

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15460

研究課題名(和文) 伸展負荷により肺静脈心筋の細胞内Ca²⁺-依存性自発活動が顕在化する機序の解明研究課題名(英文) Effect of stretch on the intracellular Ca²⁺-dependent spontaneous activity of pulmonary vein myocardium

研究代表者

浜口 正悟 (HAMAGUCHI, Shogo)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：80747767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心房細動の発生源として重要視されている肺静脈心筋の電気的自発活動と心房細動発生の危険因子となりうる伸展負荷およびangiotensin との関連性について検討した。モルモット摘出肺静脈組織標本ではangiotensin により電気的自発活動が誘発され、その作用はAT1受容体遮断薬losartan、筋小胞体IP3受容体遮断薬xestospongine C、Na⁺/Ca²⁺交換機構阻害薬SEA0400により抑制された。以上の結果から、Angiotensin はAT1受容体を介して筋小胞体Ca²⁺放出を促進し、それがNa⁺/Ca²⁺交換機構によって電気的自発活動発生の引き金となることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心房細動は臨床で最も多く見られる不整脈の一つである。患者数が多く(日本に130万人)、心原性脳梗塞を誘発するなど患者のQOLを損なうことから、治療意義の大きい疾患と考えられているが、有効かつ安全な治療薬は未だ存在しない。近年、心房細動の原因の大半が左心房に隣接する肺静脈内に局在する心筋組織の異所性自動能であることが判明した。また高血圧症や心不全などの心房細動の危険因子の多くは肺静脈に持続的な負荷がかかるものである。従ってこの肺静脈自動能が引き起こされる機序を解明し、それを抑制する薬物を見出すことができれば、心房細動の新たな治療戦略の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of stretch and angiotensin II on electrical spontaneous activity of pulmonary vein myocardium, which can be a risk factor for atrial fibrillation. In guinea pig isolated pulmonary vein tissue preparations, angiotensin II induced electrical spontaneous activity, which was suppressed by losartan (AT1 receptor antagonist), xestospongine C (IP3 receptor inhibitor) and SEA0400 (Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitor). These results indicated that angiotensin II promotes the Ca²⁺ release from IP3 receptor via the AT1 receptor, which triggers the generation of electrical spontaneous activity of pulmonary vein myocardium by Na⁺/Ca²⁺ exchanger.

研究分野：循環薬理学

キーワード：肺静脈心筋 自発活動 心房細動 angiotensin 伸展負荷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心房細動は臨床で最も多く見られる不整脈の一つである。患者数が多く(日本に130万人)、心原性脳梗塞を誘発するなど患者のQOLを損なうことから、治療意義の大きい疾患と考えられている。これまで心房細動は心房筋の異常興奮が主原因と考えられていたため、現在も治療薬は心臓にターゲットをおいた抗不整脈薬が使用されている。しかし近年、心房細動の原因の大半が左心房に隣接する肺静脈内に局在する心筋組織の異所性自動能であることが判明した^①。従ってこの肺静脈自動能を抑制する薬物を見出すことができれば、心房細動の新たな治療戦略に繋がり、社会に大きく貢献できる。この肺静脈心筋の自発活動(自発的活動電位)の発生機序や薬理学的性質については未知の点が多く、有効かつ安全な心房細動治療薬は未だ存在しない。また、高血圧症や心不全など、心房細動の危険因子の多くは肺静脈に持続的な負荷がかかるものであり、肺静脈心筋組織への伸展負荷が異所性自発活動を誘発している可能性が考えられるが、直接的な証拠は少ない。

2. 研究の目的

本研究は、心房細動の発生源として重要視されている肺静脈心筋の電氣的自発活動と、心房細動発生の危険因子となりうる伸展負荷およびその修飾因子との関連に注目する。肺静脈心筋の細胞内Ca²⁺依存的な自発活動の発生を促進する修飾因子を解明し、心房細動発生機序の解明と新たな治療戦略開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

