

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09078

研究課題名(和文)病態心におけるギャップ結合リモデリングと致死性不整脈発生基質の解明

研究課題名(英文)Arrhythmogenic gap junction remodeling in diseased hearts

研究代表者

本荘 晴朗 (Honjo, Haruo)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号：70262912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子改変による心臓突然死マウスや心室細動ストームウサギモデルを用いて、病態心におけるギャップ結合リモデリングと不整脈発生基質について解析した。病態心では心室筋の介在板領域におけるconnexin43発現が低下し、興奮伝導速度の低下や活動電位再分極の不均一性増強に基づくリエントリー不整脈の形成・持続が促進されることが判明した。ギャップ結合リモデリングにはrenin-angiotensin系やcalmodulin/CAMKII活性化が関与することも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Arrhythmogenic remodeling of myocardial gap junctions was investigated using a transgenic mouse model with cardiac dysfunction/lethal ventricular arrhythmias, and a rabbit electrical storm model induced by sustained severe bradycardia. In diseased hearts, connexin43 expression was decreased in the intercalated disc region of ventricular myocytes, which was associated with a reduction of conduction velocity and an increase in the spatial heterogeneity of action potential repolarization, leading to increased susceptibility of reentrant ventricular tachyarrhythmias. In addition, the results suggested that the renin-angiotensin system and calmodulin/CAMKII are involved in arrhythmogenic gap junction remodeling in diseased hearts.

研究分野：心臓電気生理学

キーワード：不整脈 ギャップ結合 心臓電気生理学

### 1. 研究開始当初の背景

心不全における死因の多くは心室細動や持続性心室頻拍 (VF/VT) などの致死性心室不整脈である。心肥大や心不全などの病態心では、心筋のイオンチャネルや  $Ca^{2+}$  調節蛋白の発現や機能が変化して、活動電位持続時間の延長や興奮伝導速度の低下などの電気生理学的異常を生じ、致死性不整脈の発生につながると考えられている (不整脈発生基質の形成)。病態心では、心筋細胞間の電気的結合を担うギャップ結合にも蛋白発現の変化や機能的な異常が生じることが報告されている。しかし、ギャップ結合リモデリングが病態心の致死性不整脈の発生に果たす役割はこれまで十分に解明されていない。

### 2. 研究の目的

病態心における心室筋細胞のギャップ結合の発現・分布や機能的な変化が、致死性心室性不整脈発生基質となる電気生理学的異常 (不整脈発生基質) の形成にどのように関わっているかを、病態動物モデルを用いて解明した。

### 3. 研究の方法

(1) 心室筋細胞のギャップ結合構成蛋白 connexin43 [Cx43] 発現は、Western blot 法および免疫組織化学により定量解析した。心筋細胞の介在板領域における Cx43 蛋白発現は、蛋白を界面活性剤 Triton X で処理し、Triton X 不溶性分画の Western blot 法で定量した。

(2) 心室筋の電気生理学的変化 (活動電位波形と興奮伝播・消退過程) は、摘出 Landendorff 灌流心臓の光学マッピング実験 (膜電位感受性色素: di-4-ANEPPS を使用) により評価した。不整脈 (VF/VT) の発生・維持の機序についても解析した。

(3) 心筋胎児型遺伝子発現抑制に関与する転写因子 (NRSF) の優性抑制変異体を心臓特異的に発現する dnNRSF-Tg マウスは、桑原浩一郎先生 (京都大学) から供与を受けた。 $Ca^{2+}$ /calmodulin 依存性リン酸化酵素 CaMKII に対する抑制ペプチドを心臓特異的に発現する AC3-I マウスは、Marc A. Vos 先生 (Utrecht 大学) から供与を受け、胸部大動脈に縮窄手術 [TAC] を加えて心室に圧負荷心肥大を誘発した。

### 4. 研究成果

(1) 心臓突然死マウスにおける心室筋ギャップ結合リモデリングと不整脈発生基質

dnNRSF-Tg マウス (Tg) は、生後発育とともに心筋収縮機能が低下し、VF/VT による突然死が多発した (図 1A)。dnNRSF-Tg マウス心室筋では、対照 (WT) と比べて Cx43 蛋白発現が有意に低下し、Cx43 の Ser279/282 リン酸化が亢進していた (図 1B)。活動電位光学マッピングを用いた心室筋の

電気生理学的変化と不整脈の解析では、dnNRSF-Tg マウスでは、活動電位持続時間 (APD) が延長して (図 1C)、異所性巣状興奮 (FA) が発生するとともに (1D)、興奮伝導速度の著しい低下 (図 1C) による渦巻型興奮旋回 (rotor) が形成され (図 1D)、これらが VF/VT の発生および持続に関与すると考えられた (図 1E)。

