

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15706

研究課題名（和文）川崎病モデルマウスを用いた心筋炎に伴う不整脈発生の機序の解明

研究課題名（英文）The mechanism of arrhythmogenesis associated with myocarditis using a mouse model of Kawasaki disease

研究代表者

星野 真介 (hoshino, shinsuke)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：70747576

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：FK565投与後の心機能を経時的に測定したところ、投与後1週間より心機能は低下し、投与後3ヶ月間後より徐々に改善した。モデルマウスでは心耳に異常興奮領域を認め、活動電位の延長を認めた。単離した心筋細胞で、パッチクランプ法を用いてL型Ca²⁺電流を測定したところ、有意に低下していた。カフェインにより誘発されたCa²⁺ transientの減衰時間は増加しており、NCXの機能低下が示唆された。これらの結果からFK565投与によりL型Ca²⁺電流の低下、Ca²⁺ transientの低下により、SERCAおよびNCXがダウンレギュレートし、心機能が低下することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、心筋炎によって惹起される致死性不整脈のメカニズムをイオンチャネルレベルで明らかにし、心筋炎時に抗不整脈薬に対する感受性がどのように変化するかを追求することを目的とし、研究を行った。心筋炎によって惹起される致死的不整脈の背景となる電気生理学的メカニズムは不明な点も多く、小児領域では使用できる薬剤も限られており、本研究により治療法や予防法の考察に貢献できたと考えている。

研究成果の概要（英文）：We measured cardiac function over time after FK565 administration, cardiac function decreased from 1 week after administration and gradually improved from 3 months after administration. In this model mice, abnormal excitatory regions were observed in the atrium appendage and action potential prolongation was observed. In isolated cardiomyocytes, L-type Ca²⁺ current was measured using the patch clamp method, and was significantly decreased. The decay time of Ca²⁺ transient induced by caffeine was increased, suggesting that NCX function was impaired. These results suggested that FK565 treatment decreased L-type Ca²⁺ current and Ca²⁺ transient, which downregulated SERCA and NCX, resulting in impaired cardiac function.

研究分野：小児循環器

キーワード：川崎病 モデルマウス 心筋炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋の収縮機能の調節に関わる細胞質内 Ca^{2+} は、様々な Ca^{2+} 輸送タンパクによってその細胞内濃度が調節されている。形質膜の L 型 Ca^{2+} チャンネル ($I_{\text{Ca,L}}$) や T 型 Ca^{2+} チャンネル ($I_{\text{Ca,T}}$)、筋小胞体膜の Ca^{2+} 放出チャンネル (リアノジン受容体、RyR2) の活性化は、細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させる。しかし、感染に伴う炎症や血管病変に伴う後負荷の増大により、心筋細胞内の Ca^{2+} 調整機構が破綻すると、不規則な収縮が発生したり、過度に収縮力が増強するため、高血圧や不整脈の原因となる。

川崎病のように中小血管に血管炎をきたす疾患でも、心筋炎を合併することが知られている。中には劇症型心筋炎を呈し、致死性不整脈から死に至るケースも少なくない。しかし、心筋炎によって惹起される致死的不整脈の背景となる電気生理学的メカニズムは十分に解明されていない。

現在知られている川崎病モデルマウスの作成には、パターン認識受容体である Nod (nucleotide-binding oligomerization domain) のリガンドである FK565 がよく使用されており、心筋炎のモデルマウスとしても有用である。Nod にリガンドが結合することで、炎症を惹起する NF- κ B が活性化することが知られている。

臨床の場において心筋炎に罹患時には、種々の薬剤に対する感受性が異なることが知られている。刺激伝導系に炎症が波及することにより致死性不整脈を生じるが、電気生理学的なモデリングがその一因と考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、心筋炎によって惹起される致死性不整脈のメカニズムをイオンチャンネルレベルで明らかにし、心筋炎時に抗不整脈薬に対する感受性がどのように変化するかを追求することを目的とした。