Hartley系雄性モルモットから素早く心肺を摘出し、左心房および肺静脈組織標本を作製した。また、単離心筋細胞は、肺を付けたままランゲンドルフ灌流心を作成し、コラゲナーゼ処置することで作成した。肺静脈組織標本では、心筋層の自発的興奮を捉えるため、張力測定と細胞内活動電位測定を用いた。張力測定は切り開いた肺静脈組織標本の輪走方向の張力変化をアイソメトリックトランスデューサーを用いて測定した。細胞内活動電位の測定は定法に従い、3Mの塩化カリウムで満たしたガラス微小電極(抵抗値20~30M Ω)を肺静脈組織標本の心筋層に刺入し行った。細胞内Ca²⁺動態は単離細胞に蛍光プローブを負荷し、共焦点顕微鏡法により可視化・定量した。

4. 研究成果

モルモット肺静脈組織標本において、ガラス微小電極法を用いて細胞内活動電位を測定しながら機械伸展負荷をかけたところ、自発的な活動電位が誘発された。この伸展負荷による自発活動の誘発は、伸展活性化チャネルの阻害薬であるgadoliniumやstreptomycinの前処置により抑制された。ただし、伸展負荷によって誘発された自発活動は持続時間が短いこと、誘発される自発活動の発火頻度にバラツキが生じやすいことから、各種薬物を用いた自発活動の発生機序の詳細なメカニズムを追求することは困難を極めた。

そこで次に、持続的な負荷がかかる高血圧症や心不全において血中濃度が増加し、さらには心房細動の増悪因子でもある神経液性因子angiotensinの肺静脈心筋自発活動への影響を検討した。肺静脈組織標本において、angiotensinは自発活動を誘発、もしくはその発火頻度を増大させることが張力測定、細胞内活動電位測定どちらを用いた場合でも観察された。このangiotensinによる作用は濃度依存的(10nM-1 μ M)に増大した。angiotensinによる自発活動の誘発は、AT₁受容体遮断薬losartanの前処置により完全に抑制されたが、AT₂受容体遮断薬PD123319前処置では抑制されなかった。以上の結果から、angiotensinによる肺静脈心筋の自発活動亢進作用は、AT₂受容体ではなく、AT₁受容体を介して引き起こされることが示唆された。また肺静脈心筋自発活動はnoradrenaline処置、もしくは交感神経終末からnoradrenalineを遊離させるtyramine処置によっても誘発、促進された。一方、angiotensinによる自発活動亢進作用はやアドレナリン受容体遮断薬carvedilolでは抑制されなかった。したがって、angiotensinは交感神経終末からのnoradrenaline遊離促進作用を持つことが報告されているが、この作用は肺静脈心筋の自発活動亢進には寄与していないことが示唆された。

単離した肺静脈心筋細胞を膜染色プローブPKH-67で染色し、心房筋細胞、心室筋細胞と比較したところ、心室筋細胞では細胞膜の陥入構造であるT管が観察されたのに対し、心房筋細胞、肺静脈心筋細胞ではT管構造は観察されなかった。また、BODIPY™ thapsigarginを用いて筋小胞体を染色したところ、心室筋細胞、心房筋細胞、肺静脈心筋細胞の全てにおいて、核を除く細胞全体に筋小胞体の存在が確認された。また、単離した肺静脈心筋細胞にCa²⁺蛍光プローブfluo-4AMを導入して、細胞内Ca²⁺動態を観察し、心房筋細胞、心室筋細胞と比較した。1Hzの定頻度電気刺激を用いてCa²⁺transientを惹起したところ、心室筋細胞では、Ca²⁺蛍光強度の上昇が、細胞全体で同時に発生していたのに対して、心房筋細胞、肺静脈心筋細胞では、細胞膜直下の領域でまずCa²⁺蛍光強度が上昇し、その後細胞中心部へと伝播していく様子が観察された。これらの結果から、T管構造の有無とCa²⁺transient発生時のCa²⁺濃度の上昇様式の違いが関連しており、T管が存在する場合は細胞全体で同時にCa²⁺濃度が上昇し、T管が存在しない場合は膜直下から細胞中心部へと伝播していくようにCa²⁺濃度が上昇することが明らかとなった。また、肺静脈心筋細胞では、1Hzの定頻度電気刺激を行っていない場合でも、自発的にCa²⁺transientの発生が約3割の細胞で観察された。

自発的な Ca^{2+} transient が発生していない肺静脈心筋細胞に angiotensin を処置すると筋小胞体からの局所的な Ca^{2+} 放出である Ca^{2+} spark の発生頻度を増加させると共に、約 4 割の細胞で Ca^{2+} transient の誘発が観察された。Angiotensin による Ca^{2+} transient の誘発は、 AT_1 受容体遮断薬 losartan および筋小胞体 IP_3 受容体遮断薬 xestospongine C によって抑制された。したがって、angiotensin は、 AT_1 受容体を介して IP_3 受容体からの Ca^{2+} 放出を促進することで、肺静脈心筋自発活動を亢進させていることが示唆された。

次に、angiotensin による細胞内 Ca^{2+} 動態への影響がどのように電気的自発活動へと発展するのかを明らかにするため、ガラス微小電極法を用いて自発活動発生に重要となる活動電位の緩徐脱分極の観点から検討した。肺静脈心筋組織標本において、angiotensin は、緩徐脱分極相の傾きを増大させると共に、自発活動の発火頻度を増大させた。この angiotensin による緩徐脱分極相への影響は、 AT_1 受容体遮断薬 losartan、 IP_3 受容体遮断薬 xestospongine C、そして $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構阻害薬 SEA400 によって抑制された。さらに lorastan や xestospongine C、SEA400 は、angiotensin 未処置の状態で発生している自発活動においても、緩徐脱分極の傾きと自発活動の発火頻度を抑制した。これらの結果から、angiotensin は、 AT_1 受容体を介して筋小胞体 IP_3 受容体を活性化することで、筋小胞体から Ca^{2+} を放出し、この放出された Ca^{2+} が細胞膜上に存在する $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構によって細胞外へと汲み出される際に発生する内向き電流が緩徐脱分極相を形成し、肺静脈心筋の自発活動の亢進に繋がっていることが示唆された。

引用文献

- Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G et al.
Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins.
N Engl J Med. 1998;339(10):659-666. DOI:10.1056/NEJM199809033391003

