

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18146

研究課題名(和文)肺静脈心筋への平滑筋・内皮細胞の影響の解明

研究課題名(英文)Effects of smooth muscle and endothelial cells on myocardium in the pulmonary vein

研究代表者

恒岡 弥生 (Tsuneoka, Yayoi)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50734597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：心房細動発生の原因である肺静脈心筋の自発活動に関して調査した。肺静脈より心筋細胞を単離し、Ca²⁺動態を心房筋および心室筋と比較したところ、肺静脈心筋の細胞形態およびCa²⁺の動きは心房筋と類似していることが明らかになった。このことから、肺静脈心筋で自発活動がみられる原因は、細胞のCa²⁺動態にあるのではなくK⁺電流が少ないという心筋そのものの性質を有するために周囲の細胞の影響を受けやすい可能性があることが明らかになった。現在、肺静脈心筋の自発活動が内皮細胞や平滑筋細胞により影響を受けるか、薬理的に調査を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、心房細動に関して、肺静脈の構造という新たな視点から理解が得られる。心房細動は高齢者で罹患率が多い不整脈であり、生活習慣病とも関連が深いため今後も増加すると予想される。合併症の予防に用いられる抗血小板薬には出血のリスクがあり、心房細動そのものに有効な治療法は外科的手術であることを考えると、発症メカニズムの解明と安全かつ体力のない高齢者にも適用可能な新規治療戦略の構築が急がれる。心房細動や肺静脈心筋に対する今までの研究とは異なる新たな視点からの理解によって、上記のような問題の解決に大きく貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the spontaneous activity of pulmonary vein myocardium, which is the cause of the development of atrial fibrillation. Cardiomyocytes were isolated from the pulmonary vein and their Ca²⁺ kinetics were compared with those of atrial and ventricular muscles. The cell morphology and Ca²⁺ movement of the myocardium were found to be similar to that of the atrial muscle. This suggests that the cause of the spontaneous activity in the pulmonary vein myocardium is not due to cellular Ca²⁺ dynamics, but its low K⁺ current, which is the nature of the myocardium itself. We are now investigating whether the spontaneous activity of pulmonary venous myocardium is affected by endothelial cells and smooth muscle cells.

研究分野：薬理学

キーワード：肺静脈

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心房細動は心房が不規則に興奮し、興奮波が無秩序に心室へ伝わることで不整拍動、動悸やめまいが起こる不整脈である。心房細動では心房内において血栓が形成されることがあり、このことは心筋梗塞や脳梗塞など重篤な合併症の原因となる。また、心房細動は発作を繰り返すことで持続的となり、心臓の構造的リモデリング(発現タンパク質が変化し心臓の肥大や心不全の原因となる構造的変化)を惹起する。これらのことから、心房細動は発症早期の治療・対策が必要である。

現在、心房細動の薬物治療においては、合併症による QOL 低下を軽減するために抗血小板薬などが用いられる。また、心房細動そのものに対しては抗不整脈薬が用いられるが、有効かつ安全な治療薬は未だ存在せず、発症メカニズムのさらなる解明と新たな治療ターゲットの探索が求められている。

また、心房細動は高齢者で罹患者が多い不整脈であり、生活習慣病とも関連が深いため今後も増加すると予想される。合併症の予防に用いられる抗血小板薬には出血のリスクがあり、心房細動そのものに有効な治療法は外科的手術であることを考えると、発症メカニズムの解明と安全かつ体力のない高齢者にも適用可能な新規治療戦略の構築が急がれる。

1998年に心房細動開始の引き金となる「異所性の電氣的興奮」の90%が肺静脈で発生していることが報告された(N Engl J Med., 339(10), 659-66, 1998.)。肺静脈は肺循環において肺から心臓に血液を戻す血管であるが、血管壁内部に心房から連続する心筋層が存在している(図1)。心房細動の原因となる「異所性の電氣的興奮」とは、心臓本来のペースメーカー以外で発生する好ましくない自発活動のことであり、肺静脈の心筋層での電氣活動がこれに相当する。肺静脈における異所性の電氣的興奮の実体を解明し、心房細動を合併する病態の肺静脈を調べることが心房細動発症メカニズムのさらなる解明と新たな治療ターゲットの探索につながると考えられる。

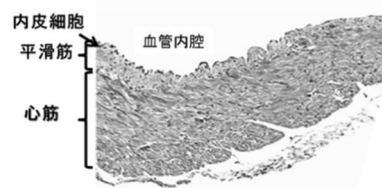


図1 肺静脈の断面図(正常モルモット)

