

令和 5 年 7 月 5 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08565

研究課題名(和文) 病態ウサギにおける重粒子線の心房細動抑制作用と電気生理学機序の解明

研究課題名(英文) Atrial Fibrillation Suppression and Electrophysiological Mechanisms of Heavy Ion Beam in Pathological Rabbits

研究代表者

網野 真理 (AMINO, Mari)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：10407976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高コレステロール血症高齢ウサギ(HC)の心房頻脈性不整脈に対する重粒子線の効果を、ギャップジャンクション(Cx40、Cx43)リモデリングと交感神経の発芽に着目して調べた。重粒子線照射は、高齢者HCウサギのAT/AFに対する脆弱性を、心臓の伝導性を改善することにより減少させた。その理由の一つとして、ギャップ蛋白の亢進と交感神経の成長抑制が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年導入された体幹部定位放射線照射(SBRT)は、難治性心室頻拍(VT)の治療に有効であることが示されているが、心房細動への臨床応用はまだ限定的である。我々の研究では、老化した高コレステロール血症ウサギの心臓に体外炭素ビーム(15Gy)を照射すると、心室性頻脈性不整脈だけでなく、心房性不整脈に対する脆弱性も減少することが示された。この抗不整脈作用は、心房Cx40/心室Cx43のアップレギュレーションと交感神経過緊張の抑制に伴う伝導速度の上昇と関連している可能性がある。これは、高齢者に多い心房細動に対する放射線治療の有用性を、伝導速度の改善を通じて示した初めての実験的研究である。

研究成果の概要(英文)：The effects of heavy ion irradiation on atrial tachyarrhythmias in hypercholesterolemic elderly rabbits (HC) were investigated with a focus on gap junction (Cx40 and Cx43) remodeling and sympathetic sprouting. Heavy ion irradiation reduced the vulnerability of elderly HC rabbits to AT/AF by improving cardiac conduction. It was suggested that one of the reasons for this is the involvement of enhanced gap protein and sympathetic nerve growth inhibition.

研究分野：心臓電気生理学

キーワード：体幹部定位放射線照射 動物実験 不整脈治療 コネキシン蛋白 交感神経 心房細動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗不整脈薬、カテーテルアブレーション、植え込み型除細動器は、頻脈性不整脈の治療における一般的なモダリティである。しかし、有効性が十分でない、副作用が耐えられない、QOLが低下するなどの理由で、臨床的な有用性が制限される場合がある。2017年、ワシントン大学のグループは、画期的な Stereotactic body radiation therapy を用いた 25Gy の X 線単回照射により、難治性心室頻拍 (VT) 患者の VT 負荷が著しく減少したことを報告した。この非侵襲的標的放射線アブレーション技術の有効性と安全性は、その後、19人の患者を対象とした前向き第 I/II 相試験 (ENCORE-VT 試験) で実証された。しかし、不整脈に対する放射線治療の基礎的メカニズムは依然として不明なままである。

我々は以前に、ウサギの心臓に標的重粒子線 (THIR、15Gy) を照射すると、2週間後に心室の主要なギャップジャンクション蛋白質コネキシン 43 (Cx43) 発現が増加することを報告した。心筋梗塞後、この Cx43 発現増加は、心室の脆弱性と再分極の空間的不均質性の低下と関連していた。これらの観察から、THIR は電気的結合を改善することで抗不整脈の可能性を持っていることが示唆された。最近、Zhang らは、マウス心臓において、単回 X 線照射 (25Gy) により Cx43 の発現が有意に (約 50%) 増加し、Nav1.5 の発現が上昇し、心室伝導速度 (CV) が加速することを示し、コネキシンとナトリウムチャネルのリプログラミングが心室不整脈の放射線療法に不可欠であるとの提唱を行った。心房性頻拍 / 細動に対する放射線治療の有用性については、まだ情報が少なく、多くの課題が残されている。

2. 研究の目的

高コレステロール血症高齢ウサギ (HC) の心房頻脈性不整脈に対する THIR の効果を、ギャップジャンクション (Cx40、Cx43) リモデリングと交感神経の発芽に着目して調べ、その抗不整脈効果についてさらなる洞察を得た。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルおよび重粒子線照射

東海大学動物倫理委員会は本研究を承認した (No.194008)。すべての動物実験は ARRIVE ガイドライン (<https://arriveguidelines.org/>) に準拠した。体重 3.0-3.5 kg の 3 歳高齢雄ニュージーランド白ウサギ 26 羽に、過去の報告に従って高脂肪・高コレステロール食 (コレステロール 0.5%、ヤシ油 10%) (オリエンタル酵母株式会社、東京、日本) を 14 週間与えた。これらの高コレステロール血症のウサギは、Cx40 発現低下による頻拍性心房不整脈モデル、交感神経過剰神経支配による頻拍性心室不整脈モデルとして立証されている。

26 羽のウサギを、15Gy の炭素線照射を受けた群 (HC+THIR、n=12) と、照射を受けなかった群 (HC、n=14) に分類した。後者には偽照射の処置は行わなかった。通常の餌を与えた 3 ヶ月齢の若いウサギを参照として使用した (Young、n=8)。放射線は、量子・放射線科学研究所の重粒子線医療加速器 (日本、千葉) より提供された。これまでの研究に準じて心臓超音波 (UCG) ガイドにて左前胸部から心臓の前外側面をターゲットにして照射を行った。炭素イオンは 290MeV/u まで加速され、真空管から放出された。単色エネルギーの粒子ビームはブラッグピーク 6cm に設定され、ビームの近位端は皮膚から 3cm の深さで、心表面 2×2cm² 四方に集束された。左側の自由壁室 (左心室 [LV]; 左心房 [LA]) には 15Gy にて単回照射した。この線量設定は、これまでの研究で適切であることが確認されている。

(2) 加算平均心電図 (SAECG) および UCG

ペントバルビタール (0.125-0.5mg/kg) を用いた軽麻酔下で、14 週目に SAECG と UCG を記録した。SAECG の解析には Cardio Star FCP-7541 (フクダ電子、東京、日本) を使用した。SAECG の解析には、Cardio Star FCP-7541 (フクダ電子、東京、日本) が使用された。信号はデジタル化され、バンドパスフィルタリング (0.05-150 Hz) され、ノイズレベル < 0.8 mV の下で自動的に平均化された。心房の遅延電位 (LP) については、50 個の P 波を平均し、加算電位を目視で調整した後、解析した。血行動態は仰臥位で UCG (Tellus UF-750XT、フクダ電子、東京、日本) により評価した。LA 直径は M-mode view で収縮末期に測定した。12 誘導心電図から RR、PQ、QRS、QT 間隔を測定した。補正 QT 間隔は、QT 間隔を RR 間隔の平方根で割ったものと定義した。

(3) In-vivo 電気生理学的試験 (EPS)

SAECG 及び UCG 後のウサギにおいて、ケタミン (20 mg/kg) とキシラジン (4 mg/kg) を用いた麻酔下で、仰臥位で心房・心室性頻脈性不整脈に対する脆弱性を評価した。胸腔切開後、定容量呼吸器 (Harvard model 670, Cambridge, MA, USA) を用いて 2% のイソフルランと 60% の酸素を吸入し、麻酔レベルを維持した。不整脈イベントを捕らえるために連続 ECG (四肢リード) モニターを行った。AT/AF を誘発するために、1mM アセチルコリン静脈内投与あるいは非投与下にて、一対の双極銀線電極から右房と左房にプログラム刺激・バースト刺激を与えた。プログラム刺激では、200ms の周期で 5 回の基本刺激 (S1) の後に、その間隔を徐々に短くした 3 回の追加刺激 (S2~S4) を行った。バースト刺激では、10V の 1ms パルスを 400bpm で 30 秒間実施した。EPS を完了したすべてのウサギ心臓を免疫染色解析用に保存した。

(4) 免疫組織化学

in-vivo EPS を完了したウサギの心臓を摘出し、20%ホルマリンを用いて 48 時間固定した。各心臓の長軸方向の切片 (厚さ 4 μ m) を作製した。心筋細胞およびその核を検出するために、切片をヘマトキシリン染色した。Cx43、Cx40、神経萌芽のマーカーである成長関連タンパク質 43 (GAP43)、交感神経のマーカーであるチロシン水酸化酵素 (TH) に対して免疫染色を行った。Cx43: 抗 Cx43 マウスモノクローナル抗体 (MAB3067; Chemicon, 東京, 日本), 二次抗体 (Histofine Simple Stain MAX Peroxidase [for use with mouse primary antibody] 414131F; Nichirei Biosciences, 東京, 日本)。Cx40: 抗マウス Cx40 ウサギポリクローナル抗体 (Cx40-A, Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA) とヤギ抗ウサギ IgG Fab フラグメント (#315-007-003; Jackson Immuno Research)。三次抗体 (Histofine Simple Stain MAX Peroxidase [for use with goat primary antibody] 414161F; Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan)。

神経染色: 抗 GAP43 マウスモノクローナル抗体 (MAB347, Chemicon) または抗 TH マウスモノクローナル抗体 (MAB5280, Chemicon) 二次抗体 (Histofine Simple Stain MAX Peroxidase [for use with mouse primary antibody] 414131F; Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan)。

免疫標識切片を、ズームカメラと画像解析ソフト (e-HisHeart; イーパス株式会社, 東京) を備えた生物顕微鏡 (BA81, 島津製作所, 日本, 京都) を用いて観察した。Cx40 または Cx43 陽性領域の合計を選択部位の総筋細胞量 ($\times 40$) で割り、心房および心室からランダムに選択した部位で得られた値 (%) を組織試料ごとに平均化した。GAP43 と TH の定量は総

GAP43-または TH-陽性面積を検査画像の正方形面積 ($\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$) で除算した。代表的な顕微鏡画像の表示では、細胞や核の大きさが比較的均一で、細胞の向きが似ている領域を抽出し、グループ間の差異をとらえた。

4. 研究成果

(1) 血清コレステロール値, SAECG, UCG および 12 誘導心電図について

ベースラインの体重および血清コレステロール濃度は若齢ウサギで最も低かったが、4 週後の体重は 3 群間で差がなかった。血清コレステロール濃度は HC および HC+THIR ウサギの両方で上昇し、4-12 週で同一レベルに達した。SAECG において HC ウサギでは、P 波が低電圧を示し、心房 LP は若いウサギに比べ RMS20 が小さいことが特徴であった。20 羽のウサギの複合解析により、HC 群と HC+THIR 群の LP における心房 RMS20ms と心室 3 パラメータの差は統計的に有意であった。UCG では、LA 径は HC 群が Young 群より大きく ($p < 0.01$)、HC + THIR 群では短縮傾向にあったが有意ではなかった ($p = 0.07$)。12 誘導心電図における QT/補正 QT 間隔は、HC 群が Young 群より長く ($p < 0.01$)、HC+THIR 群ではその延長が逆転した ($p < 0.05$)。RR 間隔、PQ 間隔、QRS 幅は 3 群間に有意差はなかった。

(2) In-vivo EPS

EPS では、AT/AF は、4 匹の Young ウサギのいずれでも誘発されなかった (発生率ゼロ)。AT/AF は、HC ウサギ 8 羽中 7 羽 (発生率、87.5%)、HC + THIR ウサギ 8 羽中 2 羽 (発生率、25%) で惹起された。誘発試験回数に対する AT/AF の発生頻度は、Young 群、HC 群、HC+THIR 群で、それぞれ 0%、9.9%、1.2%であった。HC 群では Young 群に比べ AT/AF の誘発頻度が高く、脆弱性が高まっていることが示された。HC+THIR 群では、AT/AF およびその発生頻度が HC 群に比べて有意に低く、脆弱性が改善されたことが示された。

(3) 免疫染色

HC ウサギの心房 Cx40/筋細胞 (%) は Young rabbits より少なかった ($1.0 \pm 0.9\%$ vs. $4.7 \pm 2.5\%$ [RA], $2.0 \pm 1.7\%$ vs. $5.9 \pm 3.6\%$ [LA]) (いずれも $p < 0.01$)、HC+THIR ウサギの値 ($1.8 \pm 0.8\%$ [RA], $2.6 \pm 1.2\%$ [LA]) は HC ウサギの値より大きかった (いずれも $p < 0.05$)。

