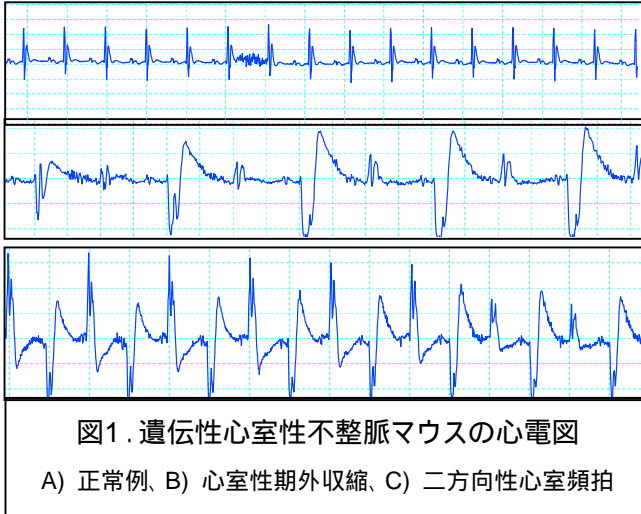


図2. 生存曲線: 遺伝性心室性不整脈マウスは自然発症の不整脈によりほぼ1年以内に突然死した

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：村越 伸行

ローマ字氏名： NOBUYUKI MURAKOSHI

所属研究機関名：国立大学法人筑波大学

部局名：医学医療系 循環器内科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：80447218

研究分担者氏名：入鹿山 容子  
ローマ字氏名：YOKO IRUKAYAMA  
所属研究機関名：国立大学法人筑波大学  
部局名：国際統合睡眠医科学研究機構  
職名：研究員  
研究者番号(8桁)：90312834

研究分担者氏名：呉林 なごみ  
ローマ字氏名：NAGOMI KUREBAYASHI  
所属研究機関名：順天堂大学  
部局名：医学部  
職名：先任准教授  
研究者番号(8桁)：50133335

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。