

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：32639

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461071

研究課題名(和文) 糖尿病における心筋酸化ストレスと不整脈基盤形成の機序および制御に関する研究

研究課題名(英文) The study of mechanisms and prevention of arrhythmogenetic remodeling of ventricular myocardium caused by oxidative stress under hyperglycemic state.

研究代表者

庭野 裕恵 (HIROE, Niwano)

玉川大学・教育学部・教授

研究者番号：00293233

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)：本研究では、心筋/骨格筋特異的 Mn-Sod (manganese superoxide dismutase)ヘテロ欠損マウスにストレプトゾトシンを投与し、高血糖負荷を加えることにより、ワイルドタイプマウスと比較して強い心筋特異的過酸化状態が生じ、単層性活動電位と有効不応期の延長(電気的リモデリング)が生じることによって、不整脈誘発性が増加した。また、Sod/catalase活性含有サレン-マンガン錯体(EUK8)の投与は、心筋での活性酸素種発生を抑制し、心筋特異的過酸化状態および電気的リモデリング抑制した。高血糖下の心筋の過剰な過酸化状態は、一義的に不整脈誘発性を亢進させる要因と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, hyperglycemic state was induced by the injection of streptozotocin (STZ) in heart/muscle-specific manganese superoxide dismutase-hetero deficient (H/M-Sod2+/-) mice and the myocardial electoro-physiological status was evaluated. In this model mice, we documented the hyper-production of reactive oxygen species(ROS) and the electrical remodeling which characterized by prolongation in ERP and MAPD with the increase of inducibility of ventricular arrhythmia. Also, EUK-8 (the SOD/catalase mimetic) treatment diminished the ROS production independently to the hyperglycemic condition, and suppressed these electoro-physiological changes. This result may indicate the importance of oxidative stress in promotion of the electrical remodeling in acute hyperglycemic state.

研究分野：循環器内科学

キーワード：酸化ストレス SOD欠損マウス 不整脈基盤 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

過剰酸化ストレス状態は、動脈硬化・心不全・加齢などによる心筋リモデリングと心血管病の発症の基盤となる。特に急性冠症候群早期で、心筋局所の過剰活性酸素主 (ROS) 産生が電気生理学的均衡を破壊し、致命的不整脈を誘発すると考えられているが、詳細な機序は不明である。

一方、近年罹病率が増加している糖尿病では、予後規定因子である心血管病合併症の進行に、酸化ストレスの関与が大きいとされる。糖尿病では心筋内でも解糖が促進され、ミトコンドリア電子伝達系が亢進する結果 ROS が多量に産生される。AGE (advanced glycation endproducts) 産生過程で生じる ROS も併せて心血管障害を誘導すると考えられている。糖尿病においても心筋不整脈基盤形成が心血管病の進行を促進している可能性があるが、糖尿病心筋 ROS 産生と電気生理学的リモデリング機序については検証されていない。

2. 研究の目的

(1) 糖尿病による心筋の過剰酸化ストレス産生が一次性に不整脈基盤形成を誘導するという仮説を検証すること。

(2) 糖尿病心筋での過剰酸化ストレス発現が電気的リモデリングをもたらす一次性要因となり不整脈発生基盤を形成する機序を解明し、抗酸化薬による抑制効果を検証すること。

3. 研究の方法

(1) 心筋骨格筋特異的ミトコンドリア superoxide dismutase (SOD2) ヘテロ欠損マウス (H/M-Sod2^{+/-}) にスオレプトゾトシン (STZ) を投与することで1型糖尿病を発症させ、臨床糖尿病を模した実験モデルを作成し、心筋組織酸化ストレス発現と催不整脈基盤の形成について検証する。

(2) H/M-Sod2^{+/-}マウス心筋細胞の primary culture による実験系を樹立し、高血糖下において内因性 ROS・イオン電流と活動電位の変化を検証し、その分子的な機序を解明することを目的とする。

4. 研究成果

(1) 高血糖 H/M-Sod2^{+/-}マウスでは、Wild Type に比較して血清中 ROS 代謝産物の増加と心筋での ROS 過剰産生が認められた (図 1、図 2)。

図 1. 血清 d-ROM 値 (Unit CXARR)

