

令和元年5月13日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16019

研究課題名(和文) SCN5A-Nedd4-2系の電气的リモデリングに関する病態解明

研究課題名(英文) Analyses of molecular mechanism of electrophysiological remodeling focusing on SCN5A-Nedd4-2

研究代表者

峯岸 慎太郎 (Minegishi, Shintaro)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80458398

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)：本研究では、Nedd4-2 C2ドメインノックアウトマウス(KO)を用いて、安静時モデルと心筋梗塞・心房細動モデルでの検討を行った。安静時モデルの心電図波形において、KOはQT延長、QRS延長、PR短縮を認め、交感神経優位であるにも関わらず、除脈を呈した。心筋梗塞モデルでは、Tpeak/Tend間隔開大を認め、心房細動モデルでは心房細動持続時間の延長を認めた。心臓の生理学的表現型を調べたが、形態的差は認めなかったにも関わらず、心電図変化が認め、病態モデルでも電气的脆弱性を示したことから、刺激伝導系におけるイオンチャネルの膜発現増加によりNedd4-2 C2 KOの効果が現れていると予測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓突然死を回避するための予防手段は十分には確立されていない。近年、致死的不整脈に対する遺伝的素因の関与が指摘されており、その中でもSCN5A遺伝子は心臓の電气的特性を決定付ける重要な遺伝子である。本研究では、SCN5Aとその制御因子であるNedd4-2に注目し、Nedd4-2 C2ドメインノックアウトマウス(KO)の電気生理学的表現型の評価を行った。KOには心臓の電気生理学的変化をもたらす基盤があり、結果として心血管合併症が重篤化し得ることが示唆された。SCN5A-Nedd4-2系に焦点をあてた研究が新たな治療戦略となる可能性があり、不整脈に対する診断・治療の可能性が拡がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that Nedd4-2 C2 isoform causes cardiac conduction change in resting condition as well as proarrhythmic change after acute myocardial infarction (MI) and atrial fibrillation (AF). The Nedd4-2 C2 knockout (KO) mice showed prolonged QRS, QT intervals, and suppressed PR interval in resting condition.

Although KO showed higher sympatho-vagal balance, bradycardia was found. In addition, enhancement of T peak/T end interval was found in mice with surgical MI. Burst pacing induced AF was sustained in KO. Morphological analyses based on both ultrasonography of the living heart, as well as histopathological findings revealed that KO mice show no significant structural change. These results suggested that Nedd4-2 with C2 domain might play an important role through post-transcriptional modification of ion channels.

研究分野：循環器

キーワード：ナトリウムチャンネル Nedd4-2 SCN5A 不整脈 高血圧

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Nedd4-2 は腎遠位ネフロンに存在する Epithelial sodium channel (ENaC) を PY-motif の結合を介してユビキチン化する。ENaC は、Na の再吸収を行うことで体液量と血圧の維持に重要な役割を果たしており、ユビキチン化された ENaC は細胞内へ取り込まれ、プロテアソームで分解される。我々のこれまでの研究から、Nedd4-2 は分子多様性を持ち、特に C2 domain を有する Nedd4-2 の機能が高血圧の発症に関わることが予想された (Minegishi S, et al. Nephron Exp Nephrol. 2012;122:95-102)。Nedd4-2 C2 domain をノックアウトした遺伝子改変マウスを作成し実験を行ったところ、高食塩食負荷開始から僅か数日で著明な高血圧症を呈することが明らかになった。さらに、腎尿細管におけるユビキチン化が特異的に抑制される結果、ENaC の分解が低下し、Na 依存性の ENaC 遺伝子の発現が活性化していることを示し、高血圧症と食塩感受性がもたらされる分子レベルの機序を明らかにした (Minegishi S, et al. Sci Rep. 2016;6:27137)。

SCN5A 遺伝子は心筋細胞膜の Na channel の  $\alpha$ -subunit をコードしており、心筋における活動電位発生の主要な分子である。SCN5A の遺伝的な loss of function ならびに gain of function が致死的不整脈発生に関わる事が知られている。 $\alpha$ -subunit の C 末端には、PY-motif が存在することから、心筋細胞活動電位 0 相を構成する SCN5A 制御にも Nedd4-2 の関与が認められている。よって、Nedd4-2 の異常によって、心筋において細胞レベルの電気生理学的異常が起こる可能性が考えられる。“心腎連関”の概念が知られているが、その分子メカニズムは明らかではない。Nedd4-2 は腎尿細管以外に心臓でも発現しており、心臓の電気的特性を決定付ける重要な遺伝子である SCN5A の制御にも関わっていることから、“心腎連関”の key molecule である可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、SCN5A とその制御因子である Nedd4-2 の役割に注目し、Nedd4-2 C2 ドメインノックアウトモデルマウスにおける検討を行うことで、心筋活動電位制御に関する分子病態の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) Nedd4-2 C2 ドメイン特異的ノックアウトマウスを用いた検討

野生型 (WT) および Nedd4-2 C2 ドメイン特異的ノックアウトマウス (KO) に対して、心電図、心臓超音波検査を実施した。また、心臓から RNA を抽出し、定量的 PCR 法により、Nedd4、SCN5A、BNP、TGF $\beta$ 、Collagen3 の発現を検討し、さらに、Primetech 社 telemetry device HD-X11 を用いて、心拍数、心拍変動の解析を行った。

#### (2) 冠動脈結紮による心筋梗塞モデルにおける検討

次に、冠動脈結紮による心筋梗塞モデルマウス (小梗塞モデル) を作成し、WT および KO に対して、生理学的検査 (心電図、心臓超音波検査、Radio telemetry、Heart rate Variability) を実施し、両マウス間の差異を解析した。

#### (3) 経食道内バーストペーシングによる心房細動モデルにおける検討

さらに、経食道内バーストペーシングによる心房細動の誘発により、心房細動持続時間を WT および KO で測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) Nedd4-2 C2 ドメイン特異的ノックアウトマウスを用いた検討

8-9 週齢の WT および KO の心電図を比較したところ、KO は WT と比較し、PR 幅の短縮、P 波幅と QRS 波幅の開大、QT 時間の延長が見られた (図 1)。しかしながら、心エコーは、麻酔をかけた状態で、心拍数を一致させて実施したが、各評価項目に WT と KO の差は見られなかった。

ノックアウトマウスでは、転写レベルにおいて、BNP の増加を認め、線維化マーカーである TGF $\beta$  と collagen3 の発現も上昇していた。

また、心拍変動の評価では、ヒトでは交感神経優位の状態を示す指標である LF/HF 比が、KO で上昇していたにも関わらず、心拍数の低下が見られた (図 2)。また、KO は WT よりも尿中のカテコラミン分画の濃度が上昇していた。

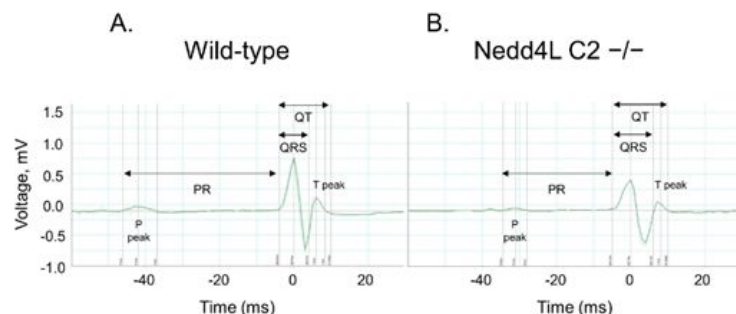


図 1. 野生型および Nedd4-2 C2 ドメイン特異的ノックアウトマウスの心電図

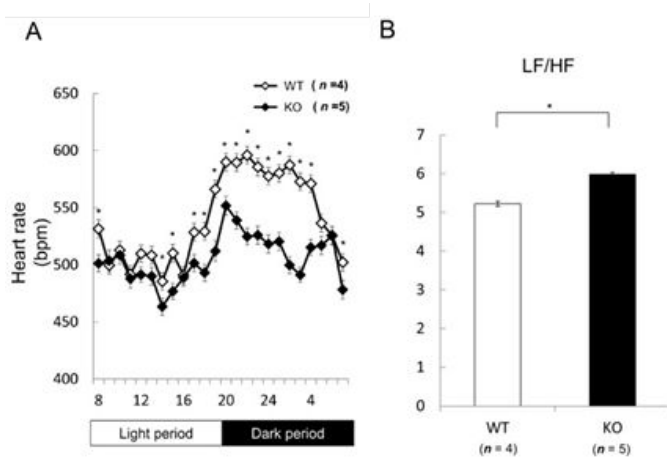


図 2. 野生型および Nedd4-2 C2 ドメイン特異的ノックアウトマウスの心拍数と心拍変動

(2) 冠動脈結紮による心筋梗塞モデルにおける検討

肉眼および組織学的な観察により、心筋梗塞部位を特定することができた(図3)。心筋梗塞モデルでは、6 週後の KO の心電図では WT と比べて著明な PR 間隔短縮や QTc 延長や Tpeak/Tend 間隔開大を認めたが(図4)、心エコー所見には差が見られなかった。

