

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790736

研究課題名(和文) 肥満による心房細動発症機序の解明

研究課題名(英文) Vulnerability of Atrial Fibrillation is Increased in a Rat Model of Metabolic Syndrome Via Phosphorylation of Calcium-Calmodulin-Dependent Protein Kinase II

研究代表者

許 東洙 (Xu, Dong-Zhu)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：20616651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：内臓脂肪蓄積型肥満による心房細動の発症メカニズムとして心房に対する容量および圧負荷に伴うリモデリング・交感神経の活性化・組織の炎症などの様々な因子の影響が考えられ、本研究は、高脂肪食肥満モデルでは心房細動の誘発率と誘発時間が有意に延長し、心房の有効不応期が有意に短縮され、血清中・内臓脂肪中のアディポサイトカイン、カルシウム調節因子であるp-CAMKII, p-SERCA, p-RYR,が高脂肪食肥満モデル有意に増加しており、高脂肪食肥満モデルは、カルシウムハンドリングの変化が、メタボリックシンドロームでAFを促進する催不整脈性基質の形成に関与している可能性があることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Metabolic syndrome is associated with the pathogenesis of atrial fibrillation(AF), however, underlying mechanism still remains unknown. To clarify this point, model of metabolic syndrome was made by feeding a rat with high fat diet and AF vulnerability as well as pathophysiological background was evaluated. AF duration was significantly prolonged in high fat diet rats, and western blotting analysis revealed that phosphorylation of calcium-calmodulin-dependent protein kinase II was significantly increased in the left atrial from rats with high fat diet. High fat diet rats provided similar condition to that of metabolic syndrome, and increased AF vulnerability. Alteration of Ca handling proteins may be involved in the development of arrhythmogenic substrate that could promote AF in metabolic syndrome.

研究分野：循環器内科

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：心房細動 肥満 リモデリング Caハンドリング

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、肥満が心房細動の発症にどのように関わっているのかは不明であることから、肥満モデル動物における心房リモデリングに、NAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素である sirtuin-1 (SIRT1) が鍵分子として関与し、その発現・活性の低下がエネルギー代謝や炎症、カルシウム調節機構に変化をもたらすことで心房細動の起こりやすい基質が形成されているという仮説を立証し、さらにその知見に基づいた心房細動の新たな予防的治療法の開発を目指して計画した。

## 2. 研究の目的

心房細動は加齢とともに増加する不整脈疾患であり、現在日本で約 100 万人の患者がいると推測される。近年の疫学研究で、高血圧と並んで肥満が重要な危険因子であることが明らかとなったが、肥満が心房細動の発症にどのように関わっているのかは不明である。本研究は、肥満モデル動物における心房リモデリングに、NAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素である sirtuin-1 (SIRT1) が鍵分子として関与し、その発現・活性の低下がエネルギー代謝や炎症、カルシウム調節機構に変化をもたらすことで心房細動の起こりやすい基質が形成されているという仮説を立証し、さらにその知見に基づいた心房細動の新たな予防的治療法の開発を目指して計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) 肥満モデル動物の作成と in vivo で の電気生理検査

モデル動物としてラットとマウス 2 種類を用いる。ラット (8 週齢、Wistar、オス) は通常食群・高脂肪食群・高脂肪食群 + resveratorol (SIRT1 活性化薬; 10 - 50mg/kg/day、経口) の 3 群に分ける。また ob/ob マウス (6 週齢、オス) も同様に、野生型マウス (対照群)、ob/ob マウス無治療群、

ob/ob マウス + resveratorol 群に分ける。実験開始前と 12 週後に、体重測定および小動物用 CT にて内臓脂肪量・心外膜周囲脂肪量を評価する。また心エコーにて左心機能や左心房径を評価する。経静脈的に電極カテーテルを心房に挿入し、電気生理検査を行う。心房細動誘発率、心房細動持続時間、心房有効不応期などを in vivo で測定する。テレメトリ - 心電図を装着し、覚醒下での自然発生的な期外収縮や心房細動の発生を調べる。

### (2) アディポサイトカインの測定

血清中・内臓脂肪中のアディポサイトカイン (adiponectin、leptin、MCP (monocyte chemotactic protein)-1 など) を ELISA 法で測定する。

### (3) 心房における遺伝子・タンパク発現 解析

Sirtuin-1 およびその関連因子である p53、NFkB、Foxo、PPAR-gamma、PGC-1、およびカルシウム調節関連分子 (L 型カルシウムチャネル、心筋リアノジン受容体、ホスホランバンなど) の遺伝子・タンパク発現・およびリン酸化タンパクの発現を、real-time RT-PCR 法・Western blotting により解析する。

