

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591061

研究課題名(和文) Kv1.3 移入線維芽細胞による不全心筋の活動電位再生と逆リモデリング誘導の研究

研究課題名(英文) Induction of reverse remodeling via reconstruction of action potential by transplantation of Kv1.3 transfected fibroblast in failed heart.

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

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

研究成果の概要(和文)：心不全における心筋リモデリングでは、一過性外向きカリウムチャンネル(Ito)発現低下による活動電位の延長を来し、さらに細胞内カルシウム過負荷による心筋傷害を引き起こして心不全を悪化する。本研究では、活動電位を正常化して心筋の逆リモデリングを誘導することを目的とした。過去の研究で十分なIto発現の誘導ができなかったため、今回の研究では、Kv1.3+Kir2.1を移入した線維芽細胞を心筋に移植する方法を採った。線維芽細胞は心筋と電気的に結合し活動電位を正常化してカルシウム過負荷を防止する。本研究では、線維芽細胞でKir2.1の移入が安定せず、目標の線維芽細胞を完成できない段階で研究期間が終了した。

研究成果の概要(英文)：The down-regulation of Ito channel in failure heart will prolong the action potential duration and it accelerates the calcium over-load induced myocardial injury. This study aimed to induce reverse remodeling by removing this vicious circle via normalization of action potential. In our preceding study, we tried to transfect Ito channel directly to the myocyte by using Kv4.2, Kv4.3 and KCHIP2 transfection, but enough amount of expression of these molecules myocyte could not be achieved, then we utilized fibroblast transplantation method in this study. We transfected Kv1.3+Kir2.1 into the fibroblast, then tried to transplant them into cardiac tissue. They will construct electrical connection to the myocytes and the action potential will be shortened as well as decrease in calcium over-load in the failure myocytes. In the recent protocol, we succeeded to transfect Kv1.3 to the fibroblast but the stable expression of Kir2.1 was not achieved during the scheduled study period.

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：Kv1.3 Kir2.1 電気的リモデリング 構造的リモデリング 心不全 不整脈

1. 研究開始当初の背景

不全心筋では心筋のリモデリングにより活動電位が延長し、それが細胞内カルシウム過負荷を介してさらに心筋を傷害する悪循環が形成されている。これまでの検討で、その電気的変化の背景には一過性外向きカリウムチャンネル(Ito)発現の減少があることが明らかになっているが、この電気的変化を解消して活動電位を正常化できれば、カルシウム過負荷による追加的傷害を避けることで心筋の逆リモデリングを誘導できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、不全心筋の活動電位正常化によって心筋の逆リモデリングを誘導するという仮説を検証することを目的とした。先行研究では Gene-Gun を用いて、心筋組織に直接 Kv4.2+Kv4.3+KChIP2(一過性外向きカリウムチャンネル(Ito)をコードする分子)を撃ち込むことを試みたが、発現量・発現期間ともに限定的であった。本研究では、Kv1.3+Kir2.1 を移入した線維芽細胞を作成し、これを心筋に移植することで組織の活動電位を修飾するという手法を採った。

3. 研究の方法

(1)線維芽細胞の作成

Kv1.3とKir2.1は正常の心筋には発現していない分子であるため、公開されている単球およびマクロファージの遺伝子クローニング情報を用い、レトロウイルス系ベクターを作成する。ベクターは、発現確認用の蛍光発色を兼ねた GFP 遺伝子を組み込んだ pIRES-hrGFP-1a を用いた。本ベクターは、先行研究ですでに Kv4.2+KChIP2 の移入に成功しているベクターである。線維芽細胞は、ラット心筋組織への生着率を考慮して NIH3T3 細胞を用いる。Kv1.3+Kir2.1 を移入した線維芽細胞は、心不全を誘発した Lewis ラットおよび Sham の Lewis ラットの心筋表面に 28G ニードルで直接注入する。

(2)心不全 vivo モデルの作成と評価

6 週齢 Lewis ラットにブタ心筋ミオシン/完全フロイントアジュバント混和物を皮下注射し、初期感作を行う。先行研究により、感作後 14-21 日に急性心筋炎が発生し、活動電位延長が最も強く発現することが明らかになっている。ラットは感作後 14 日にアバルチン麻酔下に左側開胸し、線維芽細胞混和液を心表面に直接注入する(300 μ L \times 9 カ所)。閉胸したラットは感作後 60 日まで生存させ、心機能を心臓超音波で評価した後、開胸して電気生理学的評価を行うか、または組織評価および各種分子定量的ための心筋サンプルを採取する。

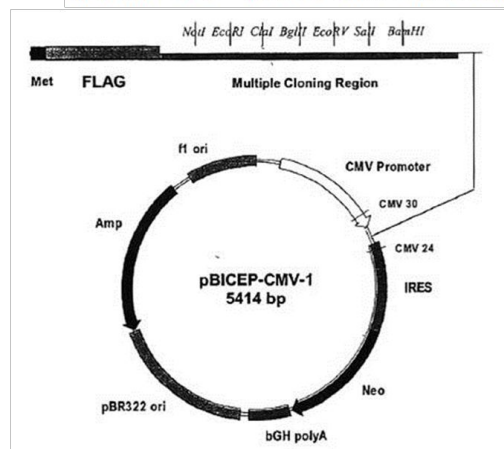
4. 研究成果

(1)ベクターの作成と Kv1.3+Kir2.1 の移入

Kv1.3とKir2.1は正常の心筋には発現して

いない分子である。公開されている単球およびマクロファージのクローニング遺伝子情報に基づいて、レトロウイルス系ベクターを作成した。ベクターは当初、発現確認用の蛍光発色を兼ねた GFP 遺伝子をすでに組み込んだ pIRES-hrGFP-1a を用いて作成した。このベクターは、先行研究ですでに Kv4.2+KChIP2 を Oocyte へ移入することに成功しているベクターである。このベクターを用いることで、Kv1.3+Kir2.1 の Oocyte への移入を PCR 法と Western blotting によって確認した。しかし、NIH3T3 細胞に対する移入は Kv1.3 の移入を確認できただけで Kir2.1 については成功しなかった。PCR 法では Kir2.1 の存在が確認できるものの、Western blotting で十分な蛋白発現を確認できず、その要因も明確には出来なかった。このため、移入用のベクターを変更することを試みた。ベクターは pBICEP-CMV-1(SIGMA)を用い(図 1)、上記の Kv1.3+Kir2.1 を組み込んだプラスミドを作成した。このベクターによって NIH3T3 への両分子の発現効率は改善したが、依然として十分量の Kir2.1 発現を認めていない。このベクターの完成はチャンネル線維芽細胞作成の鍵であり、次ステップの大きな課題である。

図1. 移入用ベクターpBICEP-CMV-1 (SIGMA)



(2)心不全 vivo モデルの作成

自己免疫性心筋炎(EAM)ラットは我々の先行研究において、急性期の心筋炎極期に著しい炎症性細胞浸潤と心機能低下、さらに慢性期の心拡大と心不全発現を確認しているモデルである(図 2)。本モデルでは特に急性期(Day14-21)に著しい活動電位延長を認め、その背景に Ito 発現の低下があることを我々が報告している。本研究では、急性心筋炎発生の早期に線維芽細胞を移植するための培養液注入をシミュレートする予備実験を行ったところ、麻酔と側開胸の負荷に耐えられずに特に心筋炎ラットの生存率が著しく低下した(72% 12%)。このため、線維芽細胞移植の対象とする vivo モデルとしては不適切と考え、別の心不全モデルの検討を行った。イソプロテレノール(ISP)負荷モデルは、急性の酸化ストレスと心拍数増加により、心内

膜側を中心とした心筋傷害を引き起こすモデルである。我々は、Sprague-Dawley rat (SD rat)に ISP 80mg/kg を2日間連続腹腔内投与することで、急性心筋炎様の細胞浸潤を伴う心不全モデルを作成した(図 3)。この負荷により、左室収縮能は駆出率 $68.6 \pm 5.1\%$ から $54.2 \pm 7.4\%$ へと有意に低下し($p=0.024$)、組織にも著しい細胞浸潤を認めた。これに伴って、心室の有効不応期(ERP:図 4)と活動電位持続時間は有意に延長し、その機序は Ito 発現低下によるものであった。これらの変化は EUK(ミトコンドリア SOD などを含む酸化ストレス除去剤)により部分的に拮抗されることから、このモデルにおいては心筋炎と同様に酸化ストレスが電気的変化の機序となっている可能性が示された。

本モデルにおいて、開胸と心筋への細胞注入をシミュレートしたところ、手術の負荷を経ても生存率はある程度保たれる(76% 54%)ことがわかり、上述の線維芽細胞移植の心不全 vivo モデルとして使用可能であることが示された。移植する線維芽細胞が完成し次第、移植実験を行う予定である

図2. 自己免疫性心筋炎ラット(EAM)における急性期心筋炎と慢性期心不全

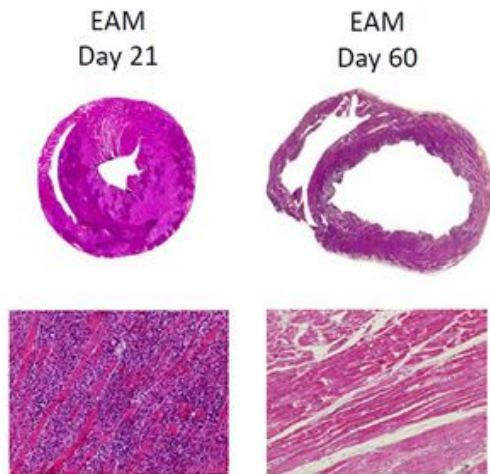


図3. イソプロテレノール負荷モデルにおける心室筋内膜傷害と細胞浸潤

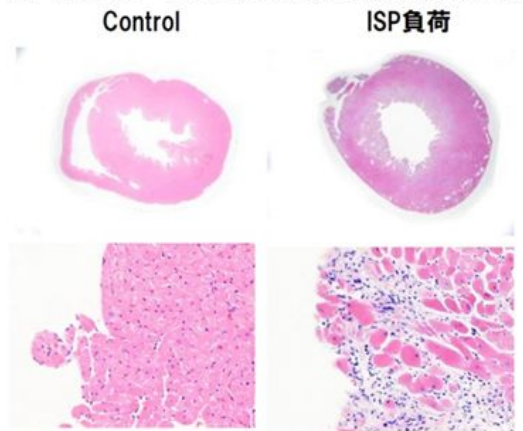
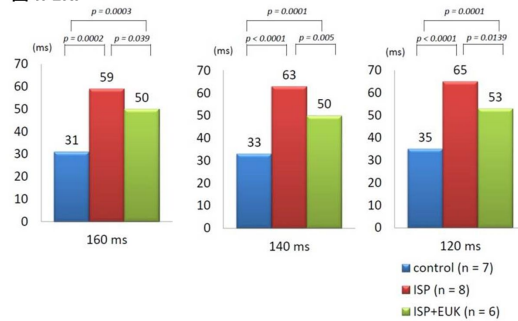


図4. ERP



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 4 件)

Kurokawa S, Niwano S, Niwano H, Cardiomyocyte-derived Mitochondrial Superoxide Causes Myocardial Electrical Remodeling by Down-regulating Potassium Channels and Related Molecules, *Circ J*, 査読有, Vol. 78, 2014, 印刷中

Kiryu M, Niwano S, Niwano H, Angiotensin II-mediated Up-regulation of Connective Tissue Growth Factor (CTGF) Promotes Atrial Tissue Fibrosis in the Canine Atrial Fibrillation Model., *EUROPACE*, 査読有, Vol. 14, 2012, pp. 1206-1214
DOI:10.1093/europace/eus052

Niwano S, Niwano H, Cardioprotective effects of sarcolemmal and mitochondrial K-ATP channel openers in an experimental model of autoimmune myocarditis. -Role of the reduction in calcium overload during acute heart failure-, *International Heart Journal*, 査読有, Vol. 53, 2012, pp. 139-145
http://www.jstage.jst.go.jp/article/ihj/53/2/53_139/_pdf

Niwano S, Niwano H, N-acetylcysteine Suppresses the Progression of Ventricular Remodeling in Acute Myocarditis. - Studies in an Experimental Autoimmune Myocarditis (EAM) model-, *Circulation Journal*, 査読有, Vol.75, 2011, pp.662-671
http://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/75/3/75_CJ-10-0673/_pdf

[学会発表](計 1 件)

Niwano S, Electrical Remodeling Induced by Primary Oxidative Stress-Studies in Primary Hyperoxidative Mice Model., 6th Annual Scientific Meeting of APHRS (Asian Pacific Heart Rhythm Society), 2013.10.5, Hong-Kong

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)
玉川大学・教育学部・教授
研究者番号：00293233