

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年～2011年

課題番号：21590602

研究課題名（和文） 肺静脈の電氣的興奮を制御する心房細動治療標的分子に関する研究

研究課題名（英文） INVESTIGATION OF THERAPEUTIC TARGET MOLECULES FOR ATRIAL FIBRILLATION REGULATING ELECTRICAL EXCITATION IN PULMONARY VEIN

研究代表者

高原 章（TAKAHARA AKIRA）

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：80377481

研究成果の概要（和文）：

本研究は肺静脈の電気生理学的特徴を明らかにすることを目的とし、肺静脈組織の電氣的活動性ならびにイオンチャネル機能や細胞内Ca<sup>2+</sup>動態に影響を与える薬物の肺静脈における応答性を検討した。肺静脈に局在する心筋では静止膜電位が心房筋より浅く、Ca<sup>2+</sup>過負荷が生じやすい環境であり、不整脈の発生原因となる撃発活動が生じやすい電気生理学的特性を有することが明らかになった。ムスカリン受容体またはGIRKチャネルは活性化により肺静脈の膜電位を過分極させるため、撃発活動を強力に抑制できる分子ターゲットになりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To clarify electrophysiological properties of the pulmonary vein (PV), we assessed its electrical activity and responses to drugs affecting intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration or ion-channel functions, which were compared with those in the atrium. In this study, triggered activity was induced by train stimulation in the PV, which was not observed in the left atrium. It is presumed that the less negative resting membrane potential in the PV cardiomyocytes induced Ca<sup>2+</sup> overload during train stimulation, leading to generation of triggered activity. Activation of muscarinic receptors or GIRK channels, which could hyperpolarize the resting membrane potential of the PV, may become a pharmaceutical molecular target for strong suppression of the generation of triggered activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：心房細動、肺静脈、異常自動能、撃発活動、活動電位、カルバコール、抗不整脈薬

## 1. 研究開始当初の背景

フラミンガム疫学研究で、心房細動は一生涯のうちに4人に1人という高い割合で発症することが報告されている。心房細動は心

血行動態に対して影響が少なく、動悸症状の改善を目的とした治療が行われるが、心原性脳梗塞をはじめとした致命的な合併症が心房細動により誘発されることが判明して以

来、心房細動の発生原因の解明、適切な治療薬の検索ならびに合併症の発生機序解明が急務となった。心房細動は心房筋に発生する異常興奮が主原因と考えられてきたが、近年の臨床的知見により、心房細動患者の9割以上は肺静脈が不整脈の発生起源であることが判明した。肺静脈に迷入している心筋組織 (myocardial sleeve) から異常興奮が発生していると推測されている。これを背景として、肺静脈と心房の接合部を電気的に焼灼するアブレーション術が新しい非薬物療法として確立したが、この治療法には長時間のX線透視による被爆や心房-食道瘻といった致命的な合併症の問題点が残されている。高齢化社会を迎えた現在、心房細動に対して有効な薬物治療法を確立することは、増加の一途をたどる心房細動患者に対する大きな福音になることが期待される。

これまで心房細動に対する薬物治療として、I群およびIII群抗不整脈薬がリズムコントロールを目的として使用されてきた。しかしながら、これら薬物による心室に対する伝導抑制や再分極遅延が致死に直結する副作用として存在するため、至適治療用量が限定されることが課題である。最近では心房筋に特異的に発現しているイオンチャンネルをターゲットとした薬物が臨床開発されているが、肺静脈は心房細動の発生源として重要な部位であるにも関わらず、肺静脈をターゲットとした薬物は現在まで知られていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、肺静脈の電気的興奮性の特徴について心房筋との相違点を明らかにすることを目的として検討を進める。イオンチャンネルの機能や細胞内Ca<sup>2+</sup>動態に影響を与える薬物を用いて検討し、肺静脈組織の電気現象に対する薬物応答性から、その特徴を明らかにする。