### (4) 病理組織評価

心房の病理切片を作成し、心房組織における間質線維化の程度を評価する。三群間で組織的リモデリングの相違を定量的に行う。

### (5) 細胞電気生理 (パッチクランプ・カルシウムイメージング)

通常食・高脂肪食・高脂肪食 + resveratorol 投与のラットそれぞれから心房筋を単離し、蛍光カルシウム指示薬 Fluo-3 を添加し、共焦点レーザー顕微鏡にてカルシウムスパークを測定する。初代心房培養細胞 (または HL-1 心房筋細胞) に脂質負荷を行ったり、脂質関連ペプチドを添加した際の細胞内カルシウム動態について、同様に測定する。

また、パッチクランプ法により、心房筋カルシウム電流・活動電位持続時間を計測する。

### (6) 高脂肪食動物モデルにおけるオメガ3脂肪酸投与実験

モデル動物としてラットとマウス2種類を用いる。通常食群、高脂肪食群、高脂肪食群+DHA群、高脂肪食群+EPA群、高脂肪食群+DHA+EPA群の4群に分ける。また ob/ob マウス(6週齢、オス)も同様に、野生型マウス(対照群)、ob/ob マウス無治療群、ob/ob マウス+resveratorol 群に分ける。実験開始前と12週後に、体重測定および小動物用CTにて内臓脂肪量・心外膜周囲脂肪量を評価する。また心エコーにて左心機能や左房径を評価する。経静脈的に電極カテーテルを心房に挿入し、電気生理検査を行う。心房細動誘発率、心房細動持続時間、心房有効不応期などを in vivo で測定する。テレメトリ-心電図を装着し、覚醒下での自然発生的な期外収縮や心房細動の発生を調べる。また、血清中・内臓脂肪中のアディポサイトカイン(adiponectin、leptin、MCP(monocyte chemotactic protein)-1など)をELISA法で測定する。オメガ3およびその関連因子であるp53、NFkB、Foxo、PPAR-gamma、PGC-1、およびカルシウム調節関連分子(L型カルシウムチャンネル、心筋リアノジン受容体、ホスホランパンなど)の遺伝子・タンパク発現・およびリン酸化タンパクの発現を、real-time RT-PCR法・Western blottingにより解析する。続いて、それぞれから心房筋を単離し、蛍光カルシウム指示薬Fluo-3を添加し、共焦点レーザー顕微鏡にてカルシウムスパークを測定する。初代心房培養細胞(またはHL-1心房筋細胞)に脂質負荷を行い、脂質関連ペプチドを添加した際の細胞内カルシウム動態について、同様に測定する。

#### 4. 研究成果

内臓脂肪蓄積型肥満であるメタボリック症候群は、心房細動発症の独立規定因子であり、特に肥満は若年者における心房細動の発症に大きく関わっている。また、肥満は心房細動の発症のみならず、心房細動の病型を発作性から持続性への移行に関わる独立規定因子であることも明らかとされている。内臓脂肪蓄積型肥満には高血圧や糖尿病などの疾患が併存することが多く、心房細動の発症メカニズムとして心房に対する容量および圧負荷に伴うリモデリング・交感神経の活性化・組織の炎症などの様々な因子の影響が考えられているが、詳細は明らかではない。

高脂肪食投与による肥満ラットモデル動物を用いて電気生理検査・心房細動誘発試験を行い、肥満に基づく in vivo での電気生理学的変化、病理組織評価を行った。また心房における哺乳類サーチュイン関連因子、カルシウム調節因子の遺伝子・タンパク発現を評価した。健常ラットおよび肥満ラットにおける心房単離心筋を用いて、カルシウムイメージングを行った。結果、高脂肪食肥満モデルでは心房細動の誘発率と誘発時間が有意に延長し、電気生理検査では、心房の有効不応期が有意に短縮されていることが分かった。病理学所見では、線維化が高脂肪食肥満モデルで著しく進んでおり、血清中・内臓脂肪中のアディポサイトカイン、カルシウム調節因子であるp-CAMKII、p-SERCA、p-RYRが高脂肪食肥満モデル有意に増加しており、高脂肪食肥満モデルは、カルシウムハンドリングの変化が、メタボリックシンドロームでAFを促進する不整脈性基質の形成に関与している可能性があることを確認した。しかし、今回の実験でNAD+依存性脱アセチル化酵素であるsirtuin-1の変化は認めず、さらに、sirtuin-1がカルシウム調節機構との直接関連は確認できなかった。

結論：高脂肪食の摂取は、メタボリック症候群類似の病態を惹起し、心房細動の持続時

間を有意に延長させた。メタボリック症候群における心房細動の不整脈基質の形成に、Caハンドリング蛋白の発現変化の関与が示唆された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Hiro Yamasaki, Nobuyuki Murakoshi, Xu DongZhu, Yoko Ito, Miyako Igarashi, Yukio Sekikuchi, Hiroshi, Tada, Kazutaka Aonuma. Vulnerability of atrial fibrillation is increased in a rat model of metabolic syndrome via phosphorylation of calcium-calmodulin- dependent protein kinase II. 第78回日本循環器学会学術総会 2014年3月22日, 東京

〔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

許 東洙 (Xu, Dong-Zhu)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号: 20616651

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号: