

機関番号：12102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21791762

研究課題名 (和文) 心室性頻拍誘発モデルマウスに対する顆粒球コロニー刺激因子投与治療の検討

研究課題名 (英文) Granulocyte-Colony Stimulating Factor Administration Reduced the Inducibility of Ventricular Tachyarrhythmias in mouse model

研究代表者

下條 信威 (SHIMOJO NOBUTAKE)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：20462210

研究成果の概要 (和文)：

致死性不整脈である心室性頻脈性不整脈 (心室頻拍、心室細動) は、急性あるいは、陳旧性心筋梗塞の合併症として周術期においても慎重な対応を要することは周知されている。また、高血圧などの基礎疾患から心筋リモデリングの進行に伴う心肥大は心室性頻拍性不整脈の独立した危険因子となり、突然死の原因となる。

一方、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は、顆粒球減少に対して使用されるサイトカイン製剤であるが、近年、心筋細胞間のギャップ結合に参与して心室性不整脈を抑制する報告がなされた。

申請者は、Dahl ラットを用いて、不整脈誘発モデルを作成し、G-CSF のその予防効果を検討した。心肥大を認めた食塩負荷高血圧ラット群に対し、G-CSF の予防投与は、有意に心室性頻脈性不整脈の発生率を抑制した。さらに、分子生物学的検討では、心臓内リン酸化コネキシン43分子は G-CSF 投与群において増加を認めた。

これらのことから、心肥大ラットにおいて、G-CSF はコネキシン43分子のリン酸化を介して心室電氣的リモデリングの進行を抑制し、心室性不整脈の発生率を低下させることが示唆された。この結果は、心疾患周術期での致死性不整脈の抑制効果の臨床試験を行う根拠の1つとなる。

研究成果の概要 (英文)：

Cardiac hypertrophy is an independent risk factor for sudden cardiac death from ventricular tachyarrhythmias (VTa). Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) has recently been reported to suppress VTa after myocardial infarction by modulating the function of gap junctions between cardiomyocytes via maintaining Connexin-43 (Cx43). We hypothesized that the G-CSF could also regress an enhanced vulnerability to VTa in the cardiac hypertrophy without ischemic fibrosis through regulating Cx43.

We used Dahl salt-sensitive rats as LVH models. The inducibility of VTa by rapid ventricular burst pacing was decreased in G-CSF administration groups compared to vehicles. Expression levels of phosphorylated Cx43 was increased in G-CSF administered rat hearts by western blotting.

We demonstrated that the G-CSF administration ameliorated the electrophysiological stability in the rat model of cardiac hypertrophy by modulating the function of gap junctions through accelerating phosphorylation of Cx43. These results warrant carefully designed clinical studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：救急医学

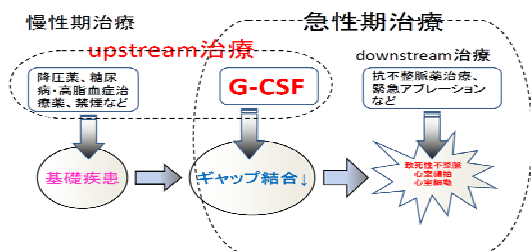
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：致死性不整脈治療

1. 研究開始当初の背景

①集中治療室管理下においても難治性致死性不整脈の治療には苦慮しているのが現状である。現行の治療としては、不整脈を押さえ込むような、いわゆる **down-stream** 治療が中心だが、急性期治療においても平行した心筋保護のための強力な **up-stream** 治療の開始が必要である。

②一方、虚血性心疾患に対する顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の血管新生については、議論の余地を残すところであるが、G-CSF による治療法は簡便かつ侵襲を伴わない治療法として今後の発展が期待されている。その中で、近年 Kuwabara らは G-CSF を用いて、心筋梗塞モデルマウスを用いて、G-CSF 投与による VT 発生を **gap-junction** の活性化を介して、VT の発生を抑制することを報告した (M. Kuwabara et al. FEBS Letters 2007)。さらに、G-CSF の心筋細胞間の **gap junction** の維持による心筋内不整脈の抑制効果が報告された (M. Kuwabara et al. FEBS Letters 2007)。しかし、心筋虚血に伴う不整脈に対する効果およびメカニズムについては十分解明されていない。



