様式C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年　6月15日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19790546
研究課題名（和文）心房細動治療の新展開：Agingに伴うコネキシンの変化が興奮伝播異常を惹き起こす
研究課題名（英文）Atrial fibrillation and uncoupling:Changing of gap junction by aging produces the abnormal impulse propagation and associated arrhythmias.

研究代表者　増宮 晴子（MASUMIYA HARUKO）
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：30286744

研究成果の概要：
申請者は心房細動をはじめとする異所性自動能の潜在的な発生メカニズムを解明し、従来のような不整脈が発生した場合のdown-stream治療法に代わる、病態の本質を治療の対象とするup-stream治療法の確立を目的としている。本研究はその全体プロジェクトの中で心房細動とコネキシン（gap junction）に焦点を絞り、agingに伴った正常および異所性自動能発生とその伝播過程でのコネキシンの生理的役割の解明を目指した。

本研究期間においては最初に正常なリズムに関する検討を行った。洞房結節標本の光学的膜電位計測法による実験系とその解析法をウサギ摘出洞房結節標本にて確立し、自動拍動の発生には個々の洞房結節細胞の性質とgap junctionを介した細胞間の相互作用が寄与していること、またこれまでに報告されている以上に洞房結節領域内は電気生理学的に複雑であることを明らかにした。

現在はagingが及ぼす自動拍動の発生とその興奮伝播に対する影響を若年と老年ラットの洞房結節を標本として、膜電位イメージング法にて比較・検討中である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：医歯薬学

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：循環器、心房細動、コネキシン、自動能、洞房結節

１．研究開始当初の背景

心房細動は比較的発症頻度の高い不整脈であり、高齢者で高血圧、動脈硬化を持つ人に多く発症する。なぜ高齢者で動脈硬化を持つ人に多く発症するのかは解明されていないが、急速な高齢化を迎えている我が国では、患者数の著しい増加が予想される。心房細動は心機能を低下させ心不全の原因となること、動悸や息切れなどの症状によりQuality of Lifeを損なうこと、さらに重大な問題として心房内に血栓を生成し脳梗塞等の血栓塞栓症の原因となることから、心房細動の治療法ならびに予防法の確立は社会的にも重要課題となっている。

２．研究の目的

本研究の最終目的は心房細動をはじめとする潜在的異所性自動能の発生メカニズムを解明し、病態の本質から治療を目指すup-stream治療法の確立である。この全体プロジェクトの中で心房細動とコネキシン（gap junction）に焦点を絞り、agingに伴った正常および異所性自動能発生とその伝播過程でのコネキシンの生理的役割の解明を目指した。

３．研究の方法

１）洞房結節標本の作成

日本白色種ウサギ、またはSprague-Dawleyラット(Adultまたは5-9 days neonate)より心臓を摘出し、95%O2-5%CO2混合ガスを十分に通気した栄養液中で洞房結節領域周辺を細切することにより標本を作成、実験に用いた。

２）細胞内活動電位の測定

ウサギ洞房結節、またはラット洞房結節標本の活動電位を3M KClを充填したガラス微小電極(20-50MΩ)を細胞内に刺入し、活動電位を記録した。活動電位パラメータとしてPhase-0 slope（最大立ち上がり速度）、Phase-4 slope（pacemaker potentialの傾き）、APD50（50%再分極時の活動電位持続時間），Amplitudeを解析した。

３）洞房結節標本の膜電位イメージング

作成した洞房結節標本に膜電位感受性色素di-4-ANEPPS(20μM)を標本に取り込ませた。膜電位イメージング測定にはタングステンハロゲンランプを用い、band-pass filterを介して取り出した480-550 nmの光を励起光としlong-pass emission filterで検出した590 nm以上の蛍光強度をCMOS sensor array（MiCAM Ultime, L-camera, Brainvision社)で画像化した。自動拍動のタイミングはタイムウィンドウ型スライサ（EN611J, Nihon Kohden, Tokyo, Japan）を用いて検出し、フレームレート0.5 – 2.0ms/frameで蛍光信号を記録し5-13回の平均加算を行った。その後、得られたdataについてspatial-filteringをかけsignal-to-noise ratioを改善させた。

４）データ解析

第１フレームを基準フレームとして蛍光強度の変化分（ΔF）を算出した。次に、基準フレームにおいて全ピクセル中の最大蛍光強度（Fmax）を求め、Fmaxの25%以上の蛍光強度を有する領域を標本領域として、ΔF/Fを算出した（Oku *et al.2007,* Okada *et al. 2007,* Okada *et al. 2008*）。

光学的計測法で得られた膜電位変化、

すなわち活動電位波形のパラメータはAPD50、phase-0 slope (slope of upstroke)、phase-4 slope (slope of pacemaker potential) について求めた。

５）シミュレーション

心筋細胞 Kyoto-model SAN cells (Sasrai et al. 2003) を発展させた Two-dimentional sheet model にてシミュレーションを行った。このモデルでは洞房結節領域内の細胞の不均一性を細胞毎にL型 Ca^{2+}チャネル電流の amplitude の大きさを無作為に設定することで表現した。その結果、各細胞の cycle length も不均一となる。

６）統計処理

数値は平均値±標準誤差で示した。また有意差検定は paired t-test または repeated- measures analysis of variance(ANOVA)により行った。

４．研究成果

本研究期間内に得られた結果は、正常な自動拍動の発生とその興奮伝播に関するものが中心となった。

（１）摘出したウサギ洞房結節標本として洞房結節領域内の正常な自動拍動の発生や興奮伝播のイメージングと膜電位色素による活動電位波形を検討し、またシミュレーションにて実験結果の検証を行った。その結果、洞房結節領域内の自動拍動発生には個々の洞房結節細胞が持つ性質だけでなく、gap junctionを介した細胞間の相互作用も寄与していること、またこれまでに報告されている以上に洞房結節領域内は電気生理学的に複雑であることを明らかにした。また本検討ではシミュレーションにより実験結果の説明が可能であった。これはシミュレーション結果を実験結果へ還元する、最初のステップとなった（*J. Physiol. Sci.* May;59(3):227-41, 2009)。

（２） Agingが及ぼす自動拍動の発生とその興奮伝播に対する影響を若年と老年ラットの洞房結節を標本として、膜電位イメージング法にて比較・検討中である。

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 10 件）

1: Masumiya H, Oku Y, Okada Y. Inhomogeneous distribution of action potential characteristics in the rabbit sino-atrial node revealed by voltage imaging. *J. Physiol. Sci.* May;59(3):227-241, 2009.（査読有）

2: Masumiya H, Asaumi Y, Nishi M, Minamisawa S, Adachi-Akahane S, Yoshida M, Kangawa K, Ito K, Kagaya Y, Yanagisawa T, Yamazaki T, Ma J, Takeshima H. Mitsugumin 53- mediated maintenance of K^+ currents in cardiac myocytes. *Channels.* Jan-Feb;3(1)6-11, 2009.（査読有）

3: Cai C, Masumiya H, Weisleder N, Matsuda N, Nishi M, Hwang M, Ko JK, Lin P, Thornton A, Zhao X, Pan Z, Komazaki S, Brotto M, Takeshima H, Ma J. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nature Cell Biology.* Jan;11(1):56-64, 2009.（査読有）

4: Cai C, Masumiya H, Weisleder N, Pan Z, Nishi M, Ko J-K, Komazaki S, Takeshima H, Ma J. MG53 regulates membrane budding and exocytosis in muscle cells. *J. Biol. Chem.* Jan 30;284(5): 3314-3322, 2009.（査読有）

5: Oku Y, Kimura N, Masumiya H, Okada Y. Spatiotemporal organization of frog respiratory neurons visualized on the ventral

medullary surface. *Respir Physiol Neurobiol.* 161: 281-290, 2008.（査読有）

6: Takemoto J, Masumiya H, Nunoki K, Sato T, Nakagawa H, Ikeda Y, Arai Y, Yanagisawa T. Potentiation of potassium currents by beta-adrenoceptor agonists in human urinary bladder smooth muscle cells: a possible electrical mechanism of relaxation. *Pharmacology.* 81: 251-258, 2008.（査読有）

7: Tsujikawa H, Song Y, Watanabe M, Masumiya H, Gupote SA, Ochi R, Okada T. Cholesterol depletion modulates basal L-type Ca^{2+} current and abolishes its -adrenergic enhancement in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294(1):H285-92, 2008.（査読有）

8: Okada Y, Kuwana S, Masumiya H, Kimura N, Chen Z, Oku Y. Chemosensitive neuronal network organization in the ventral medulla analyzed by dynamic voltage-imaging. *Adv Exp Biol Med.* 605: 353-358, 2007.（査読有）

9: Okada Y, Tamura Y, Masumiya H, Oku Y. Respiratory and metabolic acidosis differentially affect the respiratory neuronal network in the ventral medulla of neonatal rats. *Eur J Neurosci.* 26(10): 2834-2843, 2007.
（査読有）

10: Oku Y, Masumiya H, Okada Y. Postnatal developmental changes in activation profiles of the respiratory neuronal network in the rat ventral medulla. *J Physiol.* 585: 175-186, 2007.（査読有）

〔学会発表〕（計７件）

1：増宮晴子，岡田泰昌，越久仁敬　ウサギ洞房結節領域における興奮伝播の膜電位イメージング解析　第85回日本生理学会大会（東京）　J. Physiol. Sci. 58(Suppl.):20-E-03, 3.25-27, 2008

2：Oku Y, Masumiya H, and Okada Y. Homology of respiratory neuronal networks between frogs and rats: The brain adapts itself to the mode of ventilation. 5th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN), 京都テルサ、Kyoto、10.5-8, 2007.

3：Okada Y, Masumiya H, and Oku Y. Differential effects of respiratory and metabolic acidosis on the respiratory neuron network analyzed by voltage-imaging. 5th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN), 京都テルサ Kyoto、10.5-8, 2007.

4：越久仁敬，木村直史，増宮晴子，岡田泰昌　カエル脳幹部呼吸神経活動の可視化．第30回日本神経科学大会，9.10-12，横浜．2007

5：Okada Y, Masumiya H, and Oku Y. Dynamic voltage-imaging analysis of the effects of acidosis on the respiratory neuronal network in the rat ventral medulla. 第47回日本呼吸器学会学術講演会 (English Session)、Toyko、5.10-12、2007.

６．研究組織

(1)研究代表者

増宮 晴子（MASUMIYA HARUKO）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：30286744