モルモットから肺静脈組織を摘出し電氣活動を調べてみると、心筋層において自発的な電氣的興奮(自発活動)がみられる。隣接する左心房では自発活動は見られず、肺静脈には異所性の電氣的興奮を起こしやすい素地があると言える。これまでの申請者の研究により、自発活動は通常心臓の収縮に使われる筋小胞体からの Ca^{2+} 放出が自発的に起こり、細胞膜のトランスポーター Na^{+}/Ca^{2+} 交換機構を活性化することで発生していることが明らかになった(J Pharmacol Sci., 110(1), 111-6, 2009.)。 Na^{+}/Ca^{2+} 交換機構による刺激は通常心筋で興奮を起こすイオンチャネルよりも弱いものであり、この機構に基づく自発活動は肺静脈に特徴的であり、肺静脈心筋は通常心筋細胞よりも少ない刺激で異所性の電氣的興奮に至りやすい性質を有する可能性が考えられる。

肺静脈の電氣的自発活動を止める薬物は心房細動そのものの発生を止める治療薬となる可能性を有するが、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出や Na^{+}/Ca^{2+} 交換機構は心臓の興奮そのものにも影響するため、治療薬としての有用性に関しては慎重な検討が必要である。安全に使用できる治療薬としては、肺静脈心筋に選択的に作用するものである必要があり、肺静脈の特徴や病態時の組織変化を考慮した治療ターゲットの選択が必要がある。また、肺静脈は、肺静脈心筋だけでなく内皮細胞や平滑筋細胞が存在するという構造的特徴を有しているため、周囲の細胞が心筋細胞に影響を及ぼしている可能性も考える必要がある。

2. 研究の目的

肺静脈心筋の自発活動の発生メカニズムの解明を行う。具体的には、心筋細胞そのものの性質に注目して検討を行う。また、内皮細胞や平滑筋細胞により影響を受けるか調査を行う。これにより肺静脈自発活動の新たな発生メカニズムの解明につながる。

3. 研究の方法

病理化学的手法、分子生物学的手法、薬理学的的手法、ガラス微小電極法、パッチクランプ法、高速 Ca^{2+} イメージング法による細胞内 Ca^{2+} の測定、

4. 研究成果

(1) モルモット肺静脈組織標本にガラス微小電極を刺入すると、約30%の標本において、自発的な電氣的活動がみられた。自発活動のない標本では、静止膜電位は左心房よりも深かった。テルティアピン(アセチルコリン感受性 K^{+} 電流: I_{K-ACh} 遮断薬)は、肺静脈では静止膜電位を脱分極させ自動電氣活動を誘発導したが、心房筋では誘発しなかった。一方で、自発活動はアセチルコリン感受性 K^{+} 電流を活性化するカルバコールやBAPTAによる細胞内 Ca^{2+} のキレート化によっても抑制された。パッチクランプ法により静止膜電位付近で流れる K^{+} 電流を測定したところ、肺静脈心筋細胞は、心房筋細胞と同程度の I_{K-ACh} 密度を有していたが、内向き整流性 K^{+} 電流 (I_{K1}) の密度は低かった。次に自発活動の発生に関わる細胞内 Ca^{2+} 動態を観察した。肺静脈心筋細胞の Ca^{2+} transient(活動電位に伴う Ca^{2+} の動き)はテルティアピンによって誘発され、カルバコ

ールによって抑制された。活動電位を伴わない Ca^{2+} の動きである Ca^{2+} wave に対してもカルバコールは抑制作用を示した。これらの結果は、肺静脈心筋細胞は内向き整流性 K^+ 電流密度が低下しており、それが細胞内 Ca^{2+} 依存性の自発活動の発生を許容していることを示している。

肺静脈心筋の自動活動にアドレナリン受容体が関与しているか調査したところ、アドレナリン受容体刺激薬であるメトキサミン、アドレナリン受容体刺激薬であるイソプレナリンで自発活動が誘発または発火頻度の上昇が確認された。この時、最大弛緩期電位の脱分極側または過分極側への変化が認められた。心房筋では自発活動の誘発は認められなかった。アドレナリン受容体刺激により誘発された自発活動には L 型 Ca^{2+} チャネルや遅延整流性 K^+ チャネル、トランスポーター等への作用等が考えられるが、 K^+ 電流への作用も否定できない。また、肺静脈心筋細胞は内向き整流性 K^+ 電流密度が低いという特徴を有しているため、これがアドレナリン受容体刺激による自発活動の発生に繋がっている可能性が考えられる。

