

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09532

研究課題名(和文) グルタミン酸による心房細動誘発機序の解明

研究課題名(英文) Relationship between the mechanism of atrial fibrillation and glutamic acid

研究代表者

高野 信太郎 (TAKANO, Shintaro)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：80793421

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)：心筋の障害は心房細動の発生と関係性があり、その障害に酸化ストレスの関与が指摘されている。酸化ストレスの原因としてアミノ酸の一種であるグルタミン酸に着目した。グルタミン酸投与ラット(1カ月間の皮下注射 1～2 mg/g)において血中酸化ストレスマーカー(ヒドロペルオキシド、ニトロチロシン)の有意な上昇、また心筋においては肥大や線維化を示すマーカー(β-アクチンなど)の有意な発現量増加を確認した。受容体を介した変化と考え、複数のグルタミン酸受容体の発現量を測定した結果、シスチン-グルタミン酸トランスポータの発現量増加が確認された(抗酸化力を有するグルタチオン生成に関係する受容体)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心房細動は最も一般的な不整脈であり脳梗塞や心不全などの疾患と密接に関係している。有病率も年々、増加傾向となっており、病因の更なる解明に加えて治療法の進歩、予防医学が引き続き重要と考える。アミノ酸は日常的に行われている食事や運動と関連が深く、アミノ酸と心房細動の関係性が明らかになれば、治療と予防は大きく前進する事となる。今回の研究において、アミノ酸の一種であるグルタミン酸が血中の酸化ストレス量や心筋の肥大・線維化、受容体発現に影響を与える結果となり、心房細動の発生に何らかの影響を与える可能性を示す事ができた。

研究成果の概要(英文)：There is a connection between atrial fibrillation (AF) and Myocardial disorders. And It has been often indicated that Oxidative stress was involved as a cause of myocardial damage. We previously reported that Plasma glutamic acid (Glu) concentration of the AF group were significantly higher than those of the control group. We focused on the relationship between the occurrence of oxidative stress and glutamic acid.

In the monosodium glutamate group rat (a dose of 1mg/g~2mg/g MSG : subcutaneously), oxidative stress marker in blood (hydroperoxide, nitrotyrosine) was significantly elevated. and In myocardial tissue, The results of Western blotting analysis demonstrated that expression of markers associated with hypertrophy and fibrosis (such as β-actin) markedly increased in MSG group compared with the control group. As a result of examining glutamate receptors, an increase in the expression level of Cystine/Glutamic acid transporter (xCT) was confirmed. (Receptor related to glutathione)

研究分野：循環器内科

キーワード：心房細動 グルタミン酸 酸化ストレス グルタミン酸受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心房細動は最も頻度の高い不整脈であり、心不全、脳卒中や認知症の原因となって患者の QOL および生命予後を悪化させる。高齢化に伴って心不全や脳卒中の増加が予想される現在において、この病態解明は社会的に重要と考える。

複数の要因が心房細動のリスクとして知られており、例えば高齢、男性、高血圧症、心不全、甲状腺機能亢進症、糖尿病や腎不全などが挙げられる。心房細動の病態生理は未だ明らかでない部分も多いが、その発生においては炎症や酸化ストレスの存在も重要な要素と考えられている。

2. 研究の目的

我々は過去に、心房細動患者において血漿グルタミン酸濃度と酸化ストレス度 (hydroperoxide) が正相関しており、独立した心房細動の危険因子である事を報告した (Disease Markers, Volume 2016, Article ID 7650976)。よって、グルタミン酸と心房細動の原因となりえる心筋障害の関係を明らかにすることを試みた。また心房細動患者において認められる心筋障害は心筋組織内の酸化ストレスのみでなく、全身性の酸化ストレスが関係していると考えた。心筋障害の原因となる酸化ストレスに影響を与える新たな因子として、心筋にも多く分布するグルタミン酸受容体に着目した。

(1) イオンチャネル型のグルタミン酸受容体 (N-methyl-D-aspartate 受容体)

(2) 代謝型受容体

(3) グルタミン酸に関連した xCT

グルタミン酸投与におけるグルタミン酸受容体の変動と心筋障害の程度に関して分子学および組織学的に検証を行った。

3. 研究の方法

実験は院内の動物実験倫理委員会によって承認され、動物実験ガイドラインに従って実施した。合計 20 匹の 3 週齢の Wistar ラット ($50 \pm 5g$) は対照群 (CTL group) と $2mg/g$ MSG (monosodium glutamate: sigma) 群 (MSG group) にランダムに割り当てた。

動物は三協ラボサービス株式会社から購入、動物はゲージに入れ (各ゲージに 5 匹)、環境制御された条件 (温度 $20^\circ C$ 、湿度 60%) で 12 時間の明暗サイクルを維持した。標準食と水に関しては自由摂取とした。

4 週間の実験全期間にわたって、CTL 群ラットに対して 0.9% 生理食塩水の皮下 (s.c) 投与を、MSG 群ラットに対して $2mg/g$ MSG の皮下投与を実施した。3 種類の混合麻酔薬 (メドミジン、ミダゾラム、ブトルファンール) の腹腔内注射で麻酔されたラットより血液サンプルならびに心臓の摘出を行った。組織は 10% ホルムアルデヒドで固定し、パラフィンワックスに包埋、 $4mm$ 厚の切片に切り分けた。組織診断はヘマトキシリン-エオジン (H&E) 染色と結合組織を識別するための Azan 染色で行った。顕微鏡 (HS オールインワン蛍光顕微鏡 KEYENCE、日本) で観察され、評価は病理医によって行われた。

ラットの凍結心臓組織はホモジナイズした後、バッファー中でソニケーター (Branson) により超音波処理を施した。抽出物のタンパク質濃度は Qubit® タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を使用して決定した。

タンパク質は $5-12\%$ SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離され、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンに転写した。使用した抗体は、抗 NMDAR2A (abcam, ab203197)、抗 NMDAR2B (abcam, ab229636)、抗 α -アクチン (Santa Cruz Biotechnology, sc-32251)、抗 MMP9 (Cell Signaling Technology, CST, # 3852) および抗 α -チューブリン (Medical & Biological Laboratories, PM054-7)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ウサギ IgG (CST, # 7074)、HRP 標識抗マウス IgG (CST, # 7076)。発光シグナルは LAS4000 ミニ発光画像アナライザー (Fuji Film) で分析した。

大動脈血中の酸化ストレスに関しては、FREE Cardio Duo システム (WISMERLL) を使用して、血漿中のダイアクロン活性酸素代謝物 (dROM) を測定した。血清ニトロチロシン (NT) に関しては (Perkin-Elmer Life Sciences) を使用して測定した。

4. 研究成果

グルタミン酸皮下投与群 (MSG 群) のラットにおいて、血清ニトロチロシン (NT) 血漿 D-ROMs は対照群と比して有意に高値を示した。(図1)

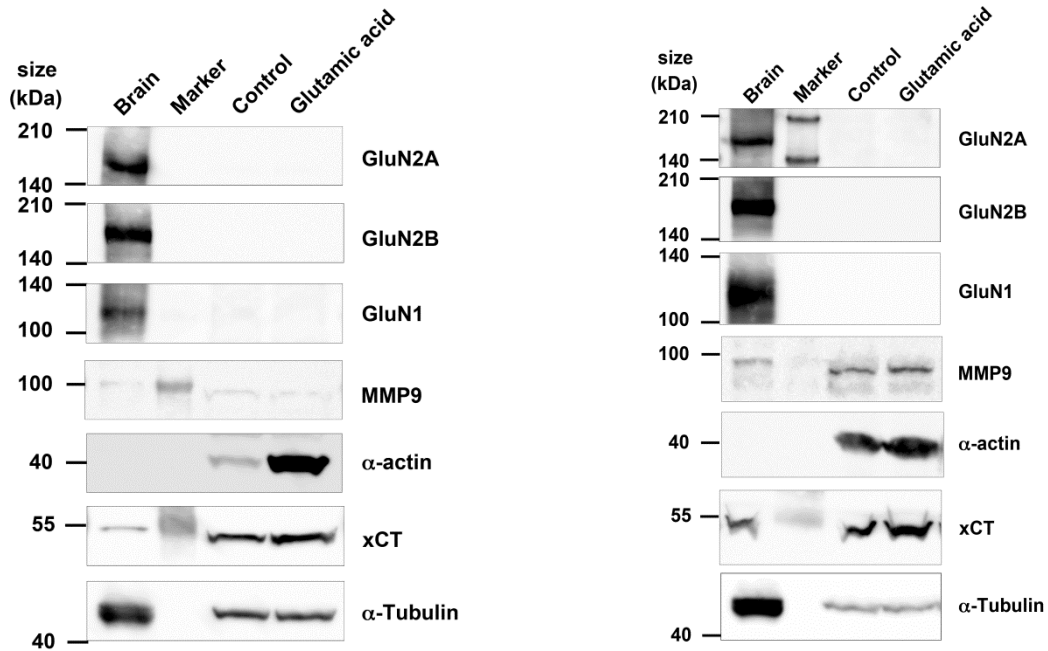
	MSG	Control	p
NT (μg/ml)	7.44 ± 1.1	5.67 ± 0.34	p < 0.05
D-ROM (U-Carr)	384 ± 32.5	284 ± 41.8	P < 0.01

図1 MSG 群と対照群における D-ROM, NT 比較

心筋組織における各種蛋白の測定は Western Blotting 法で行った。心筋組織においてイオンチャンネル型受容体である NMDA-R は GluN1 を始めとして GluN2A/N2B いずれにおいても検出されなかった (GluN2B に関しては NMDA 受容体拮抗薬であるメマンチン塩酸塩を皮下注射したラットにおいては、わずかに検出された)。(図2)

グルタチオン関連 Xc-T (シスチン/グルタミン酸トランスポーター) は MSG 群の心筋組織において発現増加を認めた (心室筋 > 心房筋)。心筋の肥大を示す α-actin についても MSG 群で有意に発現増加を認めた (心房筋 > 心室筋)。(図2)(図3)

線維化に関する MMP9 に関しては両群において有意差を認めなかった。(図2)



Western blot analysis of rat brain and atrium

Western blot analysis of rat brain and ventricle

図2 : ラット心筋組織における MSG 群と対照群の各種蛋白分析における比較

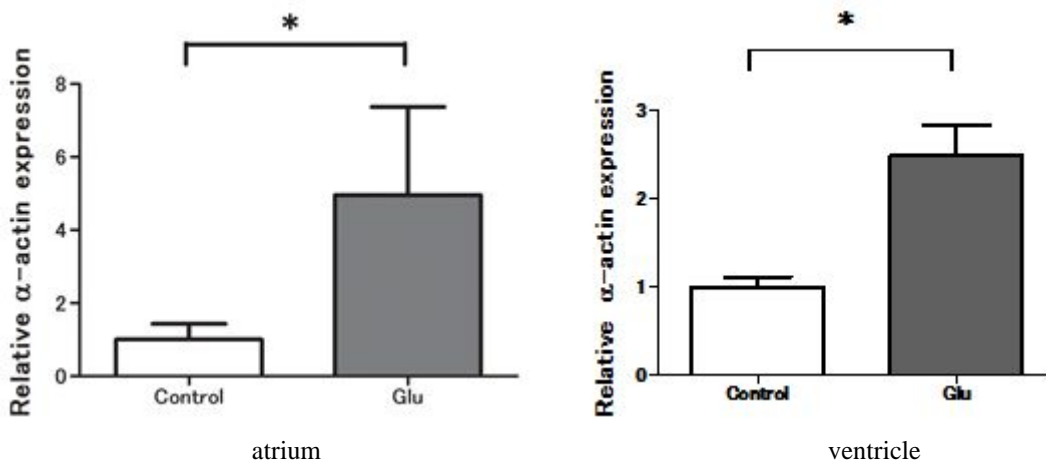


図3：ラット心筋組織におけるMSG群と対照群の比較（ $p < 0.05$ ）

HE染色・Azan染色でラット心筋の組織評価を行った。MSG群において心房、心室筋に心筋肥大の所見はなく、心筋障害の指標となる線維化に関しても認めなかった。MSG群と対照群で有意差は確認できなかった。（図4）

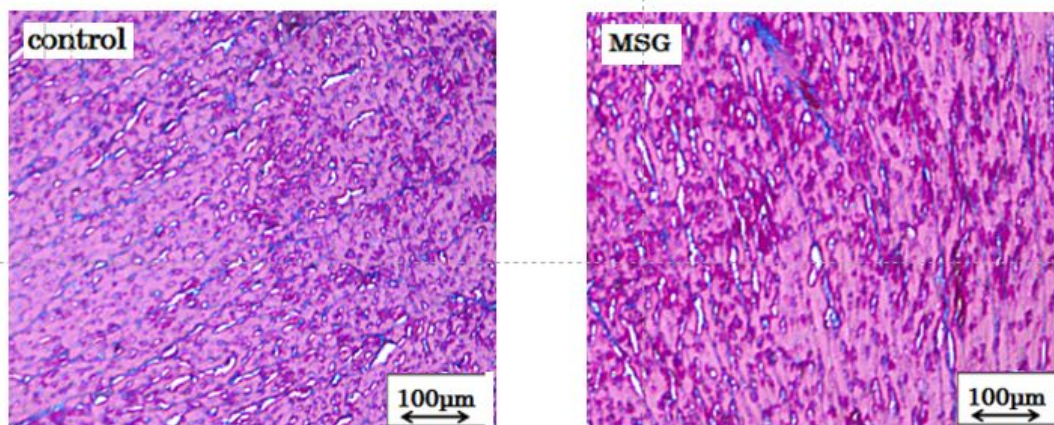


図4：MSG群と対照群におけるAzan染色の比較

高容量のグルタミン酸塩酸塩を皮下注射したラットにおいて、血液中の酸化ストレス濃度の上昇を認め、心筋組織において肥大を示唆するマーカの上昇を認めた。シスチン/グルタミン酸トランスポーター（Xc-T）の変動も認めており、Xc-Tと酸化ストレスの関与、また心筋の障害に関連している可能性があることが示唆された。

組織学的には、心筋の肥大や障害を示す線維化は見られなかったが、分子学的な変化が確認されており、心筋障害に至る前段階を表している可能性を考える。

我々の実験ではラット心臓において、複数試薬と複数回の測定を行ったが、NMDA受容体は検出されなかった。したがってNMDA受容体と酸化ストレスや心筋障害に関しては評価できなかった。

グルタミン酸が全身の酸化ストレス生成に影響を与え、血中の全身性酸化ストレスが心筋へ障害を与える可能性を見出したが、心房細動との関連に関しては更なる研究が必要と考える。

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	藤林 幸輔 (FUJIBAYASHI Kousuke) (10633323)	金沢医科大学・医学部・助教 (33303)	
研究分担者	河合 康幸 (KAWAI Yasuyuki) (40324157)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	
研究分担者	中西 宏明 (NAKANISHI Hiroaki) (90392274)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	