

令和元年5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08485

研究課題名(和文) 不均一収縮を呈する心筋においてグルコース値の上昇が不整脈の発生に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Effect of an elevation of glucose on the occurrence of arrhythmias in the myocardium with nonuniform contraction

研究代表者

進藤 千代彦 (Shindoh, Chiyohiko)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10216228

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)：不均一収縮を呈するラット多細胞心室筋を用いた研究において、グルコース値の150から400 mg/dlへの上昇は、1時間後にカルシウム・カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ (CaMK) 活性を増加させ、更にカルシウム波の伝播速度と不整脈の発生を増加させた。このカルシウム波伝播速度と不整脈発生の増加は、CaMK 阻害薬であるKN-93の存在下では抑制された。一方、ストレプトゾトシン投与による糖尿病ラットから得られた心室筋においてはグルコース値の上昇による不整脈発生の増加は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心血管障害や脳梗塞の発症は、カテコールアミンやコルチゾールの産生によって急激なグルコース値の上昇を引き起こす。このグルコース値の上昇が、主に非糖尿病患者において予後決定因子の一つとなることが知られている。本研究では1時間のグルコース値の上昇が、特に不均一収縮を呈する非糖尿病心筋において不整脈の発生を増加させたことから、グルコース値の上昇そのものが生命予後の悪化に関与していることを示唆している。更に、食後のグルコース値の変動幅のコントロールなど全く新しい発想からの治療法や創薬につながる可能性もあるため、その臨床的意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：In the rat myocardium with nonuniform contraction, an elevation of glucose from 150 to 400 mg/dl for one hour increased the activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) and further increased the velocity of Ca²⁺ waves and the occurrence of arrhythmias. These increases in the velocity of Ca²⁺ waves and the occurrence of arrhythmias were suppressed in the presence of KN-93, a CaMK inhibitor. In the myocardium obtained from streptozotocin-induced diabetes mellitus rats, the elevation of glucose to 400 mg/dl did not increase the occurrence of arrhythmias.

研究分野：呼吸生理学、循環生理学

キーワード：不整脈 グルコース 不均一収縮

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病患者では心筋梗塞や脳梗塞などの心血管イベントが多発する。そのため、血糖値のコントロールは、血圧やLDLコレステロール値のコントロール、禁煙と並んで動脈硬化の予防に重要である。糖尿病患者における血糖値コントロールの指標としてグリコヘモグロビン値(HbA_{1c})が用いられてきたものの、HbA_{1c}値の低下が2型糖尿病患者における心筋梗塞や心血管死などの太い血管に起因する合併症を減少させないことが相次いで報告されており

(White WB, et al. N Engl J Med 2013;369:1327-1335, ADVANCE Collaborative Group. N Engl J Med 2008;358:2560-2572), HbA_{1c}値のような平均的な血糖値のコントロールに加えて、血糖値の変動幅のコントロールが重要視されつつある。

一方、近年 Erickson らは図1のようにグルコース値の上昇がカルシウム・カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) を O-結合型グリコシル化することによって活性化し、遅延後脱分極を増高させ、撃発活動を介して催不整脈性を亢進させるという仮説を提唱している。しかし、日常の診療において糖尿病患者が食後の血糖上昇時に動悸などの自覚症状を訴えることはないことから、グルコース値の上昇が正常心筋において不整脈を増加させるとは考えにくく、グルコース値の上昇は一定の条件下でのみ催不整脈性を亢進させる可能性が高い。そのような条件として、まず第一に心筋障害の有無とその程度が挙げられ、次に、グルコース値の上昇の程度とその持続時間によっても心筋の反応が異なる可能性が挙げられる。実際に、食後のグルコース値の上昇は通常1時間程度と考えられ、この時間内に CaMKII がグリコシル化され、催不整脈性を発揮しうるかどうかは不明である。しかし、HbA_{1c} 値の低下によって心血管死が減少しないことの一因として、食後血糖値の一時的な上昇による催不整脈性の亢進の可能性があるため、グルコース値の催不整脈作用の有無とその機序の解明は重要である。更に、不整脈に関する研究の多くは、単離心筋細胞や拍動を停止した心臓を用いたものであり、心臓が収縮することによって生じる不均一収縮を伴う病的な心筋における不整脈の発生機序に関する研究は、大きく立ち遅れている。

