

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08407

研究課題名(和文)心房筋の横行小管の発現異常は心房細動の発生基質となるか

研究課題名(英文)Roles of T tubular distribution in genesis of atrial fibrillation

研究代表者

田中 秀央(TANAKA, Hideo)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：60236619

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)：心筋細胞における細胞膜の陥入構造である横行小管(T管)の発現異常が不整脈の発生に寄与するか否かを、灌流心を用いて検討した。ラット心房筋と心室筋との比較では、前者でCa動態(細胞内カルシウム濃度)が不均一化し易く、また興奮頻度が高くなるにつれCa動態の不均一化がより顕著になった。しかし不均一なCa動態が心房細動の発生に繋がる結果は得られなかった。そこで心房筋と同様にT管の発現の乏しいプルキンエ線維網のCa動態につきマウスの心筋梗塞モデルを用いて観察、梗塞境界部で残存するプルキンエ線維網でもCa動態の不均一化が観察された。不均一なCa動態は心臓の興奮伝導の不均一性につながる可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：We address the possibility that altered distribution of transverse (T) tubules contributes to genesis of cardiac arrhythmias by confocal microscopy. Compared with ventricular myocytes, atrial cells, which barely show T tubules, exhibited spatiotemporally non-uniform Ca²⁺ dynamics, whereas ventricular myocytes showing fine, regular distribution of the tubules had uniform Ca²⁺ transients. The inhomogeneous Ca²⁺ dynamics in the atrial cells were more evident at higher frequency of excitation. However, no definitive relevance was obtained between the T tubule distribution and arrhythmogenesis. Besides, we obtained exact relevance of inhomogeneity of Ca²⁺ dynamics to T-tubule distribution in Purkinje fibers in mouse infarct border zone. Together, inhomogeneous Ca²⁺ dynamics owing to the paucity of T tubular distribution does not directly evoke arrhythmias; however, such inhomogeneity may contribute to depressed conductivity and mechanical performances, which may lead to arrhythmogenesis.

研究分野：実験病理学、心臓病理学、不整脈

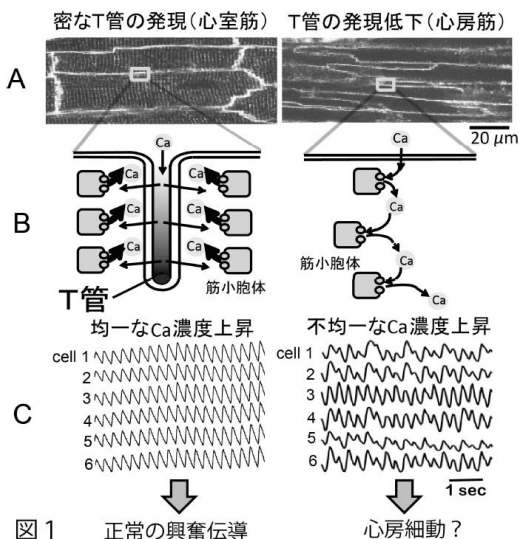
キーワード：横行小管 カルシウム 心房筋 心房細動 不整脈 プルキンエ線維 心筋梗塞 共焦点顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

心房細動 (atrial fibrillation, 以下 AF)は、近年の生活習慣病患者の増加や高齢化社会の到来とともに著しく有病率が上昇しており、生活の質の低下や生命予後の短縮を招来することから発生機序の解明や治療手段の確立が急務となっている。これまで、AF は心房への様々な負荷・障害に起因する線維化などの組織形態の異常による興奮・伝導障害によって生じるものと考えられてきたが、心房細胞の形態の異常がどのように AF の発生に寄与するかは十分には明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、横行小管 (Transverse tubules, 以下、T管) の発現の乏しい心房筋細胞の形態的特性が AF の発生に関わっているか否かを検証することを目的とした。T管は細胞膜の小管状の陥入であり、その発現が乏しい心房では、興奮時(特に高頻度)に細胞内カルシウムイオン (以下 Ca) 濃度の上昇が不十分となり、その結果 Ca 動態が不均一化し、心房の興奮伝導や収縮の不均一化が回旋性伝導など AF につながる興奮伝導異常を惹起する可能性がある (図1)。



3. 研究の方法

1) 12 週齢の成獣ラット(体重約 250 g)をペントバルビタール腹腔内投与による全身麻酔下に心臓を摘出、直ちに経冠動脈的に標準 Tyrode 液を持続灌流し、Ca 蛍光指示薬 Fluo-4/AM を灌流負荷した。続いて *in situ* 高速共焦点レーザー顕微鏡で個々の心房筋細胞の Ca 動態を、さらに膜電位感受性色素である di-4-ANEPPS の共焦点蛍

