

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09511

研究課題名(和文)心室細動の駆動源ローターの特性とその安定化に寄与する電気生理学的機序の解明

研究課題名(英文)Rotors as Drivers of Torsades de Pointes and Ventricular Fibrillation

研究代表者

辻 幸臣(TSUJI, Yukio)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：60432217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：心室頻拍・細動(VT/VF)などの致死性不整脈の電気生理学的機序を解明するために、重篤な不整脈疾患「反復する心室細動(電気的ストーム)」を再現したモデル動物を用いた実験研究を行った。VTとVFの興奮伝播を可視化することに成功し、基質特有なさまよい運動特性を示す渦巻き型旋回興奮波(ローター)がVTを、心室中隔に安定化・投錨化する高い旋回興奮頻度のローターがVFを形成することが観察された。VTでは神経型NaチャンネルNav1.8の発現亢進、VFでは心筋代謝酵素X(未発表)の発現亢進が、ローター成立に寄与することを見出し、これらが新たな治療標的となることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

致死性不整脈による心臓突然死は年々増加しており、近未来には、さらに深刻な社会問題となることが予想されている。しかし、有用な治療・予防薬はなく、その発生机序や分子基盤についても未解決な点が数多く残されている。本研究では、重篤な心臓不整脈疾患「反復する心室頻拍・細動(電気的ストーム)」を再現したモデル動物を用いて、電気的ストームを光学マッピングで可視化するとともに、心筋組織の特性変化を解析した。致死性不整脈は渦巻き型旋回興奮波によって形成されること、その成立に神経型NaチャンネルNav1.8、心筋代謝酵素X(未発表)が関与することが判明した。新しい治療薬の開発につながる知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Electrophysiological mechanisms of ventricular tachycardia and fibrillation (VT/VF) were explored, using a rabbit model of electrical storm featuring multiple defibrillator-firings for repetitive VT/VF by electrical remodeling (QT-prolongation) due to chronic atrioventricular block. A vortex-like reentrant activity termed a rotor underlies VT and VF, but they have the rotor frequency and dynamics particular to themselves. VT resulted from a rotor in the distinctive manner, possibly explaining the ECG pattern of Torsades de Pointes (TdP), and VF was maintained by high frequency rotors which became stationary at the septum. Late Na-current enhancement due to neural Na-channel Nav1.8 upregulation was a major contributor to the substrate favoring rotors to form TdP. Cardiac metabolism-related enzyme X was strikingly upregulated at the septum, suggesting that septal myocardium remodeling may play a crucial role in the conversion to VF-driving stationary rotors.

研究分野：心臓電気生理学

キーワード：電気的ストーム 渦巻き型旋回興奮(ローター) 遅延ナトリウム電流 神経型ナトリウムチャンネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 渦巻き型旋回興奮波 (ローター) は、さまよい運動特性をもつ興奮波で、心臓突然死を引き起こす心室細動 (VF) の発生・維持に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、VF 時には、興奮波の分裂や巣状興奮波が同時に出現するため、ローターの検出は容易でなく、その形成メカニズム・好発部位・動態などの詳細は未だよくわかっていない。

(2) 電気的ストーム家兎モデルを用いた予備実験として、VF 発生中の「心室中隔のローター」を捉えている。このモデル動物は、完全房室ブロックの作成と除細動器 (ICD) の埋め込みを組み合わせることで作成され、両心室肥大と QT 延長症候群と類似した心電図変化を示す。QT 時間が延長し、Torsades de Pointes (TdP) 型心室頻拍 (VT) や VF エピソードが頻回に記録される。

2. 研究の目的

(1) 電気的ストーム家兎モデルを用いて、TdP や VF など致死性不整脈の興奮伝播を可視化し、その電気生理学的機序を明らかにする。

(2) TdP は、QT 延長症候群で発生する VT で軸が捻じれる心電図波形を示す。電気的ストーム家兎モデルの電気生理学的・分子生物学的特性の変化を検討することで、TdP が特殊な心電図波形を呈するメカニズムを追究する。

(3) 心室中隔に安定化するローターが、本当に VF を維持する駆動源 (エンジン) であるのかを検討するとともに、駆動源が心室中隔となる分子生物学的基盤を探索する。

3. 研究の方法

(1) 電気的ストーム家兎モデルの作成

完全房室ブロック家兎モデルに ICD を埋め込み、補充調律下で約 3 か月経過観察すると、ほぼすべての家兎で、QT 延長、反復発生する TdP、VF エピソードが引き起こされ、約半数が電気的ストーム (定義: 24 時間内に 3 回以上の VF エピソード) に進展する。電気的ストーム進展家兎を用いて、以下の実験を行った。健康家兎をコントロールとして使用した。