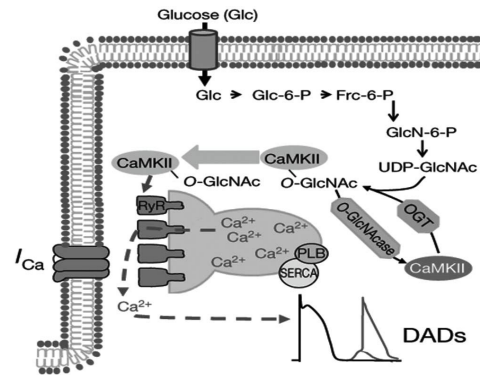


図1. グルコース値上昇時の催不整脈性亢進の仮説 (Erickson JR, et al. Nature 2013;502:372-376 より引用) グルコース値の上昇によって、フルクトース6リン酸 (Frc-6-p) がグルコサミン6リン酸 (GlcN-6-p) を経てカルシウム・カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) を O-結合型グリコシル化 (O-GlcNAc) し、これによる CaMKII の活性化が催不整脈性を亢進させるという仮説。

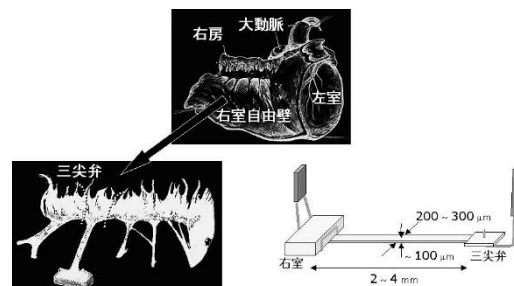


図2. 標本の摘出

下段左図のように右室より多細胞心室筋を摘出し、下段右図のように固定する。

2. 研究目的

ラット正常収縮心筋と不均一収縮心筋を用いて、グルコース値の上昇が不整脈を誘発する条件を決定し、次に、そのような不整脈が誘発される機序を不均一収縮心筋と糖尿病モデル心筋を用いて明らかにする。

- (1) グルコース値の上昇が不整脈を誘発する条件の決定
- (2) グルコース値の上昇が催不整脈性を亢進させる機序の解明
- (3) 糖尿病モデルラットにおいてグルコース値の上昇が不整脈の発生に果たす役割の解明

3. 研究方法

ラット右心室より、多細胞心室筋であるトラベクラーを摘出し（図2）、図3のような実験セットアップを用いて張力、サルコメア長、細胞内カルシウム画像、膜電位を記録した。更に、2',7'-dichlorofluorescein (DCF) 蛍光を記録することにより、活性酸素の産生を記録した。心筋局所の収縮特性を変化させるために、心筋の局所領域を 2,3-butanedione monoxime で灌流（ジェット幅 ~0.3 mm）し、ラット不均一収縮心筋モデルを作製した。糖尿病ラットの作製のため、ラットにストレプトゾトシンを腹腔内注射し、8週間後糖尿病ラットとして、実験を行った（図4）。

4. 研究成果

- (1) 正常ラットにおけるグルコース値の上昇が心筋収縮と不整脈の発生に与える影響

正常心筋におけるグルコース値の影響

2秒間隔電気刺激、0.7mM 細胞外カルシウム濃度の低カルシウム負荷状態において、グルコース値を 150 から 400mg/dl へと上昇させ、1時間後の張力、細胞内カルシウム、DCF 蛍光を記録し、グルコース値の上昇が正常心筋に与える影響を検証した。この条件下においてグルコース値の上昇は発生張力を変化させず（n=9）、ピーク細胞内カルシウム値、拡張期細胞内カルシウム値、細胞内カルシウム低下の時定数を変化させなかった（n=9）。一方、グルコース値の 400 から 150mg/dl への低下も同様に、発生張力と細胞内カルシウム