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Irie Masahiko, Hiroyuki Haruhito, Hamaguchi Shogo, Namekata Iyuki, Tanaka Hikaru	4. 巻 141
2. 論文標題 Involvement of the persistent Na ⁺ current in the diastolic depolarization and automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 9~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.08.003	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 Yusuke, Obata Kae, Ohmori Tamano, Ishiwata Kohei, Abe Manato, Hamaguchi Shogo, Namekata Iyuki, Tanaka Hikaru	4. 巻 20
2. 論文標題 Angiotensin II Induces Automatic Activity of the Isolated Guinea Pig Pulmonary Vein Myocardium through Activation of the IP3 Receptor and the Na ⁺ -Ca ²⁺ Exchanger	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1768~1768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20071768	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 Namekata Iyuki, Tanaka Yusuke, Ohmori Tamano, Tsuneoka Yayoi, Hamaguchi Shogo, Tanaka Hikaru	4. 巻 27
2. 論文標題 Cell Morphology and Early-phase Ca ²⁺ Transients of Guinea-Pig Pulmonary Vein Cardiomyocytes Compared with Atrial and Ventricular Cardiomyocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioimages	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11169/bioimages.27.1	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 Irie Masahiko, Tsuneoka Yayoi, Shimobayashi Mariko, Hasegawa Nao, Tanaka Yusuke, Mochizuki Soh, Ichige Sho, Hamaguchi Shogo, Namekata Iyuki, Tanaka Hikaru	4. 巻 133
2. 論文標題 Involvement of alpha- and beta-adrenoceptors in the automaticity of the isolated guinea pig pulmonary vein myocardium	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 247~253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2017.03.003	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 Tsuneoka Yayoi, Irie Masahiko, Tanaka Yusuke, Sugimoto Takahiko, Kobayashi Yuka, Kusakabe Taichi, Kato Keisuke, Hamaguchi Shogo, Namekata Iyuki, Tanaka Hikaru	4. 巻 133
2. 論文標題 Permissive role of reduced inwardly-rectifying potassium current density in the automaticity of the guinea pig pulmonary vein myocardium	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 195 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2016.12.006	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52件(うち招待講演 0件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 日色啓仁、入江雅彦、倉持瑞季、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 モルモット肺静脈心筋に対する 群抗不整脈薬の作用
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾高椋介、行方衣由紀、日色啓仁、大森瑤乃、瀧口正悟、田中光
2. 発表標題 モルモット肺静脈心筋細胞の自発的Ca ²⁺ transientにおけるNa ⁺ /Ca ²⁺ 交換機構の関与
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒子裕貴、阿部愛杜、加藤州、入江雅彦、森仁美、行方衣由紀、瀧口正悟、田中光
2. 発表標題 心房細動に係る肺静脈心筋の薬理学的研究: late INaの関与
3. 学会等名 第3回下総薬理学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部愛杜、田中悠介、小幡香江、石渡恒平、大森瑶乃、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 モルモット摘出肺静脈心筋における自発活動の発生機序解析
3. 学会等名 第3回下総薬理学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中悠介、小幡香江、大森瑶乃、阿部愛杜、石渡恒平、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 Angioensin が肺静脈心筋に与える影響
3. 学会等名 第28回日本循環薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 行方衣由紀、瀧口正悟、田中光
2. 発表標題 モルモット肺静脈心筋の電気生理学的・薬理学的性質
3. 学会等名 心血管膜輸送研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日色啓仁、相本恵美、瀧口正悟、行方衣由紀、高原章、田中光
2. 発表標題 動静脈瘻ラット心筋の電気生理学的性質
3. 学会等名 第2回下総薬理学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中悠介、小幡香江、大森瑶乃、阿部愛杜、石渡恒平、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 Angiotensin が肺静脈心筋自動能に与える影響
3. 学会等名 第2回下総薬理学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iyuki Namekata, Masahiko Irie, Haruna Kanae, Tsuneoka Yayoi, Shogo Hamaguchi, Hikaru Tanaka.
2. 発表標題 Intracellular calcium and membrane potential oscillation in the pulmonary vein myocardium.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中悠介、小幡香江、大森瑶乃、阿部愛杜、石渡恒平、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 Angiotensin が肺静脈心筋に与える影響
3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中悠介、大森瑶乃、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 Intracellular Ca ²⁺ dynamics in guinea pig-pulmonary vein cardiomyocytes
3. 学会等名 第27回日本バイオイメーキング学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石渡恒平、田中悠介、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 Angiotensin 受容体作動薬及び拮抗薬がモルモット肺静脈心筋自発活動に与える影響
3. 学会等名 第4回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 入江雅彦、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 心房細動薬物療法への応用を目指した肺静脈心筋自発活動発生機序の解明
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中悠介、入江雅彦、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 モルモット肺静脈心筋自発活動における、 アドレナリン受容体の役割
3. 学会等名 第136回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小幡香江、田中悠介、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 モルモット肺静脈心筋におけるAngiotensin系の作用機序の検討
3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中悠介、入江雅彦、恒岡弥生、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 肺静脈心筋自動能に与える生理活性物質の影響
3. 学会等名 第19回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 入江雅彦、瀧口正悟、行方衣由紀、田中光
2. 発表標題 モルモット肺静脈心筋の自発活動および緩徐脱分極におけるNa ⁺ 電流成分の役割
3. 学会等名 第27回日本循環薬理学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

心筋 - バーチャルラボラトリ http://www.mnc.toho-u.ac.jp/v-lab/shinkin/
--

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
研究協力者	田中 光 (TANAKA Hikaru)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	行方 衣由紀 (NAMEKATA Iyuki)		
研究協力者	高原 章 (TAKAHARA Akira)		
研究協力者	田中 直子 (TANAKA Naoko)		