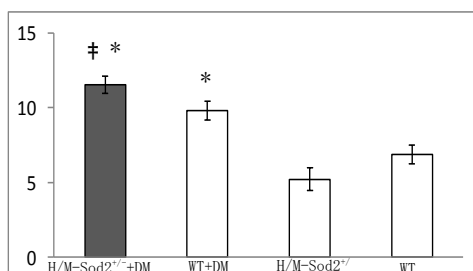
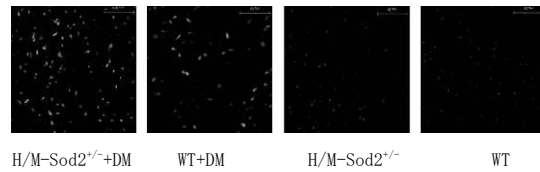


図 2. マウス心筋 DHE 染色



心筋電気生理学的評価 (麻酔・呼吸管理下) では、高血糖 H/M-Sod2^{+/-}群のみ、単層性活動電位 MAPD 延長 (H/M-Sod2^{+/-}DM 対 WT コントロール: 48.5 ± 3.2 ms 対 34.2 ± 3.2 ms, p < 0.05) および ERP 延長 (H/M-Sod2^{+/-}DM 対 WT コントロール: 67.0 ± 5.6 ms 対 50.0 ± 5.6 ms, p < 0.05) を示し、プログラム刺激下の心室性不整脈誘発率が亢進した (H/M-Sod2^{+/-}DM 対 WT コントロール: 34.0 ± 5.6 対 18.2 ± 3.2, p < 0.05)。なお、心筋組織の HE 染色および Azan 染色の所見からは、どの群においても明らかな組織障害や線維化は観察されなかった。

(2) (1)の結果より、マウスモデルにおいて糖尿病心筋での過剰酸化ストレス発現が、電気的リモデリングをもたらす一次性要因となり不整脈発生基盤を形成する可能性が示唆された。酸化ストレスと電気的リモデリングの関連をさらに検証するため、心筋過剰酸化ストレス状態を制御することによって、電気的リモデリングが抑制されるか否か検討した。

各群に Sod/catalase 活性含有サレン-マンガン錯体 (EUK8) を投与したところ、血清中 ROS 代謝産物の増加と心筋での ROS 過剰産生が抑制され (図 3)、MAPD および ERP 延長の回復 (図 4) と不整脈誘発率の低下がみられた。この結果は、酸化ストレスの制御により、不整脈基盤形成を少なくとも一部制御することが可能であることを示唆するものと考えられる。

図 3. マウス心筋 DHE 染色

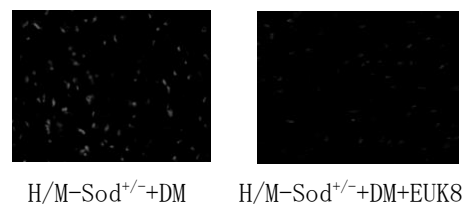


図 4-1. ERP (ms)

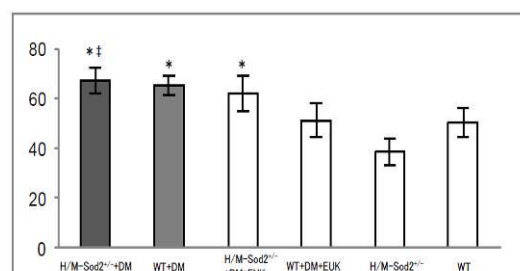
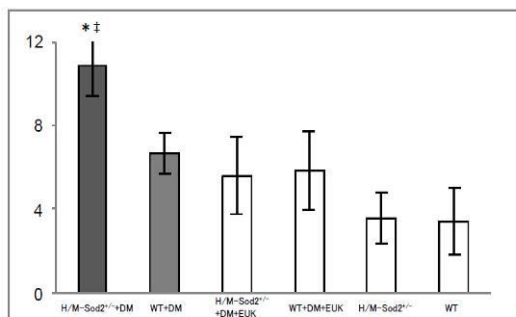
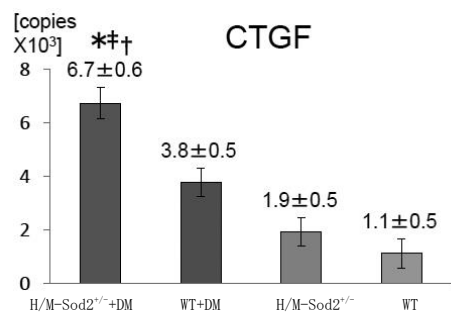


図 4-2. MAPD ($\times 10^2$ ms)



(3) 糖尿病心筋での過剰酸化ストレス発現が、電気的リモデリングをもたらす一因となり不整脈発生基盤を形成することが示唆されたが、この機序を明らかにすることが、研究目的(2)である。細胞電気生理学研究のツールとして、H/M-Sod2^{+/+}マウス心筋細胞の primary culture による実験系の樹立を試みたが、細胞の精製と維持が困難であり成功に至らなかった。機序に関わる検討として、モデルマウス心筋に発現する主要イオンチャンネルおよび間質関連タンパクについて、mRNA 発現量を定量した。その結果、Kv4.2、L型 Ca²⁺、コネクシン 43 が DM 群で有意に低下し、間質マトリセルラータンパクに属する CTGF が H/M-Sod2^{+/+}DM 群で有意に増加していた (図 5、p<0.05)。

図 5 CTGF mRNA 発現



今回の研究では、過剰酸化ストレス発現が、心筋電気的リモデリングをもたらす一因となる可能性が、高血糖モデルマウスで示された。しかし、機序については十分な知見が得られたとはいえず、さらに検証を継続している。

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 11 件)

- ① Niwano S. Is Circulating Fibroblast Growth Factor 23 a Surrogate Marker or Active Mediator for the Construction of Atrial Fibrillation Substrate? *Circ J*, 査読あり, 2015; 79: 1685-1686.
- ② 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*, 査読あり, 2014;11(8):1418-25.

- ③ Yoshizawa T, Niwano S., Niwano H., Igarashi T, Fujiishi T, Ishizue N, Oikawa J, Satoh A, Kurokawa S, Hatakeyama Y, Fukaya H, Ako J. Prediction of new onset atrial fibrillation through P wave analysis in 12 lead ECG. *Int Heart J*, 査読あり, 2014;55(5):422-7.
- ④ Kaneko Y, Horie M, Niwano S., Kusano K, Takatsuki S, Kurita T, Mitsuhashi T, Nakajima T, Irie T, Hasegawa K, Noda T, Kamakura S, Aizawa Y, Yasuoka R, Torigoe K, Suzuki H, Ohe T, Shimizu A, Fukuda K, Kurabayashi M, Aizawa Y. Electrical Storm in Patients with Brugada syndrome is Associated with Early Repolarization. *Circ Arrhythm*, 査読あり, 2014; 7: 1122-1128. doi: 10.1161/CIRCEP.114.001806.
- ⑤ Niwano S. Role of Endothelial Dysfunction in Thrombus Formation in the Left Atrium. Protective Role of Nitric Oxide Synthesis in the Surface of Atrium. *Circ J*, 査読あり, 2014; 78: 1841-1842.
- ⑥ Kishihara J, Niwano S., Niwano H., Aoyama Y, Satoh A, Oikawa J, Kiryu M, Fukaya H, Masaki Y, Tamaki H, Izumi T, Ako J. Effect of carvedilol on atrial remodeling in canine model of atrial fibrillation. *Cardiovasc Diagn Ther*, 査読あり, 2014; 4: 28-35.
- ⑦ Kurokawa S, Niwano S., Niwano H., Ishikawa S, Murakami M, Kosukegawa T, Masaki Y, Tamaki H, Toda T, Noda Y, Shimizu T, Izumi T. Cardiomyocyte-derived Mitochondrial Superoxide Causes Myocardial Electrical Remodeling by Down-regulating Potassium Channels and Related Molecules. *Circ J*, 査読あり, 2014; 78: 1950-59.
- ⑧ Niwano S., Oikawa J, Fukaya H. Prophylactic catheter ablation for ventricular tachycardia reduces morbidity and mortality in patients with implantable cardioverter-defibrillator devices. *J Arrhythmia*, 査読あり, 2013; 29: 338-341.
- ⑨ Oikawa J, Niwano S., Niwano H., Ishizue N, Yoshizawa T, Satoh A, Kurokawa S, Hatakeyama Y, Fukaya H. Prophylactic statin administration may prevent shortening of the fibrillation cycle length in patients with new onset atrial fibrillation. *Int Heart J*, 査読あり, 2013; 54, 362-70.
- ⑩ Takeuchi I, Fujita H, Ohe K, Imaki R, Sato N, Soma K, Niwano S., Izumi T. Initial

experience of mobile cloud ECG system contributing to the shortening of door to balloon time in an acute myocardial infarction patient. *Int Heart J* 2013, 査読あり, 54: 45-7.

