

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860194

研究課題名(和文) 3次元空間イメージングによる肺静脈心筋自発活動の発生および伝播機序の解明

研究課題名(英文) Three dimensional imaging for the investigation of the mechanisms of generation and propagation of automaticity in the pulmonary vein myocardium

研究代表者

行方 衣由紀 (NAMEKATA, Iyuki)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：30510309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：組織の立体構造を保持した肺静脈標本に高速3次元共焦点顕微鏡法および微小電極法を適用し、細胞から組織レベルまでの総合的視点から、自発活動の発生および伝播機序を解明することを目指した。摘出肺静脈組織標本では自発活動が観察され、その発火頻度はnoradrenalineによって増大し、acetylcholineによって減少した。自発活動が見られない標本にnoradrenalineを作用させると静止膜電位の変化および局所的な細胞内カルシウムオシレーションに続いて自発活動が誘発された。以上の結果より、肺静脈心筋の自発活動は自律神経伝達物質により影響を受けることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： We recorded the spontaneous automaticity from the myocardial layer of isolated pulmonary veins with high-speed 3-dimensional confocal microscopy and glass microelectrode technique. Spontaneous automaticity was observed in isolated pulmonary vein preparations and firing frequency was enhanced by noradrenaline, while reduced by acetylcholine. Noradrenaline affected the resting membrane potential and induced local calcium oscillations followed by spontaneous automaticity. These results indicated that spontaneous automaticity of the pulmonary vein myocardium is influenced by autonomic neurotransmitters.

研究分野：循環薬理学

キーワード：薬理学 肺静脈心筋 イメージング 自動能 心房細動

## 1. 研究開始当初の背景

心房細動は患者数が多く(日本に130万人)、心原性脳梗塞を誘発するなど患者のQOLを損なうことから、治療意義の大きい不整脈である。これまで心房細動は心房筋の異常興奮が主原因と考えられていたため、現在も治療薬は心臓にターゲットをおいた抗不整脈薬が使用されている。しかし近年、心房細動患者の9割以上は左心房に隣接する肺静脈が不整脈の源であり、さらに肺静脈に迷入している心筋組織から発生する異所性自動能が原因であることが判明した。従ってこの肺静脈自動能を抑制する薬物を見出すことができれば、心房細動の新たな治療戦略に繋がり、社会に大きく貢献できる。現在まで、肺静脈心筋細胞に存在する個々のイオンチャンネルに注目した基礎的検討はなされているが、肺静脈心筋の異所性自動能の発生機序や薬物応答性については未解明の点が多く、治療戦略を構築するための情報は極めて少ない。

そこで私は、細胞の興奮を可視化できる蛍光イメージング法を用いて、組織構造を保持した状態の肺静脈を、細胞から組織レベルまでの高い空間分解能で観察し、解析することができれば、自発活動の発生と伝播のすべての過程が可視化され、心房細動の発生機序の解明に繋がるという着想に至り、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、肺静脈の電氣的自発活動に焦点を当て、組織の立体構造を保持した肺静脈標本に高速3次元共焦点顕微鏡法および微小電極法を適用し、細胞から組織レベルまでの総合的視点から、自発活動の発生および伝播機序を解明することである。

## 3. 研究の方法

Hartley系モルモットおよびddYマウスから素早く心肺を摘出し、左心房および肺静脈組織標本を作製した。細胞内Ca<sup>2+</sup>動態は組織標本あるいは単離細胞に蛍光プローブを負荷し、共焦点顕微鏡法により可視化・定量した。心筋細胞の単離は、肺をつけたままランゲンドルフ灌流心を作成し、コラゲナーゼ処理により行った。電流測定はwhole-cell patch clamp法を適用し行った。細胞内活動電位の測定は定法に従い、3Mの塩化カリウムで満たしたガラス微小電極(抵抗値20~30 $\Omega$ )を電極内に刺入し行った。

## 4. 研究成果

モルモット・ラット・マウスの肺静脈摘出標本を組織染色した結果、肺静脈心筋層自体の厚さはモルモット>ラット>マウスの順であった。モルモットの肺静脈自体の厚さは300ミクロン程度であり、さらに肺静脈心筋層はおよそ150ミクロン程度であった。一方マウスの肺静脈自体の厚さは100ミクロン程度であり、さらに肺静脈心筋層はおよそ30

ミクロン程度であった。どの動物種でも、心筋層は血管平滑筋層と外膜に挟まれて存在していた。しかし、どの動物種でも心筋組織層の厚さは一定ではなく、肺側に行くほど薄くなっていくことが観察された。共焦点顕微鏡を用いて、肺静脈組織の断面を観察した結果、血管の内腔側から、内皮細胞層、血管平滑筋層、心筋層、そして外膜が存在していることが明らかになった。また神経の混在も観察された。さらに肺静脈心筋組織内の細胞の走行を観察すると、多くの細胞は輪走筋方向に走行していたが、局所的に異なる走行をしている細胞が観察された。

厚みのあるモルモットの肺静脈摘出標本では、蛍光プローブの均一な導入が難しく、また対物レンズの作動距離の限界のため、外膜側の心筋層の観察が困難を極めた。一方、血管組織自体の断面が薄いマウス肺静脈摘出標本は、比較的蛍光プローブの導入が容易であり、かつ対物レンズの作動距離の範囲内にあるため、顕微鏡観察に適している可能性が示唆された。

摘出肺静脈組織標本にCa<sup>2+</sup>蛍光プローブを導入し、観察した結果、どの動物種でも細胞内Ca<sup>2+</sup>オシレーションが観察された。ある心筋部位では、活動電位の発生を示唆するCa<sup>2+</sup>transientが観察範囲内の心筋層で同様に発生している様子が捉えられた。また別の心筋部位ではCa<sup>2+</sup>waveやCa<sup>2+</sup>sparkといった局所的なオシレーションが観察された。Ca<sup>2+</sup>waveが細胞間を伝播していく様子も捉えられ、その伝播速度は60から120 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 程度と、心房筋で観察されるものと大きな違いはなかった。

一方、細胞内カルシウム動態や循環器疾患の発症と深く関連すると予想される交感神経伝達物質のnoradrenalineを処置すると、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇と、自発的なCa<sup>2+</sup>oscillationの発生が観察された。そこへ筋小胞体阻害薬であるryanodineを処置すると、Ca<sup>2+</sup>オシレーションが停止した。

マウス肺静脈摘出組織標本の心筋層にガラス微小電極を刺入し、電気活動を記録した。約半分の標本で自発的電気活動が見られ、連続発火、バースト状の間欠的な発火の両方が見られた。この自発活動の発火頻度をnoradrenalineは増大させ、acetylcholineは減少させた。自発的電気活動が見られない標本に1Hzの電気刺激を加えると、活動電位が発生した。肺静脈心筋の静止膜電位は心房筋に比べて浅いものであった。自発的電気活動が見られない標本にnoradrenalineを作用させると静止膜電位の脱分極方向あるいは過分極方向へのシフトが見られ、続いて自発活動が誘発された。この自発活動に対してacetylcholineおよびadenosineは抑制効果を示した。これらの結果から、マウス肺静脈心筋では多様な自発活動が見られること、それが自律神経伝達物質により影響を受けることが明らかになった。

次に肺静脈心筋の自発活動の発生機序を検討するため、細胞膜上に存在するイオンチャンネル・トランスポーターおよび筋小胞体の阻害薬を処置した。その結果、マウス肺静脈心筋の自発活動はナトリウム・カルシウム交換機構阻害薬の SEA0400 および L 型カルシウムチャンネル遮断薬の nifedipine によって頻度の低下や停止が観察された。しかし、T 型カルシウムチャンネル遮断薬 R(-)-efonidipine によって頻度の低下や停止は観察されなかった。一方、マウス肺静脈心筋の自発活動は Ryanodine 受容体遮断薬の Ryanodine および  $IP_3$  受容体遮断薬の 2-Aminoethoxydiphenyl borate(2-APB) によって自発活動の頻度の低下および停止が観察され、筋小胞体からのカルシウムイオンの放出が関与していることも示唆された。以上の結果より、マウス肺静脈心筋の自発活動には筋小胞体からのカルシウムの放出と細胞膜を介したカルシウム流入が関与していることが示唆された。

さらに、noradrenaline の肺静脈自発活動の発生機序について詳細に検討した。モルモット肺静脈心筋摘出筋標本において、ノルアドレナリンは肺静脈心筋の自発活動を濃度依存的に誘発した。その際、細胞内カルシウム濃度の上昇も観察された。また間接型作動薬であるチラミンによっても、自発活動が惹起された。さらにアドレナリン受容体刺激薬メトキサミンも自発活動を誘発し、その興奮頻度は低値であったが、受容体刺激薬イソプレナリンの追加により頻度が著明に上昇した。一方、イソプレナリン単独では自発活動は誘発されなかった。ノルアドレナリン誘発肺静脈心筋自発活動に対し各種アドレナリン受容体選択的遮断薬を処置したところ、 $\alpha_1$  受容体選択的遮断薬プラゾシンおよび  $\alpha_2$  受容体選択的遮断薬アテノロールが自発活動を停止、あるいは頻度を減弱させた。 $\beta_1$  受容体選択的遮断薬ヨヒンビン、 $\beta_2$  受容体選択的遮断薬 ICI118551 および  $\beta_3$  受容体選択的遮断薬 SR59230 は抑制効果を示さなかった。以上の結果から肺静脈心筋において、ノルアドレナリンはアドレナリン  $\alpha_1$  受容体および  $\alpha_2$  受容体の両方を介し自発活動を発生させることが示唆された。

本研究によって、肺静脈内に混在している交感神経終末からノルアドレナリンが放出され、局所的に細胞内  $Ca^{2+}$  オシレーションが起こり、自発活動が発生することが明らかとなった。

## 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 19 件)

Iyuki Namekata, Atsuko Kanazawa, Shogo Hamaguchi, Hikaru Tanaka, Naoko

Iida-Tanaka. Fluorescence imaging-based analysis of the mitochondrial permeability transition pore opening in cardiomyocyte-derived H9c2 cells. *Int. J. Hum. Cult. Stud.* 27:14-19. 2017. [http://journal.otsuma.ac.jp/documents/journal/2017no27/2017\\_14.pdf](http://journal.otsuma.ac.jp/documents/journal/2017no27/2017_14.pdf) 査読無し

Yayoi Tsuneoka, Masahiko Irie, Yusuke Tanaka, Takahiko Sugimoto, Yuka Kobayashi, Taichi Kusakabe, Keisuke Kato, Shogo Hamaguchi, Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka. Permissive role of reduced inwardly-rectifying potassium current density in the automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium. *J. Pharmacol. Sci.* 133(4):195-202. 2017. 10.1016/j.jphs.2016.12.006 査読有り

Masahiko Irie, Yayoi Tsuneoka, Mariko Shimobayashi, Nao Hasegawa, Yusuke Tanaka, Soh Mochizuki, Sho Ichige, Shogo Hamaguchi, Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka. Involvement of alpha- and beta-adrenoceptors in the automaticity of the isolated guinea pig pulmonary vein myocardium. *J. Pharmacol. Sci.* 133(4):247-253. 2017. 10.1016/j.jphs.2017.03.003 査読有り

Shogo Hamaguchi, Koh Hikita, Yusuke Tanaka, Yayoi Tsuneoka, Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka. Enhancement of automaticity by mechanical stretch in the isolated guinea pig pulmonary vein myocardium. *Biol. Pharm. Bull.* 39(7):1216-1219. 2016. 10.1248/bpb.b15-01013 査読有り

Iyuki Namekata, Seri Kaeriyama, Shogo Hamaguchi, Naoko Iida-Tanaka, Toru Kawanish, Hikaru Tanaka. Mitochondrial membrane potential oscillations in isolated cardiomyocytes as revealed by fluorescence microscopy. *Current Topics in Pharmacology.* 20:39-44. 2016. <http://www.researchtrends.net/tia/abstract.asp?in=0&vn=20&tid=11&aid=5866&pub=2016&type=> 査読無し

Iyuki Namekata, Shogo Hamaguchi, Hikaru Tanaka. Pharmacological discrimination of plasmalemmal and mitochondrial sodium-calcium exchanger in cardiomyocyte-derived H9c2 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 38:147-150. 2015. 10.1248/bpb.b14-00525. 査読有り

Shogo Hamaguchi, Yayoi Tsuneoka, Ayumi

Tanaka, Masahiko Irie, Masato Tsuruta, Takahiro Nakayama, Iyuki Namekata, Mizuki Nada, Megumi Aimoto, Akira Takahara, Hikaru Tanaka. Manifestation of automaticity in the pulmonary-vein myocardium of rats with abdominal aorto-venocaval shunt. *J. Pharmacol. Sci.* 128(4):212-215. 2015. 10.1016/j.jpshs.2015.07.041. 査読有り

Hikaru Tanaka, Yayoi Tsuneoka, Masahiko Irie, Haruna Kanae, Yusuke Tanaka, Shogo Hamaguchi, Iyuki Namekata. Evaluation of pathological status and drug effects using isolated pulmonary vein preparations. *Current Topics in Pharmacology.* 19:51-56. 2015. <http://www.researchtrends.net/tia/abstract.asp?in=0&vn=19&tid=11&aid=5778&pub=2015&type=> 査読無し

Akira Takahara, Mihoko Hagiwara, Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka. Pulmonary-vein myocardium as a possible pharmacological target for the treatment of atrial fibrillation. *J. Pharmacol. Sci.* 126: 1-7. 2014. 10.1254/jpshs.14R09CP 査読有り

Iyuki Namekata, Yayoi Tsuneoka, Hikaru Tanaka. Electrophysiological and pharmacological properties of the pulmonary vein myocardium. *Biol. Pharm. Bull.* 36(1):2-7.2013. <http://doi.org/10.1248/bpb.b212020>. 査読有り

〔学会発表〕(計 56 件)

入江雅彦 I 群抗不整脈薬がノルアドレナリン誘発モルモット肺静脈心筋自発活動に及ぼす影響 日本薬学会第 137 回年会 2017 年 3 月 25 日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

田中悠介 Gq 共役型受容体刺激はモルモット肺静脈心筋自発活動を促進させる 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月 15 日 長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

金江春奈 マウス肺静脈心筋自発活動に対する薬理的検討 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月 15 日 長崎新聞文化ホール(長崎県・長崎市)

入江雅彦 Late  $I_{Na}$  選択的遮断薬の肺静脈心筋異所性自発活動への作用と新たな心房細動治療薬としての可能性 第 26 回日本循環薬理学会 2016 年 12 月 2 日 信州大学医学部付属病院(長野県・松本市)

田中悠介 Angiotensin 受容体作動薬及び拮抗薬がモルモット肺静脈心筋自発活動に与える影響 第 135 回日本薬理学会関東部会 2016 年 10 月 8 日 アクトシティ浜松 研修交流センター(静岡県・浜松市)

入江雅彦 肺静脈心筋自発活動に寄与するアドレナリン受容体サブタイプと抗心房細動薬カルベジロールの作用 生体機能と創薬シンポジウム 2016 2016 年 8 月 26 日 東北大学(宮城県・仙台市)

入江雅彦 モルモット摘出心筋組織における異所性自動能に対する  $Na^+$ 電流の関与 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2016 2016 年 8 月 24 日 東北大学(宮城県・仙台市)

Yayoi Tsuneoka Permissive role of reduced inwardly rectifying potassium current density in the  $Ca^{2+}$ -dependent automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium. *International and Interdisciplinary symposium 2016 『Towards a New Era of Cardiovascular Research』* 2016 年 7 月 12 日 東京医科歯科大学(東京都・文京区)

Masahiko Irie Effect of late sodium current inhibitor on the depolarization-induced automaticity of the guinea-pig pulmonary vein myocardium. *International and Interdisciplinary symposium 2016 『Towards a New Era of Cardiovascular Research』* 2016 年 7 月 12 日 東京医科歯科大学(東京都・文京区)

Iyuki Namekata Diversity in the excitation-contraction mechanisms of the myocardium. *International and Interdisciplinary symposium 2016 『Towards a New Era of Cardiovascular Research』* 2016 年 7 月 11 日 東京医科歯科大学(東京都・文京区)

望月颯 モルモット肺静脈心筋自発活動におけるアドレナリン受容体の役割 第 134 回日本薬理学会関東部会 2016 年 7 月 9 日 国際医療福祉大学(栃木県・大田原市)

入江雅彦 モルモット脱分極心筋自動能および洞房結節自動能に対する c 群抗不整脈薬の作用評価 日本薬学会第 136 回年会 2016 年 3 月 27 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

入江雅彦 モルモット肺静脈心筋自動能に対するアドレナリン受容体拮抗薬の影響 第 89 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 9 日 パシフィコ横浜会議センター(神奈川県・横

浜市)

田中悠介 モルモット肺静脈心筋自発活動における Angiotensin、Endothelin-1 の作用 第9回先端分子薬理研究会 2015年8月8日 東邦大学薬学部 (千葉県・船橋市)

入江雅彦 モルモット肺静脈心筋自動能に対する遅延ナトリウム電流遮断薬の作用 第88回日本薬理学会年会 2015年3月20日 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

恒岡弥生 モルモット肺静脈心筋の細胞内Ca<sup>2+</sup>依存性電氣的自発活動 第23回バイオイメーキング学会学術集会 大阪大学銀杏会館 2014年9月5日 (大阪府・吹田市)

入江雅彦 モルモット肺静脈心筋において内向き整流性K<sup>+</sup>電流抑制は細胞内Ca<sup>2+</sup>依存性電氣的自発活動を誘発させる 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2014 2014年8月30日 近畿大学東大阪キャンパス (大阪府・東大阪市)

田中愛弓 動静脈瘻ラット肺静脈心筋の電氣生理学的性質 第130回日本薬理学会関東支部会 2014年7月5日 星薬科大学 百年記念館 (東京都・品川区)

下林真梨子 モルモット肺静脈心筋自発的収縮における交感神経の関与 第57回日本薬学会関東支部大会 帝京大学 板橋キャンパス 2013年10月26日 (東京都・板橋区)

鶴田将人 マウス肺静脈心筋の電氣的自発活動に関する薬理的検討 第57回日本薬学会関東支部大会 帝京大学 板橋キャンパス 2013年10月26日 (東京都・板橋区)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mnc.toho-u.ac.jp/v-lab/shinkin/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

行方 衣由紀 (NAMEKATA, Iyuki)  
東邦大学・薬学部・講師  
研究者番号: 30510309

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

## (4) 研究協力者

田中 光 (TANAKA, Hikaru)  
高原 章 (TAKAHARA, Akira)  
川西 徹 (KAWANISHI, Toru)  
田中 直子 (TANAKA, Naoko)