

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460281

研究課題名(和文)心房負荷モデル動物を用いた肺静脈心筋細胞の電気的リモデリングに関する研究

研究課題名(英文)Electrical remodeling of pulmonary vein cardiomyocytes during atrial overload

研究代表者

尾野 恭一 (ONO, Kyoichi)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70185635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：現在、慢性の不整脈で最も頻度が多い心房細動は、心房内を不規則に興奮が旋回するリエントリーによって生じると考えられており、多くの心房細動は肺静脈を起源とした期外収縮が引き金になっている。我々は、肺静脈心筋が他の部位の心筋細胞とは異なり、ノルアドレナリン等により容易に自動能を発揮する電気生理学的及び形態的な特徴を有していること、さらに、過分極によって活性化されるCl<sup>-</sup>チャンネルを有していることを見いだした。新たに、肺静脈心筋の特徴を組み込んだシミュレーションモデルを開発するとともに、高頻度ペーシング刺激により心房負荷を加えたモデル動物で生じる心房筋の電気生理学的変化を解析した。

研究成果の概要(英文)：Extensions of striated myocardium from the left atrium into the pulmonary veins (PVs) are termed myocardial sleeves. Ectopic activity of cardiomyocytes in the sleeves is thought to be responsible for initiation and maintenance of atrial fibrillation, the most frequent sustained arrhythmia encountered in clinical practice. We have reported that PV cardiomyocytes have the potential to generate spontaneous activity. In this study, we found a novel hyperpolarizing-activated Cl<sup>-</sup> current in PV cardiomyocytes, not in atrial and ventricular myocytes. We also showed that the norepinephrine-induced automaticity could be stopped by Cl<sup>-</sup> channel blocker, indicating that Cl<sup>-</sup> channel may play a functional role in the NE-induced automaticity. Furthermore, a computer simulation model was constructed to reconstruct electrical activity of PV cardiomyocytes, and electrical remodeling of rat atrial myocytes using rapid atrial pacing were analyzed.

研究分野：心臓循環生理学、電気生理学

キーワード：心房細動 肺静脈 自動能 不整脈 イオンチャンネル Cl<sup>-</sup>チャンネル

1. 研究開始当初の背景

心房細動の発生に肺静脈が深く関係することを Hissaguerre らが 1998 年に報告して以来、肺静脈内部の異常興奮部位を局所的に焼灼するアブレーション法や、肺静脈心筋を左房から電気的に隔離する PV isolation 法など、心房細動治療は大きく変化した。一方、肺静脈における異常興奮発生の分子基盤についても、分子生物学的及び電気生理学的なアプローチによりいくつかの新たな知見が提出されている。国内においては、名古屋大の児玉らのグループが、ウサギおよびラット肺静脈におけるイオンチャネル mRNA 及び蛋白発現分布を調べ、肺静脈では興奮伝導遅延を基盤とするリエントリーや細胞内 Ca 調節異常による triggered activity が生じやすい基質を有していると報告している。一方、国外においては米国の Nattel らが肺静脈心筋のイオンチャネルに関する研究を行っており、その特性について多くの報告がある。2009 年、Findlay らのグループはラット肺静脈にノルアドレナリンを投与すると、自動能が発現するという論文を報告し、新たな自動能発現の一メカニズムとして注目されている。

生理的ペースメーカーである洞房結節と肺静脈心筋の異常自動能は、前者がイオンチャネルの開閉が電位・時間に依存して変化することにより生じるのに対し、後者は振動性の膜電流変化が基礎になっていることに大きな相違点がある。正常の心筋においても細胞内 Ca の過剰負荷の際に生じる振動性後電位が、肺静脈では正常時でも発生していることが示唆される。圧負荷など病態下の心筋においては Ca 過剰負荷をきたしやすいことが知られており、肺静脈心筋においてはさらなる Ca 過剰負荷を生じている可能性が高い。

2. 研究の目的

ラット肺静脈を用いて肺静脈心筋細胞の電気生理学的特性及び細胞内カルシウム動態について、自動能発現との関わりを明らかにすることを目的とする。とりわけノルアドレナリン負荷によって生じる異常自動能の起因となるイオン電流系を解明し、心房細動発生への関わりを明らかにしたい。

(1) ラット肺静脈心筋の電気生理学的特性の解析

対象となるイオン電流は電位依存性 Na チャネル、L 型及び T 型 Ca チャネル、遅延整流 K チャネル、一過性外向性 K チャネル、内向性整流 K チャネル、ムスカリン性 K チャネル、過分極活性化陽イオンチャネル、Na/Ca 交換

体、Na/K ポンプである。

(2) 病態モデル動物の作成と肺静脈心筋細胞の電気的リモデリング

麻酔下にラットを 24 時間以上急速ペーシングすることにより、心房筋細胞の電気的リモデリングが起こることを見出している。本病態モデルラットにおいて肺静脈心筋の電気的リモデリングの有無を実験的に検証し、肺静脈が心房細動維持の基質として機能している可能性を確認する。

(3) シミュレーションモデル開発

イオン電流系の定量的情報を数学モデルに組み込み、コンピュータ上で肺静脈心筋興奮を再現させる。

3. 研究の方法

(1) 肺静脈の電気生理学的特性及び分子生物学的解析

ラット肺静脈より心筋細胞を単離し、電気生理学的特性についてパッチクランプ法にて解析する。

(2) 病態モデルにおける肺静脈心筋細胞の電気的リモデリング

麻酔下にラットを 24 時間以上急速ペーシングすることにより、心房及び肺静脈心筋に生じる電気的リモデリングについて解析する。

(3) シミュレーションモデル作成

報告されている心筋細胞モデルをベースに、肺静脈心筋の形態的特徴及び電気生理学的パラメータを組み込んで、肺静脈心筋の自動能を再現する。

4. 研究成果

(1) ラット肺静脈心筋の電気生理学的特性の解析及びシミュレーション

肺静脈心筋細胞は、形態は固有心筋に似ているものの、固有心筋細胞とは異なりわずかな刺激でも興奮しやすい性質を有している。肺静脈心筋細胞では、静止膜電位形成に寄与する「内向性整流 K チャネル」と呼ばれる K チャネルの電流密度が小さい。また、脱分極によって活性化される L 型 Ca 電流の電流密度も固有心筋に比べて小さい。

さらに、肺静脈心筋には膜の過分極によって活性化される Cl 電流が存在することを見いだした。この電流は、過分極で活性化されるので、自動能を生み出すには最適な性質を有している。同じような過分極活性化電流が、洞房結節のペースメーカー細胞にも存在し (I<sub>f</sub> 電流、と呼ばれる)、まさにペースメーカー電流を構成するとされている。しかしながら、肺静脈心筋細胞は Cl を通すのに対し、洞房結節細胞の I<sub>f</sub> 電流は陽イオンを通すということが、決定的に異なる。過分極活性化 Cl 電流は心房筋や心室筋細胞では

記録することができず、肺静脈心筋に固有の電流系と考えられる。

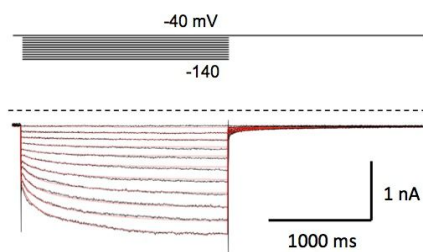


図1．過分極活性化 Cl 電流とシミュレーション波形．細胞から記録した電流（黒）とコンピュータシミュレーションによる波形（赤）を重ね書きしている。ほとんど重なっており、うまく近似できていることを示す。

新しく見つかった過分極活性化 Cl チャンネルが、ノルアドレナリン誘発自動能に関与しているのかを検討するために、コンピュータシミュレーションによる解析をおこなった。ここでは、Hodgkin-Huxley 型のゲートモデルを用いて過分極活性化 Cl チャンネルの開閉過程を近似した。

このシミュレーションモデルを用い、実際に記録された NE 誘発自発性活動電位中に流れる Cl 電流の大きさを予測したところ、静止膜電位が比較的深く、発火頻度が比較的遅い細胞においては、活動電位終了後から Cl 電流の振幅が徐々に大きくなり、次の活動電位が発生する直前で最大振幅となっている。即ち、こうした細胞において自発性活動電位の発生に関与していると考えられた。

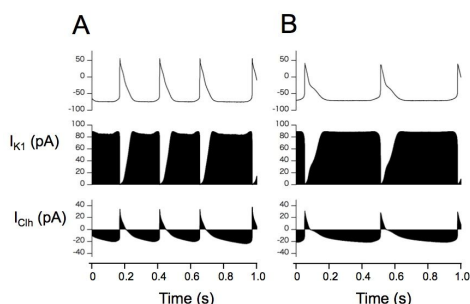


図2．活動電位中に流れる過分極活性化 Cl 電流と内向き整流 K 電流．拡張期において次第に活性化し、自発性活動電位が発生する直前で最大の活性化が得られている。

## (2) 病態モデルにおける肺静脈心筋細胞の電気的リモデリング

ラットをセボフルレン吸入により麻酔し、心房を 24 時間以上にわたって急速ペーシング (1500 回/分) すると、時間経過とともに心室応答が次第に不規則になる。ペーシング 24 時間後に心房細動の誘発試験を行ったところ、ペーシング群において心房細動の発現率及びその持続時間が有意に増加していた。ペーシング群のラット心房筋細胞を単離し、電気生理学的特性を解析したところ、L 型 Ca チャンネルの電流密度が有意に減少していることがわかった。定量 PCR により測定した mRNA 量も減少しており、Ca チャンネルの発現が低下したものと考えられる。Ca チャンネルの減少による心房筋の収縮が心房細動発現率増加に関与していると考えられた。