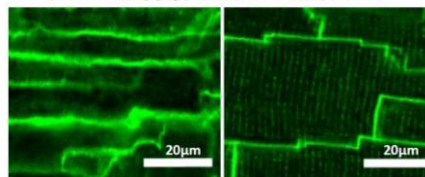
光像から T 管の発現を観察し、両者の関連を検討した。

3) 心筋梗塞モデルマウスを用いて心房と同様にT管の発現の乏しいPurkinje線維を対象として梗塞・虚血傷害心の Ca 動態や T 管の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 心房筋と心室筋の T 管の発現を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、心室筋細胞ではほぼ均一な T 管の発現が確認されたのに対し、心房ではT管の発現は殆ど観察されなかった (図2)。

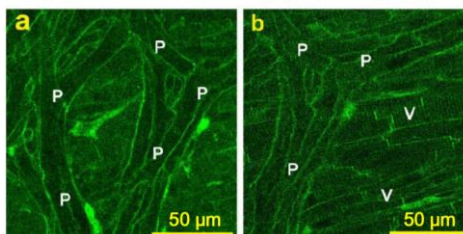
図2 心房筋(左)、心室筋(右)



(2) また低頻度の興奮では個々の心房筋細胞が興奮に伴って時間的・空間的に均一な一過性の Ca 濃度上昇 (Ca トランジェント) を示したのに対し、高頻度駆動下には Ca 動態が不均一化し、しばしば興奮に伴って細胞内に高 Ca 濃度を示す領域が波状に伝播し、頻度に依存して Ca 動態の不均一化がより顕著になった。しかし T 管の発現低下が AF の発生につながる結果は得られなかった。

(3) そこで心房筋と同様に T 管の発現に乏しいプルキンエ線維網の Ca 動態ならびに T 管の発現につきマウスの心筋梗塞モデルを用いてラット心と同様の手法で観察・解析した。梗塞は冠動脈の結紮により作成した。その結果、梗塞の境界部では壊死心筋や肉芽組織に残存するプルキンエ線維網 (P) が観察され、T 管の発現は殆ど認めないことが確認された (図3)。

図3 P:プルキンエ線維、V:心室筋

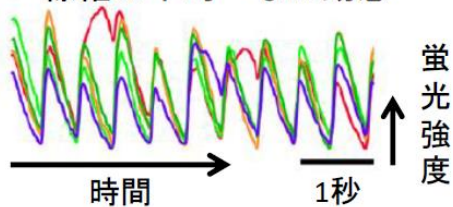


(4) 心筋梗塞に陥った領域の境界部位のプルキンエ線維では個々の細胞において異常な Ca 波が発生し、また一拍毎に Ca トランジェントが変動するオルタナンス現象

など個々の細胞で不均一・不安定な Ca 動態が確認された (図 4)。

- (5) またこの不安定な Ca 動態は、梗塞 3-4 日の心筋壊死の時期、梗塞 7-9 日の肉芽形

図4: 梗塞境界部プルキンエ線維の不均一なCa動態



成期でともに観察された。さらに Ca 動態の不均一性は健常心のプルキンエ線維に比べて梗塞境界部でより顕著で発生することが示された。

- (6) 以上、T 管の乏しい心房筋やプルキンエ線維では Ca 動態が時間的・空間的に不均一になることが明らかになった。不均一な Ca 動態は T 管の発現低下に加え、虚血による筋小胞体からの Ca の放出機構の異常も関わっているものと考えられる。またこれらの Ca 動態異常は、心臓の興奮伝導の不均一性をもたらす可能性が示唆されるが、不整脈の発生に繋がることの証拠は得られなかった。
- (7) 本研究で観察された Ca 動態の異常に加え、細胞自体のイオンチャネル機能の異常、細胞間結合、間質の影響などが伝導障害をもたらし、AF の発生基質を形成する可能性はあると考える。AF の発生病理説明には、さらにこれらの要因を考慮した統合的な検討が必要となる。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- ① Matsuyama TA, Tanaka H, Ishibashi-Ueda H, Takamatsu T. Spatiotemporally non-uniform Ca^{2+} dynamics of cardiac fibers in mouse myocardial infarct, *J Histochem Cytochem*, 査読有, 65, 2017, 655 – 667
DOI:10.1369/0022155417730280
- ② Tanaka H, Matsuyama T, Takamatsu T, Towards an integrated understanding of cardiac arrhythmogenesis – growing roles of experimental pathology, *Pathol Int*, 査読有, 67, 2017, 8 – 16. DOI:10. 1111/pin.12487
- ③ Ohira S, Tanaka H, Harada Y, Minamikawa