レニン阻害薬 aliskiren (ali) は、dnNRSF-Tg マウス心室筋の Cx43 発現変化や興奮伝導障害を軽減し、VF/VT の発生を抑制した (図 1A-C,E)。

以上の結果から、renin-angiotensin を介する心室筋ギャップ結合リモデリングが、NRSF 遺伝子改変マウスの致死性不整脈発生基質の形成に重要な役割を果たすことが明らかになった。

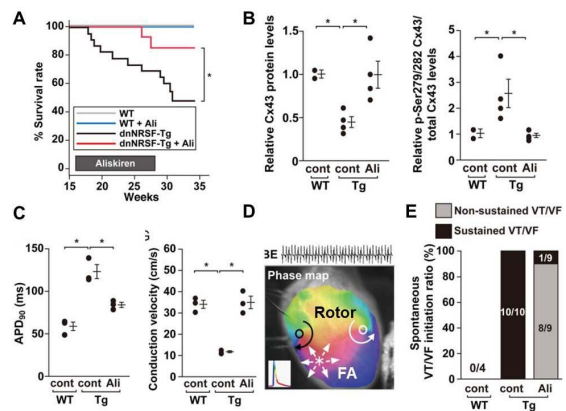


図 1. dnNRSF-Tg 心臓突然死マウスにおける心室筋 Cx43 リモデリングと VF/VT 発生基質

(2) 心室筋ギャップ結合リモデリングにおける calmodulin/CAMKII の役割

病態心では  $Ca^{2+}$ /calmodulin 依存性リン酸化酵素 CaMKII の活性化による心筋イオンチャネルのタンパク発現や開口動態の変化が、致死性不整脈の発生に重要な役割を果たすことが報告されている。ギャップ結合リモデリングにおける calmodulin/CAMKII の役割について検討した。

Calmodulin 阻害薬 W7 をウサギ灌流心臓に急性投与すると、心室筋細胞の介在板領域 (TritonX 不溶性分画) における Cx43 蛋白発現が増加した (図 2A)。W7 を作用させた心臓に誘発した VT では、rotor の旋回運動が不安定化して VT の早期停止することが観察された (図 2B)。

遺伝子改変により CaMKII を恒常的に抑制した AC3-I マウスでは、心室筋介在板領域の Cx43 蛋白発現が亢進しており、胸部大動脈縮窄 [TAC] により心室筋圧負荷を加えると Cx43 発現が更に増加した (図 2C)。心室筋の興奮伝導速度は、対照マウス (WT) では

TAC による心室筋圧負荷を加えると低下したが、AC3-I マウスでは心室筋圧負荷を加えても低下しなかった (図 2D)。

以上の結果から、圧負荷による心室筋のギャップ結合リモデリングには calmodulin/CAMKII が関与することが判明した。

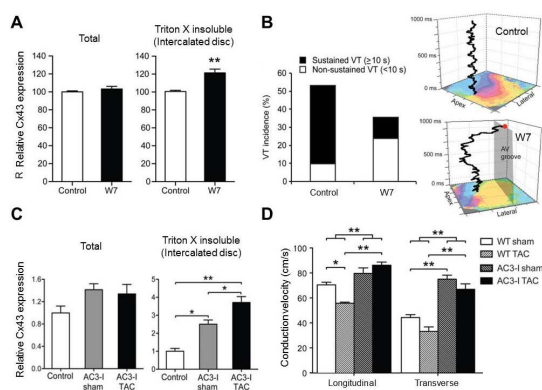


図 2. 心室筋 Cx43 リモデリングにおける calmodulin/CAMKII の役割

### (3)ウサギ VF storm モデルにおける不整脈発生基質

ウサギの房室結節を破壊して高度の除脈を数週間持続させると、トルサード・ド・ポアンツ (TdP) 型 VT が頻回に生じて VF に移行する (ウサギ VF storm モデル)。VF storm ウサギ心室筋では Cx43 蛋白発現が低下していた。摘出灌流心の電気生理学的解析では、VF storm ウサギ心室筋の活動電位持続時間 (APD) 延長が観察され、これは主に遅延整流 K<sup>+</sup>チャンネル発現低下を反映するものと考えられた。さらに、VF storm ウサギでは、心室筋活動電位再分極時相に心室内較差が生じていた。灌流液に epinephrine を添加すると、APD が更に延長して再分極時相に著しい心室内較差が生じた。興奮伝播の解析では、早期興奮波が再分極遅延領域を迂回して伝播することにより渦巻型興奮旋回 (rotor) が形成され、TdP 型 VT が発生する様子が観察された。遅延 Na<sup>+</sup>電流を抑制する ranolazine は、APD を短縮して再分極時相の心室内較差を改善した。

