

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007-2008

課題番号：19790515

研究課題名（和文） 心房リモデリングの成立機序解明に関する研究

研究課題名（英文） Investigation of the mechanism in the development of atrial remodeling

研究代表者

宮本 卓也（MIYAMOTO TAKUYA）

山形大学・医学部・助教

研究者番号：20447204

研究成果の概要：心房の構造学的変調の解明は新しい心房細動治療薬開発の糸口となりうる。頸動静脈短絡による容量負荷心肥大モデルの拡大心房筋では対照に比し、Connexin(Cx)43 と -catenin 及び GSK-3bata の蛋白発現低下が認められ、これらの蛋白間相互作用が確認された。MAP kinase(ERK1/2, JNK, p38)の蛋白発現及びリン酸化には変調を認めなかった。Cx43 発現の低下は、Cx43 の膜分画へ輸送や構造構築の過程の変調により起こるものと仮定し、培養心房筋細胞を用いた伸展刺激と電気刺激を同時に加えることが可能な新しい実験系にて証明を試みた。

交付額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,700,000 | 0       | 1,700,000 |
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 450,000 | 3,650,000 |

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心房リモデリング、ギャップジャンクション、コネクシン

## 1. 研究開始当初の背景

1) 社会的背景；心房細動は高齢化に伴いその罹患人口が増加している。合併する脳塞栓症は、寝たきりの原因として重要であり、心

房細動の抑制は世界的急務である。心房細動は日常臨床で最も頻繁に遭遇する不整脈であり、脳梗塞を代表とする血栓性塞栓症の重大な危険因子である。高齢化が進んだ現代社

会では心房細動に合併する脳塞栓症は、寝たきりの原因として重要であり、その不整脈の抑制と合併する血栓塞栓症の予防は世界的に重要な課題となっている。

## 2) 分子生物学的背景

心房細動の発生とその持続に関する機序に関しては十分に解明されておらず、1995年に Allessie らのグループがヤギの心房頻回ペーシングにより心房細動類似の興奮が再現でき、心房頻回刺激持続時間を延長することにより興奮の持続時間も延長すると報告した (Wijffels MC et al Circulation 1995;92:1954-68)。心房細動の持続それ自体が心房筋細胞に電気生理学的変化を生じさせ、これがさらに心房細動の持続を助長するという現象で、電気的リモデリングと呼ばれる。その根底には、心房細動の反復による心房不応期の短縮、不応期の頻度依存性の消失、伝導速度の低下が挙げられている。心房細動が長続きすると薬理的な除細動が困難になるという臨床的観察を説明する電気生理学的機序として大きく注目された。これまでの分子生物学的研究成果は、心筋イオンチャネルの構造と機能を明らかにし、イオンチャネル遮断薬として抗不整脈薬が多数開発され、心房細動の停止や再発の防止に広く臨床の現場で使用されている。しかし、現在我々が使用しているイオンチャネル遮断薬による、心房細動へのアプローチのみでは、心房細動の停止および再発の防止には限界があり、最近の大規模臨床試験の結果もそれを示唆した (AFFIRM investigator. N Engl J Med 2002; 347:1825-33)。イオンチャネル遮断薬である抗不整脈薬による心房細動抑制効果には限界があり、イオンチャネル遮断薬とは異なる新しい治療薬開発が期待されている。イオンチャネル遮断薬による電気的アプローチの

みで、十分な治療効果が得られない理由の一つとして、心房細動の電気的リモデリングに伴って起こる構造学的(器質的)リモデリングが推測される。構造学的リモデリングは、電気学的リモデリングによる血行力学的変化に伴い、心房壁応力の増大から、心房の拡大をきたし、その変化が持続すれば構造学的変化は不可逆的なものとなり、ついには心房筋の変性や心房間質の繊維化へ至る。電気学的リモデリング同様、構造学的リモデリング成立の詳細な機序は不明である。心房リモデリングは、少なくとも電気的および血行力学的2つの因子がその進展に関与する複雑さゆえ、詳細な機序を解明する実験系がなく、その考案が望まれる。最近では、リモデリングの進展にレニン・アンジオテンシン系亢進が関与していると考えられており、アンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシン1型受容体拮抗薬によるリモデリング抑制が試みられているが、その効果は確立されていない。心房リモデリング機序解明の新しい標的分子に gap junction(GJ)が注目されている。心房細動は心房の伝導遅延を来すことから、細胞間の電気的結合に中心的な役割を果たしている GJ に関する研究が進み、GJ の構成タンパク質である connexin (Cx) family の発現や細胞内局在の変調が心房細動の病因に関与している可能性を示唆する臨床的および実験的データが蓄積しているが、Cx 発現の変調と心房リモデリング、及び不整脈現象の関連性と詳細な機序を明確に示した報告は、我々の知る限りない。細胞骨格との linker protein である  $\beta$ -catenin と介在板蛋白である zonula occludens-1(ZO-1) が Cx43 蛋白の膜分画への輸送と GJ 構築に必要なとの報告があり、Cx 発現変調の機序解明の手がかりとなる可能性あり、興味深い (Wu JC. J Cell Biochem. 2003 Mar

1;88(4):823-35)。我々は、頸動静脈短絡による容量負荷心肥大モデル (Takahashi N. Jpn Circ J 2000;64:861-67) の心房拡大に注目し、心房リモデリングに関連する可能性のある分子を検索してきた。拡大心房における Cx 40 及び 43 の蛋白発現低下を western blotting により確認した (Haugan K, Miyamoto T et al; Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2006; 99(1): 71-9)。さらに、拡大心房にて細胞骨格の linker protein として知られる、 $\beta$ -catenin の蛋白発現の低下と、免疫沈降法にて Cx 43 と  $\beta$ -catenin の分子間結合を確認している。電気生理学的介入による心房細動抑制効果の限界の要因の 1 つに、心房の構造学的変調 (心房リモデリング) が挙げられる。拡大した心房は、心房径拡大という量的問題のみならず、心房筋の質的変調も伴っている。我々の心房拡大モデル (家兔頸動静脈シャント) でも gap junction(GJ) 構成蛋白である connexin43(Cx43) の発現の低下という質的変調が確認され、同モデルの心房内伝導速度の低下と心房性不整脈易誘発性との関連が示唆されている。拡大心房では、これら分子間の結合が対照のシャム群と比較して、弱い傾向が認められている。このモデルの電気学的特性を high-resolution optical mapping 法にて検討した所、シャム群と比較して有意な伝導速度の遅延が認められた。このモデルで、心房細動を含む上室性頻拍のエピソードは捉まっていないが、ランゲンドルフ灌流心にてプログラム刺激を加えると、シャム群では上室性頻拍は全例誘発されなかったのに対して、拡大心房では高率 (8 例中 7 例) に上室性頻拍が誘発された。さらに、誘発された 16 の上室性不整脈エピソード中 9 エピソードが単一リエントリー性で、残りが巣状興奮による不整脈であることが判明している。興味深いことに、16 エ

ピソード中 15 のエピソードが左房後壁を起源とするものであった (Hirose M et al: J Cardiovasc Electrophysiol 2005; 16: 760-769)。観察された不整脈の易誘発性は、Cx43 の機能的異常が関連していると考え、同様の実験系にて Cx modifier である Rotigaptide(ZP123, Kjolbye AL. J Pharmacol Exp Ther 2003 Sep;306(3):1191-9) の前投与にて不整脈誘発性が改善するか ex vivo にて検討した。ZP123 により心房の遅延伝導は改善したが、不整脈の易誘発性に改善は認められなかった (Haugan K, Miyamoto T et al; Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2006; 99(1): 71-9)。

## 2. 研究の目的

心房リモデリングの成立過程における Cx43 の発現変調のメカニズムを解明することによって、心房リモデリング成立機序を解明し、イオンチャネル遮断薬以外の新しい治療標的解明の糸口とすること。上述したように、 $\beta$ -catenin は、zonula occludens-1(ZO-1) と相互作用を起こすことが報告され、また、ZO-1 は Cx43 が GJ を形成する際の重要な adapter protein として働く事が報告されている (Wu JC. J Cell Biochem. 2003 Mar 1;88(4):823-35)。また、in vitro で細胞への伸展刺激である、cyclic strain が ZO-1 の発現や、その細胞内局在に影響を及ぼす事が報告されている (Collins NT Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Jan;26(1):62-8)。以上より、Cx 蛋白変調を来たす過程において、ZO-1 と  $\beta$ -catenin の関与が示唆された。 $\beta$ -catenin と ZO-1 を介する機序で、Cx 43 の膜分画へ輸送や構築に異常を来たし、心房内の電気生理学的変調を来たす仮説を立て検証した。

### 3. 研究の方法

心房拡大モデル(家兔頸動静脈シャント)の心房筋を用いた in vivo での検討で変調の認められた Cx43 と  $\beta$ -catenin 及び GSK-3 $\beta$  の発現変調のメカニズムを in vitro の実験系を用いて検討する。培養心房筋細胞に進展刺激や電気刺激を加えることが可能な実験系の確立を目指した。

### 4. 研究成果

拡大心房筋蛋白での検討では、Cx43 と  $\beta$ -catenin 及び GSK-3 $\beta$  の発現低下が認められ、これらのタンパク質の蛋白間相互作用が確認された。MAP kinase(ERK1/2, JNK, p38) の蛋白発現及びリン酸化には変調を認めなかった。そこで我々は tight junction associated protein である zonula occludens-1(ZO-1)に着目した。ZO-1 と Cx43 は相互作用を起こすことが報告され、ZO-1 は Cx43 が GJ を形成する際の重要な adapter protein として働く。 $\beta$ -catenin と ZO-1 を介する機序で、Cx 43 の膜分画へ輸送や構造の構築に異常を来たし、心房内の電気生理学的変調を来たすという仮説を、培養心房筋細胞系を用いた、伸展刺激と電気刺激を同時に加えることが可能な新しい実験系にて証明を試みた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Niizeki T, Takeishi Y, Miyamoto T, Kubota I, et al. Persistently increased serum concentration of

heart-type fatty acid-binding protein predicts adverse clinical outcomes in patients with chronic heart failure. Circulation journal 72, 109-114, 2008. 査読有

Ishino M, Takeishi Y, Miyamoto T, Kubota I, et al. Risk stratification of chronic heart failure patients by multiple biomarkers: implications of BNP, H-FABP, and PTX3. Circulation journal 72(11), 1800-1805, 2008. 査読有

Niizeki T, Takeishi Y, Miyamoto T, Kubota I, et al. Relation of serum heart shock protein 60 level to severity and prognosis in chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. American Journal of Cardiology. 102(5), 606-610, 2008. 査読有

[学会発表](計 1 件)

Kitahara T, Takeishi Y, Miyamoto T, Kubota I, et al. Serum midkine predicts cardiac events in chronic heart failure patients. American Heart Association Scientific Sessions, 2008. Nov8 - 12, New Orleans, USA.

[図書](計 1 件)

宮本卓也、久保田功、ライフメディコム、カレントセラピー、2008、66-71

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮本 卓也 ( MIYAMOTO TAKUYA )

山形大学・医学部・助教

研究者番号：20447204

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし