

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591081

研究課題名(和文)肺高血圧症等による右心負荷時の致死性不整脈の発生機序の解明

研究課題名(英文)Pressure Overload by Pneumonectomy Causes Right Ventricular Lethal Arrhythmias: Analysis by Optical Mapping

研究代表者

高瀬 凡平(Takase, Bonpei)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・病院・准教授)

研究者番号：50518214

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文):肺癌治療で片肺全摘術は頻用され術後不整脈機序は不明である。ラット摘出心臓にOptical mapping解析実施、不整脈機序を検討した。方法:SD rats左片肺全摘出、1日・4日・1週間・2週間・4週間後に肺動脈圧測定、心摘出、Tyrode液還流、Na channel脱分極感受性色素染色、心室脱分極様式・速度・活動電位不均一性(APDd)を測定した。細動(VF)誘発した。結果:術後1日から肺動脈圧上昇、2週間持続、4週後正常に復した。肺動脈上昇間、右心室伝導障害・APDd拡大・VF誘発頻度が増加した。結語:片肺全摘術後心室性不整脈に、右心圧上昇による右心伝導障害・再分極不均一性が関与する。

研究成果の概要(英文):Right ventricular (RV) pressure overload due to severe pulmonary hypertension (svr-PH > 40 mmHg) sometimes causes lethal arrhythmias, although the mechanisms are unclear. To investigate if RV pressure overload produces RV arrhythmogenic vulnerability, we serially performed optical mapping analysis (OMP) with electrophysiological study (EPS) to the heart excised from pneumonectomy-induced (LP+H) svr-PH rats. Action potential duration dispersion (APDd) and connexin43 (Cx43) expression were measured in RV. LP+H-svr-PH transiently sustained. OMP revealed abnormal RV conduction and increased APDd accompanying ventricular fibrillation/tachycardia (VF/VT) induction by EPS with normal Cx-43 in LP+H -svr-PH. Conclusions; Transiently sustained (>24-hours) svr-PH can cause lethal arrhythmias possibly due to the mechanoelectric transduction not including Cx43degradation.

研究分野:心臓病学

キーワード:肺動脈高血圧 致死性不整脈 再分極異常

1. 研究開始当初の背景

(1) 原発性肺動脈性肺高血圧の予後は不良で、約30%の症例が予期せぬ突然死をきたすと報告されている(1,2)。また、肺がんに伴う肺全摘手術直後にも不整脈が頻発するとされている。すなわち、肺動脈性肺高血圧による右心負荷が右心室の催不整脈性を惹起すると報告されているものの(3)、その機序に関しての詳細は不明である。

(2) 心臓内圧が上昇すると容易に stretch-activated ion channel(SAC)が誘導され、伝導様式・脱分極興奮伝播の変化や心臓電気生理的变化を容易にきたすと考えられる。左片肺全摘手術に伴う致死性不整脈の誘発性の亢進に関しては、心臓の器質的变化よりもむしろ SAC 等の機序を介した病態も示唆される。

2. 研究の目的

肺全摘手術実験モデルである、ラットの左片肺全摘モデルをもちいて、催不整脈の機序を、Optical mapping analysis 法とラットに対する不整脈誘発法及び心筋伝導関連物質である connexin43の心筋内発現様式から検討した。これにより、肺動脈性高血圧症の致死性不整脈の機序が SAC 等を介した電気生理学的な病因によるものか、心臓の器質的变化によるものかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) Sprague-Dawley rats (male; 8 weeks old; 250-300 g; n = 64)の皮下に ketamine hydrochloride (5 mg/kg)を投与し麻酔した。麻酔下に気管内挿管し、人工呼吸下で左開胸し、左片肺全摘手術を施行した。Rats は覚醒させ、以下の実験操作を施行した。すなわち、左片肺全摘手術作成後、2時間後、4時間後、16時間後、1日後、4日後、一週間後、2週間後、4週間後に以下の項目につき計測を実施した (n=41)。

(2) 肺動脈圧測定: Rats は、全摘手術と同様に再度麻酔した。右頸静脈を cut down し圧測定専用装置に付随したカテーテルを rats 右心室内に挿入し、肺動脈まで進めた。肺動脈圧及び右心室圧は小動物血管内圧想定装置 (PhysioTel and DataquestTM, Data Sciences International, St Paul, Minnesota, USA)にて直接法にて血管内圧を測定した。

(3) 形態学的測定: Rats を麻酔後、経時的に心臓超音波装置(8-MHz ; UF-750XT, Fukuda Denshi Co Ltd., Tokyo, Japan)を用いて右心室の拡張度と右心室機能を各測定時点で計測した。さらに、安楽死後、心筋をホルマリン固定後、右心室 (RV) の重量と左心室 (LV)と心室中隔 (interventricular septum[IVS]) の重量を測定し、右心室 remodeling の指標

として、RV/(LV + interventricular septum[IVS])重量を求めた。また、心臓摘出直前の開胸時に視覚的に心筋壁運動につき定性的に評価した。

(4) Optical mapping analysis 法と不整脈誘発法: Rats を麻酔後、正中切開にて開胸し、迅速に心臓を摘出した。大動脈から冠動脈洞にカニューレを挿入した。酸素化し37度に保温した Tyrode 溶液 (CaCl₂ [2], NaCl [140], KCl [4.5], dextrose [10], MgCl₂ [1], and HEPES [10, pH 7.4], in mmol/L)にて直ちに灌流した。さらに、Tyrode 溶液を一定容量で灌流している水槽に心臓を固定し、大動脈に挿入したカニューレから Na 感受性蛍光色素 (di-4-ANEPPS [15 μmol/L])を約40ml、2分間かけて灌流染色した。さらに、心臓の拍動を停止させるため2,3-butanedione monoxime (Wako Chemical, Tokyo, Japan, 20 mM)を灌流した。Optical mapping analysis は high-quality charge couple device (CCD) camera (Leica 10447050, Geneva, Switzerland) を用いて4秒間撮像した。撮像は心筋が洞調律であることを確認してから、左心室、右心室外膜面の興奮伝播速度と伝播様式、得られた活動電位の持続時間(APD)を commercialized software (Ultima-6006; Sei Media, Inc., Tokyo, Japan)にて解析した。殊に、右心室心膜面の約5x5mmの関心部位(ほぼ右心室自由壁の中央)を任意に設定し、この部位における APD の分布のヒストグラムと、APD の実波形を記録した。APD は APD60ms を使用した。ヒストグラムより、最大 APD と最小 APD の差から APD dispersion を決定し、左片肺全摘手術摘出心臓における、経時的 APD dispersion 変化を比較した。

さらに、催不整脈性を調べるために、右心室の3箇所、すなわち右心室心尖部、心臓基部、右室流出路を20回の連続刺激 (burst pacing, 5, 50, 100 V; 40-ms interval, 20 trains) 各 voltage にて3回づつ施行し、致死性不整脈の誘発の有無を検討した。

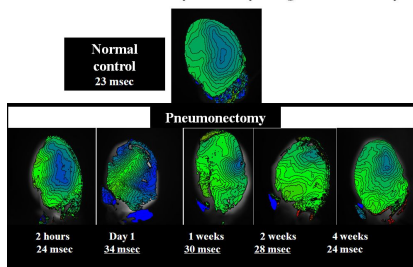
(5) 病理学的及び免疫組織学的検討: 摘出心臓を 4% paraformaldehyde phosphate buffer solution (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) にて48時間固定した。それぞれの標本は、70% ethanol にて脱水し paraffin 固定した。組織学的検討は、hematoxylin and eosin, Elastica van Gieson 及び Masson trichrome にて染色した。心筋伝導蛋白である connexin43の心筋組織内発現の程度を定性的に評価するため、免疫組織染色を施行した。すなわち、Anti-connexin43 monoclonal antibody (1:2,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を用いて、心筋組織内の心筋 gap-junction 蛋白 connexin43 の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 左片肺全摘手術術後2時間から収縮期肺動

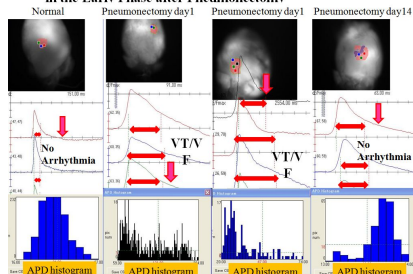
脈圧に一致する右室収縮期圧は徐々に上昇し、左片肺全摘手術後2週間目まで圧の上昇は持続した。しかし、左片肺全摘手術後4週間では、肺動脈圧、右室収縮期圧は正常に復した。肺動脈圧の変化に一致して、右心室の洞調律伝播速度、伝播様式は遅延及び異常化したものの、左片肺全摘手術4週間後には正常に復した(図1)。

図1 Pneumonectomy-induced Transient RV overload produces RV Conduction Delay and Arrhythmogenic Vulnerability



(2) APD dispersion も同様に、肺動脈圧、右室収縮期圧の上昇に一致して異常な延長を認めたものの、左片肺全摘手術4週間後には正常に復した(図2)。

図2 AP Duration Dispersion is Evident in the Early Phase after Pneumonectomy



(3) 肺動脈圧、右室収縮期圧が著明に上昇し、右心室の洞調律伝播速度、伝播様式は遅延及び異常化が認められ、APD dispersionの異常な延長が認められている時期に一致して、burst pacingにて致死性不整脈(多形性心室頻拍・心室細動)が容易に誘発された(図3)。

図3-1 Pulmonary Hypertensive Heart VT/VF was easily induced by RV burst stimulation after pneumonectomy

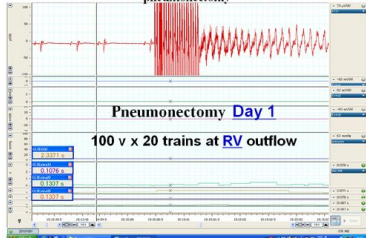
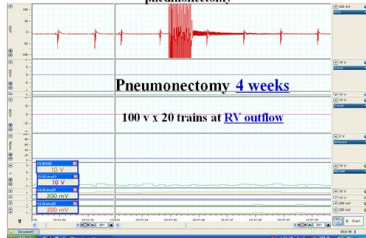
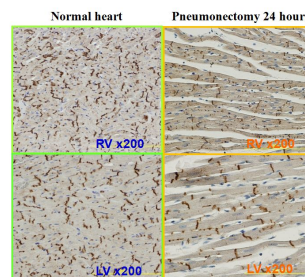


図3-2 Normotensive Heart VT/VF was NOT induced by RV burst 4 weeks after pneumonectomy



(3) 肺動脈圧が著明に上昇し、右心室の洞調律伝播速度、伝播様式が遅延及び異常化し、APD dispersionが延長している際に右心室心筋の connexin43発現を調べると、図4に示したごとく異常は認められなかった。

図4 Connexin 43 (Gap junction protein)



(4) 上記の結果を一覧表にして図5に示した。左片肺全摘手術後の右心室における致死性不整脈の誘発性は肺動脈圧、右室収縮期圧の著明な上昇、右心室の洞調律伝播速度、伝播様式は遅延及び異常化、APD dispersion延長に相関していた。

図5 Pneumonectomy-induced PH transiently causes RV conduction disturbance and arrhythmia induction

	Day 1 (n=7)	Day 4 (n=7)	1 week (n=7)	2 weeks (n=20)	4 weeks (n=10)
sRVP (mmHg)	26.9 ± 3.6	51.9 ± 4.8	54.5 ± 4.8	44.0 ± 2.8	34.1 ± 3.4
RAP (mmHg)	5.3 ± 1.0	5.4 ± 0.9	5.1 ± 0.8	5.6 ± 0.8	5.5 ± 0.5
RV dilatation	-	+	+	+	-
RV Conduction Disturbance	-	+	+	+	-
VF/VT induction	-	+	+	±	-

(5) 図5にまとめた如く、左片肺全摘手術の1日後から1 - 2週間後の間には、著明な肺動脈圧の上昇が認められ、この間に右心室伝播速度・伝播様式の異常化とAPD dispersion延長があり、致死性不整脈が容易に誘発された。しかし、この際心筋組織中の心筋伝導蛋白 connexin43の発現は正常であった。これらから、左片肺全摘手術に伴った一過性の肺高血圧は、APD dispersionの延長に認められる右室心筋再分極性の異常と右心室伝播速度・伝播様式の異常により明らかである右室脱分極の異常の双方が関与している可能性が示唆された。

(6) 左片肺全摘手術による肺動脈圧の上昇は一過性のものであり、その持続時間も長くとも3 - 4週間以内であり、短期間の圧不可では connexin43変化(4, 5)のような器質的变化は認められず、右心室伝播速度・伝播様式の異常やAPD dispersion異常で認められるような機能的変化が主体であることが示唆される。左片肺全摘手術における肺動脈圧上昇に伴う右心室圧負荷は、右心室の致