(2) モルモット肺静脈から心筋細胞を単離し、隣接する心房筋や心室筋と細胞形態および細胞内 Ca^{2+} 動態を比較した。肺静脈心筋細胞には筋小胞体が豊富に存在しており、その量や分布は心房筋や心室筋と比較して違いは見られなかった。一方で、細胞膜が陥入してできる横行小管は、心室筋細胞では細胞中心部まで形成されていたが肺静脈心筋には存在しなかった。 Ca^{2+} transient (活動電位が発生する際にみられる Ca^{2+} の動き) で起こる Ca^{2+} 濃度上昇は、心室筋では細胞膜直下でも細胞内部でも同時にみられたが、心房筋や肺静脈心筋では最初に細胞膜直下で起こり、その後細胞内部に広がった。 Ca^{2+} wave や Ca^{2+} spark (活動電位を伴わない細胞内局所でみられる Ca^{2+} の動き) は、心室筋、心房筋、肺静脈心筋のすべてで観察されたが、肺静脈心筋では Ca^{2+} spark に続いて Ca^{2+} transient が発生する現象が観察された。このことから、T 管を持たないモルモット肺静脈心筋細胞では、 Ca^{2+} の伝播は心房筋細胞と類似していることが確認された。また、肺静脈心筋細胞の自発的な Ca^{2+} 濃度上昇には、 Ca^{2+} spark が関与していることも確認できた。

(3) マウス肺静脈心筋の自発活動に対し、心筋には作用せず平滑筋や内皮細胞に選択的に作用を示す薬物を用いて評価を行った。現在、平滑筋の心筋に対する影響は、平滑筋にのみ存在する Ca^{2+} 依存的に開口する K^+ チャネルに注目し、イベリオトキシン等の薬物による評価、内皮細胞の心筋に対する影響は、内皮型一酸化窒素合成酵素 eNOS に注目して L- NIO 等の薬物により評価を行っている。

(4) その他、血管の周囲に存在する組織として、血管毒性を示す有害金属を用いて血管周囲脂肪組織への影響に関して調査した。かつて血管周囲脂肪組織は単なる血管の支持組織にすぎないと考えられてきたが、最近では PVAT を除去した血管は、PVAT が付いたままの血管と比べ、アドレナリンや電気刺激などの収縮刺激への反応性が減弱することなどから血管の収縮および弛緩機能に影響を及ぼすことが明らかになっている。カドミウムや砒素は血管毒性を有し、長期曝露により高血圧や動脈硬化等のリスクを上昇させる。これら有害金属が血管周囲脂肪組織に及ぼす影響を調査した。その結果、投与直後にはメタロチオネインや heme oxygenase-1 (HO-1) 等の生体防御因子の発現を増加させることや、炎症性サイトカインに作用することが確認されている。なお、濃度・期間など曝露条件により影響は様々であると思われるので、さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Iyuki Namekata, Yusuke Tanaka, Tamano Ohmori, Yayoi Tsuneoka, Shogo Hamaguchi, Hikaru Tanaka	4. 巻 26
2. 論文標題 Cell Morphology and Early-phase Ca ²⁺ Transients of Guinea-Pig Pulmonary Vein Cardiomyocytes Compared with Atrial and Ventricular Cardiomyocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 bioimages	6. 最初と最後の頁 21-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.11169/bioimages.27.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yayoi Tsuneoka, Masahiko Irie, Yusuke Tanaka, Takahiko Sugimoto, Yuka Kobayashi, Taichi Kusakabe, Keisuke Kato, Shogo Hamaguchi, Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka	4. 巻 133
2. 論文標題 Permissive role of reduced inwardly-rectifying potassium current density in the automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 1.95E+204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2016.12.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masahiko Irie, Yayoi Tsuneoka, Mariko Shimobayashi, Nao Hasegawa, Yusuke Tanaka, Soh Mochizuki, Sho Ichige, Shogo Hamaguchi, Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka	4. 巻 133
2. 論文標題 Involvement of alpha- and beta-adrenoceptors in the automaticity of the isolated guinea pig pulmonary vein myocardium	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 2.47E+255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2017.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中悠介、入江雅彦、恒岡弥生、濱口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 肺静脈心筋自動能に与える生理活性物質の影響
3. 学会等名 第19回応用薬理シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 恒岡弥生, 阿久井悠樹, 富田幸一朗, 高橋勉, 篠田陽, 藤原泰之
2. 発表標題 マウス血管組織のメタロチオネイン遺伝子発現に対するカドミウムと亜鉛の影響
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 恒岡弥生, 阿久井悠樹, 富田幸一朗, 高橋勉, 篠田陽, 藤原泰之
2. 発表標題 血管周囲脂肪組織におけるカドミウムによるメタロチオネインの誘導.
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----