T, Kumamoto Y, Matoba S, Yaku H, Takamatsu T, *Sci Rep*, 査読有, 7, 2017, 1 – 9. DOI:10.1038/srep42401

- ④ Fujii M, Tanaka H, Nakamura A, Suzuki C, Harada Y, Takamatsu T, Hamaoka K. Histopathological characteristics of post-inflamed coronary arteries in Kawasaki disease-like vasculitis in rabbits. *Acta Histochem Cytochem*, 査読有, 49, 2016, 29 – 36. DOI:10.1267/ahc.15028.

〔学会発表〕 (計 14 件)

- ① Hideo Tanaka. Understanding pathogenesis of arrhythmias from non-electrical aspects. The 10th Asia-Pacific Heart Rhythm Society Scientific Sessions 2017, 2017
- ② Taka-aki Matsuyama, Hideo Tanaka, Spatiotemporally non-uniform dynamics of intracellular Ca^{2+} of the heart with special references to the transverse tubules, The 82nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2018.
- ③ 田中秀央, 松山高明, 高松哲郎 心房カルシウム動態の時空的不均一性 第 39 回心筋生検研究会 2017.
- ④ 田中秀央. 機能分子イメージングから探る不整脈の発生機序 第 21 回日本小児心電学会学術集会 2017.
- ⑤ 松山高明, 田中秀央, 植田初江, 高松哲郎 心筋梗塞後に心内膜面に残存するプルキンエ細胞の高速カルシウムイメージング法による機能解析 第 105 回日本病理学会総会 2016
- ⑥ 大平卓, 原田義規, 南川丈夫, 高松哲郎, 夜久均, 田中秀央 Raman 分光法による心筋虚血の特徴 第 105 回日本病理学会総会 2016
- ⑦ Matsuyama T, Tanaka H, Takamatsu T. Towards an integrated understanding of atrial arrhythmogenesis – combined fluorescence imaging of excitation and the relevant histological analysis in perfused rat heart – Gordon Research Conference 2016 Cardiac Regulatory Mechanisms, 2016
- ⑧ Matsuyama T, Tanaka H, Takamatsu T. Beat-to-beat variability of intracellular Ca^{2+} dynamics of Purkinje cells in the infarct

border zone of the mouse heart revealed by rapid scanning confocal microscopy.

Frontiers in Cardiovascular Biology 2016, 2016

- ⑨ 松山高明、原口亮、植田初江、田中秀央
ヒト心臓刺激伝導系組織の連続切片による立体画像再構築 第 57 回日本組織細胞化学会 2016.
- ⑩ 松山高明、田中秀央、植田初江 高速共焦点レーザー顕微鏡でみた心筋梗塞後に残存するプルキンエ線維の機能的変化 第 38 回心筋生検研究会 2016
- ⑪ 田中秀央 なぜ、不整脈は起こるのか - 心電図から心筋機能分子イメージングへ - 第 58 回日本臨床検査医学会近畿支部総会 2015
- ⑫ 田中秀央、高松哲郎 心筋・線維芽細胞間コミュニケーションがもたらす心臓の興奮伝導異常 第 104 回日本病理学会総会 2015
- ⑬ Hideo Tanaka Arrhythmogenic potentials of myofibroblasts in cardiac tissues 79th Scientific Session of Japanese Circulation Society 2015
- ⑭ 万井弘基、田中秀央、高松哲郎 カルシウムパラドックスはいかにして心筋拘縮を引き起こすのか? ラット灌流心における心筋カルシウム動態と細胞構造の解析 - 第 36 回心筋生検研究会 2016

[図書] (計 2 件)

- ① 熊本康昭、田中秀央、学際企画、光学顕微鏡の使い方 - 理論と実践-、組織細胞化学 2017、111 - 125.
- ② 田中秀央、学際企画、光学顕微鏡を使いこなす、組織細胞化学 2015、1 - 10.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 <http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pcr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 秀央 (TANAKA, Hideo)
京都府立医科大学・大学院医学研究科
・教授

研究者番号：60236619

(2) 研究分担者

山岡 禎久 (YAMAOKA, Yoshihisa)
佐賀大学・大学院工学系研究科・准教授
研究者番号：80405274

(3) 連携研究者

松山高明 (MATSUYAMA, Takaaki)
昭和大学医学部・法医学講座・准教授
研究者番号：40349113