3. 研究の方法

川崎病モデルマウスを用いて、以下の方法で血管炎と心筋炎の程度を観察した。

心臓超音波、表皮心電図を用いて非観血的に不整脈および心機能評価を行った。

$I_{\text{Ca,L}}$ 、RyR2、SERCA2 の発現量をタンパクレベルで定量的に解析した。

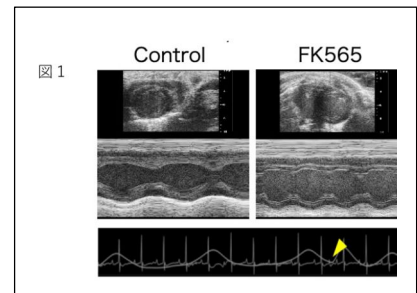
パッチクランプ法を用いて、 $I_{\text{Ca,L}}$ の L 型 Ca^{2+} チャンネル遮断薬による抑制作用を調べる。詳細な方法は以下の通りである。

- (A) 川崎病モデルマウスは Motomura ら (2015) の方法を用いて作成した。
- (B) さらにこのモデルマウスを用いて、以下の方法で血管炎と心筋炎の程度を観察した。
 - a) H/E 染色およびエラスチン / コラーゲン染色を行い、病理組織学的検査を行った。
 - b) 小動物用超音波装置を用いた心機能の解析
 - c) 表皮心電図を用いた不整脈の評価
 - d) 血液検査で炎症の程度の確認
 - e) マウスから心臓を取り出し、ランゲンドルフ灌流法により酵素 (コラゲナーゼ) 処理を行い、心室筋細胞を単離する。単離した心室筋細胞を用いてパッチクランプ法により $I_{\text{Ca,L}}$ の電流密度、電気生理学的特性の検討をおこなった。
 - g) さらに $I_{\text{Ca,L}}$ の L 型 Ca^{2+} チャンネル遮断薬による抑制作用を調べた。薬剤としては、 $I_{\text{Ca,L}}$ に対しては、臨床で用いられているジヒドロピリジン系化合物、ベンゾジアゼピン系化合物、

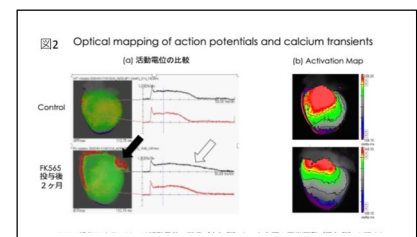
フェニルアルキルアミン系化合物を用い、心筋炎時の $I_{Ca,L}$ の電気生理学的特性や臨床使用薬に対する感受性の変化の検討をおこなった。

4. 研究成果

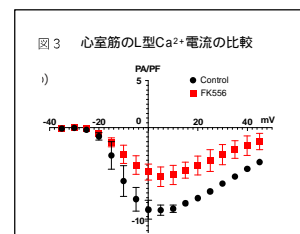
我々は、生直後(生後 24 時間以内)のマウス心臓にランゲンドルフ灌流法(生理的心臓灌流法)を適用して心室筋細胞の単離に初めて成功した(Hoshino *et al.*, 2012)。そこで、その実験手法を用いて生後 24 時間以内 (day-0)、生後 7 日 (day-7)、生後 14 日 (day-14)、生後 21 日 (day-21)、生後 28 日 (day-28) および生後 10~15 週の成獣マウスから心室筋細胞を単離し、パッチクランプ法で L 型 Ca^{2+} チャンネル遮断薬であるベラパミル、ニフェジピン、ジルチアゼムに対する感受性を検討した。その結果、ベラパミルに対しては day-0、day-7、day-14、day-21 マウス心室筋細胞では、day-28 と成獣マウス心室筋細胞に比較して有意に高い感受性を示した。一方、ニフェジピン、ジルチアゼムに対してはすべての発達段階のマウスについて感受性の差は認められなかった。これにより心筋の収縮機能に直接関わる Ca^{2+} 輸送タンパク質の発現量、機能や薬剤感受性が成長に伴って変化することを改めて示すことができた。



次に、心臓超音波を用いて、FK565 投与後の心機能を経時的に測定を行ったところ、投与群では投与後 1 週間より心機能は低下し、投与後 3 ヶ月間後より徐々に改善した。心電図では上室性期外収縮を認めた(図 1)が、心室性不整脈は認めなかった。

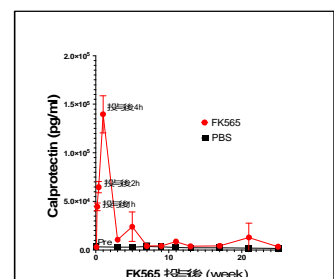


Activation map を用いて心筋表面の活動電位を測定し、興奮速度の検討をおこなったところ、モデルマウスでは心耳に異常興奮領域を認め、活動電位の延長を認めた(図 2)。次に FK565 投与マウスから単離した心筋細胞で、whole-cell patch clamp を用いて心室筋の収縮に関連する L 型 Ca^{2+} 電流を測定したところ、+10 mV で最大となる Ca^{2+} 電流を control が比較して有意に低下しており(図 3)、phospho-phospholamban sarcoplasmic reticulum-ATPase, Na^+-Ca^{2+} exchanger の発現が低下した。SERCA の機能をカフェインにより誘発された Ca^{2+} の減衰速度から評価したところ FK565 投与により SERCA 機能は有意に低下した。カフェインにより誘発された Ca^{2+} transient の減衰時間は FK565 投与により増加しており、NCX の機能低下が示唆された。



これらの結果から FK565 投与により L 型 Ca^{2+} 電流の低下、 Ca^{2+} transient の低下さらに Phospholamban の機能低下により、SERCA および NCX がダウンレギュレートし、心機能低下をきたすことが示唆された。単離された心筋細胞において NOD1 リガンドは特異的な NF- κ B の活性化を誘導することが過去に報告されており、NF- κ B により EC coupling が障害されたものと思われる。

次に表皮心電図で確認された心房性不整脈について、心房筋に非特異的に発現している持続性遅延整流性外向き K 電流 (I_{Kur}) を測定したが、control と比較して有意な変化は認めなかった。血液検査では白血球数の増加を認め、ELISA を用いて炎症のバイオマーカーであるカルプロテクチンの測定をおこなったところ投与後 4 時間でピークとなった。心室筋の L 型 Ca^{2+} チャンネルに対して、ベラパミル、ニフェジピン、ジルチアゼムに対する感受性を検討したが、モデルマウスとコントロールで感受性の差は認められなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miroslaw Lech , Jun Oyamada, Chisato Shimizu, Shinsuke Hoshino, Dorota A Bulik, Bryan Gutierrez, Hetal Sarvaiya, Bulbul Kapoor, Laura Koppes, Radka Saldova, Henning Stockmann, Simone Albrecht, Ciara McManus, Pauline M Rudd, Andrew M Kahn, Lori B Daniels, John B Gordon, Adriana H Tremoulet, Jane C Burns, et al	4. 巻 12
2. 論文標題 Circulating Markers of Inflammation Persist in Children and Adults With Giant Aneurysms After Kawasaki Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circ Genom Precis Med	6. 最初と最後の頁 e002433
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCGEN.118.002433	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sagawa H, Hoshino S, Yoshioka K, Ding WG, Omatsu-Kanbe M, Nakagawa M, Maruo Y, Matsuura H	4. 巻 83
2. 論文標題 Postnatal developmental changes in the sensitivity of L-type Ca ²⁺ channel to inhibition by verapamil in a mouse heart model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatric Research	6. 最初と最後の頁 1207-1217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/pr.2018.46	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Burns JC, Hoshino S, Kobayashi T.	4. 巻 2
2. 論文標題 Kawasaki disease: an essential comparison of coronary artery aneurysm criteria.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lancet Child Adolesc Health.	6. 最初と最後の頁 840-841
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/S2352-4642(18)30334-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinsuke Hoshino
2. 発表標題 Biomarkers of Inflammation and Fibrosis in the Young Adults With History of Kawasaki Disease
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2019（国際学会）
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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------