

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21592001

研究課題名（和文） 敗血症病態がペースメーカー細胞に及ぼす影響
- 遺伝子による不整脈治療戦略の構築 -

研究課題名（英文） Effects of septic condition on pacemaking cell.
- Anti-arrhythmic strategy by gene-based treatments -

研究代表者

畠山 登 (HATAKEYAMA NOBORU)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70251907

研究成果の概要（和文）：敗血症病態の心房筋細胞では、活動電位の短縮が認められた。これらの変化はイオンチャネルの発現変化より、機能変化による影響が考えられ、頻脈性不整脈の発生に影響を及ぼしているものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：In atrial myocytes from septic model of guinea pig, duration of action potential was significantly shortened. This may be the result of the nitration of the ion channels that would alter channel functions rather than the changes in atrial expression of the channels. The reduction of action potential duration could play a role for the development of atrial tachyarrhythmia in sepsis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：敗血症，不整脈，イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

敗血症は感染に合併する全身性炎症反応を特徴とし、周術期に高い死亡率を示す病態として知られている。この敗血症病態では、上室性頻拍や心房細動などの不整脈がしばしば観察されるが、その発生機序や治療については現在も不明な点が多く、抗不整脈薬の選択指針も不明瞭である。

2. 研究の目的

心臓調律機序に対して敗血症病態が及ぼす影響について、ペースメーカー機序に主眼を置き、電気生理学、チャネル構成蛋白の発現変化により多面的な検討を行い、敗血症病

態における不整脈発生機序を明らかにするとともに治療戦略を構築するための知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作成

大腸菌内毒素であるリポポリサッカライドをモルモット腹腔内に投与し、10 時間後に麻酔下に心臓を摘出し、実験に供した。

(2) 電気生理学的検討

摘出した心臓の上行大動脈にカニューレシオンを行い、コラゲナーゼ、トリプシンを灌流することで単離心房筋細胞を分離した。Whole-cell current clamp 法により活動電位

を測定し、Whole-cell voltage clamp 法により、電位依存性ナトリウム電流(I_{Na})、L型カルシウムチャネル電流(I_{Ca})、遅延整流性カリウム電流(I_K , I_{Kr} , I_{Ks})について検討を行った。

(3) Western blotによるチャネル構成蛋白の発現についての検討
Cav1.2, Kv11.1, Kv7.1について、チャネル構成蛋白の発現における敗血症病態の影響について検討した。

(4) RT-PCRによるチャネル構成蛋白の発現についての検討

Nav1.5, Cav1.2, Kv11.1, Kv7.1について、チャネル構成蛋白の発現における敗血症病態の影響について検討した。

(5) 敗血症病態におけるNO過剰発現の有無についての検討

iNOS, eNOSの発現について、Western blotおよびRT-PCRにより検討を行った。

(6) 免疫染色法によるチャネル発現, NO, およびニトロチロシン発現についての検討

4. 研究成果

LPSによる敗血症病態モデルにおいて以下の結果が得られた。

(1) 活動電位の変化

活動電位の短縮が見られた。この短縮はNO合成阻害薬であるL-NAMEあるいはEIT (S-ethylisothiourrea)のにより回復した。

(2) イオンチャネル電流の変化

① I_{Na} は変化が見られなかった。

② I_{Ca} は抑制された。さらにisoprenalineを用いた β 刺激による I_{Ca} の増大も抑制した。これらの変化は、L-NAMEあるいはEIT (S-ethylisothiourrea)のにより回復した。

③ I_K は増大した。この増大は I_{Kr} より、むしろ I_{Ks} による増大であることが確認された。また、この増大もL-NAMEあるいはEIT (S-ethylisothiourrea)のにより回復した。

(3) チャネル発現の変化

① Western blotによりCav1.2の発現は抑制され、Kv11.1, Kv7.1の発現は増大した。これらの変化はL-NAMEにより回復した。

② RT-PCRにおいてはNav1.5, Kv11.1, Kv7.1について発現に有意な変化は認められなかった。Cav1.2は発現の抑制は観察されたが、L-NAMEによる回復は認められなかった。

③ 免疫染色法においてもNav1.5の発現変化は認められなかった。

(4) NOの過剰発現について、Western blot, およびRT-PCRによりiNOSの発現増大が観察された。eNOSについては変化は認められなかった。

(5) 単離心房筋細胞において、NOの過剰発現

が免疫染色法により確認され、さらに心房筋組織においてニトロチロシンの発現増大が観察された。

以上より、敗血症病態においてはNOの過剰発現により、チャネルリモデリングが発生し、チャネル電流の変化とチャネル機能の変化が起こる結果、活動電位の短縮が起こり、不応期が短縮することで、頻脈性不整脈が発生しやすくなるものと結論された。

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4件)

Hatakeyama N, Sakuraya F, Matsuda N, Kimura J, Kinoshita H, Kemmotsu O, Yamazaki M, Hattori Y: Pharmacological significance of the blocking action of the intravenous general anesthetic propofol on the slow component of cardiac delayed rectifier K^+ current. J Pharmacol Sci. 2009 Jul;110(3):334-43.

松田直之, 山本誠土, 寺前洋生, 高野健一, 別府賢, 山崎弘美, 横尾宏毅, 島山登, 小池薫, 服部裕一. 敗血症性ショックにおけるアポトーシスの治療. 日本薬理学雑誌 134 巻 4号 198-201 (2009.10).

島山登, 青木優太, 木下浩之, 寺前洋生, 松田直之, 山崎光章. 周術期不整脈の管理と治療 全身性炎症反応症候群(SIRS)と頻脈性不整脈、その治療戦略. 日本臨床麻酔学会誌 30 巻 5号 765-770 (2010.09)

Aoki Y, Hatakeyama N, Yamamoto S, Kinoshita H, Matsuda N, Hattori Y, Yamazaki M: Role of ion channels in sepsis-induced atrial tachyarrhythmias in guinea pigs. Br J Pharmacol. 2012; 166:390-400.

DOI:10.1111/j.1476-5381.2011.01769.x

[学会発表] (計10件)

島山登 敗血症時の頻脈性不整脈発生機序に対するnitrotyrosylationの影響. 第30回日本循環制御医学会総会 2009.6 鹿児島

島山登 敗血症時の頻脈性不整脈における心房筋イオンチャネル発現と機能の変化. 社団法人日本麻酔科学会 第56回学術集会 2009.8 神戸

島山登 全身性炎症反応症候群(SIRS)と

頻脈性不整脈, その治療戦略. 日本臨床麻酔学会第 29 回大会 2009.10 浜松

Hatakeyama N. Tachyarrhythmia in sepsis is attributable to both the inhibition of calcium channel expression and nitrotyrosilation of calcium channel. Society of critical Care Medicine 39th Critical Care Congress. 2010.1 Miami Beach, U. S. A.

畠山 登 敗血症時の頻脈性不整脈発生機序に対する nitrotyrosylation の影響. 第31 回循環制御医学会総会 2010.5 大阪

畠山 登 敗血症モルモットにおける心房筋カルシウムチャネル変化の検討. 第 31 回循環制御医学会総会 2010.5 大阪

畠山 登 敗血症モルモット心房筋カルシウムチャネル発現および機能の変化. 日本麻酔科学会第 57 回学術集会 2010.6 福岡

Hatakeyama N. Effect of Hydrogen Peroxide on Action Potential and the Protection by Propofol in Cardiac Myocytes. 2010 Annual Meeting of the American Society Anesthesiologists. 2010.10 San Diego, U. S. A.

Hatakeyama N. Modulation on Expression and Function of Calcium and Potassium Channels in Septic Guinea Pig Atrium. Society of critical Care Medicine 40th Critical Care Congress. 2011.1 San Diego, U. S. A.

Hatakeyama N. Modulation of Potassium Channel Plays a Role for Septic Tachyarrhythmia. 2011 Annual Meeting of the American Society Anesthesiologists. 2011.10 Chicago, U. S. A.

[図書] (計 1 件)

畠山 登 カテコラミンの使い方 Pros & Cons. 救急・ER ノート 2. 羊土社 197-202, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畠山 登 (HATAKEYAMA NOBORU)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：70251907

(2) 連携研究者

青木 優太 (AOKI YUTA)
富山大学・大学病院・助教
研究者番号：10621667

木下 浩之 (KINOSHITA HIROYUKI)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：70291490

山本 誠士 (YAMAMOTO SEIJI)
富山大学大学院・医学薬学研究部・助教
研究者番号：10456361