GAP43 神経密度 ($\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$) は、HC ウサギでは Young ウサギに比べて $42 \pm 32\%$ (RA) $42 \pm 29\%$ (LA) 増加した (いずれも $p < 0.05$)。しかし、HC+THIR ウサギでは HC ウサギに比べ有意に減少した。TH 陽性神経密度は、HC ウサギで Young rabbits に比べ $42 \pm 35\%$ (RA), $47 \pm 40\%$ (LA) 増加した (いずれも $p < 0.01$)。逆に、HC+THIR ウサギでは HC ウサギに比べ有意に減少した。

結論

重粒子線照射は、高齢者 HC ウサギの AT/AF に対する脆弱性を、心臓の伝導性を改善することにより減少させた。その理由の一つとして、交感神経の成長抑制と組み合わせたギャップジャンクション蛋白のアップレギュレーションが関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 網野真理 吉岡公一郎 株木重人 國枝悦夫	4. 巻 87
2. 論文標題 “非カテーテル” アブレーション ~カテーテル要らずの低侵襲アブレーションとは~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 循環器内科, 87(3);1-7, 2020	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 網野真理、吉岡公一郎、下川卓志、古澤佳也	4. 巻 54
2. 論文標題 肺癌患者に対する重粒子線照射が心臓へ及ぼす効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 放射線生物研究 Radiation Biology Research Communications	6. 最初と最後の頁 114-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 網野真理、株木重人、國枝悦夫、吉岡公一郎	4. 巻 2
2. 論文標題 致死性心室不整脈に対する体外放射線治療	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 藤沢市内科医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 網野真理、株木重人、國枝悦夫、吉岡公一郎	4. 巻 10
2. 論文標題 特集/不整脈診療・治療の最新トピクス: 難治性心室不整脈に対する体外放射線照射による低侵襲不整脈治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 科学評論社「循環器内科」	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 網野真理、株木重人、國枝悦夫、吉岡公一郎	4. 巻 10
2. 論文標題 体外放射線照射による難治性心室不整脈の新世代治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 『臨床放射線』特集「心臓定位放射線治療」	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Mari Amino ^{1,2} , Takashi Shimokawa ² , Shigeto Kabuki ³ , Etsuo Kunieda ³ , Tetsuri Sakai ¹ , Shin Sakama ¹ , Kengo Ayabe ¹ , Atsuhiko Yagishita ¹ , Yuji Ikari ¹ , Masatoshi Yamazaki ⁴ , Itsuo Kodama ⁵ , Koichiro Yoshioka ¹
2. 発表標題 Basic mechanism of atrial and ventricular arrhythmia suppression by heavy ion irradiation in hypercholesterolemia elderly rabbits
3. 学会等名 European Society of Cardiology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mari Amino ¹ , Noboru Kawabe ² , Sachie Tanaka ² , Yoshiya Furusawa ³ , Shimokawa Takashi ³ , Masatoshi Yamazaki ⁴ , Yuji Ikari ¹ , Koichiro Yoshioka ¹
2. 発表標題 Biological effect of carbon-radiotherapy for VT suppression in non-ischemic rabbit heart.
3. 学会等名 Heart rhythm 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 網野真理 ^{1) 5)} , 株木重人 ²⁾ , 国枝悦夫 ²⁾ , 橋本順 ³⁾ , 早田憲治 ⁴⁾ , 斉藤俊輝 ⁴⁾ , 山下高史 ⁴⁾ , 下川卓志 ⁵⁾ , 吉岡公一郎 ¹⁾
2. 発表標題 体外放射線照射による難治性不整脈の新世代治療
3. 学会等名 第30回 日本心臓核医学総会・学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mari Amino, Masatoshi Yamazaki, Noboru Kawabe, Sachie Tanaka, Yoshiya Furusawa, Shimokawa Takashi, Ryoko Niwa, Haruo Honjo, Naoki Tomii, Ichiro Sakuma, Yuji Ikari, Teruhisa Tanabe, Itsuo Kodama, Koichiro Yoshioka
2. 発表標題 Heavy ion irradiation to heart shows atrial antiarrhythmic effect in hypercholesterolemic elderly rabbits
3. 学会等名 European Heart rhythm COVID19のためサイト登録 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mari Amino, Masatoshi Yamazaki, Noboru Kawabe, Sachie Tanaka, Yoshiya Furusawa, Shimokawa Takashi, Ryoko Niwa, Haruo Honjo, Naoki Tomii, Ichiro Sakuma, Yuji Ikari, Teruhisa Tanabe, Itsuo Kodama, Koichiro Yoshioka
2. 発表標題 Extracorporeal Heavy-ion Irradiation to Aged-rabbit with Hypercholesterolemia Express Atrial Antiarrhythmic Effects due to Upregulated Connexin Expression and Suppressed Nerve Sprouting.
3. 学会等名 日本循環器学会 COVID19のためサイト登録
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 網野真理
2. 発表標題 不整脈に対する新たな低侵襲非カテーテル治療法 「体外放射線療法に未来はあるか」 重粒子線による頻脈性上室不整脈・致死性心室不整脈の抑制効果
3. 学会等名 第66回日本不整脈心電学会学術大会 (JHRS2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡公一郎
2. 発表標題 不整脈に対する新たな低侵襲非カテーテル治療法 「体外放射線療法に未来はあるか」 放射線不整脈治療の現状
3. 学会等名 第66回日本不整脈心電学会学術大会 (JHRS2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 網野真理、下川卓志、吉岡公一郎
2. 発表標題 重粒子線の抗不整脈作用：基礎実験からその機序に迫る
3. 学会等名 第67回日本不整脈心電学会学術大会Basic Science Summit
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 網野真理、株木重人、國枝悦夫、坂間晋、酒井哲理、綾部健吾、柳下敦彦、吉岡公一郎
2. 発表標題 心室頻拍に対する定位放射線治療後の脱分極時間と自律神経機能の変化
3. 学会等名 心電学関連春季関連大会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mari Amino, Shigeto Kabuki, Etsuo Kunieda, Tetsuri Sakai1, Susumu Sakama, Kengo Ayabe, Atsuhiko Yagishita, Yuji Ikari, Koichiro Yoshioka
2. 発表標題 Analysis of depolarization abnormality and autonomic nerve function after stereotactic body radiation therapy (SBRT) for ventricular tachycardia in a patient with old myocardial infarction
3. 学会等名 International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology (ISHNE) International Society of Electrocardiology (ISE) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koichiro Yoshioka, Mari Amino, Shigeto Kabuki, Etsuo Kunieda, Tetsuri Sakai1, Susumu Sakama, Kengo Ayabe, Atsuhiko Yagishita, Yuji Ikari
2. 発表標題 Changes in arrhythmogenic properties and heart rate variability after carbon-ion radiotherapy to anterior chest in patients with mediastinum cancer
3. 学会等名 International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology (ISHNE) International Society of Electrocardiology (ISE) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 網野真理、鈴木重人、國枝悦夫、坂間晋、酒井哲理、綾部健吾、柳下敦彦、吉岡公一郎
2. 発表標題 VTに対するライナックを用いた照射計画 循環器内科医の立場から
3. 学会等名 心電学関連春季大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mari Amino, Takashi Shimokawa, Shigeto Kabuki, Etsuo Kunieda, Atsuhiko Yagishita, Yuji Ikari, Koichiro Yoshioka
2. 発表標題 Radiotherapy for Fetal Ventricular Arrhythmia 「Basic Study of Ventricular Tachycardia Radiotherapy Using Heavy Ion in Animal Models」
3. 学会等名 第81回日本医学放射線学会総会
4. 発表年 2022年

〔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	吉岡 公一郎 (YOSHIOKA Koichiro) (30246087)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	山崎 正俊 (YAMAZAKI Masatoshi) (30627328)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任准教授 (12601)	
研究分担者	佐久間 一郎 (SAKUMA Ichiro) (50178597)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------