

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16045

研究課題名（和文）ヒト肺静脈心筋における異常自動能の発生機序の解明

研究課題名（英文）Hyperpolarization-activated currents in pulmonary vein cardiomyocytes isolated from human.

研究代表者

高木 大地（Takagi, Daichi）

秋田大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70723394

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）：ヒト肺静脈心筋より、電気生理学的評価を行い、セシウムによりブロックされる過分極活性化電流を認め、ヒト肺静脈心筋においても過分極活性化陽イオン電流（funny current）を有していることが示された。また、採取した検体の一部を用いて、RNA-seqにより6つの心臓領域におけるタンパク質コードRNAとロングノンコードRNA（lncRNA）の発現量を解析した。心房細動の有無で最も変化する部位は、肺静脈心筋であることがわかった。イオンチャネル関連遺伝子セットが有意に心房細動患者の肺静脈心筋に濃縮されていた。また、がん関連lncRNAは、心房細動のあるPVで発現が増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト肺静脈心筋より、電気生理学的評価を行い、過分極活性化電流を認め、ヒト肺静脈心筋においても過分極活性化陽イオン電流（funny current）を有していることが示された。心不全治療で臨床使用されているイバブラジン（過分極活性化陽イオンチャネル阻害薬）が心房細動発症抑制などに関与する可能性が示唆された。また、RNA-seqにより6つの心臓領域におけるタンパク質コードRNAとロングノンコードRNA（lncRNA）の発現量を解析し、心房細動の有無で最も変化する部位が肺静脈心筋であることがわかった。がん関連lncRNAなど後天的な遺伝子制御が心房細動の進行に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Electrophysiological evaluation from human pulmonary vein myocardium showed hyperpolarisation-activated currents blocked by caesium, indicating that human pulmonary vein myocardium also has hyperpolarisation-activated cation currents (funny currents). The expression levels of protein-coding RNA and long non-coding RNA (lncRNA) in six cardiac regions were analysed by RNA-seq using a portion of the collected specimens. The region most altered in the presence or absence of atrial fibrillation was found to be the pulmonary vein myocardium. Ion channel-related gene sets were significantly enriched in the pulmonary vein myocardium of patients with AF. Cancer-related lncRNAs were also up-regulated in PVs with atrial fibrillation.

研究分野：電気生理学

キーワード：心房細動 肺静脈心筋 過分極活性化電流

1. 研究開発当初の背景

心房細動は慢性の不整脈の中で最も頻度が高く、高齢化が進む日本においては、2005年 71.6 万人だったのが 2050 年には 103 万人と予測されており、近年その罹患患者数が増加してきている(日本循環器学会ガイドライン)。心房細動は、心不全・脳梗塞・認知症などを引き起こす原因となる。1998 年、心房細動の起源が肺静脈に存在することが報告され(Haissaguerre, N Engl J Med. 1998)、肺静脈心筋を左房から隔離する肺静脈焼却術など、心房細動治療は大きく進歩した。肺静脈心筋における異常興奮発生のメカニズムについても、実験動物を使った電気生理学的研究により新たな知見が追加された(Namekata, J Pharmacol Sci. 2009; Doisne, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009 など)。それにも関わらず、世界的規模で患者数は増加の一途であり、その予防や治療は臨床および医療経済上重要な課題であり、新規治療法の開拓は常に国際的な関心事項である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト肺静脈心筋を用いて、心房細動の発生源における、過分極活性化電流や内向整流性カリウムチャネルの生理機能を解明し、これらの電流がどのように心房細動の発生を制御するか明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) 肺静脈心筋を含む心臓組織の採取

僧帽弁手術時の右側左房切開時に、肺静脈側より 1mm × 1mm × 5-10mm の組織片を採取した。単離までは術中に用いている心筋保護液と同様の液体で保存した。