(2) 摘出灌流心の光学マッピング

光学マッピングシステムを用いて、TdP と VF の興奮伝播様式を解析した。摘出ランゲンドルフ灌流心を膜電位感受性色素 (di-4-ANEPPS) で染色した後、心表面および心内膜面より膜電位を記録した。

(3) 単離心室筋細胞の電位依存性 Na^+ チャネル電流記録

パッチクランプ法を用いて、左室心室筋細胞の電位依存性 Na^+ チャネル電流を記録した。テトロドトキシン感受性電流を用いて、 Na^+ チャネル電流の持続成分である遅延 Na^+ 電流 ($I_{\text{Na-L}}$) を測定した。

(4) ウェスタンブロットと免疫組織染色

左室心筋組織の抽出蛋白を用いて、蛋白定量を行った。一次抗体として、anti-phospho-Ser286-CaMKII (p-CaMKII, Santa Cruz), anti-oxidized-M281/282-CaMKII (ox-CaMKII, GeneTex), anti-CaMKII (Santa Cruz), anti- $\text{Na}_v1.5$ (Alomone), anti-phospho-Ser571- $\text{Na}_v1.5$ (p- $\text{Na}_v1.5$, オハイオ州立大学 Peter Mohler 教授から供与), anti- $\text{Na}_v1.8$ (Novus Biologicals), anti-phospho-Akt1/2/3 (Santa Cruz), anti-Akt1/2/3 (Santa Cruz) を使用した。バンド強度を GAPDH (Fitzgerald) で標準化し、定量評価した。心臓組織片のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックからの断面スライスを用いて、免疫組織染色を行った。一次抗体として anti- $\text{Na}_v1.8$ (Novus Biologicals) を使用した。

(5) 遺伝子発現解析

アジレント・テクノロジー社製 Rabbit オリゴ DNA マイクロアレイを用いて、電気的ストーム家兎とコントロール家兎心室筋の遺伝子発現を網羅的に解析し、心室中隔心筋と左室心筋の相違を比較検討した。

4. 研究成果

(1) TdP と VF はどちらともローターによって形成される。

ローターの巡回頻度は、TdP で 6~7Hz、VF で 9Hz であった。特有な興奮伝播様式を示すローターが TdP を形成することが判明した。電気的ストーム家兎摘出灌流心 ($n=3$) の心内膜側マッピングにて、VF の自然発生中、心室中隔付近に巡回中心を持つローターの動きを持続的に捉えることに成功した。詳細は、未発表のため割愛する。

(2) 遅延 Na^+ 電流亢進によって引き起こされる不応期延長領域 (アイランド) が TdP 駆動ローターの発生・維持に貢献する。

電氣的ストームに進展した家兎を用いて、光学マッピングを行ったところ、活動電位持続時間 (APD) の延長部位が心基部でアイランド様に存在することを、13/15 羽中 (87%) で観察した。エピネフリン添加により、APD は更に延長し、アイランドはより一層明瞭化 (図 A 矢印) 遅延 I_{Na-L} 電流 (I_{Na-L}) 阻害薬 ranolazine 10 μ M によりアイランドは消失した。類似の反応が *in vivo* でも認められた。このモデル動物では、エピネフリン負荷が TdP の誘発に有用であった。臨床診療で使われる同用量のエピネフリンを投与すると、QT 時間が延長し、TdP が断続的に発生した。リドカイン 2 mg/kg の静脈内注射による I_{Na-L} 遮断が、QT 時間を短縮、反復発生する TdP を完全に抑制した。これらの所見より、 I_{Na-L} の亢進がこのモデルの催不整脈性に大きく寄与していると考えられた。

(3) I_{Na-L} 亢進の原因としての神経型 Na^+ チャネルサブユニット $Nav1.8$ の意義

I_{Na-L} が増加すると、活動電位持続時間の延長、細胞内 Na^+ 蓄積と Na^+/Ca^{2+} 交換機構を介した細胞内 Ca^{2+} 過負荷が引き起こされ、不整脈 (早期/遅延後脱分極 [EAD/DAD]) や拡張障害の発生が促される。 I_{Na-L} は、先天性 QT 延長症候群 3 型のみならず、心肥大・心不全・薬剤誘発性 QT 延長症候群・糖尿病などの後天性の病態でも増大する。心臓 Na^+ チャネル $Nav1.5$ (*SCN5A*) の遺伝子変異により I_{Na-L} が増加することはよく知られている一方で、チャネル蛋白の翻訳後修飾や制御機構を介する機序についての詳細はよくわかっていない。これまでに、 Ca^{2+} /カルモジュリンキナーゼ (CaMKII) による $Nav1.5$ のリン酸化修飾、phosphoinositide 3-kinase シグナル経路の減弱、神経型 Na^+ チャネル $Nav1.8$ (*SCN10A*) の発現増加 によって I_{Na-L} 亢進が引き起こされることが示されている。ここでは、これらの既知報告を参考に、 I_{Na-L} 亢進の非遺伝性メカニズムについて、