2. 研究の目的

本研究では、心室性不整脈誘発モデルラットを用いて、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の予防投与によるその抑制効果を検

討する。さらに、モデルラットの心筋を解析することで、そのメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

研究開始当初、マウスおよびラットの心筋梗塞モデルを想定していたが、カテーテルによる測定などを考慮し、ラット中心とした。また、心室性頻脈性不整脈の誘発において、心筋梗塞モデルが不安定であったことから、心室内カテーテルによる電気刺激による誘発のモデルの作成を試みた。

12 週齢 Dahl Rat に高塩分負荷食 (8.0g NaCl) 4 週間摂取させ高血圧としたグループ、通常食 (0.3gNaCl) を同様に摂取させ正常血圧グループの 2 群を作成し、さらに、1 週間前からの G-CSF (50µg/kg/day, 3days) 投与の有無のトータルで以下の 4 群を作成した。

1. 正常血圧群 (Control)
2. 正常血圧 + G-CSF (Control + G-CSF) 群
3. 高血圧 (HT) 群
4. 高血圧 (HT + G-CSF) 群

2, 4 群の G-CSF 投与後に頸静脈的にカテーテルを挿入し、電気生理学的検査を行い、心室に留置した電極により電気刺激による心室性頻脈性不整脈 (心室頻拍, 心室細動) を誘発する。その発生頻度、持続時間を比較検討する。以下にペーシング刺激プロトコルを示す。

induction protocol (Burst pacing)

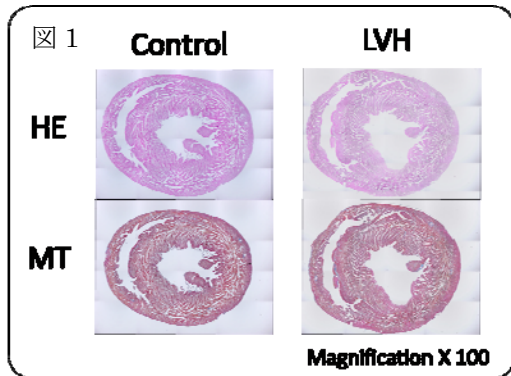
- Catheter: 2Fr, quadripolar, 5mm spacing (Ensemble, Japan Life Line)
- Pacing site: Ventricle = 1
- Pacing pulse: square wave (6 ms, 6 V)
- Pacing interval: 40 ms

- Pacing duration: 30 sec
- Number of Induction: 3 rounds
- Induction interval: 3 min

さらに、犠牲剖検により摘出した心臓を心筋 Gap junction の重要な分子である Connexin 43(phospho and total)およびその関連タンパクである Zo-1、Autophagy 関連タンパクでもある LC-2,3 についても、ウェスタンブロッティング、免疫染色などの手法を用いて検討する。

4. 研究成果

高食塩負荷 Dahl ラットにおいて、血圧は有意に上昇し(data not shown)、心重量は有意に増大した(表)。有意な心肥大は認めるものの、線維化においては、病理検査上有意な差は認めなかった(図 1) (HE:ヘマトキシンエオジン染色、MT:マッソントリクローム染色)。



G-CSF 投与群において、有意な白血球の増加を認め、G-CSF の効果は確認された(表)。心室内留置カテーテルでの電気刺激による心室性頻脈性不整脈誘発試験において、G-CSF 群で有意な誘発率の抑制効果が確認された(表 1, 2)。

表 1

	Control		LVH model	
	G-CSF (n=2)	Vehicle (n=3)	G-CSF (n=9)	Vehicle (n=8)
Body weight, g	418±23	417±17	407±11	412±16
Ventricle weight, g	1.1±0.1	1.1±0.1	1.2±0.1*	1.2±0.1*
Sinus cycle length, ms	188±32	208±3	176±31*	176±25*
WBC, / μ l	19370±1174	7700±2335	15083±4397*	6976±1308*
VT induction rate, %	0%	33%	11%	63%

*p<0.05 vs Vehicle, *p<0.05 vs Control

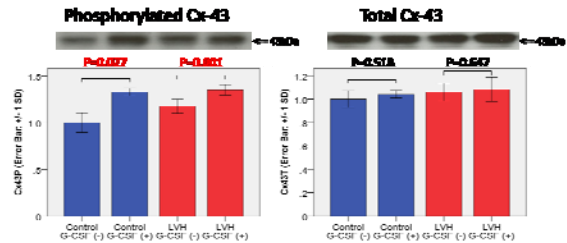
LVH 群のみの比較を以下に示す。

表 2

	G-CSF (n=8)	Vehicle (n=8)	P value
Body weight, g	407±11	412±16	0.385
Ventricle weight, g	1.2±0.1	1.2±0.1	0.658
Sinus cycle length, ms	176±31	176±25	0.961
WBC, / μ l	15083±4397*	6976±1308*	<0.001
VT induction rate, %	30±35	50±44	0.302
1 st induction, n	4	5	0.488
2 nd induction, n	3	2	0.728
3 rd induction, n	1*	5	0.034

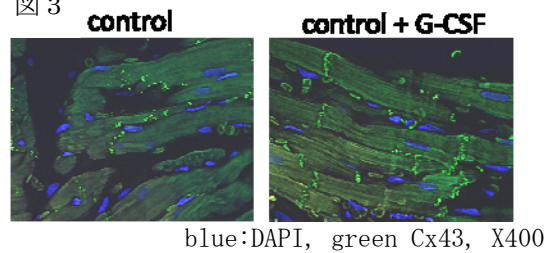
さらに、不整脈誘発試験後摘出した心臓のウェスタンブロッティングでは、G-CSF 投与群において有意なリン酸化コネクシン 43 の上昇を認めた(図 2)。一方、トータルのコネクシン 43 は有意な変化はなく、G-CSF によるコネクシン 43 のリン酸化による制御が関与していることを示している。

図 2



摘出心筋の免疫染色では、コネクシン 43 はコントロールの心筋細胞周囲に比して G-CSF 群で有意な増加、特に心筋細胞間に密に濃縮されていることが確認された(図 3)。

図 3



blue:DAPI, green Cx43, X400

これらの結果は、心筋リモデリングの進行によってダウンレギュレートされたコネクシン 43 分子が、G-CSF の投与により正常化した可能性が考えられる。免疫染色の結果からはそのメカニズムとして、コネクシン 43 分子のリン酸化による心筋細胞内ロカリエーションの変化の関与も示唆される。

今回、心肥大ラットにおいて、G-CSF はコネクシン 43 分子のリン酸化を介して心室電気のリモデリングの進行を抑制し、心室性不整脈の発生率を低下させることが示された。

今後、培養細胞系実験も導入し、より詳細なメカニズムの解明を進めるとともに、心筋梗塞モデルも含めた心疾患術後モデルの作成による検討を行う。今回の結果はその研究を進めるに十分な根拠となりうる。さらに、それらの結果を踏まえて心疾患周術期に導入することで、致死性不整脈の抑制効果の臨床試験を行え、致死性不整脈による心疾患周術期死亡率を減少させることが期待される。

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)

[学会発表] (計2件)

① 下條信威、町野毅、許東洙、櫻本秀明、関義元、萩谷圭一、安田貢、河野了、青沼和隆、水谷太郎、心室頻拍に対する G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子) 予防投与による抑制効果の検討、第38回日本集中治療医学会学術集会、2011年2月24日～26日、横浜

② Takeshi Machino, Nobutake Shimojo, Donzhu Xu, Hiro Yamasaki, Miyako Igarashi, Yukio Sekiguchi, Hiroshi Tada, Kazutaka Aonuma. G-CSF Reduces Ventricular Tachycardia Inducibility in the Cardiac Hypertrophy via Upregulation of Phosphorylated Connexin-43. Heart Rhythm society' s 32th Annual Scientific sessions, 2011.5, San Francisco (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下條 信威 (SHIMOJO NOBUTAKE)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師

研究者番号：20462210