死性不整脈に対する催不整脈の増悪に十分であると考えられる。その機序としては、本研究からはその詳細は不明であるものの、心臓内圧が上昇すると容易に stretch-activated ion channel(SAC)が誘導され、伝導様式・脱分極興奮伝播の変化や APD の変化を容易にきたすと考えられる。左片肺全摘手術に伴う致死性不整脈の誘発性の亢進に関しては、connexin43発現変化よりもむしろ SAC 等の機序を介した病態が示唆される。また、肺高血圧症における APD dispersion 異常と致死性不整脈発生に関する関係はこれまでの報告に一致する (6, 7)。

(7) 今後、左片肺全摘手術に伴う一過性の肺高血圧と致死性不整脈誘発性との関係において、その機序解明には、SAC の選択的拮抗物質である tarantula venom 由来の peptide(GsMTx-4)を用いたさらなる研究が必要と考えられる。

<引用文献>

Rubin LJ. Introduction: Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guideline. *Chest*, 126, 2004, 7S-10S

Kuriyama T. Clinical aspect of precapillary pulmonary hypertension, *Nihon Kyobu. Sikkan Gakkai Zasshi (JP J Respir Disease)*, 30, 1992, 3-11

Umar S, Lee JH, da Lange E, Iorga A, Partow-Navid R, Bapat A, van der Laarse A, Saggari R, Ypey DL, Karagueuzian HS, Eghbali M. Spontaneous ventricular fibrillation in right ventricular failure secondary to chronic pulmonary hypertension. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 5, 2012, 181-190

Koura T, Hara M, Takeuchi S, Ota K, Okada Y, Miyoshi S, Watanabe A, Shiraiwa K, Mitamura H, Kodama I, Ogawa S. Anisotropic conduction properties in canine atria analyzed by high-resolution optical

mapping: preferential direction of conduction block changes from longitudinal to transverse with increasing age. *Circulation*, 105, 2002, 2092-2098

Sasano C, Honjo H, Takagishi Y, Uzzaman M, Emdad L, Shimizu A, Murata Y, Kamiya K, Kodama I. Internalization and dephosphorylation of connexin43 in hypertrophied right ventricles of rats with pulmonary hypertension. *Circ J*, 71, 2007, 382-389

Kohl P, Bollensdorff C, Garny A. Effects of mechanosensitive ion channels on ventricular electrophysiology: experimental and theoretical models. *Exp Physiol*, 91, 2006, 307-321

Morris CE, Juranka PF. Nav+ channel mechanosensitivity: activation and inactivation accelerate reversibly with stretch. *B iophys J*, 93, 2007, 822-833

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10件)

Takase B, Nagata M. Fixed-dose combination of losartan and hydrochlorothiazide significantly improves endothelial function in uncontrolled hypertension by low-dose amlodipine: a randomized study. *Anadolu Kardiyol Derg. 査読有*, 2014, 20146, 85-91

DOI : 10.5152/akd.2014.5049.

Takase B, Hattori H, Tanaka Y, Nagata M, Ishihara M . Anti-sympathetic action enhances

statin's pleiotropic effects: the combined effect of rosuvastatin and of atenolol on endothelial function. *Int Angiol*、査読有、2014、33、27-34

<http://www.minervamedica.it/en/journals/international-angiology/article.php?cod=R34Y2014N01A0027>

Watanabe E, Tanabe T, Osaka M, Chishaki A, Takase B, Niwano S, Watanabe I, Sugi K, Katoh T, Takayanagi K, Mawatari K, Horie M, Okumura K, Inoue H, Atarashi H, Yamaguchi I, Nagasawa S, Moroe K, Kodama I, Sugimoto T, Aizawa Y. Sudden cardiac arrest recorded during Holter monitoring: prevalence, antecedent electrical events, and outcomes. *Heart Rhythm*、査読有、2014、11、1418-25
DOI: 10.1016/j.hrthm.2014.04.036

Takase B, Nagata M, Hattori H, Tanaka Y, Ishihara M. Combined therapeutic effect of probucol and cilostazol on endothelial function in patients with silent cerebral lacunar infarcts and hypercholesterolemia: a preliminary study. *Med Princ Pract*、査読有、2014、23、59-65
DOI: 10.1159/000355825

Takase B, Hattori H, Tanaka Y, Uehata A, Nagata M, Ishihara M, Fujita M. Acute Effect of Whole-Body Periodic Acceleration on Brachial Flow-Mediated Vasodilatation Assessed by a Novel Semi-Automatic Vessel Chasing UNEXEF18G System. *J Cardiovasc Ultrasound*、査読有、2013、21、130-6.
DOI: 10.4250/jcu.2013.21.3.130.

高瀬凡平、東村悠子、木村一生、田中良弘、服部秀美、石原雅之. 出血性ショック心臓における致死性不整脈の機序に関する実験的検討 活動電位不均一性と Connexin43 変化について. *Therapeutic Research*、2013、34、1060-66
https://square.umin.ac.jp/saspe/archive/41/41th_07.pdf

Tanaka Y, Takase B, Yao T, Ishihara M. Right Ventricular Electrical Remodeling and Arrhythmogenic Substrate in Rat Pulmonary Hypertension. 査読有、*Am J Respir Cell Mol Biol*、2013、28、e003277
DOI: 10.1161/JAHA.112.003277

Enomoto S, Yoshino A, Takase B, Kuwahara T, Tatsuzawa Y, Nomura S. *Gen Hosp Psychiatry*、査読有、2013、35、575、e7-8
DOI: 10.1016/j.genhosppsych.2013.02.004.

Takase B, Tanaka Y, Hattori H, Ishihara M. Importance of platypnea orthodeoxia in the differential diagnosis of dyspnea. *Intern Med*、査読有、2012、51、1651-2
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22790121>

高瀬凡平、田中良弘、東村悠子、服部秀美、石原雅之、浜部晃、永井智雄. 肺全摘手術術後の右心室負荷による催不整脈性に関する検討. *Therapeutic Research*、2012、33、1616-1621
https://square.umin.ac.jp/saspe/archive/39/39th_03.pdf

〔学会発表〕(計9件)

Takase B. Possible Favorable Marker of Positive Head-up Tilt and Negative T-wave Alternans during Test in Suspected High Risk Reflex Syncope Patients., American Heart Association Scientific Session 2014、2014年11月15日～11月19日、Chicago、USA

Takase B., Tanaka Y. Cardiac Autonomic Activity, Cardiac Function and Arrhythmogenic Property in Hemorrhagic Shock Heart: Effect of Artificial Oxygen Carrier., American Heart Association Scientific Session 2014、2014年11月15日～11月19日、Chicago、USA

Takase B., Tanaka Y., Ishihara M. Arrhythmogenic Substrate in Hemorrhagic Shock-Induced Heart and Effect of Artificial Blood., Heart Rhythm 2014、2014年5月7日～5月10日、San Francisco、USA

Takase B., Hamabe A, Nagai T, Tabata H. T-wave Alternans during Head-up Tilt Testing in Suspected High Risk Reflex Syncope Patients., 第29回日本不整脈学会学術大会、2014年7月22日～7月25日、東京

Takase B., Tanaka Y. Myocardial Electrical Remodeling and Arrhythmogenic Substrate in Hemorrhagic Shock-Induced Heart. Association Scientific Session 2013、2013年11月16日～11月20日、Dallas、USA

Takase B., Tanaka Y. Pressure Overload Causes Right Ventricular Lethal Arrhythmias: Analysis

by Optical Mapping in Pulmonary Artery Banding and Pneumonectomy Model. Association Scientific Session 2013、2013年11月16日～11月20日、Dallas、USA

Takase B. What is the Latest Guidelines, Algorithms of Management of Syncope. The 6th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Sessions, 2013年10月3日～10月06日、Hong Kong

Takase B., Tanaka Y., Ishihara M. Right Ventricular Remodeling and Arrhythmogenic Substrate in Monocrotalin-induced Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Failure. American College of Cardiology 2013, 62th Annual Scientific Session, 2013年03月09日～03月12日、San Francisco、USA

〔図書〕(計2件)

高瀬凡平 他、医学書院、今日の循環器疾患治療指針、2013、64

高瀬凡平 他、先端医学社、2013、血压、10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高瀬凡平 (TAKASE, Bonpei)
防衛医科大学校・病院・准教授
研究者番号：50518214

(2) 研究分担者

石原雅之 (ISHIHARA, Masayuki)
防衛医科大学校・防衛医学研究センター・教授
研究者番号：10508500

(3) 連携研究者

田中良弘 (TANAKA, Yoshihiro)
防衛医科大学校・病院・教授

研究者番号：50533981