## 3. 研究の方法

モルモットから肺静脈または左心房を摘出し、Krebs-Henseleit液中で微小電極法を適用して心筋活動電位を記録した。標本に高頻度電気刺激(周期長 100–200 ms, n=100)を与え、撃発活動の誘発性および薬物応答性を評価した。

## 4. 研究成果

モルモットから摘出した肺静脈標本の活動電位を微小電極法で記録すると、約 1 Hz の興奮頻度の自発活動が約 20% の標本に観察された。肺静脈には図1に示すように、中膜付近に心筋細胞が局在しており、この領域から自発活動が発生しているものと考えられた。心房側に比べて肺側で心筋層が薄くなっていた。

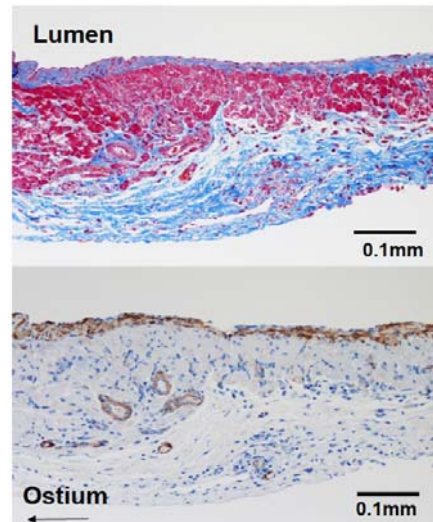


図1. 肺静脈の縦断面の組織像。

上段は Masson-trichrome 染色、下段は抗  $\alpha$ -smooth muscle actin 抗体による染色。内腔面に平滑筋細胞が分布し、心筋は中膜に分布していることがわかる。

肺静脈組織に、周期長 100 ms の頻回刺激を与えたところ、図2に示すように、最終刺激に対する応答後に第4相の緩徐脱分極とそれに引き続く自発興奮が観察された。この刺激条件下では 46/48 例の肺静脈にこのような撃発活動が観察されたが、左心房標本には認められなかった (0/8 例)。また、撃発活動の発生率は4本の肺静脈でほぼ同程度であった。肺静脈の撃発活動の発生率および自発興奮の発生数は刺激頻度に依存して増加し、連結周期長は刺激頻度に応じて短縮した。

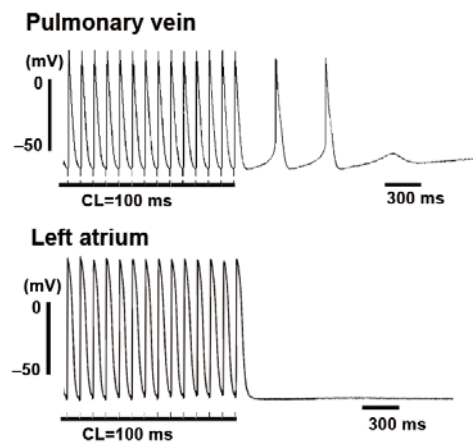


図2. 肺静脈に誘発された撃発活動。

肺静脈に 10Hz の刺激を 100 発与えると、刺激終了直後に自発的な興奮(撃発活動)が観察される(上段)。このような電気活動は、左心房標本では観察されない。

頻回刺激後に生じる自発興奮の発生数を指標にして、各種薬物の作用を検討した。図3に示すように、ベラパミル (Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害薬)、リアノジン (小胞体Ca<sup>2+</sup>遊離阻害薬) およびピルジカイニド (Na<sup>+</sup>チャンネル阻

害薬)は、自発興奮の発生数を有意に減少させた。

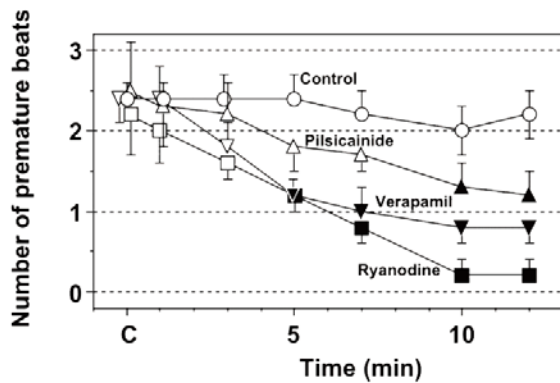


図3. 撃発活動に対する各種薬物の作用.

ベラパミル ( $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル阻害薬;  $1 \mu\text{M}$ )、リアノジン (小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離阻害薬;  $0.1 \mu\text{M}$ ) およびピルジカイニド ( $\text{Na}^{+}$ チャンネル阻害薬;  $10 \mu\text{M}$ ) は肺静脈で誘発された自発活動の発生数を有意に抑制した。黒のシンボルは統計学的に有意であることを示している。

肺静脈心筋の静止膜電位は心房筋より浅いことが既に知られている。図4に示すように、内向き整流性 $\text{K}^{+}$ チャンネルの刺激作用を有するカルバコール (コリン作動薬) を肺静脈に適用すると、静止膜電位の過分極が認められた。また、頻回刺激後に生じる自発興奮の発生数発生はカルバコール処置により完全に抑制した。

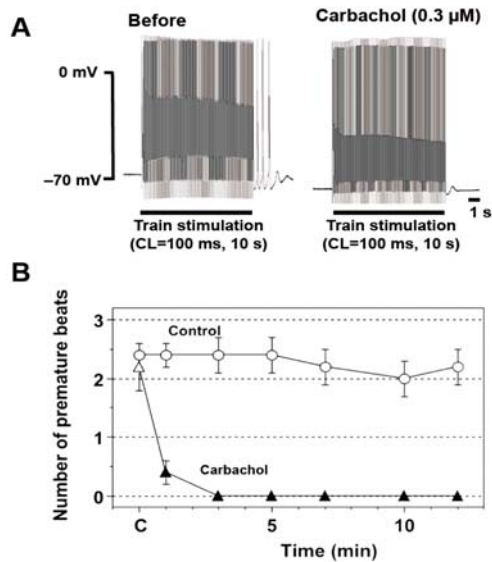


図4. 撃発活動に対するカルバコールの作用.

カルバコール (コリン作動薬;  $0.3 \mu\text{M}$ ) は、肺静脈で誘発された自発活動の発生数を完全に抑制した。黒のシンボルは統計学的に有意であることを示している。

以上の結果より、肺静脈に局在する心筋では不整脈の発生原因となる撃発活動が生じやすい特性を有することが示された。撃発活

動の発生機序として、肺静脈心筋では心房筋に比べて $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷が生じやすいことが考えられた。その原因として、静止膜電位が左心房より  $6 \text{ mV}$ 程度浅いことが関与することも明らかとなった。肺静脈のムスカリン受容体またはGIRKチャンネルの刺激は撃発活動を強力に抑制する分子ターゲットの1つと考えられた。

## 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16件)

- ① Takahara A, Takeda K, Tsuneoka Y, Hagiwara M, Namekata I, Tanaka H. Electrophysiological effects of the class Ic antiarrhythmic drug pilsicainide on the guinea-pig pulmonary vein myocardium. *J. Pharmacol. Sci.* 2012; 118(4): 506-511. 査読あり、DOI: 10.1254/jphs.12022FP
- ② Namekata I, Tsuruoka N, Tsuneoka Y, Matsuda T, Takahara A, Tanaka Y, Suzuki T, Takahashi T, Iida-Tanaka N, Tanaka H. Blocking effect of NIP-142 on the KCNQ1/KCNE1 channel current expressed in HEK293 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2011; 34(1): 153-155. 査読あり、DOI: 10.1248/bpb.34.153
- ③ Takahara A, Sugimoto T, Kitamura T, Takeda K, Tsuneoka Y, Namekata I, Tanaka H. Electrophysiological and pharmacological characteristics of triggered activity elicited in guinea-pig pulmonary vein myocardium. *J. Pharmacol. Sci.* 2011; 115(2): 176-181. 査読あり、DOI: 10.1254/jphs.10232FP
- ④ Nouchi H, Kiryu N, Kimata M, Namekata I, Takahara A, Shigenobu K, Tanaka H. Developmental changes in action potential prolongation by  $\text{K}^{+}$  channel blockers in the chick myocardium. *J. Pharmacol. Sci.* 2011; 115(2): 235-238. 査読あり、DOI: 10.1254/jphs.10205SC
- ⑤ Takahara A, Wagatsuma H, Aritomi S, Konda T, Akie Y, Nakamura Y, Sugiyama A. Measurements of cardiac ion channel subunits in the chronic atrioventricular block dog. *J. Pharmacol. Sci.* 2011, 116(1): 132-135. 査読あり、DOI: 10.1254/jphs.11019SC
- ⑥ Yamamoto T, Ohno S, Niwa S, Tokumasu M, Hagiwara M, Koganei H, Fujita S, Takeda T, Saitou Y, Iwayama S,

- Takahara A, Iwata S, Shoji M. Asymmetric synthesis and biological evaluations of (+)- and (-)-6-dimethoxymethyl-1,4-dihydropyridine-3-carboxylic acid derivatives blocking N-type calcium channels. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011; 21(11): 3317-3319. 査読あり、DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.04.007
- ⑦ Nishi I, Sugiyama A, Takahara A, Watabe H, Kuroki K, Igawa M, Enomoto T, Iida K, Koseki S, Aonuma K. Utility of short-term variability of repolarization as a marker for monitoring a safe exercise training in patients with cardiac diseases. *Int. Heart J.* 2011; 52(5): 304-307. 査読あり、DOI: 10.1536/ihj.52.304
- ⑧ Ishizaka T, Takahara A, Iwasaki H, Mitsumori Y, Kise H, Nakamura Y, Sugiyama A. Cardiovascular effects of azelnidipine in comparison with those of amlodipine assessed in the halothane-anesthetized dogs. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2010; 106(2): 135-143. 査読あり、DOI: 10.1111/j.1742-7843.2009.00478.x
- ⑨ Tanaka H, Namekata I, Hamaguchi S, Kawamura T, Masuda H, Tanaka Y, Iida-Tanaka N, Takahara A. Effect of NIP-142 on potassium channel  $\alpha$ -subunits Kv1.5, Kv4.2 and Kv4.3, and mouse atrial repolarization. *Biol. Pharm. Bull.* 2010; 33(1): 138-141. 査読あり、DOI: 10.1248/bpb.33.138
- ⑩ Agata N, Kato Y, Namekata I, Takahara A, Tanaka H, Chino D, Koike K, Tanaka Y.  $H_2$  receptor-mediated positive inotropic effect of histamine in neonatal guinea-pig left atria. *Biol. Pharm. Bull.* 2010; 33(12): 2033-2035. 査読あり、DOI: 10.1248/bpb.33.2033
- ⑪ Tanaka H, Namekata I, Ogawa T, Tsuneoka Y, Komikado C, Takahara A, Iida-Tanaka N, Izumi-Nakaseko H, Tsuru H, Adachi-Akahane S. Inhibitory effects of *S*(+)-efonidipine on the rabbit sinus node action potential and calcium channel subunits Cav1.2, Cav1.3 and Cav3.1. *Eur. J. Pharmacol.* 2010; 649(1-3): 263-267. 査読あり、DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.09.014
- ⑫ Namekata I, Tsuneoka Y, Akiba A, Nakamura H, Shimada H, Takahara A, Tanaka H. Intracellular calcium and membrane potential oscillations in the guinea pig and rat pulmonary vein myocardium. *bioimages* 2010; 18: 11-22. 査読あり、[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bioimages/18/0/18\\_0\\_11/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bioimages/18/0/18_0_11/_article)
- ⑬ Takahara A, Nakamura Y, Wagatsuma H, Aritomi S, Nakayama A, Satoh Y, Akie Y, Sugiyama A. Long-term blockade of L/N-type  $Ca^{2+}$  channels by cilnidipine ameliorates repolarization abnormality of the canine hypertrophied heart. *Br. J. Pharmacol.* 2009; 158(5): 1366-1374. 査読あり、DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00407.x
- ⑭ Nakamura Y, Takahara A, Sugiyama A. Famotidine neither affects action potential parameters nor inhibits HERG  $K^+$  current. *J. Toxicol. Sci.* 2009; 34(5): 563-567. 査読あり、DOI: 10.2131/jts.34.563
- ⑮ Takahara A, Sasaki R, Nakamura M, Sendo A, Sakurai Y, Namekata I, Tanaka H. Clobutinol delays ventricular repolarization in the guinea pig heart: comparison with cardiac effects of hERG  $K^+$  channel inhibitor E-4031. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2009; 54(6): 552-559. 査読あり、DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181bfb17c
- ⑯ 安東賢太郎, 中村裕二, 高原章, 杉山篤: 心臓カテーテル検査時に肺動脈解離を起こしたビーグル犬の1例. *動物の循環器* 41 (2): 44-48, 2009. 査読あり、[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsvc/41/2/41\\_2\\_44/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsvc/41/2/41_2_44/_article/-char/ja/)
- [学会発表] (計20件)
- ① 米山 史陽, 萩原 美帆子, 千葉 俊樹, 高原 章: 麻酔ウサギを用いた心房・心室の電気生理学的特性の同時評価モデル. 第85回日本薬理学会年会 (2012.3.14、京都)
- ② 有富 静, 新沼 多美, 川上 麻衣, 北原 吉朗, 高原 章: アドリアマイシン誘発心腎障害モデルラットに対するL/N型カルシウム拮抗薬シルニジピンの効果. 第34回日本高血圧学会総会 (2011.10.22、宇都宮)
- ③ 本間 邦恵, 田中 光, 高原 章: マウス心筋の再分極過程の特徴: 心電図と単相性活動電位を用いた評価. 第55回日本薬学会関東支部大会 (2011.10.15、船橋)
- ④ 藤原 香織, 木村 伊都紀, 松尾 和廣, 田中 光, 高原 章: シプロフロキサシンの心臓電気薬理学的作用: ハロセン麻酔モルトモデルによる検討. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011 (2011.8.31、東京)
- ⑤ 鈴木 早苗, 恒岡 弥生, 田中 光, 高原 章

- : モルモット心房における oseltamivir の電気生理作用特性. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011 (2011.8.31、東京)
- ⑥ 高原 章、藤原 香織、大槻 篤史、岡 貴之、行方 衣由紀、田中 光: ハロセン麻酔モルモットモデルにおけるジフェンヒドロミンおよびクロペラスチンの心臓電気薬理学的作用. 第 124 回日本薬理学会関東部会 (2011.6.4、東京)
- ⑦ 高原 章、竹田 潔、恒岡 弥生、行方 衣由紀、田中 光: モルモット肺静脈の興奮伝導に対するペプリジルの作用特性. 第 27 回日本心電学会学術集会 (2010.10.9、大分)
- ⑧ 恒岡 弥生、行方 衣由紀、高原 章、川西 徹、田中 光: モルモット肺静脈心筋の組織・細胞の形態および自発活動. 第 19 回日本バイオイメージング学会学術集会 (2010.9.10、横浜)
- ⑨ Takahara A, Sugimoto T, Takeda K, Namekata I, Tanaka H. Electropharmacological analysis of triggered activity in the pulmonary vein myocardium of the guinea pig. WorldPharma2010 - 16th World Congress of Basic Clinical Pharmacology (2010.7.22, Copenhagen, Denmark)
- ⑩ Namekata I, Ohara M, Hirota Y, Kawanishi T, Takahara A, Tanaka H. Effects of SERCA activators, ellagic acid and gingerol, on diabetes mellitus-induced diastolic dysfunction in isolated murine ventricular myocardia. WorldPharma2010 - 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (2010.7.20, Copenhagen, Denmark)
- ⑪ 行方 衣由紀, 恒岡 弥生, 高原 章, 田中 光: モルモット肺静脈心筋における自発活動の電気生理学的および薬理学的性質. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2010.3.29、盛岡)
- ⑫ 岡 貴之、大槻 篤史、高原 章、行方 衣由紀、田中 光: 鎮咳薬クロペラスチンの hERG K<sup>+</sup>電流に対する作用. 第 83 回日本薬理学会年会 (2010.3.18、大阪)
- ⑬ 竹田 潔、行方 衣由紀、高原 章、田中 光: モルモット摘出左心房-肺静脈標本におけるペプリジルの電気生理学的作用. 第 83 回日本薬理学会年会 (2010.3.17、大阪)
- ⑭ 恒岡 弥生、行方 衣由紀、高原 章、田中 光: モルモット肺静脈心筋の電氣的自発活動およびカルシウム動態の検討. 第 83 回日本薬理学会年会 (2010.3.17、大阪)
- ⑮ 福本 真利江、行方 衣由紀、高原 章、田中 光: 動静脈瘻心肥大ラットの心房におけるカルバコールの電気生理学的作用. 第 83 回日本薬理学会年会 (2010.3.17、大阪)
- ⑯ 高原 章、中村 真理子、佐々木 梨江子、仙道 晶子、岡 貴之、大槻 篤史、櫻井 悠紀子、行方 衣由紀、田中 光: 鎮咳薬クロブチノールの催不整脈特性: E-4031 との比較. 第 121 回日本薬理学会関東部会 (2009.10.10、東京)
- ⑰ 岩崎 宏、高原 章、中村 裕二、佐藤 吉沖、永井 猛、新開 規弘、杉山 篤: ピルジカイニド経皮貼付剤の薬理作用と電気生理学的効果: 慢性房室ブロック犬心房での検討. 第 121 回日本薬理学会関東部会 (2009.10.10、東京)
- ⑱ Namekata I, Tsuneoka Y, Sugimoto T, Takeda K, Kawanishi T, Nakamura R, Takahara A, Tanaka H. Electrophysiological and pharmacological properties of the isolated guinea-pig pulmonary vein myocardium. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (2009.7.28, Kyoto)
- ⑲ 恒岡 弥生、杉本貴彦、竹田 潔、行方 衣由紀、高原 章、田中 光: モルモット肺静脈心筋の自発活動への Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換機構と筋小胞体の寄与. 第 120 回日本薬理学会関東部会 (2009.7.11、東京)
- ⑳ 高原 章、杉本 貴彦、行方 衣由紀、田中 光: モルモット肺静脈に誘発される撃発活動の電気薬理学的特性. 第 26 回日本心電学会学術集会 (2009.7.2、京都)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

① 名称: 持続型心房細動モデル動物、その持続型心房細動誘発方法及び製造方法

発明者: 高原 章

権利者: 東邦大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-144710

出願年月日: 2011 年 6 月 29 日

国内外の別: 国内

② 名称: 心房細動を誘発させる方法

発明者: 杉山 篤, 高原 章, 橋本 敬太郎

権利者: 東邦大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-15743

出願年月日: 2011 年 1 月 27 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

- ① 名称：心房細動モデル動物の作製方法、心房細動を誘発させる方法及び心房細動を誘発させた動物を用いた心房細動抑制剤の評価方法  
発明者：杉山 篤, 高原 章, 橋本 敬太郎  
権利者：東邦大学  
種類：特許  
番号：特許第 4704712 号  
取得年月日：2011 年 3 月 18 日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://gyoseki.toho-u.ac.jp/thuhp/KgApp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高原 章 (TAKAHARA AKIRA)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：80377481

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

行方 衣由紀 (NAMEKATA IYUKI)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：30510309