以上の結果より、高度除脈依存性 VF storm ウサギにおける VF/VT 発生には、K<sup>+</sup>および Na<sup>+</sup>チャンネルの変化とギャップ結合の発現変化による活動電位再分極の不均一性増大が重要な役割を果たすことが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文] (計 9 件)

Tomii N, Yamazaki M, Arafune T, Kamiya K, Nakazawa K, Honjo H 他 2 名. Interaction of phase singularities on spiral wave tail:

reconsideration of capturing the excitable gap. Am J Physiol Heart Circ Physiol (in press) 2018. 査読有  
doi: 10.1152/ajpheart.00558.2017.

Ogawa T, Honjo H, Yamazaki M 他 4 名. Ranolazine facilitates termination of ventricular tachyarrhythmia associated with acute myocardial ischemia through suppression of late I<sub>Na</sub>-mediated focal activity. Circ J 81: 1411-1428, 2017. 査読有  
doi: 10.1253/circj.CJ-17-0128.

Kushiyama Y, Honjo H, Niwa R, Takanari H, Yamazaki M 他 4 名. Partial I<sub>K1</sub> blockade destabilizes spiral wave rotation center without inducing wave breakup and facilitates termination of reentrant arrhythmias in ventricles. Am J Physiol Heart Circ Physiol 311: H750-H758, 2016. 査読有  
doi: 10.1152/ajpheart.00228.2016.

Yamada C, Kuwahara K, Yamazaki M, Nakagawa Y, Nishikimi T, Kinoshita H, Kuwabara Y, Minami T, Yamada Y, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Honjo H 他 3 名. The renin-angiotensin system promotes arrhythmogenic substrates and lethal arrhythmias in mice with non-ischaemic cardiomyopathy. Cardiovasc Res 109 :162-173, 2016. 査読有  
doi: 10.1093/cvr/cvv248.

Takanari H, Bourgonje VJ, Fontes MS, Raaijmakers AJ, Driessen H, Jansen JA, van der Nagel R, Kok B, van Stuijvenberg L, Boulaksil M, Takemoto Y, Yamazaki M, Tsuji Y, Honjo H 他 6 名. Calmodulin/CaMKII inhibition improves intercellular communication and impulse propagation in the heart and is antiarrhythmic under conditions when fibrosis is absent. Cardiovasc Res 111: 410-421, 2016. 査読有  
doi: 10.1093/cvr/cvw173.

### [学会発表] (計 22 件)

Tsuji Y. Electrical storm associated with bradycardia. The 10<sup>th</sup> Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session/The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society 2017.

Yamazaki M. Therapeutic target of atrial fibrillation. The 10<sup>th</sup> Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session/The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society 2017.

Honjo H. Cardiac excitation wave propagation and arrhythmogenesis. 第 93 回日本生

理学会 2016.

Inada S, Harrell DT, Haraguchi R, Ashihara T, Aiba T, Ikeda T, Mitsui K, Honjo H. Multi-scale simulation studies of excitation conduction including cardiac conduction system and whole ventricles. 第 93 回生理学会 2016.

Yamazaki M, Honjo H 他 3 名. 3-D atrial scroll wave as a mechanism of persistent atrial fibrillation. 第 55 回日本生体医工学会 2016.

Tomii N, Yamazaki M, Arafune T, Kamiya K, Honjo H 他 2 名. Effective point stimulation for cardiac spiral wave termination. American Heart Association Scientific Session 2016.

Ogawa T, Honjo H, Yamazaki M, 他 3 名. Role of late  $I_{Na}$ -mediated focal electrical activity in ventricular tachyarrhythmia associated with acute myocardial ischemia. European Society of Cardiology Congress 2016.

Honjo H. Spontaneous activity of pulmonary vein myocardial sleeves. 第 30 回日本不整脈学会/第 32 回日本心電学会 2015.

[ 図書 ] ( 計 2 件 )

山崎正俊 他 1 名. 心房細動の機序：光学マッピングによる検討. 不整脈 2017. メディカルレビュー社, 58-66, 2017.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

本庄 晴朗 ( HONJO Haruo )  
名古屋大学・環境医学研究所・准教授  
研究者番号：70262912

### (2) 研究分担者

山崎 正俊 ( YAMAZAKI Masatoshi )  
東京大学・工学部・特任研究員  
研究者番号：30627328

辻 幸臣 ( TSUJI Yukiomi )  
長崎大学・医歯薬総合研究科・講師  
研究者番号：60432217