

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08682

研究課題名(和文) 右心室流出路を起源とする致死性不整脈の発生機序解明

研究課題名(英文) Integrated analysis of arrhythmogenic substrates in right ventricular outflow tract for the genesis of the lethal ventricular arrhythmia.

研究代表者

松山 高明 (Matsuyama, Takaaki)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：40349113

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)：右室流出路領域に存在する不整脈源は心内膜面にもその原因となる構造が存在する可能性を考え、ラット右心室心内膜面の細胞内カルシウム蛍光イメージングを行ったところ、右室流出路下部にプルキンエ線維の豊富な分布がみられた。このような部位において虚血下でプルキンエ線維の電気的不安定性が出現するから明らかにするため、マウス心臓の冠動脈結紮心筋梗塞モデルを用いて観察したところ、梗塞の境界部位のプルキンエ線維で不整脈の発生につながる可能性のある異常な細胞内カルシウム変動が確認された。この現象はプルキンエ線維と一般心筋の結合部分のT管の分布の違いも関連している可能性も考えられ、検討を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

致死性不整脈の発生源の一つとして心室内の特殊な構造で刺激伝導系の末梢にあるプルキンエ線維の存在が臨床的にも注目されているが、実際にどのように機能障害を生じて不整脈源性を発揮しているのは明らかではない。本研究では心室性不整脈の発生につながる可能性のある電気生理学的異常がどのような形態学的基盤を基にして生じているのかを肉眼的かつ組織学的にも視覚的に示すことができた。心室の致死性不整脈の発生機序を解明する上で、このような生きた心臓の電気生理学的現象の視覚的情報はその病態の理解を深め、さらにそれに対するより有効な治療方法の開発の一助となる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Recently, the region of right ventricular outflow tract (RVOT) has been highlighted as an arrhythmogenic substrate, however, its morphologic characteristics for arrhythmogenesis still remains unclear. In the present study, we assumed that the endocardial Purkinje fiber network is a crucial arrhythmogenic structure in the ventricle, and visualized electrical excitation patterns and intracellular calcium dynamics using fluorescent imaging in mouse heart myocardial infarct model. Irregular and slower impulse propagations were observed at the border of the infarction, and Purkinje fibers in the peri-infarct zone exhibited non-uniform intracellular calcium dynamics (beat-to-beat alternans of the calcium transient). This electrical vulnerability of the Purkinje fiber network under ischemic condition was observed as the unstable intracellular calcium dynamics at the border of the infarcted area. This phenomenon might be associated with the genesis of lethal ventricular arrhythmia.

研究分野：Pathology

キーワード：刺激伝導系 不整脈原性器質 プルキンエ線維 心室性不整脈 カルシウム動態 虚血 病理形態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頻脈性不整脈の発生機序としてリエントリ、自動能、撃発活動が知られているが、実際に心臓の様々な部位で発生する不整脈において、どの機序がどのような形態と関連して発生しているかは明らかにされていないことが多い。本研究では以前から致死性不整脈の起源として着目されている右心室流出路を基盤として発生する不整脈の発生機序の解明を主なテーマとした。Brugada 症候群などによる特発性心室頻拍/細動では明らかな解剖・組織学的異常がないものの、臨床的には右室流出路に不整脈の起源があることが電気生理学的に示されている。このような、形態学的に異常のない右室流出路からなぜ不整脈が発生しやすいのかを明らかにするには、従来のホルマリンで固定された標本の形態解析のみでは限界があり、不整脈という時間とともに変化する心臓内の興奮伝導異常を可視化して同定する時空的な解析を合わせた統合的な研究手法が必要であると考えた。

2. 研究の目的

心臓の流出路は右室・左室流出路ともに心臓の発生過程の最終段階で形成され、心室中隔と両心室接合部を含む複雑な立体構造をしているため、発生学的にも形態学的にもその複雑な心筋構築が関連して不整脈が発生しやすい基質を形成している可能性がある。本研究の目的は右室流出路部分の電気的特徴を高速蛍光イメージング法で解析し、不整脈の発生起源となりうる右室流出路の局所を詳細に同定し、健全な心臓においても潜在的に電気的不安定性を有している局所が存在することを明らかにする。さらにその不整脈の原因となり得る異常興奮を示す部分の心筋の大きさ・配列、間質の密度の違いやギャップ結合などの機能蛋白質、イオンチャネルの分布を含めた組織形態学的特徴から、構造上異常のない心臓における心室性不整脈の起源と発生機序を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

