

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590860

研究課題名(和文)

ギャップ接合リモデリングに伴う致死性不整脈の発生機序解明と治療戦略の確立

研究課題名(英文)

Arrhythmogenic mechanism of gap junctional uncoupling

研究代表者：

本荘 晴朗 (HARUO HONJO)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授

研究者番号：70262912

研究成果の概要(和文)：ギャップ接合を介する心筋細胞間電気結合の低下が、心室細動・頻拍など致死性不整脈の発生・維持を促す機序を、ウサギ摘出灌流心の活動電位光学マッピングにより解析した。ギャップ接合機能の薬理的阻害は心室スパイラルリエントリーの安定した旋回を促した。一方、ギャップ接合機能の促進は、旋回中心付近の強く湾曲した興奮波の伝播を抑制することにより旋回動態を不安定化し、リエントリーの持続を妨げた。心筋ギャップ接合機能促進は、病態心における致死性不整脈治療に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Arrhythmogenic mechanisms of intercellular electrical uncoupling was investigated by optical mapping of perfused rabbit hearts. Pharmacological inhibition of myocardial gap junctions stabilized the dynamics of spiral-wave reentry and facilitated its perpetuation, whereas enhancement of gap junctional coupling destabilized spiral-wave reentry and promoted its early self-termination by compromising propagation of excitation waves with strong curvature near the rotation center. These results suggest that enhancement of gap junctional coupling could be a useful strategy for the treatment of life-threatening arrhythmias in diseased hearts with gap junctional remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ギャップ接合、致死性不整脈、スパイラルリエントリー、光学マッピング、活動電位、興奮伝播

1. 研究開始当初の背景

心臓を構成する個々の心筋細胞はギャップ接合と呼ばれるチャンネル構造で相互に結合しており、心筋細胞の電氣的興奮(活動電位)はこのチャンネルを通る局所電流を生じ、隣接する心筋細胞に次々と活動電位を発生させる。このようにして心臓の一箇所から発生した心筋興奮が心臓全体に伝播すること

により、調和の取れた心筋収縮がもたらされる。

心筋の肥大や虚血など様々な病態では、心筋細胞のギャップ接合に質的および量的変化が生じること(ギャップ接合のリモデリング)が知られている。例えば、圧負荷肥大心では、心室筋長軸端に位置する介在板のギャップ接合発現が低下するとともに、細胞側面

への発現が増加することが報告されている。また、急性心筋虚血では、ギャップ接合蛋白の脱リン酸化が亢進し、細胞間電気結合が低下することが示されている。このような病態に伴う心筋ギャップ接合のリモデリングは、興奮伝播特性を大きく変化させ、心室細動や心室頻拍などの致死性不整脈の発生を促すことが示唆されている。しかし、その機序についてはこれまで十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ギャップ接合を介する心筋細胞間の電気結合の変化が、心筋興奮伝播特性や、心室スパイラルリエントリー（心室細動や心室頻拍の発生メカニズム）のダイナミクスに対して、どのような変化をもたらすかについて、実験動物摘出灌流心臓の活動電位高分解能光学マッピングにより検討することである。特に、下記の事項について検討した。

(1) 心筋細胞間の電気結合を心臓の摘出灌流組織標本で評価する電気生理学的方法を確立するとともに、心筋細胞間電気結合の減弱あるいは増強が、二次元興奮波の伝播特性に及ぼす影響を定量的に解析する。

(2) 心室スパイラルリエントリーのダイナミクスおよびその持続に対して、心筋細胞間電気結合の減弱あるいは増強がどのような作用を及ぼすかを、活動電位波形変化の面から明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 心筋活動電位光学マッピング

心臓における活動電位の伝播特性を詳細に解析するためには、時間および空間分解能に優れた電気活動のマッピングが必要である。本研究では、我々が開発した、高輝度発光ダイオード(LED)とCMOS型撮像素子搭載高速度ビデオカメラを組み合わせた心筋活動電位高分解能光学マッピングシステムを用いて、電位感受性色素で染色したウサギ摘出灌流心臓の興奮伝播ダイナミクスや活動電位波形変化を解析した(図1)。

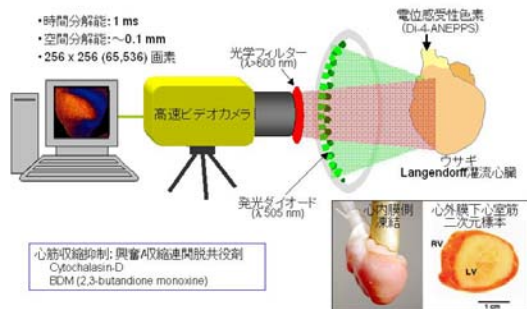


図1. 心筋活動電位光学マッピングシステム。

(2) 活動電位光学マッピング画像の解析および心室スパイラルリエントリーの誘発

興奮伝播の解析には、興奮前面の等時線マップ、位相マップによるスパイラルリエントリー旋回中心(位相特異点)の解析などの手法を用いた。

心室スパイラルリエントリーの誘発には直交電場刺激を用いた。心室壁には厚みがあるため、渦巻き興奮波は複雑な三次元構造をとり、常に心表面にスパイラル構造が現れるとは限らない。本研究では左心室内膜側を液体窒素で凍結アブレーションし、心外膜下心筋(厚さ約1mm)のみを残存させた二次元標本を用いることにより、心表面からスパイラル構造を観察することを可能にした(図1)。

4. 研究成果

(1) 心筋細胞間電気結合の減弱あるいは増強が興奮波の伝播特性に及ぼす作用

①空間定数(space constant)による心筋細胞間電気結合の評価

ケーブル理論では、組織空間定数は、細胞膜抵抗/組織抵抗(ギャップ接合抵抗)の平方根に比例する。したがって、細胞膜抵抗が変化しない状態では、空間定数の変化はギャップ接合の変化を反映する。心室筋心外膜面に設置した細い単極電極から閾値下の陰極通電を行い、閾値下脱分極の電気緊張電位の空間的減衰から空間定数を求めた(図2)。

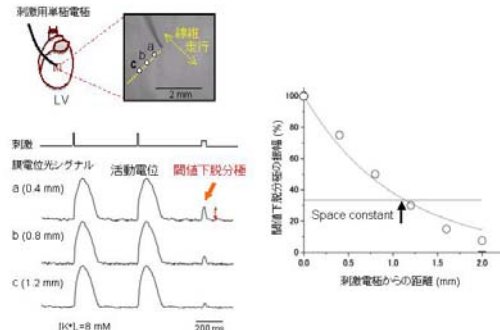


図2. 空間定数(space constant)の計測。

ギャップ接合チャネルの開口を抑制するcarbenoxolone (30 μ M)は空間定数が有意に短縮した。一方、ギャップ接合チャネルの開口を促進するrotigaptide (0.1 μ M)作用下では、空間定数が有意に延長した(図3)。

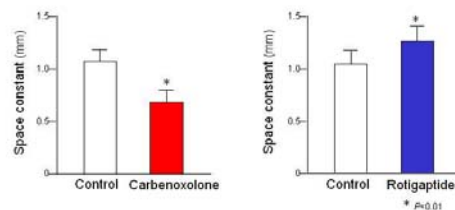


図3. Carbenoxoloneとrotigaptideによる空間定数(space constant)の変化。

②興奮波面湾曲の効果

湾曲した興奮波の局所伝導速度(CV)は、波面の湾曲度(K)に依存して低下し、その程度は興奮波の伝播方向と垂直方向の電気的拡散係数(細胞間電気結合を示す)に比例することが知られている： $CV=CV_0-D \cdot K$ (CV_0 は平面波の興奮伝導速度; D は拡散係数を示す)。したがって、湾曲した興奮波の波面曲率と局所伝導速度との関係を解析することにより、細胞間電気結合コンダクタンスの指標である拡散係数を定量的に求めることができる。

心室筋の一点に電気刺激を加えて楕円形に広がる興奮波を作成し、その長軸方向の局所伝導速度と波面の曲率を計測した。波面の曲率と局所伝導速度との間には、負の直線関係を認めた(図4)。この直線の傾きが拡散係数を示す。

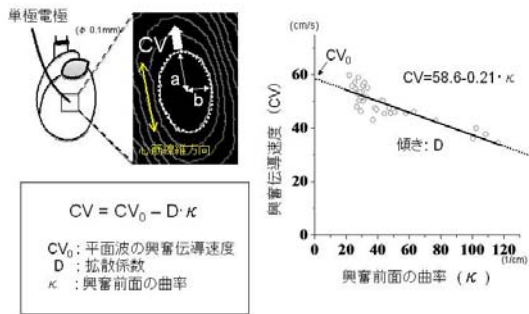


図4. 局所伝導速度と波面の曲率との関係。

Carbenoxolone (30 μM)は拡散係数を有意に減少させた。一方、rotigaptide (0.1 μM)は拡散係数を有意に増加させた(図5)。また、rotigaptide 作用下への波面曲率と局所伝導速度と回帰直線は、薬物添加前の回帰直線と交差していた。即ち、rotigaptide による細胞間電気結合の増強は、曲率の小さい興奮波の伝導速度を増加させるが、強く湾曲した興奮波の伝導はかえって低下させることが明らかになった(図5)。

