

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09486

研究課題名(和文) 持続性心房細動に対する新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategy for persistent atrial fibrillation

研究代表者

村越 伸行 (Murakoshi, Nobuyuki)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：80447218

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)：心房筋細胞株HL-1細胞と線維芽細胞を混合培養し、高頻度ペーシングあるいはイソプロテレノール添加による電気生理学的特性を記録した。処置群細胞では活動電位持続時間の短縮および遅延後脱分極様異常電位が認められた。異常興奮が認められた細胞群では細胞内カルシウム過負荷を示し、カルシウム調節関連分子の発現変化が認められた。化合物ライブラリーのスクリーニングから、活動電位持続時間を回復させ、異常電位を消失させる天然化合物を見出した。アンジオテンシンII持続投与によって、心房線維化、および心房細動持続時間の延長が認められ、化合物投与によって心房線維化を軽減し、心房細動誘発率・持続時間を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心房細動は高齢者に多く、日本で100万人以上の患者がいると推定される不整脈疾患の一つであり、生活の質の低下、心不全・脳梗塞の発症リスクの上昇をもたらす。心房細動に対する薬物治療やカテーテルアブレーション治療が確立しているものの、高齢化社会の進展とともに患者数が増加しており、また持続性心房細動では再発率がなお高いのが問題である。本研究では病態の解明、新たな治療法・予防法の開発のために、病気を反映した培養細胞系を確立したこと、その培養系を用いたスクリーニングにより、心房細動を抑制しうる化合物を見出すことができたことが学術的意義である。本研究をさらに発展させ、心房細動の治療・予防の開発につなげたい。

研究成果の概要(英文)：Cardiac myocyte cell line HL-1 cells were cocultured with cardiac fibroblasts, and treated with rapid electrical stimulation or treated with isoproterenol (ISO). After treatment, electrophysiological properties were recorded by using multielectrode array system. ISO-treated cells showed the shortening of action potential duration (APD), and partially exhibited delayed afterdepolarization (DAD)-like potentials. Such cell clusters showed intracellular calcium overload, and alterations in expressions of calcium handling-related molecules. Screening for compound library, a natural compound was found to reduce the shortening of APD / the abnormal electrical activity. Angiotensin II (100 ng/kg/min)-administered wild-type mice showed atrial fibrosis progression, and atrial fibrillation (AF) prolongation, whereas treatment with the compound could partially inhibit the pathological phenotypes.

研究分野：循環器内科

キーワード：不整脈 心房細動 異常電位 連続性分裂電位 培養細胞

## 1. 研究開始当初の背景

心房細動は60歳以上の高齢者に多い最も頻度の高い持続性不整脈疾患の一つであり、現在日本では約150万人の患者が存在すると推定される。生活の質や運動耐容能の低下、心不全の発症リスクの上昇をもたらす臨床的に重要な疾患であり、最も重大な合併症である心原性脳梗塞を、洞調律と比較して約5倍に増加させると報告されている。その結果、生命予後を1.5~2.5倍に悪化させ、寝たきりの増加、医療コストの増加を引き起こす。現在、高齢化社会の進展や生活習慣の変化に伴い心房細動の発症率・罹患率は徐々に増加傾向にあり、健康長寿の実現のためには心房細動の発症リスクの管理、心房細動患者のリスク層別化、そして適切な治療介入が重要である。心房細動の発症機序は肺静脈から発生する異常興奮がトリガーとなり左心房に伝導することによって生じるという概念に基づいて、肺静脈-左心房接合部を電氣的に隔離するカテーテルアブレーション治療(肺静脈電氣的隔離術)が確立している。発作性心房細動に対するカテーテル治療後の再発率は改善しているものの、しかしながら持続性心房細動に対するカテーテル治療1年後の再発率は約40%、3年で約60%となお高く、生活の質と生命予後の改善・医療費抑制のために、持続性心房細動に対するさらなる治療成績の改善が必要である。

## 2. 研究の目的

心房細動(発作性・持続性)に対する治療法として、肺静脈電氣的隔離術をベースとしたカテーテルアブレーションは確立した治療法であるが、持続性心房細動における高い再発率が大きな問題として残っている。本研究は持続性心房細動における電気生理学的・分子学的研究を基に、肺静脈-左心房間異常電位あるいは左心房内異常電位を抑制する標的分子・薬剤を明らかにすること、ドラッグ・デリバリー・システムによってピンポイントで薬剤を投与するシステムを構築することを目的とし、その結果、持続性心房細動のより効率的な治療法の開発に応用することが目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 心房筋・線維芽細胞混合培養による異常電位・興奮伝播様式の確認と分子機序の評価

HL-1心房筋細胞または初代心房筋培養細胞を多点平面電極上に培養する。または心臓線維芽細胞と混合培養する。アンジオテンシンII添加あるいは心房筋高頻度ペーシングを48時間持続後、活動電位持続時間、局所電位、興奮伝播様式を多点電極記録システムと膜電位イメージングで記録する。これまでの研究で異常電位の抑制効果が認められたコネキシン40に対するアンチセンス核酸などを導入し、異常電位の消失・細胞伝導性抑制が得られるかどうか、多点電極記録システム、高速イメージングシステムを用いて評価する。心房筋線維芽細胞混合培養を免疫染色し、コネキシン、カルシウムチャンネル、カリウムチャンネル、リアノジン受容体などの発現を評価する。また、RNAを回収し、定量的PCR法で遺伝子発現を解析する。

### (2) 電位伝導抑制薬のスクリーニング

多点電極記録システム、膜電位高速イメージングシステムを用いて、心房筋混合培養における電位の消失・細胞伝導性抑制を指標に化合物ライブラリー(抗不整脈薬、受容体拮抗薬、標的分子化合物、免疫抑制薬など)のスクリーニングを行い、電位の消失・抑制に有効な薬剤を明らかにする。

### (3) 心房細動易誘発性モデルマウスの生理学的・病理学的評価

野生型健常マウスを対照群、心房細動易誘発性モデルマウスを疾患群とする。心房細動易誘発性モデルとして、アンジオテンシンII持続投与あるいは高脂肪食投与マウスを用いる。両群マウスに対し頸静脈的に多点電極カテーテルを右心房に挿入し、電気生理検査および心房細動誘発を行う。全身麻酔下で心房細動の誘発性・持続性を評価し、同時に心房細動中の心内電位を記録する。また全身麻酔下でテレメトリー心電計を植込み、自然発生性の心房細動を観察し、持続性を評価する。心房細動モデルマウスのランゲンドルフ灌流心あるいは心房組織切片を、培養細胞を用いた検討と同様、多点平面電極システム、高速イメージングを併用し、活動電位持続時間、局所電位、興奮伝播様式を記録し、心房内異常電位(連続性分裂電位)を同定する。

### (4) 心房細動易誘発性モデルマウスに対する電位伝導抑制薬の効果

心房細動易誘発性モデルマウスに異常電位抑制薬・伝導抑制薬あるいは対照として溶媒のみを投与する。2~4週後、心エコーで心機能・形態を評価する。電気生理検査で心房細動誘発率・持続時間を測定する。多点電極アレイシステム、高速イメージングにより心房内異常電位の消失を確認する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 心房筋・線維芽細胞混合培養による異常電位・興奮伝播様式の確認と分子機序の評価

初代心房筋培養細胞と線維芽細胞、あるいは心房筋細胞株 HL-1 細胞と線維芽細胞を平面電極上に混合培養した。高頻度ペーシング、イソプロテレノール添加、あるいはアンジオテンシン II 添加による電気生理学的特性を多電極アレイを用いて記録した。イソプロテレノール添加群の混合培養細胞では活動電位持続時間の短縮が認められ、一部に遅延後脱分極 (delayed afterdepolarization: DAD) が認められた。また、異常興奮が認められた部位では、細胞内カルシウム過負荷を示し、NCX (sodium calcium exchanger) 発現亢進などカルシウム調節関連分子の発現変化が認められた。

##### (2) 電位伝導抑制薬のスクリーニング

多電極記録システム、膜電位高速イメージングシステムを用いて、心房筋混合培養における活動電位持続時間・細胞伝導時間の抑制を指標に化合物ライブラリー (抗不整脈薬、受容体拮抗薬、標的分子化合物、免疫抑制薬など) のスクリーニングを行い、電位の消失・抑制に有効な標的を探索した。その中で天然化合物 X などいくつかの化合物が異常電位の消失させる作用を有していることを見出した。

##### (3) 心房細動易誘発性マウスモデルの生理学的・病理学的評価

野生型マウス・高脂肪食マウスに対し頸静脈的に多電極カテーテルを右心房に挿入し、電気生理検査および心房細動誘発を行った。高脂肪食マウスでは、通常食マウスと比較し、有意な体重の増加、内臓脂肪・皮下脂肪の蓄積が認められ、心房からの遅延後脱分極からの誘発活動の亢進が認められた。その結果、心房細動誘発率・持続性の亢進が認められた。

浸透圧ミニポンプによるアンジオテンシン II 2週投与 (100ng/kg/min) により、有意な血圧の上昇、左心房径増大、心房線維化促進が認められ、右心房からの電気生理検査により有効不応期の短縮、心房細動誘発率の亢進、心房細動持続時間の延長が認められた。

##### (4) 心房細動易誘発性モデルマウスに対する電位伝導抑制薬の効果

浸透圧ミニポンプによるアンジオテンシン II 持続投与 (100ng/kg/min) による心房細動易誘発性モデルマウスに対し、化合物 X を投与した。アンジオテンシン II 投与に伴う心房線維化を化合物投与によって有意に抑制し、また心房細動誘発率の上昇を有意に抑制した。またアンジオテンシン II 投与によって短縮した心房有効不応期を回復させた。

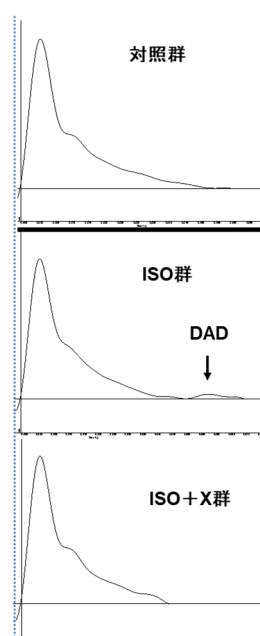


Figure 1. 多電極アレイによる活動電位記録  
a) 対照群, b) isoproterenol群, c) isoproterenol + compound X群

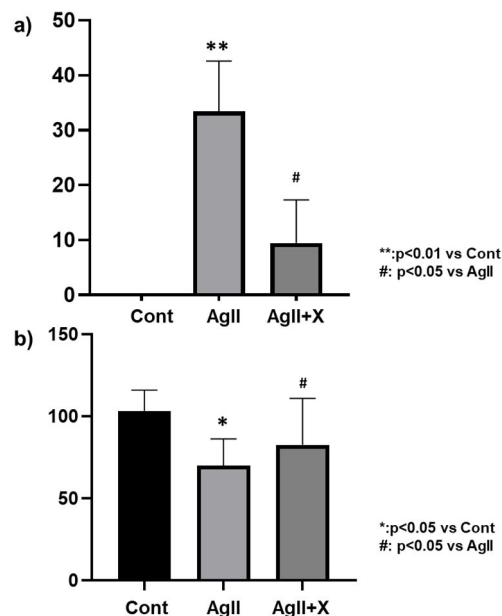


Figure 2. a) 心房細動誘発率、b) 心房有効不応期に対する化合物Xの効果, Cont: control; AgII: angiotensin II; AgII+X: angiotensin II + compound X

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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	許 東洙  (Xu Dongzhu)  (20616651)	筑波大学・医学医療系・准教授    (12102)	