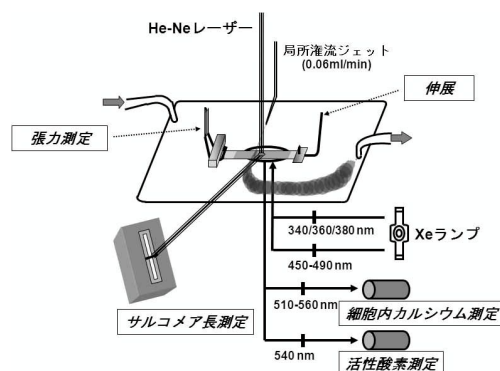


図3. 実験のセットアップ

ラット右室より摘出した多細胞心室筋（長さ 3 mm、幅 0.3 mm、厚さ 0.08 mm）を、位置制御可能な心筋連結用アームとカトランスデューサーの間に固定する。カトランスデューサーで張力を、レーザー光回折法によってサルコメア長を、カルシウム蛍光色素であるフラ2を心筋内に刺入することにより細胞内カルシウム画像を、高コンプライアンス電極を用いることにより膜電位を記録する。更に、DCF 蛍光を用いて活性酸素産生画像を記録する。心室筋の局所に 20mM BDM を含む HEPES 溶液を灌流することにより（ジェット幅~0.3mm）、空間的に不均一な収縮を引き起こす。

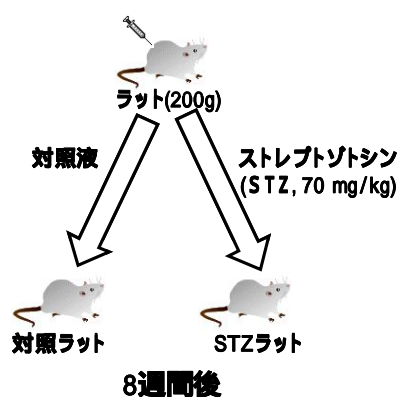


図4. 糖尿病ラットの作製

ラット腹腔内にストレプトゾトシンを投与し、糖尿病ラットを作成した。

動態を変化させなかった。更に、グルコース値の上昇は DCF 蛍光の変化率に影響を与えなかった。

不均一収縮心筋におけるグルコース値の影響

糖尿病患者に認められる病的な心筋の実験モデルとして研究代表者らが確立した不均一収縮心筋を用いた。0.4 秒間隔電気刺激、2mM 細胞外カルシウム濃度の高カルシウム負荷状態において、グルコース値を 150 から 400mg/dl へと上昇させた際のカルシウム波伝播速度と DCF 蛍光の変化を記録した。0.4 秒間隔、7.5 秒間の電気刺激の後にカルシウム波と後収縮が誘発され、グルコース値の上昇はカルシウム波の伝播速度と後収縮の高さを増加させた (n=9)。逆に、グルコース値の 150mg/dl への低下は伝播速度と後収縮の高さを減少させた (n=9)。0.4 秒間隔の電気刺激は DCF 蛍光の変化率に影響を与えなかった。

グルコース値の上昇による CaMKII のグリコシル化

CaMKII の阻害薬である KN-93 (1 μ M) の存在下で、グルコース値の 150 から 400mg/dl への上昇はカルシウム波伝播速度を増加させなかった (n=7)。

刺激薬である 200mM イソプロテレノールを加え、高カルシウム負荷状態において不整脈を誘発した。グルコース値の 150 から 400mg/dl への増加により、電気刺激によって誘発された不整脈数は増加した (n=8)。ここで、グルコース値上昇による CaMKII のグリコシル化は、フルクトース 6 リン酸 (Frc-6-p) がグルコサミン 6 リン酸 (GlcN-6-p) に変化することで始まる (図 1)。そこで、GlcN-6-p への変換酵素を阻害するジアゾ 5 オキソ L ノルロイシン (DON、50 μ M) 存在下において、グルコース値の上昇が不整脈の発生に与える影響を記録した。DON 存在下では、グルコース値の上昇は電気刺激によって誘発される不整脈数を増加させなかった (n=7)。更に、CaMKII の阻害薬である KN-93 (1 μ M、n=9) と autocalmitide-2 related inhibitory peptide (1 μ M、n=6) の存在下においてもグルコース値の上昇は不整脈数を増加させなかった。

グルコース値上昇による浸透圧変化の役割

グルコース値の上昇は浸透圧の上昇を引き起こす。この浸透圧の上昇が催不整脈性の亢進に関与するかどうかを検証するために、150mg/dl のグルコース値に L-グルコース 250mg/dl を加えることにより、グルコース 400mg/dl と同様の变化を引き起こすかどうかを検証した。L-グルコースを加えることによるグルコース値の上昇は電気刺激によって誘発される不整脈数を増加させなかった (n=6)。

CaMKII 活性の記録

CaMKII 活性の測定を SignaTECT CaM KII Assay System (Promega) を用いて行った。高カルシウム負荷状態において 150 mg/dl グルコース値に比べて 400mg/dl では CaMKII 活性が増加した (n=5)。

(2) 糖尿病ラットにおいてグルコース値の上昇が心筋収縮と不整脈の発生に与える影響

ストレプトゾトシン投与ラットにおけるグルコース値と体重の変化

ストレプトゾトシン腹腔内投与後 8 週後のラットでは血中グルコース値が上昇し、体重が減少した。

ストレプトゾトシン投与ラットにおける心筋収縮特性の変化

ストレプトゾトシン投与ラットではコントロールと比較して発生張力が低下した。更に、最大収縮速度と最小弛緩速度が低下し、収縮能と弛緩能が低下した。

ストレプトゾトシン投与ラットにおけるグルコース値上昇の影響

ストレプトゾトシン投与ラットにおいて、グルコース値の 150 から 400mg/dl への上昇は、低カルシウム負荷状態では発生張力と細胞内カルシウム動態を変化させなかった。高カルシウム負荷状態では細胞内カルシウムを変化させずに、発生張力を低下させた。このことは、糖尿病ラットではカルシウム負荷状態において収縮蛋白のカルシウム親和性が低下することを示した。更に、このグルコース値の上昇は電気刺激によって誘発される不整脈数を増加させなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Miura M, Taguchi Y, Handoh T, Hasegawa T, Takahashi Y, Morita N, Matsumoto A, Sato H, Shindoh C. Regional increase in ROS within stretched region exacerbates arrhythmias in rat trabeculae with nonuniform contraction. *Pflügers Arch* 2018; 470:1349–1357. doi.org/10.1007/s00424-018-2152-x 査読有

Yamaguchi K, Shindoh C, Miura M. Diaphragm muscle contraction decrease in a mouse model of ovalbumin-induced allergic airway inflammation. *J Allergy Ther* 2017; 8:3.1000265. DOI: 10.4172/2155-6121.1000265. doi: 10.4172/2155-6121.1000265 査読有

Miura M, Nagano T, Murai N, Taguchi T, Handoh T, Satoh M, Miyata S, Miller L, Shindoh C, Stuyvers BD. Effect of carbenoxolone on arrhythmogenesis in rat ventricular muscle. *Circ J*. 2016; 80: 76-84. doi: 10.1253/circj.CJ-15-0401 査読有

〔学会発表〕(計 22 件)

High glucose concentration decreases myofilament Ca²⁺ sensitivity only under high Ca²⁺-load in normal rat myocardium. Taiki Hasegawa, Ayana Matsumoto, Yui Takahashi, Natsuki Morita, Haruka Sato, Masahito Miura. 91st AHA meeting (Chicago) 2018 Nov 9.

Ca²⁺ within the mitochondria affects the occurrence of arrhythmias in rat right ventricular hypertrophy. Yui Takahashi, Taiki Hasegawa, Natsuki Morita, Ayana Matsumoto, Haruka Sato, Masahito Miura. 91st AHA meeting (Chicago) 2018 Nov 9.

Isoforms of Rho-kinase Play Different Roles in Cardiac Muscle. Taiki Hasegawa, Masahito Miura, Shinichiro Sunamura, Haruka Sato, Kimio Satoh, Hiroaki

Shimokawa. 第 82 回日本循環器学会（大阪）平成 30 年 3 月 23 日

Paradoxical muscle stretch during contraction increases regional ROS generation and arrhythmias in rat myocardium with nonuniform contraction. Masahito Miura, Taiki Hasegawa, Yui Takahashi, Ayana Matsumoto, Natsuki Morita, Haruka Sato. 90th AHA meeting (Anaheim) 2017 Nov 14.

Elevation of Glucose Increases Arrhythmias and Decreases Myofilament Ca²⁺ Sensitivity under Ca²⁺ Overload in Rat Myocardium with Nonuniform Contraction. Tetsuya Handoh, Masahito Miura, Chiyohiko Shindoh. 第 8 1 回日本循環器学会（金沢）平成 29 年 3 月 19 日

Elevation of glucose increases arrhythmias under Ca²⁺ overload in rat myocardium with nonuniform contraction. Tetsuya Handoh, Masahito Miura, Chiyohiko Shindoh.

第 63 回日本不整脈心電学会学術大会（札幌）平成 28 年 7 月 17 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：三浦 昌人

ローマ字氏名：Miura Masahito

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：30302110