電氣的ストーム家兎モデルの左室心筋組織で検討した。APD が著しく延長した領域 (アイランド) が含まれた心基部横断面の免疫組織染色にて、 $Nav1.8$ が心筋細胞に強発現していることが観察された (図 B)。ウエスタンブロットでも、その発現量増加が確認されたことから、 $Nav1.8$ が、 I_{Na-L} 亢進を引き起こす重要な分子であることが示唆された。電氣的ストーム家兎心室筋では、CaMKII の活性亢進に沿って $Nav1.5$ -Ser571 (CaMKII によるリン酸化部位) が過リン酸化されていたが、そのリン酸化分画は 30% の増加に留まった。 $Nav1.8$ 遮断による抗不整脈効果を検討するため、電氣的ストーム家兎に、選択的 $Nav1.8$ 阻害薬 A-803467 (10 mg/kg) を静注したところ、QT 時間が短縮し、エピネフリン誘発 TdP は完全に抑制された。

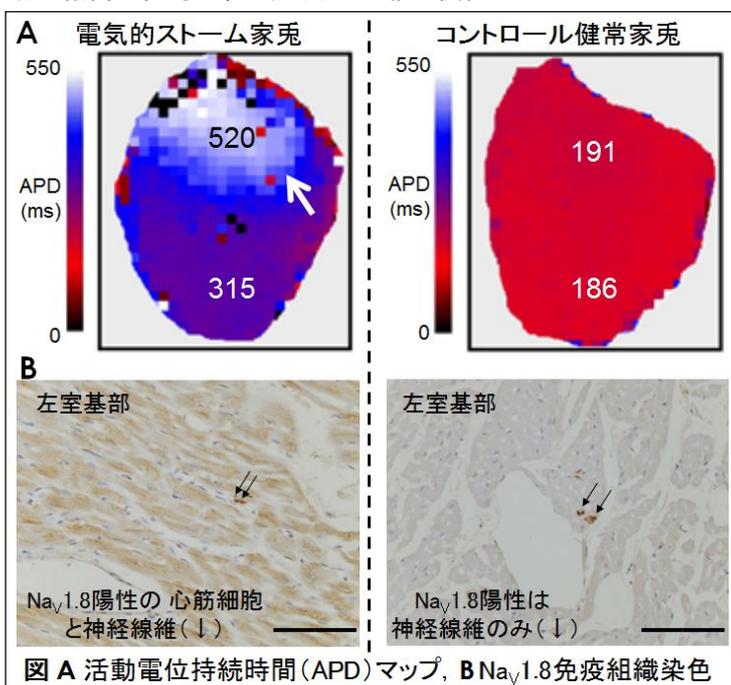


図 A 活動電位持続時間 (APD) マップ, B $Nav1.8$ 免疫組織染色

(4) VF の駆動源が心室中隔となる機序：心室中隔心筋リモデリングの特殊性

VF を駆動するローターが心室中隔で安定化する候補因子を探索するために、遺伝子発現の網羅的解析を行った。心筋代謝に関連する遺伝子 X (未公表) の発現が、電氣的ストーム家兎では健常家兎と比し、心室中隔心筋で 10-15 倍、左室心室筋で 5 倍増加していた。発現が 2 倍以上増加を示した遺伝子数は、左室心室筋で ~30 に対し、心室中隔心筋では >100 に及んだことより、特異的な心室中隔心筋リモデリングがローターの安定化に寄与することが示唆された。ローターの動態に影響を及ぼすことが報告または予想されるイオンチャネル：内向き整流 K^+ チャネル、ATP 感受性 K^+ チャネル、 Ca^{2+} 感受性 K^+ チャネルの遺伝子発現には変化がなかった。

まとめ

重篤な不整脈疾患「電氣的ストーム」を呈する家兎モデルを用いて、TdP や VF がローターによって形成されることを示すとともに、TdP と VF 駆動ローターの巡回頻度や動態などの特徴を明らかにした。基質に依存して発生したローターが VT を形成し、それが心室中隔で安定化するローターに転換することにより VF が成立することが示唆される。EAD/DAD を機序とする撃発活動は、不整脈の開始を担うが、TdP や VF の持続には関わらないと考えられる。さらに、ローターの成立を促す因子として、 $Nav1.8$ や心筋代謝酵素 X を見出した。これらが、治療薬開発のための標的となることが期待される。

Tsuji Y, Hojo M, Voigt N, El-Armouche A, Inden Y, Murohara T, Dobrev D, Nattel S, Kodama I, Kamiya K. Ca²⁺-related signaling and protein phosphorylation abnormalities play central roles in a new experimental model of electrical storm. *Circulation*. 2011; 123:2192-203.

Tsuji Y, Opthof T, Yasui K, Inden Y, Takemura H, Niwa N, Lu Z, Lee JK, Honjo H, Kamiya K, et al. Ionic mechanisms of acquired QT prolongation and torsades de pointes in rabbits with chronic complete atrioventricular block. *Circulation*. 2002; 106:2012-8.

Tsuji Y, Zicha S, Qi XY, Kodama I, Nattel S. Potassium channel subunit remodeling in rabbits exposed to long-term bradycardia or tachycardia: discrete arrhythmogenic consequences related to differential delayed-rectifier changes. *Circulation*. 2006; 113:345-55.

Glynn P, Musa H, Wu XQ, Unudurthi SD, Little S, Qian L, Wright PJ, Radwanski PB, Gyorke S, Mohler PJ, et al. Voltage-gated sodium channel phosphorylation at Ser571 regulates late current, arrhythmia, and cardiac function in vivo. *Circulation*. 2015; 132:567-577.

Yang T, Chun YW, Stroud DM, Mosley JD, Knollmann BC, Hong C, Roden DM. Screening for acute IKr block is insufficient to detect torsades de pointes liability: role of late sodium current. *Circulation*. 2014; 130:224-34.

Dybkova N, Ahmad S, Pabel S, Tirilomis P, Hartmann N, Fischer TH, Bengel P, Tirilomis T, Ljubojevic S, Renner A, et al. Differential regulation of sodium channels as a novel proarrhythmic mechanism in the human failing heart. *Cardiovasc Res*. 2018; 114:1728-1737.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuji Y, Dobrev D	4. 巻 10 (Suppl 33)
2. 論文標題 Electrical storm: mechanistic and therapeutic considerations to avoid death in the survivors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Thorac Dis	6. 最初と最後の頁 S4053-S4056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2018.09.111.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsuji Yukio, Dobrev Dobromir	4. 巻 255
2. 論文標題 Prognostic impact of electrical storm in patients with implantable cardioverter defibrillators: Mechanistic and therapeutic considerations to reduce the risk of death	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 101 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2017.12.085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 7件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Tsuji Y.
2. 発表標題 Electrical storm and heart failure worsening: mechanistic and therapeutic considerations to avoid death in the survivors
3. 学会等名 Asian Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamazaki M, Tsuji Y et al.
2. 発表標題 Torsadogenic action of late Na ⁺ current in experimental electrical storm.
3. 学会等名 Heart Rhythm Scientific Sessions 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuji Y.
2. 発表標題 Cellular and molecular mechanisms of electrical storm.
3. 学会等名 42nd Meeting of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辻幸臣
2. 発表標題 CaMKII as a target for novel therapy to treat lethal ventricular tachyarrhythmias.
3. 学会等名 第57回日本生体医工学学会大会 (旧日本エム・イー学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuji Y, Yamazaki M et al.
2. 発表標題 Mechanisms of electrical storm associated with QT prolongation: successful mapping of Torsades de Pointes in rabbits.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuji Y.
2. 発表標題 Therapeutic targets to avoid ICD shocks-associated worsening heart failure.
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuji Yukio mi
2. 発表標題 CaMKII-mediated phosphorylation of sodium channel and arrhythmogenesis in a rabbit model of electrical storm.
3. 学会等名 2018 THRS Annual Conference in Conjunction with Tokyo-Taipei-Seoul Arrhythmia Joint Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuji Yukio mi
2. 発表標題 Electrical storm associated with bradycardia
3. 学会等名 Asian Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 辻幸臣, 山崎正俊, 本荘晴朗, 蒔田直昌
2. 発表標題 心室細動ストーム家兎モデルを用いた致死性不整脈のトランスレーション研究
3. 学会等名 第24回法医病理セミナー・ワークショップ「心臓突然死への挑戦」(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 辻幸臣
2. 発表標題 致死性不整脈の発生に果たすNaチャンネルリン酸化異常の意義: 電氣的ストーム実験モデルでの検討
3. 学会等名 名古屋大学平成29年度基盤医学特論 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 平尾見三、小室一成	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 376
3. 書名 不整脈 識る・診る・治す	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山崎 正俊 (YAMAZAKI Masatoshi) (30627328)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任准教授 (12601)	
研究分担者	本荘 晴朗 (HONJO Haruo) (70262912)	名古屋大学・環境医学研究所・准教授 (13901)	
研究協力者	ナッテル スタンレー (NATTEL Stanley)	モントリオール大学心臓研究所, マギル大学	
研究協力者	ドブレブ ドブロミア (DOBREV Dobromir)	デュイスブルグ・エッセン大学	
研究協力者	時田 直昌 (MAKITA Naomasa) (00312356)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・副所長 (84404)	