高頻度刺激群での肺静脈心筋の解析は、ペーシング後の肺静脈心筋細胞の単離がきわめて困難で、今回は心房筋の解析のみにとどまっている。心房筋細胞と同様の電気的リモデリングが生じているのか、また、潜在性自動能が亢進しているのか、今後引き続いて検討していく。



図3．急速ペーシング中のラットの心電図。時間が経つにつれ RR 間隔が不規則になっている。

## 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4件)

Hong M, Fujisawa S, Shimbo T, Shibata S, Ohba T, Ono K. Age-related effects of dexmedetomidine on myocardial contraction and coronary circulation in isolated guinea pig hearts. J Pharmacol Sci 2016. 査読有. (in press) doi:10.1016/j.jphs.2016.05.002  
Koyama T, Sato S, Kanbayashi T, Kondo H, Watanabe H, Shimizu T, Ito H, Ono K. Apnea during Cheyne-Stokes-like breathing

detected by a piezoelectric sensor for screening of sleep disordered breathing. *Sleep and Biological Rhythms*, **13**(1), 57-67, 2015. (査読あり)

URL:<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/sbr.12097/abstract>

尾野恭一 心臓の生理的自動能と異常自動能：イオンチャンネルクロックとカルシウムクロック. *臨牀と研究* 91(6), 851-854, 2014. (査読なし) URL:<http://www.doctor-info.net/keyword/index.php>

Okamoto Y, Kawamura K, Nakamura Y, Ono K. Pathological impact of hyperpolarization-activated chloride current peculiar to rat pulmonary vein cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 66:53-62, 2014. (査読有り) doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.11.002.

〔学会発表〕(計 9 件)

尾野恭一、Ca and K channels in cardiac pacemaker activity – The Mechanism of Heart Beats-、第 30 回日本不整脈学会学術大会・第 32 回日本心電学会学術集会合同学術大会、平成 27 年 7 月 29 日、京都国際会館(京都)

尾野恭一、肺静脈自動能と Cl-チャンネル第 30 回日本不整脈学会学術大会・第 32 回日本心電学会学術集会合同学術大会、平成 27 年 7 月 31 日、京都国際会館(京都)  
Ono, K., Umehara, S., Okamoto, Y., Adachi, T., Ohba, T., Amano, A. (2015) Electrophysiological study and simulation analysis of Potential Automaticity in Rat Pulmonary Vein Cardiomyocyte. 多階層生体機能学終了記念シンポジウム、平成 27 年 3 月 4 日、大阪大学中之島センター佐治敬三ホール

Adachi T, Shibata S, Okamoto Y, Sato S, Fujisawa S, Ohba T, Ono K. Postnatal change of heart rate and sinoatrial node pacemaker activity in mice. IUPS2013、平成 26 年 7 月, Birmingham, UK

Ono K, Okamoto Y, Adachi T, Ohba T, Takano M. Arrhythmogenic nature of pulmonary vein cardiomyocytes. 第 90 回日本生理学会大会、平成 26 年 3 月 27-29 日, タワーホール船堀(東京都)

Hongo M, Fujisawa S, Adachi T, Simbo T, Shibata S, Ohba T, Ono K. Age-related effects of dexmedetomidine, an alpha-2 agonist, on coronary vasoactivity and cardiac function in guinea-pig hearts 日本生理学会第 91 回大会, 平成 27 年 3 月 16-18 日, 鹿児島大学キャンパス(鹿児島)

尾野 恭一(2015).「生理学教育におけるバイオシミュレーション教材の必要性」 e-Heart シンポジウム、平成 27 年 2 月 28 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、エポック立命 21(滋賀)

梅原象平、姫野友紀子、尾野恭一、野間昭典、天野晃数学モデルを用いたラット肺静脈心筋細胞におけるノルアドレナリン誘発自動能の解析第 93 回日本生理学会大会、平成 28 年 3 月 22-24 日、札幌コンベンションセンター(札幌)

岡本洋介、鷹野誠、尾野恭一。ラット肺静脈心筋細胞の不整脈性第 93 回日本生理学会大会、平成 28 年 3 月 22-24 日、札幌コンベンションセンター(札幌)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：生体信号測定装置及び生体信号測定方法

発明者：安達健、尾野恭一、伊藤昭彦、預幡哲也

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-056512

出願年月日：2016 年 3 月 22 日

国内外の別：国内

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

尾野 恭一 (ONO, Kyoichi)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70185635

### (2) 研究分担者

大場 貴喜 (OHBA, Takayoshi)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80431625

柴田 繁啓 (SHIBATA, Shigehiro)

秋田大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10326671

(2013 年度まで研究分担者)

### (3) 連携研究者