- ⑪ Ishikawa S, Niwano S, Imaki R, Takeuchi I, Irie W, Toyooka T, Soma K, Kurihara K, Izumi T. Usefulness of a Simple Prognostication Score in Prediction of the Prognoses of Patients With Out-of-Hospital Cardiac Arrests. *Int Heart*, 査読あり, 2013; 54, 362-70.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Fujiishi T, Niwano S, Murakami M, Nakamura H, Igarashi T, Ishizue N, Oikawa J, Kishihara J, Fukaya H, Niwano H, Ako J. Prediction of Upcoming Therapeutic Episodes of ICD through Routine Data in Periodic Device Clinic of ICD Patients. American Heart Association, Congress 2015. (2015 年 11 月 7 日、オランダ、米国)
- ② Kishihara J, Niwano S, Niwano H, Satoh A, Igarashi T, Ishizue N, Fujiishi T, Yoshizawa T, Murakami M, Fukaya H, Ako J. Aliskiren Suppresses Extracellular Matrix Genes in Atrial Fibrillation - A Global mRNA Profiling in the Canine Experimental Atrial Fibrillation Model -. (2015 年 8 月 31 日、ロンドン、英国)
- ③ Ishizue N, Niwano S, Nakamura H, Igarashi T, Fujiishi T, Yoshizawa T, Oikawa J, Kishihara J, Murakami M, Fukaya H, Niwano H, Ako J. Linagliptin, a DPP-4 Inhibitor, Suppresses the Electrical Remodeling and Myocardial Injury in Isoproterenol-induced Myocardial Injury Model in Rat. European Society of Cardiology Congress 2015. (2015 年 9 月 1 日、ロンドン、英国)
- ④ Niwano S. Arrhythmias and Myocardial Remodeling in Autoimmune Myocarditis Model. Symposium in 29th Annual Meeting of The Japanese Heart Rhythm Society. (招待講演、2014 年 7 月 24 日、東京プリンスホテル、東京都港区、日本)
- ⑤ Ishizue N, Niwano S, Saitou M, Igarashi T, Fujiishi T, Yoshizawa T, Kishihara J, Murakami M, Fukaya H, Niwano H, Miyaoka H, Ako J. Antiepileptic medicines increase the prevalence of Brugada-type ST elevation in patients with epilepsy. American Heart Association, Congress 2014. (2014 年 11 月 18 日シカゴ、米国)
- ⑥ Yoshizawa T, Niwano S, Niwano H, Ishizue N, Oikawa J, Satoh A, Kurokawa S, Hatakeyama Y, Fukaya H, Ako J. Febuxostat Prevents Atrial Remodeling via Decreasing Production of Reactive Oxygen Species in

Canine Model of Atrial Fibrillation. American Heart Association, Congress 2013. (2013 年 11 月 21 日ダラス、米国)

- ⑦ Oikawa J, Niwano S, Niwano H, Ishizue N, Yoshizawa T, Satoh A, Kurokawa S, Hatakeyama Y, Fukaya H, Ako J. "PAF predicting score" for distinction of paroxysmal and non-paroxysmal atrial fibrillation by using clinical parameters and fibrillation cycle length in the surface ECG. American Heart Association, Congress 2013. (2013 年 11 月 19 日ダラス、米国)
- ⑧ Oikawa J, Niwano S, Ishizue N, Yoshizawa T, Satoh A, Kurokawa S, Hatakeyama Y, Fukaya H, Niwano H. Use of statins suppress the shortening of the fibrillation cycle length in patients with new-onset atrial fibrillation -Possible anti-remodeling effect of statin for atrial structural remodeling. European Society of Cardiology Congress 2013. (2013 年 8 月 31 日アムステルダム、オランダ)

[図書] (計 5 件)

- ① 庭野慎一、阿古潤哉. 松澤佑次編. ここまで明らかになった尿酸代謝ワールドと高尿酸血症の病態解明. メディカルビュー社 2015 p.62-67.
- ② 庭野慎一. 奥村謙編. 不整脈治療 update. 医薬ジャーナル社. 2015 p.97-101.
- ③ 庭野慎一. 堀正二、永井良三編. 循環器疾患最新の治療 201-2015 南江堂 2014, p.287-290.
- ④ 庭野慎一. 井上博、許俊鋭、檜垣濱男、代田浩之、筒井浩之編. 今日の循環器疾患治療指針 第 3 版. 医学書院 2013, p.255-257.
- ⑤ 庭野慎一. 池田隆徳、山下武志編. 不整脈概論. Medical View 2013, p.164-171.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庭野 裕恵 (NIWANO, Hiroe)
玉川大学・教育学部・教授
研究者番号：00293233

(2) 研究分担者

庭野 慎一 (NIWANO, Shinichi)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：70282978