2) 肺静脈心筋の単離

採取した肺静脈組織を細かく切り込みを入れ、酵素液(コラゲナーゼ 0.00175g/ml, サーマシン 0.0012g/ml, エラスターゼ 0.001g/ml, ヒアルロニダーゼ 0.0005g/ml)に浸し、37 度の振とう器で振とうし、肺静脈心筋を単離した。

3) パッチクランプ

ホールセルパッチクランプ法を用いて、膜電位・膜電流を記録した。電極は抵抗が 2.0-5.0M のものを用いた。同条件下で過分極活性化電流、膜容量を記録した。

4) 心臓組織を用いたトランスクリプトーム解析

複数遺伝子の関与や、心臓複数部位での遺伝子発現を比較検討するため、RNA-seq により、心臓 6 領域における coding RNA および lncRNA の発現を解析した。標本は左房、左心耳、右房、洞結節、左室、右室、肺静脈、右心耳から採取し、洞調律 23 サンプルと心房細動 23 サンプルにて解析を行なった。

4. 研究成果

1) 研究結果

A) 過分極活性化電流

19例(洞調律 10例、発作性心房細動 3例、慢性心房細動 6例)より肺静脈組織を採取し、肺静脈心筋を単離した。このうち、3例(15.9%)でパッチクランプにより過分極活性化電流、膜容量を記録することが可能であった。心房細動症例では、心筋細胞の状態が悪く、数が少なく、心筋の繊維化が疑われた。

過分極活性化電流は、セシウムにより抑制され、キャリアは過分極活性化陽イオンチャネルであることが示唆された(Fig.1)。得られた電流の活性化曲線を Fig.2 で示す($V_h = 88.499 \pm 1.38$ mV)。

B) 遺伝子発現変異の解明

遺伝子発現の変化が最も多い部位は肺静脈であった。発現変動遺伝子においてイオンチャネル関連遺伝子が enrich されていた。また、SAMMSON や FOXCUT のような癌関連 lncRNA の発現が上昇していた。これらの lncRNA は共発現ネットワーク解析にてがん関連転写因子 FOXC1 と同じネットワークに属しており、発癌に類似する機序で後天的に心房細動を進行させる可能性が示唆された。

2) 結論

本研究は、ヒト肺静脈心筋に過分極活性化電流があることを示し、またそのキャリアが過分極活性化陽イオンチャネルであることを示唆した。また、トランスクリプトーム解析により、(1)RNA の変化が肺静脈で最も大きく、(2)FOXCUT-FOXC1 軸のような後天的な遺伝子制御が、心房細動の進行に寄与する可能性を示唆した。

本研究結果は、肺静脈の催不整脈性の根底にある細胞メカニズムの理解に貢献し、臨床使用されているイバブラジン(過分極活性化陽イオンチャネル阻害薬)を含めた様々な薬剤による薬理学的効果を明らかにし、心房細動に特化した創薬の橋渡し研究となる可能性がある。

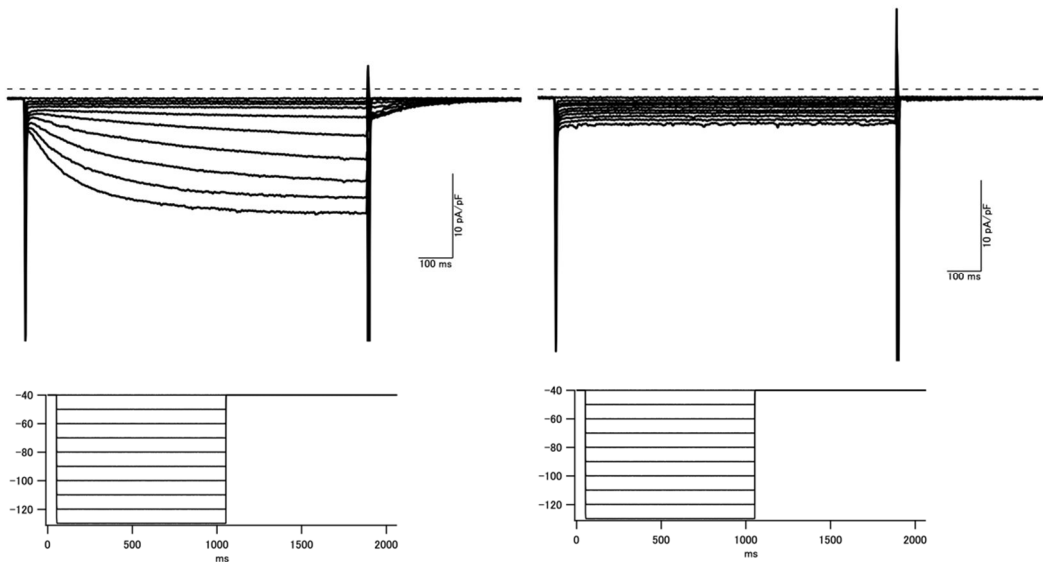


Fig.1 ホールセルパッチクランプ法で肺静脈心筋の電流を測定した過分極活性化電流(左)、Csにより抑制されている(右)

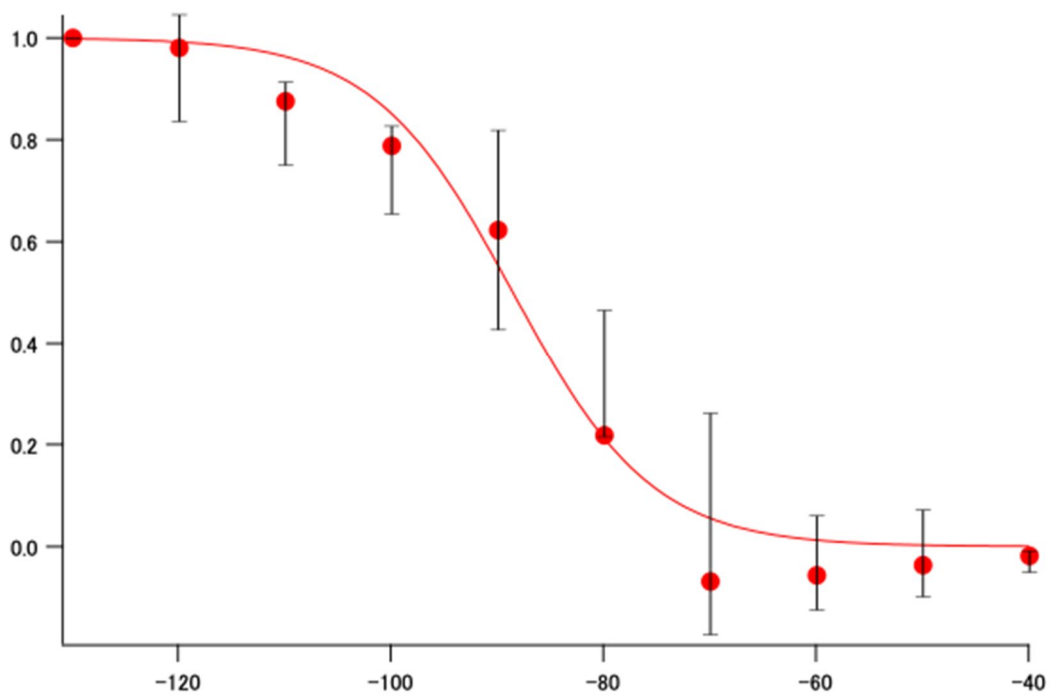


Fig.2 過分極活性化電流の活性化曲線

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Igarashi W, Takagi D, Okada D, Kobayashi D, Oka M, Ito T, Ishii K, Ono K, Yamamoto H, Okamoto Y.	4. 巻 24
2. 論文標題 Bioinformatic Identification of Potential RNA Alterations on the Atrial Fibrillation Remodeling from Human Pulmonary Veins.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International journal of Molecular science	6. 最初と最後の頁 10501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24131050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高木 大地
2. 発表標題 ヒト肺静脈心筋細胞の潜在的自動能に関する過分極活性化電流についての検討
3. 学会等名 日本心臓血管外科学会総会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------