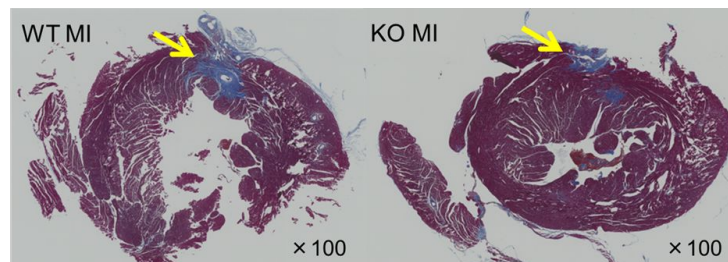


図 3. マッソントリクローム染色で観察した心筋組織(黄矢印は線維化部分を示す)

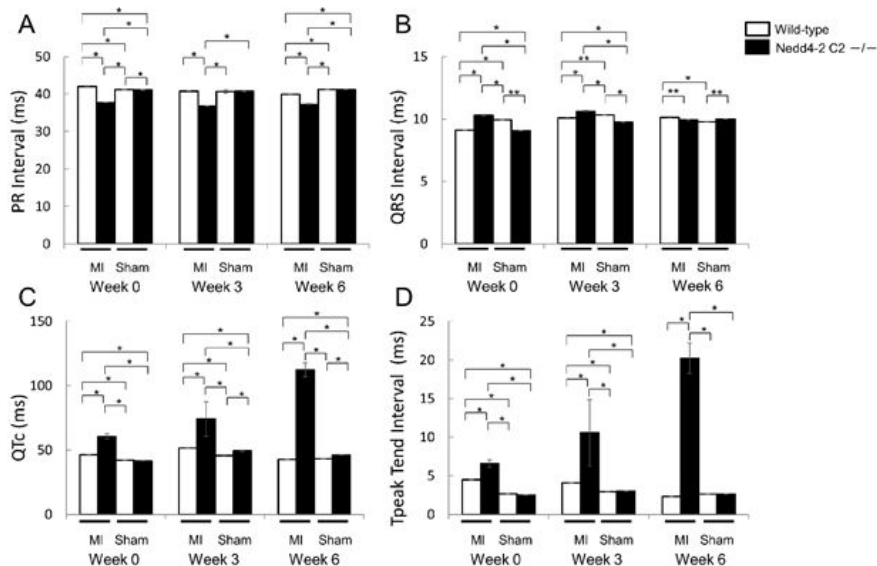


図 4. 心筋梗塞モデルの心電図所見の比較

(3) 経食道バーストペーシングによる心房細動モデルにおける検討

さらに、経食道バーストペーシングによる心房細動持続時間においては、KO は WT よりも延長する傾向がみられた。これらの検討により、Nedd4-2 C2 KO には、心臓の電気生理学的変化をもたらす基盤があり、その結果、心血管合併症が重篤化する可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Minegishi S, Ishigami T, Kawamura H, Kino T, Chen L, Nakashima-Sasaki R, Doi H, Azushima K, Wakui H, Chiba Y, Tamura K. An Isoform of Nedd4-2 Plays a Pivotal Role in Electrophysiological Cardiac Abnormalities. Int J Mol Sci. 2017;18(6). 査読有 doi: 10.3390/ijms18061268.

〔学会発表〕(計 1 件)

川村 飛翔、峯岸 慎太郎、中島 理恵、土肥 宏志、陳 琳、木野 旅人、石川 義弘、藤田 孝之、  
Rajesh Plajapati、石上 友章、田村 功一  
Na チャネル調節因子 Nedd4-2 の心臓電気生理学的表現型に与える影響の解析  
2017 年 第 243 回 日本循環器学会関東甲信越地方会

〔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：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.mdpi.com/1422-0067/18/6/1268>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：石上 友章

ローマ字氏名：(ISHIGAMI, tomoaki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。