

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580421

研究課題名(和文)心房細動モデルを用いた心房筋におけるチャネル分子背景の加齢性変化の解析

研究課題名(英文) Age-dependent changes of atrial channel characteristics using a rat model of atrial fibrillation

研究代表者

伊藤 公一 (Ito, Koichi)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：50330874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：心房細動は加齢と共に発症率が上がる最も頻度の高い不整脈であり、脳梗塞や心筋梗塞等のリスク要因になるため臨床的に非常に重大な疾患である。本研究では心房細動誘発モデルを作製しその有用性及び心房細動の分子機序を、電気生理学的及び分子生物学的手法を用いて検討した。この結果、経食道頻回刺激により老齢ほど心房細動モデルを作製しやすく、分子レベルではヒトと共通する発症メカニズムを持っていること、さらに心房に加齢依存的に発現しているIKACHチャネルが心房細動の発生に大きく関与していることが明らかになった。また心房細動の持続に重要であるとされるギャップ結合は、本モデルにおいては関与が小さいことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：As atrial fibrillation (AF) is the most frequently developed in an age-dependent manner and causes the brain or heart infarction, this arrhythmia is clinically very important. However, the detailed mechanism of AF remains still unclear. In this study, we established the rat AF model triggered by transesophageal atrial pacing and evaluated it with electrophysiological and molecular biological methods. We elucidated that the transesophageal atrial pacing to the Fisher344 rat induced AF with aging and that at molecular background of this AF was similar to human AF. Moreover, the IKACH but not IKur channel expressed in the atrium was involved in the generation of AF. On the other hand, the gap-junction in the atrial myocytes did not mediate the re-entry circuit which maintains the AF. These results may shed light on the mechanism of AF and will open the way to treatment for AF.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 疾病予防・制御

キーワード：心房細動 病態モデル動物 加齢 イオンチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

心房細動は加齢に伴って発生率が上がる不整脈の中でも最も頻繁に発症が見られる不整脈であり、心不全のみならず脳梗塞等の様々な病態のリスク要因となり得ることが知られている。しかしながらこれまで心房細動の詳細な分子メカニズムは明らかになっていない理由の一つとして心房細動モデル動物の作製が比較的困難なことがあげられる。しかし実験動物としてげっ歯類で簡便にモデル作製ができれば心房細動メカニズム解明のために非常に有用であることは間違いない。

## 2. 研究の目的

これまでに、経食道カテーテル電極からの刺激を行うことによりラットにおいても心房細動様の心電図記録を得ることに成功している。この心房細動誘発ラットを用いて、心房細動の背景にある不整脈基盤を解明し、加齢性変化や薬物存在下等、様々な条件下における分子レベルの変化が実際の心房細動にどのように影響を与えるかを検討することにより、心房細動の分子メカニズムを理解することを目的としている。

## 3. 研究の方法

上記の目的を達成するために以下の項目について検討を行う。

(1)ラットにおいても心房細動様の心電図波形を得ることに成功したが、この心房細動がヒトを含む他の動物におけるものと同様かどうか等その性質を明らかにする。このため、経食道カテーテル電極を用いて心房直下から頻回刺激を送ることによりラットに心房細動モデルを作製する。このモデルにおいて心房細動を誘発させた状態で心電図を記録し、その波形、振幅、周波数、持続時間、F波の特徴、阻害薬等を用いた薬理的性質について検討を行う。また、老齢動物や若齢動物を用いて刺激条件による心房細動の起きやすさを上記パラメータを用いて検討する。

(2)加齢に伴って心房細動の発生率が増加することから電氣的リモデリング時のみならず老化過程においても同様の変化があるはずだと推定される。心房細動誘発ラットを用いて加齢に伴う不整脈基盤に関する検討を行い、同時に分子レベルでの対応を調べるため、老齢動物と若齢動物の各々の心房におけるイオンチャンネル組成をリアルタイムPCR法、及びウエスタンブロット法を用いて調べる。さらに心房細動のリエンターに關しても同様の検討を行う。

(3)加齢に伴った不整脈基盤を形成する分子に対して遮断薬や作動薬を適用する等により、心房細動の薬理学的手法を用いた制御の可能性の検討を行う。具体的には、創薬上のターゲットとなりうる、心房特異的に発現を示す  $I_{Kur}$  チャンネルや  $I_{KACh}$  チャンネルの阻害薬(具体的にはDPO-1やテルチアピン)等を用いて経食道頻回刺激を行い、心房細動発生率を検討する。ギャップ結合についても同様の検討を加えるため、阻害薬(カルベノキソロン)を用いて同様の検討を行う。

(4)心房細動の基礎疾患として高血圧、糖尿病、虚血性心疾患等が挙げられるが、それらの疾患モデル動物を用いて上記に記したパラメータ・手法を用いて心房細動の発症に与える影響を検討する。

## 4. 研究成果

経食道カテーテル電極を心房の直下に配置し、頻回刺激(83 Hz、20-50 V、30秒)を行うことによって一定して心房細動を誘発することに成功した(下図)。

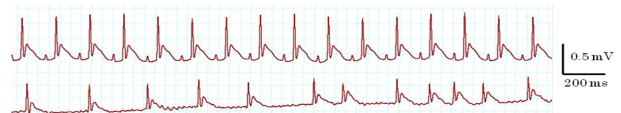


図1 通常の心電図(上)と経食道頻回刺激後に誘導された心房細動(下)

この方法を用いて以下の結果を得られた。

(1)ラットにおいて誘発される心房細動の詳細な検討

経食道電極カテーテルを用いて頻回刺激を行うことによって心房細動モデルラットを作製しこの心房細動の性質を検討した。この結果、老齢ラットは若齢ラットに比べ心房細動の誘発率が高くその持続時間も有意に長かった。これらの心房細動の誘発率は一般にヒトの治療薬として用いられているキニジンやアミオダロンの投与下においては濃度依存的に抑制された。これらの結果から経食道カテーテル刺激法によって引き起こされる心房細動はヒトの心房細動と共通する発症メカニズムを持っており老齢動物において心房細動が起きやすい器質があることが示唆された。この心房細動誘発モデルが開発されてから詳細にその性質を電気生理学的に検討した例はこれまでになく、上記の基礎データは今後このモデルを役立てる上で貴重なものとなるのは間違いなく、ヒトの心房細動へ外挿の可能性につながるものになるだろう。

(2)加齢に伴う不整脈基盤の検討

心房細動は老化と共に発症率が増加する。

この理由として、一度心房細動が起こった後の電気リモデリング以前に加齢によるリモデリングと言うべき心房内の催不整脈基盤が生じることが考えられる。このため、不整脈発生の大きな要因である活動電位再分極過程の延長に参与するとされる各種のカリウムチャンネルの心房における定量・分布をリアルタイム PCR 法やウエスタンブロット法によって解析した。この結果、 $I_{K_r}$ 、 $I_{K_s}$ 、 $I_{to}$  チャンネルに関しては老齡ラットと若齡ラットとの間で有意な差が観察されなかった。また心房に特異的に発現する  $I_{K_{ur}}$  も老齡ラットと若齡ラットにおける差は見られず、他の遅延整流性カリウムチャンネルと比較して発現量がわずかにしか見られなかったことから、ラット心房の活動電位再分極相において寄与が少ないことが示唆された。これに対して  $I_{K_{ACh}}$  は老齡ラット右心房では増加し、老齡ラット左心房では減少していたことから、心房細動を始めとする加齢性の不整脈発症に関与していることが示唆された。

### (3)薬理学的方法論を用いたチャンネル抑制による心房細動の制御

心房におけるカリウムチャンネル発現の結果をもとに、加齢に伴う発現量の変化が個体レベルで心房細動の発生にどのように関わっているのかを検討するため、心房細動誘発ラットにおいて薬理学的方法論による心房細動誘発の抑制における効果を検討した。その結果、心房に加齢依存的に発現している  $I_{K_{ACh}}$  チャンネルの特異的遮断薬であるテルチアピンは濃度依存性に心房細動の誘発を抑制することが明らかになった。これに対し、 $I_{K_{ur}}$  チャンネルの特異的遮断薬 DPO-1 は抑制作用がみられなかった。このことから頻回刺激心房細動モデルラットにおいて  $I_{K_{ACh}}$  が心房細動の発生に深く関与している可能性が示唆された。また、老齡群においてもテルチアピンが若齡群と同様の遮断効果をもたらした。この結果は、 $I_{K_{ur}}$  遮断薬を通じた心房細動薬の開発を進めようとする現在の流れに対して一石を投じるものであり、 $I_{K_{ACh}}$  のチャンネル特性の変化について詳細な研究が必要であることが重要であると共に、より効果的かつ副作用のない創薬への警告となり得るものであると考えられる。

### (4)リエントリー制御へのギャップ結合の関与の検討

心房細動発生メカニズムには刺激生成の異常と共に興奮伝導の異常があるが、この伝導異常には細胞間のギャップ結合が関与していると考えられている。この可能性について検討するため、まず心房に発現しているコネキシン(ギャップ結合を構成している)の発現量を検討した。コネキシンには 40、43、45 の 3 種類の発現が知られているが、コネキシン 43 のみが老齡動物のみ発現量が有意に少なかった。そこでギャップ結合の減少が加齢

性に心房細動発生が増加することとの関連を検討するため、ギャップ結合の特異的阻害薬であるカルベノキソロンを静脈内投与して心房細動の誘発を試みた。しかしながらこれは心房細動の発生率、及び発生した場合の持続時間ともに全く影響が見られなかった。これらのことから心房細動を誘発するとされるリエントリーとよばれる異常興奮回路は、本モデルにおいてはギャップ結合とは別のメカニズムで起こっていることが示唆された。

総括すると、経食道カテテル刺激による心房細動誘発モデルラットは、心電図上の波形や持続時間といった点、及び現在ヒトにおいて使用されている治療薬を使った結果からもほぼヒトの心房細動に類似した結果が得られており、非常に簡単に作製できることから非常に有用であると結論づけられる。さらに  $I_{K_{ACh}}$  がその発生に重要であるという結果が得られたことは、創薬における非常に重要な情報となる。しかしながら先行研究で考えられていたギャップ結合の関与に関しては本モデルでは否定された。この理由として急性の誘発実験とヒトで何度も繰り返し心房細動を経た後で観察される心房細動ではメカニズムが異なる点もあると考えられ、まさしくそれが電气的リモデリングの影響であると思われた。この点も含め、今後さらに詳細な検討を加えることが必要であり、これをクリアしたのちに病態モデル動物やストレス負荷ラットを用いることによる心房細動への影響の検討をしていくことが心房細動の発生をめぐる総合的な理解につながり、将来的な臨床応用に重要になると考えられた。

現在これらの結果は複数の学術論文に投稿中である。

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

柴田悠樹、谷口紗貴子、伊藤公一、桑原正貴  
「心房細動誘発性におけるギャップ結合の関与とその加齢性変化」  
第 156 回 日本獣医学会学術集会  
2013 年 9 月 21 日 岐阜大学

伊藤公一、小島由紀子、桑原正貴、局博一  
「経食道頻回刺激によるラット心房細動モデルの作出」  
第 155 回 日本獣医学会学術集会  
2013 年 3 月 28 日 東京大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 公一 (ITO, Koichi)

東京大学大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：50330874

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし