

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25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590804

研究課題名（和文） 心房細動リスク因子（メタボリック症候群・心房拡大）における心房炎症機構の解明

研究課題名（英文） Mechanisms Triggering Atrial Fibrillation Associated with Mechanical Stretch of Atrium and Metabolic Syndrome

研究代表者

笹野 哲郎（SASANO TETSUO）

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・准教授

研究者番号：00466898

研究成果の概要（和文）：

心不全や高血圧の際に心房細動が生じやすいことは知られていたが、そのメカニズムは解明されていなかった。我々は、心房筋に伸展刺激を加えると心房筋が一過性にATPを放出すること、そのATPがマクロファージを遊走因子となることを発見した。マウスの心房伸展モデルでは、マクロファージの浸潤に続いて心房の炎症と線維化が生じ、心房頻拍が誘発された。ATP放出に寄与していたのはPannexin-2を中心とするギャップジャンクションファミリーチャンネルであり、このチャンネルの阻害薬は心房の炎症、線維化、頻拍を抑制した。このメカニズムは心房伸展の際の心房細動発症に重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Although atrial dilatation is well-known risk for atrial fibrillation, the mechanism linking them remains unclear. We aimed to elucidate the mechanism that mechanical stretch induced atrial inflammation, especially focusing the infiltration of macrophage. The stretched atrial myocytes released ATP in extracellular space, which evoked migration of macrophage. The gap junction family channel including pannexin-2 contributed this mechanism. Murine model of atrial stretch showed infiltration of macrophage, followed by inflammation, fibrosis, and atrial tachycardia. A gap junction channel blocker inhibited these changes. This mechanism may play pivotal role for atrial fibrillation under conditions with atrial dilatation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心房細動、マクロファージ、炎症、ATP、ギャップジャンクションチャンネル

1. 研究開始当初の背景

心房細動は最も頻度の高い持続性不整脈であり、脳梗塞の合併等により患者 QOL を著

しく低下させることが大きな社会問題となっている。加齢・心不全・心房拡大によって発症頻度が増加すること、メタボリック症候群に合併することが多いことから、高齢化社

会を迎えたわが国では特にその治療戦略の確立が急務である。

心房細動治療は当初はイオンチャネルをターゲットとする薬物治療が中心であったが、満足できる治療成績を上げるには至らなかった。これに代わる戦略として現在は2つのアプローチがとられている。一つはカテーテルアブレーションであり、特に孤立性心房細動の起源の多くが肺静脈内 myocardial sleeve であることから、肺静脈隔離法は心房細動の治療効果を著しく向上させた。一方心不全やメタボリック症候群に合併する心房細動は肺静脈起源でないものも多く、心房の線維化とイオンチャネル発現変化による心房リモデリングが主たる原因と考えられる。そこで第二の戦略として心房リモデリングに介入する“アップストリーム治療”が試みられ、レニン-アンジオテンシン系を標的とした治療は一定の成果をあげている。しかし、このアップストリーム治療は未だ発展途上であるともいえる。

高感度 CRP や IL-6 と心房細動の関連の研究等から、炎症は心房細動の危険因子と考えられ、一方、メタボリック症候群では全身の軽微な炎症があると考えられている。しかし、心房細動のリスク因子と心房炎症の直接的な関係はまだ明らかではない。そこで、メタボリック症候群や心房拡大などのリスク因子における心房炎症のメカニズムを理解することが、心房細動に対する効果的なアップストリーム治療を確立する上で重要と考え、本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

心房細動はメタボリック症候群や加齢・心不全・心房拡大に合併することが多いと報告されているが、これらのリスク因子と心房細動の直接的な因果関係は解明されていない。メタボリック症候群では全身の軽微な炎症があること、炎症が心房細動の危険因子であることから、心房の炎症は重要なファクターであると考えられる。本研究では、心不全・心房拡大やメタボリック症候群における心房炎症のメカニズムを包括的に解明し、心房細動に対する新たなアップストリーム治療のターゲットを探索することを目的とする。

特に、心房伸展刺激における心房の炎症を研究の中心として検討することとした。

3. 研究の方法

(1) in vitro study

①マウス心房筋細胞からの ATP 放出

マウス心房筋細胞の cell line である HL-1 細胞 (Louisiana State University, Dr.

Claycomb より分与) を用いて実験を行った。HL-1 細胞はシリコンチャンバーの上に培養し、Strex 社製 ST-140 を用いて 20%の伸展刺激を加えた。伸展刺激後より経時的に細胞外液を採取し、Promega 社製 ATP assay kit を用いて ATP 濃度を測定した。

②マウス心房筋細胞との共培養におけるマクロファージ遊走試験

マウス腹腔マクロファージ又はマウスマクロファージの cell line である J774 細胞を Modified Boyden chamber (Millipore 社製、径 8 μ m) の上で培養し、シリコンチャンバーの上に培養した HL-1 細胞と共培養を行った。その上で HL-1 細胞にのみ反復性機械的伸展刺激 (20%, 1Hz) を加えた。刺激 24 時間後に chamber ごとマクロファージを PKH26 (Sigma) を用いて染色し、共焦点顕微鏡にてマクロファージの遊走能を評価した。

③阻害剤及び siRNA

上記①②実験において、培地に Carbenoxolone (Sigma), Apyrase (Nacalai), PPADS (Alexis Corporation) などを加えて評価を行った。さらにマウス Pannxin-2 に対する siRNA を作成した。siRNA は Invitrogen 社 Block iT system を用いて作成し、Lentivirus を用いて HL-1 細胞に導入した。Blasticidin によるセレクションを行い、stable に Pannxin-2 がノックダウンされた細胞を前述の①②の実験に用いた。また、scramble sequence を同様に lentivirus を用いて導入したものをコントロールとした。

(2) in vivo study

①マウス TAC モデルの作成

マウス (C57/BL6J) に対して大動脈縮窄 (TAC) 手術を行い、10 日後に心房を取り出して心房重量の測定、組織学的評価を行った。組織学的評価は、HE 染色、Mallory Azan 染色を行い、さらにマクロファージの検出には F4/80 を用いた免疫染色を施行した。1 視野あたりの F4/80 陽性細胞をカウントして評価した。さらに、この TAC モデルマウスに対して、TAC 手術 3 日前より 10 日後まで連日 carbenoxolone (25 または 50nmol/g/day) を腹腔内投与した。コントロール群としては水を連日同量投与した群を用いた。また、開胸術のみを施行し、TAC を行わなかった群を Sham とした。

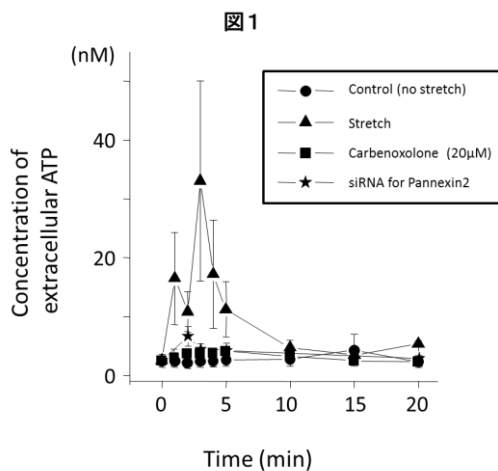
②光学的マッピング

TAC 術 10 日後にマウス心臓を取り出し、Langendorff 灌流下に光学的マッピングを行った。灌流は normal Tyrode (NaCl 135mM, KCl 5.4mM, CaCl₂ 1.8mM, MgCl₂ 0.53mM,

NaH₂PO₄ 0.33mM, Glucose 5.5mM, HEPES 5mM, pH 7.4)を用い、4ml/分で灌流を行った。Tyrode液はO₂ 95%, CO₂ 5%の混合ガスで酸素化し、37±1°Cに温度コントロールを行った。血液をwashoutした後Tyrode液を5分以上灌流して安定化させた。その後、電位感受性色素 di-4-ANEPPS(5μM)を10分間灌流し、Tyrode液でwashoutして染色を行った。1Fr電極カテーテルまたは針電極を右心房に留置し、電気刺激下に左心房の興奮をMiCAM Ultima(Brainvision社)を用いて撮影した。収縮によるartifactを抑制するため、Blebbistatin(5μM)を投与した。光学的マッピング下に、プログラム刺激装置(BC-03、フクダ電子より貸与)を用いて心房に電気刺激を与え、心房性不整脈の誘発を試みた。誘発プログラムは、3連までの期外刺激(基本周期120ms、S2-S4の期外刺激は有効不応期まで)及び頻回刺激(刺激間隔40msまで、99拍)を与えた。

4. 研究成果

(1) 伸展刺激による心房筋からのATP放出
 マウス心房筋細胞(HL-1)に機械的伸展刺激を加え、経時的に細胞外ATP濃度を測定した。図1に示すように、20%の伸展刺激により、刺激3分後をピークとする細胞外ATP濃度の上昇を認めた。Gap junction channel(GJC)のブロッカーであるCarbenoxolone(CBX)を培地に加えると、このATP放出は有意に抑制されことから、心房筋細胞膜に存在するGJCがこのATP放出経路であると考えられた。



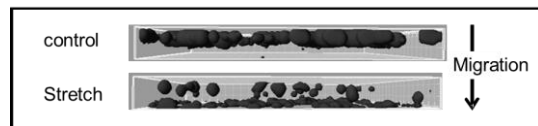
HL-1細胞に発現しているGJCを検索したところ、Connexin-40, 43, 45及びPannexin-2の発現が認められたが、ATP放出に大きく関与すると報告されているPannexin-1は発現していないことが判明した。siRNAにてPannexin-2をノックダウン

したHL-1細胞では細胞外へのATP放出が抑制されたことから、HL-1細胞においてはPannexin-2がATP放出に関与していると考えられた(図1)。

(2) 心房筋細胞の伸展刺激によるマクロファージ遊走の誘導

HL-1細胞とマクロファージを共培養し、HL-1細胞に伸展刺激を加えた。培養24時間後にPKH26を用いてマクロファージを染色し、chamberごと共焦点顕微鏡で撮影して3D画像の再構成を行った(図2)。コントロール(共培養(+), 伸展刺激(-))ではマクロファージの遊走は見られないが、伸展刺激下では多数のマクロファージが膜を通過してlower chamberに遊走していた。すなわち、心房筋細胞は伸展刺激によって液性因子を介してマクロファージ遊走を惹起していた。

図2



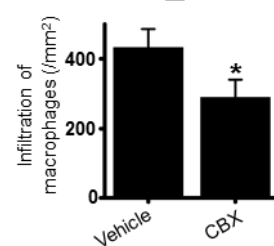
Boyden chamberのupper及びlower chamberのマクロファージ細胞数を計測し、その比よりmigration indexを算出して定量的評価を行った。共培養の培地に前述のGJCのブロッカーであるcarbenoxolone(CBX)や、ATP分解酵素であるapyrase、さらにP2レセプターの阻害薬であるPPADSを加えると、マクロファージの遊走は有意に抑制された。また、Pannexin-2をノックダウンしたHL-1細胞でもマクロファージの遊走を抑制することが判明した。

(3) 心房伸展モデルマウスにおけるマクロファージ浸潤の評価

心房伸展と心房リモデリングの関連をin vivoで検証するため、心房筋の伸展モデルを作成した。マウス(C57/BL6J)に対して大動脈縮窄(TAC)手術を行い、10日後に心房の伸展と炎症及び線維化の評価を行った。健常マウス、Sham手術群に比し、TAC手術10日後のマウスでは心房/体重比が増加していた。また、F4/80抗体を用いた免疫染色では、TAC術後には心内膜面に強いマクロファージの浸潤が見られた。

このTACモデルマウスに対し、手術3日前より10日後まで連日carbenoxolone(CBX)の腹腔内投与を行った。すると、TAC10日後のマクロフ

図3

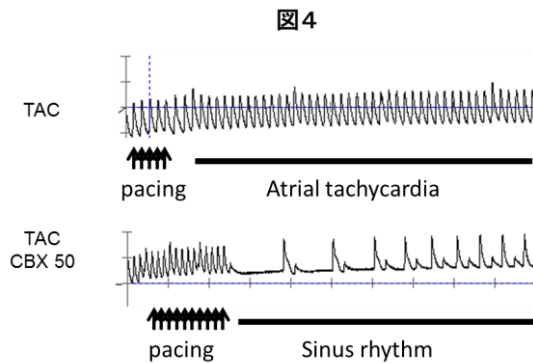


アージ浸潤は有意に抑制された (図3)。

さらに Mallory -Azan 染色による線維化の評価を行うと、TAC 術後には線維化の亢進が見られ、CBX 投与はこの線維化を抑制した。心房肥大に関しても、CBX 投与により TAC 術後の心房/体重比を抑制していた。

(4) 心房性不整脈誘発性の評価

Langendorff 灌流して電位感受性色素による染色を行い、心房の光学的マッピングを行ってプログラム刺激による心房細動誘発を試みた。プログラム刺激後に 10 拍以上持続するものを心房頻拍(AT)、10 拍未満のものを反復性心房応答(RAR)と定義し、それぞれの誘発性を評価した。TAC 術後には、健常マウス・Sham 手術群に比して高率に AT, RAR が誘発された。TAC 術前より連日 CBX を投与すると、この AT, RAR の誘発は有意に抑制された(図4)。



以上の結果より、心房伸展刺激においては、心房筋細胞から放出された細胞外 ATP がマクロファージの浸潤を誘導し、さらに心房の線維化を惹起して、心房性不整脈の基質を形成していることが明らかとなった。これは、心房リモデリングの初期メカニズムの一つとして重要な要素と考えられる。細胞外 ATP 放出に関するギャップジャンクションチャンネルの抑制は、心房細動治療の新たな選択肢となりうると考えられた。

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9件)

1. Sasano T, Takahashi K, Sugiyama K. Gene therapy for cardiac arrhythmias. *Acta Cardiologica Sinica* 2013; 29: 226-234.
2. Chang KC, Sasano T, Huang S. NOS1AP, an emergent new genetic marker for QT prolongation and sudden cardiac death. *Acta Cardiologica Sinica* 2013; 29: 217-225.
3. Nakamura T, Hachiya H, Tanaka Y,

Yagishita A, Sugiyama K, Suzuki M, Kawabata M, Sasano T, Hirao K, Isobe M. Distribution of the origin of adenosine triphosphatesensitive atrial tachycardias with the earliest activation recorded in the his bundle catheter - are they limited to the immediate vicinity of the his bundle? -. *Circ. J.* 2013;77:626-631.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/77/3/77_CJ-12-1025/_article

4. Oishi S, Sasano T, Tateishi, Y, Tamura N, Isobe M, Furukawa T: Stretch of atrial myocytes stimulates recruitment of macrophages via ATP released through gap-junction channels. *J Pharmacol Sci* 2012;120:296-304.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/120/4/120_12202FP/_article

5. Soleimanifard S, Abd-Elmoniem K, Sasano T, Agarwal H, Abraham MR, Abraham T, Prince J. Three-dimensional regional strain analysis in porcine myocardial infarction: A 3T magnetic resonance tagging study. *J Cardiovasc Magn Reson* 2012;14:85

doi: 10.1186/1532-429X-14-85.

6. Greener ID, Sasano T, Wan X, Igarashi T, Strom M, Rosenbaum DS, Donahue JK: Connexin43 gene transfer reduces ventricular tachycardia susceptibility after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1103-1110.

doi: 10.1016/j.jacc.2012.04.042.

7. Yagishita A, Hachiya H, Nakamura T, Sugiyama K, Tanaka Y, Sasano T, Kawabata M, Isobe M, Hirao K. Coexistent idiopathic left ventricular tachycardia and atrial fibrillation induced by maintained va conduction during ventricular tachycardia. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 2012; 35: e353-5.

doi: 10.1111/j.1540-8159.2012.03405.x.

8. Abd-Elmoniem K, Santaularia Tomas M, Sasano T, Soleimanifard S, Vonken E-J, Youssef A, Agarwal H, Dimaano V, Calkins H, Stuber M, Prince J, Abraham T, Abraham M. Assessment of distribution and evolution of mechanical dyssynchrony in a porcine model of myocardial infarction by cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2012; 14: 1

doi: 10.1186/1532-429X-14-1

9. Yamashiro K, Sasano T, Tojo K, Namekata M, Kurosawa J, Sawada N, Suganami T, Kamei Y, Tanaka H, Tajima N, Utsunomiya K, Ogawa Y, Furukawa T. Role of transient receptor potential

vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 398: 284-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.082.

〔学会発表〕 (計 32 件)

1. Sasano T, Terui M, Oya M, Sugiyama K, Maeda S, Tanaka Y, Kawabata M, Yokoyama Y, Hirao K, Matsuura M. Noninvasive Assessment of Local Excitation in Pulmonary Vein and Left Atrium by Novel High-Sensitive Magnetocardiography. Asia-Pacific Heart Rhythm Society meeting, Taipei, 2012 Oct 4.
2. Sasano T, Terui M, Nakamura T, Sugiyama K, Yagishita A, Tanaka Y, Kawabata M, Hachiya H, Kawara T, Hirao K. Noninvasive Detection of Pulmonary Venous Excitation by Novel High-Sensitive Vector Magnetocardiography. Heart Rhythm Society meeting, Boston, USA, 2012 May 9.
3. Sasano T, Hirao K, Isobe M, Okamura T, Kato N, Furukawa T. NOS1AP Deletion Enhanced Susceptibility to Ventricular Tachyarrhythmias and Cardiac Death in Pressure Overload. American Heart Association, Orlando, USA, 2011 Nov.
4. Sasano T, Tsuchiya J, Hirao K, Okamura T, Kato N, Isobe M, Furukawa T. Oxidative Stress Enhances Arrhythmogenicity and Impairment of Cardiac Function in Nos1ap Deleted Mice. 14th Tokyo-Taipei-Seoul Arrhythmia Conference, Busan, South Korea, 2011 Oct.
5. Sasano T, Oishi S, Tamura N, Isobe M, Furukawa T. Extracellular ATP Evokes Infiltration of Macrophage in Stretched Atrium. Asia-Pacific Heart Rhythm Society meeting, Fukuoka, 2011 Sep. (Symposium)
6. Koizumi A, Sasano T, Kimura W, Miura N, Furukawa T. Genetic destruction of transcription factor in His-Purkinje system mimicked J wave syndrome in mouse. Asia-Pacific Heart Rhythm Society meeting, Fukuoka, 2011 Sep.
7. Sasano T, Matsubara S, Hirao K, Isobe M, Okamura T, Kato N, Furukawa T. Genetic NOS1AP Deletion Enhances Ventricular Tachycardia and Cardiac Death in Pressure Overload. Asia-Pacific Heart Rhythm Society meeting, Fukuoka, 2011 Sep.
8. Sasano T, Horigome Y, Takahashi Y, Ogiwara I, Furukawa T:

Hyperthermia-induced Ventricular Tachycardia and Sudden Death in Mouse Model of Dravet Syndrome. Asia-Pacific Heart Rhythm Society meeting, Fukuoka, 2011 Sep.

9. Sasano T, Matsubara S, Furukawa T, Hirao K, Isobe M: Genetic Deletion of NOS1AP Induces Ventricular Tachycardia and Sudden Cardiac Death in Pressure Overloaded Condition. 2011 Venice Arrhythmia conference, Venice, Italy, 2011 Oct 10th.

10. Sasano T, Oishi S, Furukawa T. Autocrine/Paracrine Mechanisms for Macrophage Migration Evoked by Mechanical Stretch of Atrial Myocytes. 13th Tokyo-Taipei-Seoul Arrhythmia Conference, Fukuoka, 2010 Oct.

(他 22 件)

〔図書〕 (計 1 件)

1. Sasano T, Kurokawa J. Remodeling of potassium channels in cardiac hypertrophy In: Molecular Mechanisms of Cardiac Remodeling. Jugdutt BI, Dhalla NS (Eds): Springer, New York, in press. (2012)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究所
生命機能情報解析学ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/gradh/bi/index.html>

東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報
薬理学ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/mri/cph/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹野 哲郎 (SASANO TETSUO)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究
科・准教授

研究者番号 : 00466898

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

古川 哲史 (FURUKAWA TETSUSHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号 : 80251552

