

平成 21 年 3 月 6 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18590788

研究課題名（和文） イオンチャネル再生療法による心不全制御の実験的研究

研究課題名（英文） The study of resuscitation of down-regulated ion-channels as a novel therapy for ventricular dysfunction.

研究代表者

庭野 慎一 (NIWANO SHINICHI)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：70282978

研究成果の概要：本研究は、不全心筋がイオンチャネルの発現低下による活動電位延長と Ca^{2+} 過負荷による心筋傷害の悪循環に陥っていることに着目し、発現の低下したイオンチャネルの再生によって心不全を制御できるか否かを検討することを目的とした。心不全モデルとしては Lewis ラットにブタ心筋ミオシンを感作させて作成する自己免疫性心筋炎ラット(EAM)を用い、その急性期(感作後 14-21 日)に一過性外向き K^{+} チャネル(Ito)の発現低下を主機序とする活動電位延長が起こっていることを確認した。予備研究として、活動電位を短縮する薬物(K_{ATP} チャネル開口薬:ニコランジル・メキシレチン)の投与実験を行い、急性期の活動電位短縮と慢性期の心機能改善を確認した。Ito 遺伝子(Kv4.2, KChiP2)導入のためのプラスミド(ベクターは pIRES-hrGFP-1a)を作成し、NIH3T3 細胞、oocyte への Ito チャネルの transfect を確認できたが、Gene-gun によるラット心筋表面への打ち込みでは十分なチャネル発現を得ることが出来ず、心筋の活動電位を変化させるには至らなかった。予備研究において、急性期の活動電位を修飾することで心不全を治療する可能性を示すことが出来たが、Gene-gun による遺伝子移入には限界があり、今後はチャネルを transfect した細胞の移植など、チャネル再生のための新たな方法論を検討する必要があると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	480,000	3,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心筋炎, 電気的リモデリング, 酸化ストレス, イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

心不全に陥っている病的不全心筋では、イオンチャネル発現様式が変化するため活動電位が延長している。この様な変化は電気的リモデリングとして理解され、不全心筋にお

ける不整脈発生に関与していると考えられる。一方、活動電位の延長によって生ずる細胞内 Ca^{2+} 過負荷は、ミトコンドリアやゴルジ体など細胞内構造の機能を低下させ、細胞障害を引き起こす。結果的に細胞変性、アポト

ーシス、間質線維化などの構造的リモデリングが発生し、心不全がさらに悪化する。この様に、不全心筋においては電気的リモデリングと構造的リモデリングが悪循環を形成していると考えられる。この活動電位の変化は、主として一過性外向き K⁺チャンネル(Ito)の down-regulation によることが明らかにされており、このチャンネルを再生することが出来れば、心不全におけるリモデリングの悪循環を断ち切り、心機能の改善が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、発現の低下した Ito チャンネルの再生によって心不全を制御できるか否かを検討することを目的とした。すなわち、down-regulate した Ito チャンネルを遺伝子導入し、心筋細胞に発現させることで、延長した活動電位を正常化することで、心不全モデルの心機能が改善するか否かを検討した。

3. 研究の方法

本研究では、心不全モデルとして Lewis ラットにブタ心筋ミオシンを感作させて作成する自己免疫性心筋炎ラット(EAM)を用いた。本モデルは、感作後急性期(14-21日)に急性心筋炎と心不全を呈し、慢性期(35-60日)には拡張型心筋症様の慢性心不全を呈するモデルである。我々の先行研究によって、本モデルでは左心収縮能の低下とともに活動電位の延長が起こり、その背景として Ito チャンネル遺伝子(Kv4.2, KChIP2)の発現が down-regulate していることが明らかとなっている(Wakisaka et al. *Cardiovasc Res*, 2004)。本研究では、活動電位の延長、すなわち Ito チャンネルの down-regulation が明瞭になる超急性期(10-14日)に遺伝子導入を行うことを目標とした。

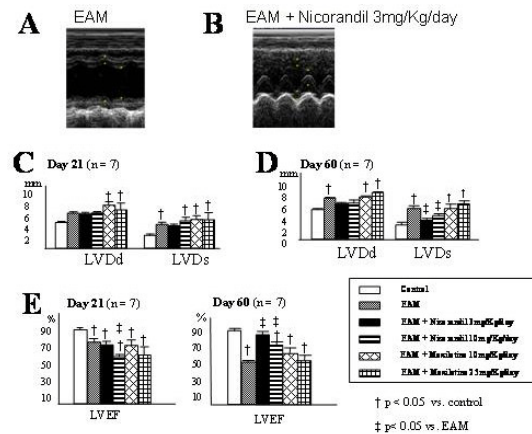
- 1) 基礎薬物実験-薬物による活動電位修飾の影響の検討: 基礎実験として、EAMの超急性期(10-14日)から、メキシレチン(25mg/kg/day, 細胞膜 K-ATP チャンネル開口作用あり)、またはニコランジル(10mg/kg/day, ミトコンドリア K-ATP チャンネル開口作用あり)を投与し、慢性期(60日)に心機能の評価を行った。
- 2) Ito 遺伝子導入のためのベクター作成: 正常 Lewis ラット心筋より、Kv4.2 と KChIP2 遺伝子の全長をクローニングし、GFP 遺伝子を併せ持つ pIRES-hrGFP-1a を発現ベクターとしてこれらを挿入する。遺伝子発現性を確認するため、NIH3T3 細胞へ transfect し、GFP 蛍光発色と RT-PCR 法により Ito 遺伝子の発現を確認する。またチャンネル機能を確認するため、oocyte へ transfect し、パッチクランプ

法で Ito チャンネルの機能を確認する。

- 3) Lewis ラット心筋への遺伝子導入: 上記ベクターによる in vivo での遺伝子導入を確認するため、コントロール(遺伝子未挿入)の pIRES-hrGFP と Ito 遺伝子を挿入したベクターを各々金粒子にコーティングし、麻酔側開胸した正常ラット心室表面に Gene-gun でこれを打ち込む。心筋内の遺伝子発現は、蛍光発色及び心筋活動電位の変化によって評価する。
- 4) EAM ラットへの遺伝子導入による心機能修飾の検討: EAM 超急性期(感作後 10 日)に、ラットを麻酔側開胸し、Sham 群としてコーティングしない金粒子、コントロールとして GFP 遺伝子のみのベクターの金粒子、Ito 遺伝子を挿入したベクターの金粒子を各々打ち込み、急性期(感作後 21 日)および慢性期(感作後 60 日)のラットの心機能および活動電位、イオンチャンネル遺伝子発現を評価する。

4. 研究成果

- 1) 基礎薬物実験-薬物による活動電位修飾の影響の検討: EAM では、急性期の活動電位延長と心機能低下、慢性期における心室拡張と心機能低下を認めた。メキシレチン投与群では、急性期に活動電位の短縮を認め、心機能は若干低下(有意差なし)を認めたが、慢性期においては心機能が有意に改善していた(下図参照)。



ニコランジル投与群では急性期の活動電位、心機能共に変化は認められなかったが、慢性期に有意に心機能が改善していた。ニコランジルの作用は、ミトコンドリアの Ca²⁺過負荷による心筋保護作用によると考えられた。メキシレチンは急性期に心筋活動電位を短縮することにより、急性期の Ca²⁺過負荷を抑制し、慢性期の心機能を保持する pre-conditioning 作用を示したものと考えられた。

- 2) Ito 遺伝子導入のためのベクター作成 : Kv4.2 と KChIP2 遺伝子を挿入したベクター(pIRES-hrGFP)により、NIH3T3 細胞および oocyte への transfect が確認できた(図 2&3 参照)。

図2

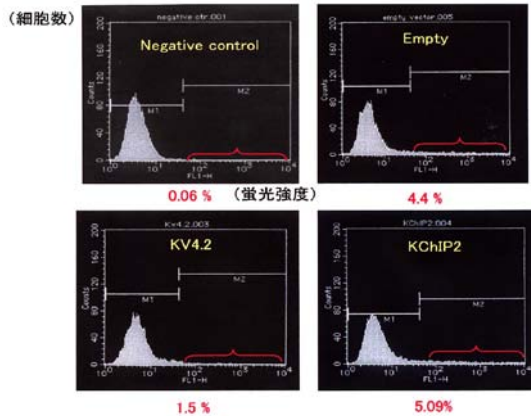
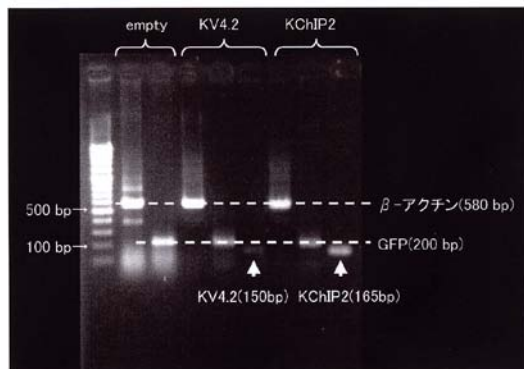


図3



- 3) Lewis ラット心筋への遺伝子導入 : 上記と同一のベクターを用い、in vivo での遺伝子導入を試みたが、Gene-gun による心筋表面への打ち込みではわずかな蛍光発色を認めるものの、十分なチャネル発現を得ることが出来ず、心筋の活動電位を変化させるには至らなかった。ベクターのコーティング量を数倍レベルに増加しても結果は同様であり、Ito 遺伝子導入において、Gene-gun という手法には限界があるものと推定された。今後はチャネルを transfect した細胞の移植など、チャネル再生のための新たな方法論を検討する必要があると考えられた。なお、in vivo での十分な遺伝子導入が実現できなかったため、プロトコル 4 の実施は本研究においては断念した。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

- 1) Yoshida T, Niwano S, Niwano H, Imaki R, Satoh D, Masaki Y, Nakazato K, Soma K, Izumi T. Atrial natriuretic peptide (ANP) suppresses acute atrial electrical remodeling in the canine rapid atrial stimulation model. *Int J Cardiol.* 123, 147-154(2008). 査読有
- 2) Niwano S, Fukaya H, Yuge M, Imaki R, Hirasawa S, Sasaki T, Yumoto Y, Inomata T, Izumi T. Role of the Electrophysiologic Study (EPS)-Guided Preventive Therapy for the Management of Ventricular Tachyarrhythmias in Patients with Heart Failure. *Circ J* 72, 268-273(2008). 査読有
- 3) Fukaya H, Niwano S, Satoh D, Masaki Y, Niwano H, Kojima J, Moriguchi M, Izumi T. Inhomogenic effect of bepridil on atrial electrical remodeling in a canine rapid atrial stimulation model. *Circ J* 72, 318-326(2008). 査読有
- 4) Imaki R, Niwano S, Niwano H, Satoh D, Yoshida T, Masaki Y, Izumi T. Neutral endopeptidase inhibitor suppresses the early phase of atrial electrical remodeling in a canine rapid atrial pacing model. *Indian Pacing Electrophysiol J.* Apr 1;8(2), 102-13(2008). 査読有
- 5) Hirasawa S, Niwano S, Kishihara J, Kiryu M, Imaki R, Izumi T. Effect of nifekalant on refractory life-threatening ventricular arrhythmias in patients with cardiopulmonary resuscitation or during the perioperative state. *J Arrhythmia* 24, 141-148(2008). 査読有
- 6) Shimizu A, Nitta T, Imai K, Kurita T, Kobayashi Y, Niwano S, Watanabe S, Soejima K, Abe H. ICD Therapy for Idiopathic Ventricular Fibrillation in Japan -The ICD-Web Registry administered by the Japanese Heart Rhythm Society. *J Arrhythmia* 24, 133-140(2008). 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- 1) Niwano S, Sasaki S, Niwano H, Fukaya H, Izumi T. Radical scavengers prevent the development of electrical remodeling in myocarditis model by suppressing reactive oxygen species (ROS). JMCC 45, S4-S5(2008). 国際心臓研究学会, 2008 年 12 月, 横浜.
- 2) Fukaya H, Niwano S, Niwano H, Masaki M, Kiryu M, Sato D, Moriguchi M, Izumi T. Angiotensin II receptor blocker suppresses

- the Oxydative Stress, Tissue Inflammation, and Atrial Electrical Remodeling in the Canine Experimental Model. JMCC 45, S13(2008). 国際心臓研究学会, 2008年12月, 横浜.
- 3) Kiryu M, Niwano S, Kishihara J, Imaki R, Hirasawa S, Izumi T. Effect of nifekalant on refractory life-threatening ventricular arrhythmia in patients with cardiac pulmonary resuscitation or perioperative state. JMCC 45, S14(2008). 国際心臓研究学会, 2008年12月, 横浜.
 - 4) Fukaya H, Niwano S, Niwano H, Masaki Y, Kiryu M, Kurokawa S, Hatakeyama Y, Yumoto Y, Moriguchi M, Izumi T. Angiotensin II Receptor Blocker Suppresses the Electrical and Structural Remodeling through the Suppression of Oxidative Stress and Inflammation in the Canine Atrial Fibrillation Model. Eur Heart J 29, 473s(2008). 欧州心臓病学会, 2008年9月, ドイツ.
 - 5) Niwano S, Sasaki S, Niwano H, Kurokawa S, Fukaya H, Izumi T. The importance of the phase of administration of radical scavenger to prevent the electrical and structural remodeling in rat experimental autoimmune myocarditis. Eur Heart J 29, 372s(2008). 欧州心臓病学会, 2008年9月, ドイツ.
 - 6) Niwano S, Sasaki T, Kurokawa S, Fukaya H, Hatakeyama Y, Yumoto Y, Niwano H, Izumi T. Spectral Analysis of the Fibrillation Waves in Body Surface ECG can Predict the Effects of Antiarrhythmic Agents for Atrial Fibrillation. Circ J 72, suppl I-451(2008). 日本循環器学会, 2008年3月, 福岡.
 - 7) Niwano S, Fukaya H, Kurokawa S, Hatakeyama Y, Yumoto Y, Moriguchi M, Niwano H, Izumi T. Long-term Prognosis of the Patients with Frequent Type of Ventricular Arrhythmias Originating from the Right Ventricular Outflow Tract (RVOT). Circ J 72, suppl I-562-563(2008). 日本循環器学会, 2008年3月, 福岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庭野 慎一 (NIWANO SHINICHI)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：70282978

(2) 研究分担者

庭野 裕恵 (NIWANO HIROE)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：00293233