- 1) 拍動した状態のラット摘出ランゲンドルフ灌流心に膜電位感受性色素(di4-ANEPPS)を負荷して、心電図記録下に右室流出路部分の心筋の膜電位変化に伴う蛍光強度の変化を CMOS カメラで高速取得(500frames/s)して捉える実験を行った。顕微鏡はマクロズーム顕微鏡(MVX-10)を用い、画像取得と蛍光マッピングデータの解析は画像取得解析システム MicMA-02(Brainvision)を用いた。低カリウム、低マグネシウムの灌流液の変化により心筋活動電位の再分極相の延長状態を再現した状態では、右室流出路に異常興奮部位が観察され、その伝導様式を解析した。また、その異常興奮部位では細胞内カルシウム動態異常が発生している可能性を考え、上記と同様のラット灌流心に Ca²⁺蛍光プローブ(Fluo-4)を負荷して、高速共焦点レーザー顕微鏡により異常興奮を示す部分の細胞内 Ca²⁺動態を観察することも試みた。
- 2) さらにこれらの機能的および形態学的特徴がヒト心臓においても同様にみられるか、剖検心を用いて組織学的検索を行い比較検討した。

4. 研究成果

右室流出路領域の異常興奮部位の特定を行うにつれ、不整脈源は心外膜面のみでなく、心内膜面にもその起源となる部位が存在する可能性が考えられたことから、ランゲンドルフ

灌流下のラット心臓の右心室を切開して心内膜面の検討も蛍光イメージング法を用いて同様に行ったところ、ラット心臓の右室流出路下部のヒト心臓でいう中隔縁柱に相当する部位付近において、細胞内カルシウム濃度が最も早期に上昇する現象が捉えられた。さらに同部位に対して高速共焦点レーザー顕微鏡を用いた検討を行ったところ、プルキンエ線維の豊富な分布が見いだされ、ここではCa²⁺トランジェントも確認できた。これらの心内膜面に観察されるプルキンエ線維の生理的状態における不整脈原性を検討する前に、虚血下における変化を検討するため、マウス心臓で冠動脈を結紮した心筋梗塞モデルを作成し、病的な虚血状態におけるプルキンエ線維の細胞内Ca²⁺動態イメージングを行った。その結果、心筋梗塞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Ca²⁺波が出現し、また一拍ごとにCa²⁺トランジェントが変動するオルタナンス現象も確認された。こういった不安定なカルシウム動態は、心筋梗塞後3-4日の心筋壊死の時期、梗塞後7-9日の肉芽形成期とともに観察され、免疫組織化学的検討を加えて *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 誌上に発表した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡でプルキンエ線維と一般心筋の結合部分の構造を観察した。両者には T 管 (横行管)の分布の違いが見出され、その移行部位(結合部位)の介在板の構造を明らかにすべく観察を継続している。現在はヒト心臓の形態観察による研究を開始し、ヒト心臓の左室心内膜面を粗削りして、低真空走査電子顕微鏡で不整脈源の発生に関連すると思われるプルキンエ細胞と一般心筋との結合部分を同定する検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuyama Taka-aki, Ohuchi Hideo, Saito Koji, Kondo Fukuo, Fukusato Toshio, Ishibashi-Ueda Hatsue	4. 巻 6
2. 論文標題 Occurrence of a primary liver cancer with an unusual histologic appearance as a late Fontan complication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 152366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2019.02.016.	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 -
1. 著者名 Matsuyama Taka-aki, Haraguchi Ryo, Nakashima Junko, Kusano Kengo, Ishibashi-Ueda Hatsue	4. 巻 37
2. 論文標題 Three-dimensional histologic reconstruction of remnant functional accessory atrioventricular myocardial connections in a case of Wolff-Parkinson-White syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cardiovascular Pathology	6. 最初と最後の頁 1~4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.carpath.2018.07.003	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 -
1. 著者名 Miyamoto Koji, Matsuyama Taka-aki, Noda Takashi, Ishibashi-Ueda Hatsue, Kusano Kengo	4. 巻 6
2. 論文標題 Pathology after a combination of sequential and simultaneous unipolar radiofrequency ablation of ventricular tachycardia in a postmortem heart with cardiac sarcoidosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 1219~1224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ccr3.1577	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 -
1. 著者名 松山高明	4. 巻 36
2. 論文標題 不整脈の既往がある心臓を解剖するために知っておきたいこと	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 診断病理	6. 最初と最後の頁 7-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 松山 高明, 曾根 浩元	4. 巻 23
2. 論文標題 正常心臓解剖の再考 心房・心室の解剖	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heart View	6. 最初と最後の頁 128-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Matsuyama Taka-aki, Tanaka Hideo, Ishibashi-Ueda Hatsue, Takamatsu Tetsuro	4. 巻 65
2. 論文標題 Spatiotemporally Non-Uniform Ca ²⁺ Dynamics of Cardiac Purkinje Fibers in Mouse Myocardial Infarct	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 655 ~ 667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155417730280	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 -

1. 著者名 Tanaka H, Matsuyama T, Takamatsu T	4. 巻 67
2. 論文標題 Towards an integrated understanding of cardiac arrhythmogenesis - Growing roles of experimental pathology	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 8-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12487	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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 田中秀央, 松山高明, 高松哲郎
2. 発表標題 心筋カルシウム動態の時空的均一性 横行小管の発現との関連
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松山 高明, 高木 孝士, 曾根 浩元, 本田 一穂, 原口 亮, 植田 初江, 田中 秀央
2. 発表標題 ヒト心臓房室刺激伝導系組織の立体画像再構築
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taka-aki Matsuyama, Mari Hashimoto, Masaya Fujishiro, Noriko Nemoto, Xiao-Pen Lee, Masafumi Takimoto, Keizo Sato
2. 発表標題 Subtle lesions probably associated with lethal cardiac events in the heart; 3 cases of non-forensic autopsy
3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taka-aki Matsuyama, Hideo Tanaka, Mihoko Yamaguchi, Siew Yen Ho
2. 発表標題 Suspected of non-compaction cardiomyopathy in a heart failure case of double outlet of right ventricle in left isomerism
3. 学会等名 The Weinstein Cardiovascular Development and Regeneration Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松山高明, 曾根浩元, 佐藤俊弥, 塚本茂人, 新家俊郎, 九島巳樹, 小形岳寛, 田中秀央, 池田善彦
2. 発表標題 心筋細胞の好塩基性変性の臨床的意義
3. 学会等名 第 40 回 心筋生検研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taka-aki Matsuyama
2. 発表標題 Morphological exploration of arrhythmogenic substrates for refractory ventricular arrhythmia in the autopsied humans hearts after catheter ablation therapy
3. 学会等名 Japanese Heart Rhythm Society
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松山高明
2. 発表標題 心筋炎の病理診断
3. 学会等名 第 106回 日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松山高明
2. 発表標題 心筋生検における炎症細胞の評価 -心筋炎とその鑑別疾患-
3. 学会等名 第 106回 日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松山高明
2. 発表標題 恒久型心臓ペースメーカーリードの心内癒着部位の検討
3. 学会等名 第 106回 日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松山高明
2. 発表標題 三尖弁輪に二重房室結節様組織を認めたフォンタン術後の兩大血管右室起始症の1剖検例
3. 学会等名 第20回成人先天性心疾患学会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松山高明、田中秀央、植田初江、高松哲郎
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第105回日本病理学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Taka-aki Matsuyama, Hideo Tanaka
2. 発表標題 Towards an integrated understanding of atrial arrhythmogenesis, combined fluorescence imaging of excitation and the relevant histological analysis in perfused rat heart
3. 学会等名 Gordon Research Conference Cardiac Regulatory Mechanisms (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Taka-aki Matsuyama, Hideo Tanaka, Tetsuro Takamatsu
2. 発表標題 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
3. 学会等名 Frontiers in Cardiovascular Biology 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Taka-aki Matsuyama, Hideo Tanaka, Hatsue Ishibashi-Ueda, Tetsuo Takamatsu
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第63回日本不整脈心電学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松山 高明, 原口 亮, 植田 初江, 田中秀央
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第57回日本組織細胞化学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松山高明、田中秀央、植田初江
2. 発表標題 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細胞の機能的変化
3. 学会等名 第38回心筋生検研究会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 松山高明	4. 発行年 2018年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 340
3. 書名 カテーテルアブレーションがうまくいくカラクリ	

1. 著者名 松山高明	4. 発行年 2016年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 213
3. 書名 循環器診療に活かす心臓血管解剖学	

1. 著者名 松山高明	4. 発行年 2016年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 343
3. 書名 心室頻拍のすべて	

1. 著者名 松山高明	4. 発行年 2017年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 214
3. 書名 診断モダリティとしての心筋病理	

〔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
連携研究者	原口 亮 (Haraguchi Ryo) (00393215)	兵庫県立大学・応用情報科学研究科・准教授 (24506)	
連携研究者	田中 秀央 (Tanaka Hideo) (60236619)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	