

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890061
 研究課題名（和文） 心房細動における炎症の関与－マクロファージの役割に関する検討と治療標的の検索
 研究課題名（英文） The Autocrine Mechanisms for Macrophage Migration Evoked by Mechanical Stretch of Atrial Myocytes.
 研究代表者
 笹野 哲郎（SASANO TETSUO）
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教
 研究者番号：00466898

研究成果の概要（和文）：

心房細動は、心不全や心臓弁膜症などによる心房伸展の際に発症することが知られている。また、心房細動の発症及び進展には心房の炎症と線維化が重要な役割を果たす。本研究では、心房筋に伸展刺激を加えた際に生じる炎症メカニズムを、マクロファージを中心に検討した。心房筋細胞は伸展刺激によって一過性に細胞外に ATP を放出し、そのオートクライン作用によってケモカインの発現を誘導してマクロファージ浸潤を惹起していることが判明した。この機序は心房細動の発症に関与していると思われる。

研究成果の概要（英文）：

Atrial dilatation is well-known contributor for atrial fibrillation, but its mechanism remains unclear. The aim of this study was to clarify the mechanism of atrial inflammation in stretched atrium. We found that mechanical stretch of atrial myocytes enhanced migration of macrophages. Further examinations revealed that atrial myocyte released ATP into the extracellular space, resulting in increased expression of chemokine by autocrine fashion. This mechanism may link between atrial dilatation and macrophage infiltration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：心房細動、心房リモデリング、細胞外 ATP、オートクライン作用

1. 研究開始当初の背景

心房細動は持続性不整脈のなかでも最も頻度が高く、高率に脳梗塞の合併および突然死を来し、患者 QOL を著しく低下させることが大きな社会問題となっている。加齢とともに発症頻度が指数関数的に増加すること、メタボリックシンドロームに合併することが多いことから、高齢化社会を迎えたわが国では特にその治療戦略の確立が急務と考えられる。

心房細動治療は従来、心臓イオンチャネルに対する薬物治療、すなわち on target 治療が主体であったが、十分な治療効果を上げるには至らなかった。これに代わる戦略として現在は 2 つのアプローチがとられている。一つはカテーテルを用いた電氣的焼却術であり、特に孤立性心房細動の起源の多くが存在する肺静脈を隔離する肺静脈隔離法は、心房細動の治療効果を著しく向上させた。しかしながら、わが国で特に問題となる高齢者やメタボリックシンドロームに合併する慢性心房細動は肺静脈起源でないものも多く、加齢やメタボリックシンドロームなどによる線維化、すなわち心房筋リモデリングが心房細動の維持メカニズムとして重要と考えられる。そこで、第二の戦略として心房筋リモデリングに介入する“アップストリーム治療”が試みられ、特にレニン-アンジオテンシン系をターゲットとした治療は一定の成果をあげている。しかし、このアップストリーム治療は未だ発展途上であるともいえる。

高感度 CRP の普及から、メタボリック症候群の背景には全身性の軽微な炎症があるとの考えが支持されている。炎症が心房細動の危険因子の 1 つであることは知られているものの、炎症と線維化すなわち心房筋リモデリングの因果関係に関しては十分解明が進んでいない。そこで、炎症と線維化を結びつけるシグナル経路をより良く理解することが、心房筋リモデリングに対する効果的なアップストリーム治療を確立する上で重要と考え、本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

(1) 心房細動の初期に生じると考えられる心房炎症の機序を検討する。特に、心房細動の重要なリスク因子である心房拡大(心房伸展)に焦点を絞り、マクロファージを中心に、炎症性細胞の浸潤機序を検討する。

(2) 心房リモデリングの病態モデル動物を

作成し、マクロファージの浸潤を評価する。

3. 研究の方法

(1) マウス心房筋細胞とマクロファージの相互作用 (in vitro study)

① 細胞及び装置

マウス心房筋細胞は、Dr. Claycomb より分与された HL-1 細胞を使用した。マクロファージはマウス腹腔マクロファージまたは又は J774.1 細胞を使用した。

機械的伸展刺激は、STREX 社製 ST-140 を用いて行った。HL-1 細胞はシリコンチャンバー内で培養し、20%の伸展刺激を加えた。

② マクロファージの遊走能評価

HL-1 細胞とマクロファージを modified Boyden chamber を用いて共培養し、HL-1 細胞に機械的伸展刺激を加えた。24 時間後、Hoechst 33342 及び PKH26 (Sigma) を用いて核及び細胞膜を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510) を用いてマクロファージの遊走を評価した。

③ 心房筋細胞からの ATP 放出

心房筋細胞からの ATP 放出を評価するため、HL-1 細胞に機械的伸展刺激を加え、細胞外の ATP 濃度を測定した。伸展前に培地を HBSS バッファーに置換し、伸展刺激前及び刺激 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 分後に HBSS をサンプリングして ATP 濃度を測定した。ATP 濃度測定には Promega 社 ATP assay kit を使用した。

④ 心房筋細胞の伸展刺激におけるケモカイン発現評価

HL-1 細胞に伸展刺激を加え、24 時間後に細胞を回収して mRNA を抽出した。マイクロアレイ解析により mRNA の発現変化を網羅的に検討した後、特にケモカインの発現に関して定量的 RT-PCR により評価した。

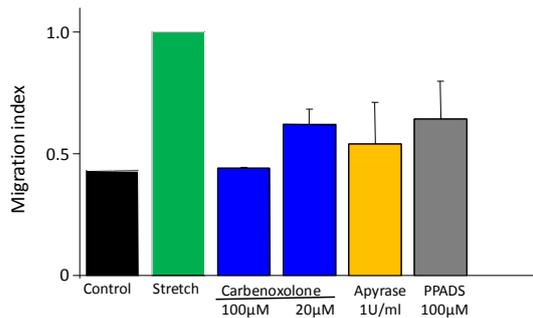
(2) マウス心房伸展刺激におけるマクロファージの浸潤 (in vivo study)

マウスを低気圧飼育 (-0.5MPa) または大動脈縮窄モデル (TAC) を作成し、経時的にマウス心房の組織切片を作成した。HE 染色にて単核球の浸潤を評価し、免疫組織染色にてマクロファージ等の炎症性細胞の浸潤を評価した。

4. 研究成果

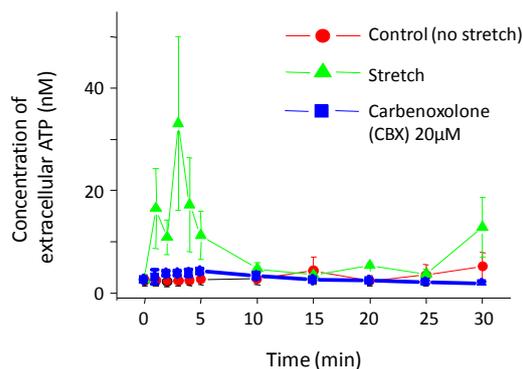
(1) マクロファージの遊走における心房筋細胞の関与

マウス心房筋細胞とマクロファージを共培養し、心房筋細胞に物理的伸展刺激を加えると、マクロファージの遊走能が著明に亢進した。この遊走能亢進はATP分解酵素であるapyraseやgap junction channelのブロッカーであるcarbenoxolone、さらにP2レセプターの阻害薬であるPPADSにより抑制された。以上の結果より、心房筋からgap junction channelを介して放出されたATPあるいは他のヌクレオチドがマクロファージ遊走に関与していると考えられた(下図)。



(2) 心房筋細胞からのATP放出

HL-1細胞に機械的伸展刺激を加え、刺激前後での細胞外液(HBSS)中のATP濃度を測定した。20%の伸展刺激により、刺激3分後をピークとする細胞外ATP濃度の上昇が認められた。このATP濃度上昇は、carbenoxolone 20µMによってほぼ完全に抑制された。この結果より、HL-1細胞からのATP放出は分泌顆粒を介したものではなく、gap junction channelが一過性に開口することにより放出されていると考えられた(下図)。



(3) 心房筋細胞の伸展刺激におけるケモカイン発現

HL-1細胞に伸展刺激を加え、ケモカインの発現変化を検討すると、Cx3C11の発現量が増大していることが判明した。

(4) マウス心房伸展刺激におけるマクロファージの浸潤

低気圧飼育モデル・TACモデル共に心房拡大が認められた。F4/80抗体を用いてマクロファージの浸潤を評価したところ、いずれのモデルにおいても経時的なマクロファージの心房内への浸潤が認められた。