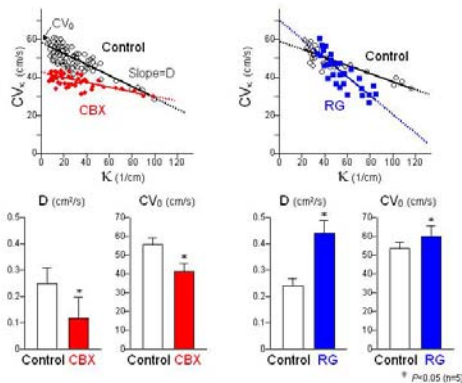


図5. Carbenoxolone と rotigaptide による拡散係数の変化。

(2) 心筋細胞間電気結合の減弱あるいは増強が心室スパイラルリエントリーのダイナミクスに及ぼす作用

薬物添加前のコントロールで誘発した心室スパイラルリエントリーは、線状の機能的ブロックの周囲を規則正しく旋回していた。位相マップによる旋回中心の解析では、位相特異点の移動の軌跡が機能的ブロックとほぼ一致することが確認された。

Carbenoxolone (30 μM)作用下で誘発した心室スパイラルリエントリーでは、コントロールと比べて、機能的ブロックの長さが短縮し、安定した旋回運動が長時間持続した(図6)。位相マップによる旋回中心の解析においても、位相特異点の移動距離がコントロールよりも短縮した。

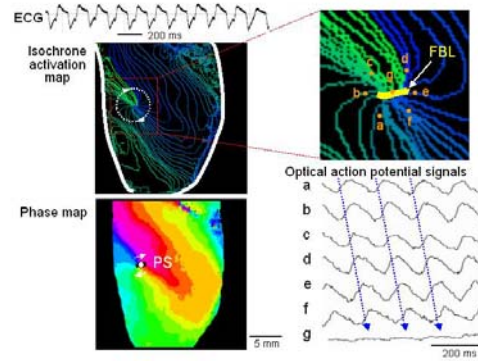


図6. Carbenoxolone 作用下の心室スパイラルリエントリー

一方、rotigaptide (0.1 μM)作用下の心室スパイラルリエントリーでは、機能的ブロックの長さがコントロールよりも延長するとともに、その位置や形状が一拍ごとに大きく変化した。機能的ブロックが房室弁輪の興奮障壁まで達して、リエントリーが早期に停止することが多かった(図7)。

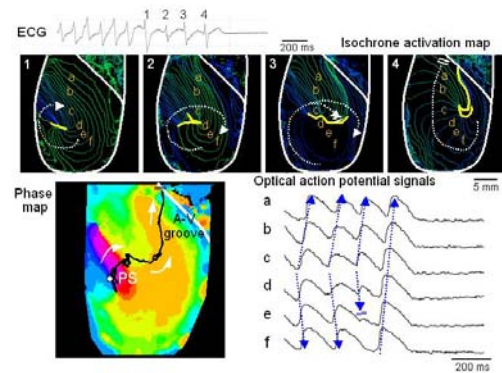


図7. Rotigaptide 作用下の心室スパイラルリエントリー

旋回中心付近の興奮伝播と活動電位波形の解析では、旋回中心付近で局所的な減衰伝導が生じていることが観察され、これが機能

的ブロックの位置を移動させてスパイラルリエントリーの不安定化をもたらすことが明らかになった (図8)。

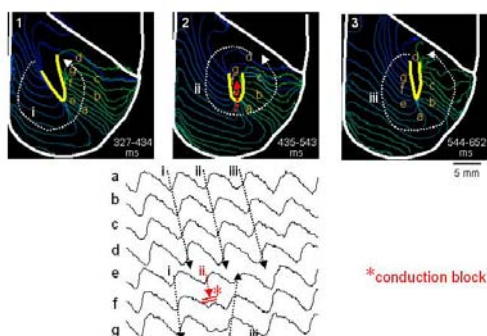


図8. Rotigaptide 作用下のスパイラルリエントリー：旋回中心付近の興奮伝播と活動電位波形の解析

誘発した心室頻拍/細動の持続時間は、carbenoxolone (30 μ M)作用下では有意に延長し (300 秒以上持続する不整脈の割合が 51% から 80%まで増加)、rotigaptide (0.1 μ M)作用下では誘発不整脈の持続時間が有意に短縮した (300 秒以上持続する不整脈の割合が 56%から 24%まで減少)。

以上の結果から、ギャップ接合を介する心筋細胞間電気結合の低下は、スパイラルリエントリーの旋回動態を安定化させ、その持続を促すことが判明した。一方、心筋細胞間電気結合の増強は、スパイラルリエントリーの旋回中心付近において強く湾曲した興奮波の伝播を抑制することにより局所的な減衰伝導をもたらし、スパイラル旋回動態の不安定化によるリエントリーの早期停止を促進することが明らかになった。

(3) 抗不整脈薬 bepridil の作用

Bepridil は心筋細胞の多くのイオンチャネル (K チャネル、Ca チャネルおよび Na チャネル) に対する遮断作用を有する抗不整脈薬である。この薬物は、平面波興奮伝導速度や、空間定数、拡散係数を増加させることが示され、心筋細胞間の電気結合を増強させることが明らかになった。心室スパイラルリエントリーの解析では、この薬物は rotigaptide と同様に、旋回中心付近で局所的な減衰伝導をもたらして旋回ダイナミクスが不安定化し、リエントリーの早期停止を促すことが判明した。Bepridil の抗不整脈作用の一部には、ギャップ接合を介する心筋細胞間電気結合の増強作用が関与している可能性が示唆される。

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 6 件)

- ① Takanari H, Honjo H, (8 名) Kamiya K, Kodama I: Bepridil facilitates early termination of spiral-wave reentry in two-dimensional cardiac muscle through an increase of intercellular electrical coupling. *J Pharmacol Sci* 115: 15-26, 2011 (査読有)
- ② Nakagawa H, Honjo H, (6 名) Kamiya K, Kodama I: Acute amiodarone promotes drift and early termination of spiral wave reentry. *Heart Vessels*. 25: 338-347, 2010 (査読有)
- ③ Ishiguro YS, Honjo H, (8 名) Kamiya K, Kodama I: Early termination of spiral wave reentry by combined blockade of Na⁺ and L-type Ca²⁺ currents in a perfused two-dimensional epicardial layer of rabbit ventricular myocardium. *Heart Rhythm* 6: 684-692, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 24 件)

- ① Takemoto Y, Honjo H (5 名) Kamiya K, Kodama I: Increased electrical coupling destabilizes spiral-wave reentry in favor of its early termination through inhibition of wave propagation near the rotation center. *Heart Rhythm* 2010. 2010.5. (Denver, USA)
- ② Takanari H (2 名) Honjo H, (1 名) Kodama I, Kamiya K: Inhibition of calmodulin increases intercellular coupling of ventricular myocardium by enhancement of connexin43 localization in intercalated disk. *American Heart Association Scientific Sessions*. 2010.11. (Chicago, USA)
- ③ Takanari H, (5 名) Honjo H, Kamiya K, Kodama I: A unique modification of spiral wave reentry by bepridil: relating to ion channel blocking action and inhibition of calmodulin. *European Society of Cardiology* 2009. 2009. 8-9. (Barcelona, SPAIN)
- ④ Honjo H (4 名) Kamiya K, Kodama I: Dynamics of spiral wave reentry. *36th International Congress of Physiological Sciences*. (invited) 2009.7. (Kyoto)
- ⑤ Takemoto Y (6 名) Honjo H (1 名) Kamiya K, Kodama I: The effects of intercellular electrical uncoupling on the dynamics of spiral reentry in ventricular myocardium of isolated rabbit hearts. *36th International Congress of Physiological Sciences*. 2009.7. (Kyoto)
- ⑥ Takanari H (4 名) Honjo H (1 名) Kamiya K, Kodama I: Bepridil destabilizes spiral-wave reentry in favor of its early termination through tremendous drift of rotation center. *The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society*. 2009.3. (Osaka)
- ⑦ Takemoto Y, (6 名) Tsuji Y (1 名) Honjo H,

Kamiya K, Kodama I: Intercellular uncoupling stabilizes spiral-wave reentry in favor of its persistence. The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2009.3. (Osaka)

〔図書〕(計1件)

- ① 本荘晴朗, 児玉逸雄: スパイラル・リエントリーと抗不整脈薬. 杉本恒明(監), 井上博(編): Medical Topics Series 不整脈 2009. 大阪・東京: メディカルレビュー社, 14-24, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本荘 晴朗 (HONJO HARUO)

名古屋大学・環境医学研究所・准教授
研究者番号: 70262912

(3) 連携研究者

神谷 香一郎 (KAMIYA KAICHIRO)

名古屋大学・環境医学研究所・教授
研究者番号: 50194973

辻 幸臣 (TSUJI YUKIOMI)

名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号: 60432217

児玉 逸雄 (KODAMA ITSUO)

名古屋大学・環境医学研究所・名誉教授
研究者番号: 30124720