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. Sasano T, Abraham MR, Chang KC, Ashikaga H, Mills KJ, Holt D, Hilton J, Nekolla S, Dong J, Lardo AC, Halperin HR, Dannals R, Marbán E: Abnormal Sympathetic Innervation of Viable Myocardium and the Substrate of Ventricular Tachycardia after Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 2266-75. 査読有

2. Holz A, Lautamäki R, Sasano T, Merrill J, Nekolla SG, Lardo AC, Bengel FM: Expanding the Versatility of Hybrid Cardiac PET-CT: Feasibility of Delayed Contrast Enhancement CT for Infarct Detection in A Porcine Model. *J Nucl Med* 2009; 50: 259-65. 査読有

3. Kakusaka S, Asayama M, Kaihara A, Sasano T, Suzuki T, Kurokawa J, Furukawa T: A receptor-independent effect of estrone sulfate on the hERG channel. *J Pharmacol Sci.* 2009; 109: 152-6. 査読有

4. Sasano T, Kelemen K, Greener ID, Donahue JK: Ventricular tachycardia from the healed myocardial infarction scar: validation of an animal model and utility of gene therapy. *Heart Rhythm* 2009; 6: S91-7. 査読有

5. Lautamaki R, Schuleri KH, Sasano T, Javadi MS, Youssef A, Merrill J, Nekolla SG, Abraham MR, Lardo AC, Bengel FM.: Integration of Infarct Size, Tissue Perfusion and Metabolism by Hybrid Cardiac PET-CT – Evaluation in a Porcine Model of Myocardial Infarction. *Circulation Cardiovascular imaging.* 2009; 2: 299-305. 査読有

6. Johnston PV, Sasano T (contributed equally), Mills K, Evers R, Lee ST, Smith RR, Lardo AC, Steenbergen C, Gerstenblith G, Lange R, Marbán E.: Engraftment, differentiation and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2009; 120: 1075-83. 査読有

〔学会発表〕(計 7件)

1. Sasano T, Chang KC, Youssef A, Abd-Elmoniem KZ, Vonken E, Mills KJ, Osman NF, Stuber M, Halperin H, Calkins H, Abraham MR, Marbán E.

Identification of Substrate of Ventricular Tachycardia by Regional Strain MR Imaging in Infarct Porcine Heart. Gordon Research Conference 2009. イタリア 平成21年2月

2. 笹野哲郎、古川哲史、磯部光章

局所ストレイン MRI 解析を用いた心筋梗塞後心室頻拍の起源同定の試み
第25回日本心電学会学術集会 新潟 平成20年11月

3. 笹野哲郎、古川哲史、磯部光章

Optimization of Intracoronary Cell Infusion Protocol to Maximize Early Engraftment of Cells without Thromboembolic Complications. 第73回日本循環器学会 大阪 平成21年3月

4. 古川哲史、貝原麻美、角南明彦、笹野哲郎

Na⁺チャネル可視化プローブと薬物ハイスループットスクリーニング系の作製
第26回日本心電学会学術集会 京都 平成21年7月

5. 笹野哲郎、Eduardo Marbán、古川哲史

ブタ心筋梗塞モデルに対する Cardiosphere-derived cell を用いた細胞治療—経冠動脈的投与の至適条件検討と細胞治療による心機能・不整脈源性の評価—
第26回日本心電学会学術集会 京都 平成21年7月

6. 笹野哲郎、Shuo-Tsan Lee、Eduardo Marbán、古川哲史

ブタ心筋梗塞モデルを用いた、Ischemic postconditioningの不整脈抑制作用の検討—再灌流不整脈と慢性期心室性不整脈に対する抑制効果—
第26回日本心電学会学術集会 京都 平成21年7月

7. 笹野哲郎、大石咲子、田村典子、磯部光章、古川哲史

Autocrine/Paracrine Mechanisms for Macrophage Migration Evoked by Mechanical Stretch of Atrial Myocytes.
第74回日本循環器学会 京都 平成22年3月

〔図書〕(計 1件)

笹野 哲郎 :

心室性不整脈の遺伝子治療の可能性 新・心臓病診療プラクティス13 不整脈を診る・治す (文光堂) 青沼和隆・松崎益徳 編
2009; 426-427

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹野 哲郎 (SASANO TETSUO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任助教

研究者番号 : 00466898

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし