

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390053

研究課題名(和文)心房細動発生における活性酸素種の役割の解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Role of reactive oxygen species in the genesis of atrial fibrillation and novel therapeutic strategy

研究代表者

中谷 晴昭 (NAKAYA, HARUAKI)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60113594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：活性酸素種(ROS)への慢性暴露に着目し、心筋・骨格筋特異的Mn-SOD欠損マウス(H/M-SOD^{-/-})の心筋を用いて、その電気生理学的異常を明らかにし、抗酸化作用物質の慢性投与が、その電気生理学的変化を軽減するか否かを検討した。その結果ROSへの慢性暴露はK⁺電流密度の減少によってAPD₉₀の延長等の電気生理学的異常を惹起して、心房細動易誘発性に繋がるが、抗酸化作用物質の慢性投与によってこれらの電気生理学的異常が軽減することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species (ROS) are suggested to play an important role in the genesis of atrial fibrillation in elderly patients. However, a direct evidence of arrhythmogenic properties associated with chronic exposure to ROS is lacking. This study was undertaken to evaluate electrophysiological alterations induced by chronic exposure to ROS using heart/muscle-specific manganese-superoxide dismutase-deficient (H/M-SOD^{-/-}) mice. Atrial action potential was prolonged with a decreased K⁺ current density and susceptibility to atrial fibrillation was increased. In atrial tissues of H/M-SOD^{-/-} mice fibrotic changes and decreased expression of connexin 43 protein were observed. These electrophysiological and histological abnormalities were lessened by chronic intake of an antioxidant in H/M-SOD^{-/-} mice. Thus, chronic exposure to ROS can increase susceptibility to atrial fibrillation and dietary intake of antioxidant nutrients may prevent oxidative stress-induced arrhythmias.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：活性酸素種 老化 心房細動 アップストリームアプローチ Mn-SOD欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

細胞内で産生される活性酸素種 (ROS) は蛋白質や脂質といった生体成分を酸化し、細胞老化と共にその機能不全を引き起こす。しかしながら、それがどのような機序で惹起されるかについては十分検討されておらず、その予防手段も確立されていない。加齢に伴って最も罹患率の高くなる不整脈は心房細動であり、65歳を越える老人においては5%以上にその発生が認められ、脳梗塞という合併症を惹起する事から、大きな医療的課題となっている。

2. 研究の目的

老化によって発生率が高まる心房細動の発生機序としてROSの慢性的負荷に着目し、心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスを用いて病態生理学的役割を明らかにし、新たな治療手段の開発に資する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスの作製

共同研究者の白澤卓二教授 (順天堂大学医学部)、清水孝彦准教授 (千葉大学医学研究院) の協力で、組織特異的に Mn-SOD を欠損させたマウスを作製した。すなわち、心筋・骨格筋特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Muscle Creatine Kinase (MCK)-Cre マウスを組織特異的に Mn-SOD Exon3 両側に loxP 配列を挿入したマウス (Mn-SOD flox マウス) と体外受精にて交配し Conditional KO マウスを作製した。この心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスを順次作製し、そのマウスを薬物非投与群および抗酸化作用を持つ薬物を慢性的に投与した薬物投与群として実験に供した。実験に使用する前に麻酔下で肢誘導から心電図を記録した。

(2) 心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウス心臓の電気生理学的研究

既に我々が報告した方法 (Liao et al, *J Clin Invest* 2010) に従い、マウス摘出心臓を酸素化した栄養液で灌流したランゲンドルフ心においてその電気生理学的特性を解析した。具体的には右房に接着させたペースング電極から、プログラム電気刺激装置を用いて早期電気刺激法によって有効不応期 (ERP) の測定を行った。同時に右房から左房への伝導時間も測定した。また、右心房バースト刺激を行い、心房細動誘発率を測定した。これらの電気生理学的パラメーターについて、上記の方法により薬物投与および非投与の対照群、薬物投与および非投与の Mn-SOD 欠損マウス群の摘出心において検討を行った。

心室の電気生理学的評価を麻酔開胸下のマウスを用いて行った。心室プログラム刺激によって ERP を測定すると共に、バースト刺激で心室頻拍、心室細動の誘発性について

検討した。

(3) 心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウス心筋細胞の活動電位および膜電流の解析

心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスおよび野生型 (WT) マウスより、コラゲナーゼ処理によって心室筋細胞および心房筋細胞を単離した。その心房筋細胞においてパッチクランプ法を適用し、カレントクランプモードによって活動電位を記録すると共に、ボルテージクランプモードで各種膜電流を測定し、膜容量により補正する形で電流密度を算出した。電流系では速い L 型 Ca^{2+} 電流、外向き K^{+} 電流、内向き整流 K^{+} 電流を測定した。WT マウスおよび心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスの心筋細胞の間で活動電位、特に活動電位幅に差異が認められるか、検討を行った。また、心筋細胞の膜電流系の電流密度に差異があるかも検討した。そして両群マウスへの抗酸化薬の慢性投与によってこれらのパラメーターに対する影響があるか否かについて検討を行った。

(4) 心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウス心房の組織学的変化とコネキシン発現の検討

これらマウスの心房組織の線維化を Masson's trichrome 染色で評価した。また、コネキシン 43 およびコネキシン 43 の発現を免疫組織染色で検討した。ここでも、抗酸化薬の長期投与によって心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスにおける線維化やコネキシン分布の状況が影響を受けるか否かを検討した。

4. 研究成果

活性酸素種 (ROS) は心筋細胞の老化やそれに伴う心房細動等の不整脈の発生に関与するとされているが、ROS の慢性負荷がどのような電気生理学的異常を起こすか明らかとなっていない。本研究では心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損 (H/M-SOD^{-/-}) マウスを用い、その病態生理学的解析を行った。

(1) H/M-SOD^{-/-} マウスにおける心電図変化

23 - 25 週齢の野生型 (WT) マウスと H/M-SOD^{-/-} マウスから、麻酔下に心電図を記録した。WT マウスの心電図に比して、H/M-SOD^{-/-} マウスの心電図では QRS 幅が有意に延長すると共に、PR 間隔および QT 間隔が有意に延長していた。抗酸化作用を持つプロシアニジン等のポリフェノールを含むリンゴポリフェノール (AP) を長期投与すると、野生型マウスの心電図は変化しなかったが、H/M-SOD^{-/-} マウスの心電図では QRS 幅延長が有意に軽減し、QT 間隔延長も軽減傾向が見られた。

(2) H/M-SOD^{-/-} マウスにおける心室筋の電気生理学的変化

23 - 25 週齢の WT マウスと H/M-SOD^{-/-} マウスを麻酔下、開胸して in vivo において心室プログラム刺激を行い、有効不応期(ERP)を測定し、バースト刺激で心室頻拍(VT)心室細動(VF)の誘発性を検討した。H/M-SOD^{-/-} マウスの心室筋では WT マウスの心室筋に比して、ERP が有意に延長していたが、AP の慢性投与を受けた H/M-SOD^{-/-} マウスの心室筋では ERP 延長は減弱していた。WT マウスでは心室バースト刺激で VT/VF の誘発は認められなかったが、H/M-SOD^{-/-} マウスでは 19 例中 12 例で VT/VF の誘発があり、AP の慢性投与でその発生率は 17 例中 5 例に減少した。

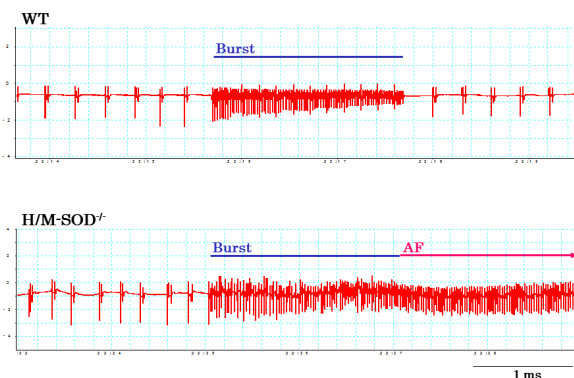
(3) H/M-SOD^{-/-} マウスの心室筋細胞の電気生理学的変化

酵素的に単離した WT マウスと H/M-SOD^{-/-} マウスの心室筋細胞から活動電位を記録した。WT マウス心室筋細胞に比して、H/M-SOD^{-/-} マウスの心室筋細胞では 90% 再分極レベルでの活動電位幅 (APD₉₀) が有意に延長していた。また、H/M-SOD^{-/-} マウスの心室筋細胞では早期脱分極様の異常自動能を示す心室筋細胞が多かった。AP の慢性投与を受けた H/M-SOD^{-/-} マウスの心室筋細胞では APD₉₀ の延長や異常自動能発生率が軽減していた。

WT マウスと H/M-SOD^{-/-} マウスの心室筋細胞の膜電流系についても検討を行った。これら二種類の心室筋細胞の間で、L 型 Ca²⁺ 電流密度および脱分極時の外向き K⁺ 電流密度に差異は認められなかったが、内向き整流 K⁺ 電流密度は減少していたが、AP の慢性投与で有意に回復していた。

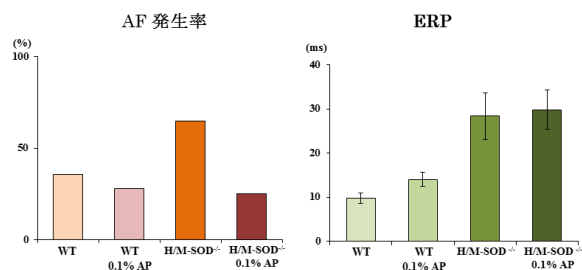
(4) H/M-SOD^{-/-} マウス心房筋の電気生理学的変化

12 - 20 週齢の WT マウスと H/M-SOD^{-/-} マウスから麻酔下で心臓を摘出し、酸素化した栄養液で灌流してランゲンドルフ心を作成した。心房組織の ERP を測定すると共にバースト刺激によって心房細動の易誘発性について検討した。



WT および H/M-SOD^{-/-} マウス摘出心における心房細動 (AF) 誘発実験

H/M-SOD^{-/-} マウスの心房では WT マウスの心房に比して、ERP が延長し、AP の慢性投与によって野生型マウス心房では変化がなかったが、H/M-SOD^{-/-} マウスの心房では ERP の延長が軽減した。また、バースト刺激による心房細動誘発試験では、H/M-SOD^{-/-} マウス摘出心では WT 摘出心に比して、心房細動誘発率が高まっていた。AP の慢性投与により、WT マウス心では心房細動誘発率は変化しなかったが、H/M-SOD^{-/-} マウス心では心房細動誘発率が減少していた。



WT および H/M-SOD^{-/-} マウス摘出心における心房細動 (AF) 誘発率と ERP

(5) H/M-SOD^{-/-} マウスの心房筋細胞の電気生理学的変化

酵素的に単離した心房筋細胞からパッチクランプ法を用いて活動電位および膜電流系について検討した。H/M-SOD^{-/-} マウスの心房筋細胞では WT マウスの心房筋細胞に比して活動電位幅 (APD₉₀) が延長し、L 型 Ca²⁺ 電流密度は変わらなかったものの、有意に外向き K⁺ 電流密度が減少していた。

(6) H/M-SOD^{-/-} マウスの心房組織変化

心房組織を Masson's trichrome 染色を行って線維化の度合いを検討すると、H/M-SOD^{-/-} マウスの心房筋組織は WT マウスの心房筋組織と比して、線維化が進み、AP 慢性投与でその度合いは減弱していた。

また、心房組織をコネキシン 43 の免疫組織染色を行って、その量的変化を検討した。H/M-SOD^{-/-} マウスの心房筋組織は WT マウスの心房筋組織と比して、コネキシン 43 の分布が減少しており、AP の慢性投与で回復傾向が認められた。H/M-SOD^{-/-} マウスの心室筋組織においても WT マウスの心室筋組織に比して、コネキシン 43 の減少が認められており、心室組織でも同じ傾向が認められた。

ROS への慢性暴露は、心室組織においても様々な電気生理学的変化を惹起し VT/VF 易誘発性を高めたが、心房組織においても、K⁺ 電流密度の減少に活動電位幅延長等の電気生理学的変化を来し、心房細動易誘発性につながる事が明らかとなった。また、これらの心室・心房の電気生理学的変化は抗酸化物質の慢性投与によって軽減する事から、ROS は心室および心房の不整脈発生に重要な役割を果たす事が確認された。

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
下線)

[雑誌論文](計 13 件)

Sunagawa T, Shimizu T, Matsumoto A, Tagashira M, Kanda T, Shirasawa T, Nakaya H. Cardiac electrophysiological alterations in heart/muscle-specific manganese-superoxide dismutase-deficient mice: Prevention by a dietary antioxidant polyphenol. *BioMed Research International*. 2014; 2014: 1-12 DOI: 10.1155/2014/704291 査読有
中谷 晴昭. 抗不整脈薬. *医薬ジャーナル Medicine and Drug Journal 新薬展望 2014 増刊号*. 2014; 50(S-1): 235-240 査読無
Nakaya H. Role of K_{ATP} channels in cardiac arrhythmias. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2013; 19(3): 237-243 DOI: 10.1177/1074248413515078 査読有
中谷 晴昭. 心房細動の発生機序—その変遷も含めて—臨床と研究 特集/最近の心房細動の診療. 2013; 90(9): 5-8 査読無
中谷 晴昭. <集中治療におけるアミオダロン注の位置づけ>アミオダロン注の電気薬理学的特性. *Peog. Med*. 2013; 33: 762-766 査読無
中谷 晴昭. ニコランジル研究会 - 25年の軌跡と今後の課題 - 基礎. *Ther Res*. 2013; 34: 348-352 査読無
中谷 晴昭, 松本 明郎. 5.心電学研究の進歩. *循環器学 2012 年の進歩 循環器専門医*. 2013; 21: 108-112 査読無
Sunagawa T, Watanabe K, Ozawa Y, Nakashima S, Kanda T, Tagashira M, Sami M, Kaneko T, Tahara S, Nakaya H, Shirasawa T, Shimizu T. Apple polyphenols regulate mitochondrial superoxide generation and extend survival in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *Int J Life Sci Med Res*. 2012; 2: 46-51 査読有
Nishida A, Takizawa T, Matsumoto A, Miki T, Seino S, Nakaya H. Inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels and L-type Ca²⁺ channels by amiodarone elicits contradictory effect on insulin secretion in MIN6 cells. *J Pharmacol Sci*. 2011; 116: 73-80 査読有
Yamashita T, Inoue H, Okumura K, Kodama I, Aizawa Y, Atarashi H, Ohe T, Ohtsu H, Kato T, Kamakura S, Kumagai K, Kurachi Y, Koretsune Y, Saikawa T, Sakurai M, Sato T, Sugi K, Nakaya H, Hirai M, Hirayama A, Fukatani M, Mitamura H, Yamazaki T, Watanabe E, Ogawa S, J-RHYTHM

Investigators. Randomized trial of angiotensin receptor blocker vs. dihydropyridine calcium channel blocker in the treatment of paroxysmal atrial fibrillation with hypertension (J-RHYTHM Study). *Europace*. 2011; 13: 473-479 DOI: 10.1093/europace/euq439. 査読有
Nakaya H. Novel antiarrhythmic drugs for the treatment of atrial fibrillation: Current perspective. *J Arrhythmia*. 2011; 27: 156-157 査読有

[学会発表](計 24 件)

野呂瀬 一美, 小倉 武彦, Li KeXin, Feng Xue, 中谷 晴昭. 細胞内寄生体 *Toxoplasma gondii* による心臓機能障害. 第 83 回日本寄生虫学会 2014. 3. 27 愛媛
小島 章光, 西田 洋文, 松本 明郎, 岩田 和美, 白山 武司, 矢部 千尋, 中谷 晴昭. 低酸素時における洞徐脈に対する Nox1/NADPH オキシダーゼの保護作用. 第 87 回日本薬理学会年会 2014. 3. 20 仙台
Nakaya H. Assessment of drug effects on multiple ionic currents in vitro & in vivo. 第 1 回心臓安全性に関するシンクタンクミーティング 2014 in 霧島 2014. 1. 11 霧島
中谷 晴昭, 鈴木 一正, 霊園 良恵, 清水 孝彦, 松本 明郎, 砂川 忠広, 白澤 卓二. 心筋・骨格筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスの心房筋における電気生理学的異常. 第 30 回日本心電学会学術集会 2013. 10. 11 青森
Norose K, Ishikawa T, Li K, Ogura T, Nakaya H, Furuya M, Osawa M.. Analysis of the cardiac disorder caused by the intracellular parasite *Tosoplasma gondii*. 第 15 回国際免疫学会 2013. 8. 23 イタリア
Nakaya H, Sunagawa T, Shimizu T, Matsumoto A, Maruyama H, Tagashira M, Kanda T, Shirasawa T. Increased susceptibility to ventricular arrhythmias in heart/muscle-specific Mn-superoxide dismutase-deficient mice: improvement with dietary antioxidant polyphenols. 第 30 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会総会 2013. 6. 29 サンディエゴ (アメリカ合衆国)
石川 敬, 小倉 武彦, 中谷 晴昭, 古屋 充子, 大澤 光次郎, 李 可歆, 野呂瀬 一美. 細胞内寄生体 *Toxoplasma gondii* による心臓障害の解析. 第 82 回日本寄生虫学会 2013. 3. 30 東京
佐見 学, 砂川 忠広, 田頭 素, 神田 智正, 中谷 晴昭, 白澤 卓二, 清水 孝彦. りんごポリフェノールは心筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスにおいて活性酸素の生成を抑

制する. 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013. 3. 25 仙台
中谷 晴昭. アミオダロン注の電気薬理学的特性. 第 17 回アミオダロン研究会 2012. 10. 27 東京
山本 涉, 橋本 哲郎, 松浦 潤治, 荻野恭浩, 町田 泰一, 小林 恒文, 山中 義弘, 石綿 紀久, 山下 徹, 谷本 耕司郎, 三好俊一郎, 中谷 晴昭, 小川 聡. イヌ心房ペーシングモデルにおける選択的 K_{ACh} チャネル遮断薬 NTC-801 の抗心房細動効果: c および 群薬との比較. 第 29 回日本心電学会学術集会 2012. 10. 12 千葉
中谷 晴昭. 心房細動薬物療法の現状と未来: アップストリームアプローチの重要性. 第 2 回 BUNGO AF Forum 2012. 8. 12 大分
中谷 晴昭. 心房細動の薬物療法の現状と未来. トランスレーショナルセミナー IN DOKKYO 2012. 6. 18 栃木
中谷 晴昭. 病態解明における機能研究の重要性とその先に見えるもの. 第 60 回循環力学研究会 2012. 5. 26 東京
松本 明郎, 砂川 忠弘, 清水 孝彦, 小澤 裕介, 丸山 浩央, 田頭 素行, 白澤 卓二, 中谷 晴昭. 心筋特異的 Mn-SOD 欠損マウスにおける心室不整脈易誘発性とリンゴポリフェノール投与による改善. 第 85 回日本薬理学会年会 2012. 3. 14 京都
Nakaya H. Pharmacological approaches to atrial fibrillation: current status and future perspective. 45th ASCEPT Annual Scientific Meeting 2011 2011. 12. 4 オーストラリア
中谷 晴昭. 心不全におけるイオンチャンネルの変化とリモデリング. 第 15 回日本心不全学会学術集会 2011. 10. 13 鹿児島
Nakaya H. Pharmacological treatment of atrial fibrillation: An overview. 第 28 回日本心電学会学術集会, 第 26 回日本不整脈学会学術大会, The 4th APHRS 合同学術集会 2011. 9. 22 福岡
西田 淳, 滝沢 太一, 松本 明郎, 三木 隆司, 清野 進, 中谷 晴昭. アミオダロンの ATP 感受性 K^+ チャネルと L 型 Ca^{2+} チャネルに対する抑制作用は互いに相殺し合って MIN6 細胞からのインスリン分泌を増強しない. 第 124 回日本薬理学会関東部会 2011. 6. 4 東京
Yamashita T, Ogura T, Nakaya H. Antiarrhythmic effects of NTC-801, a selective acetylcholine-activated K^+ channel blocker, on experimental atrial fibrillation. Heart Rhythm 2011 2011. 5. 4 サンフランシスコ (アメリカ合衆国)
Matsumoto R, Machida T, Hashimoto N, Kuwahara I, Ogino Y, Matsuura J, Yamamoto W, Itano Y, Zamma A, Kamon J, Kobayashi T, Ishiwata N,

Yamashita T, Ogura T, Nakaya H. Electropharmacological profiles of NTC-801, a novel selective acetylcholine-activated K^+ channel blocker. Heart Rhythm 2011 2011. 5. 4 サンフランシスコ (アメリカ合衆国)

[図書] (計 13 件)

中谷 晴昭. 第 37 章 心臓の働き. “標準生理学 第 8 版” 医学書院 2014. 1140 (585-599)
中谷 晴昭. K_{ATP} チャネルの基礎から臨床まで. “Medical Topics series 不整脈 2013” メディカルトリビュー社 2013. 203(23-32)
中谷 晴昭. 5. 不整脈の治療法. “内科学書改訂第 8 版 3 循環器疾患 腎・尿路疾患” 中山書店 2013. 537(116-119)
中谷 晴昭. 抗不整脈薬開発の変遷と将来への展望. “日本心電学会 30 年の軌跡” 日本心電学会 2013. 419(143-147)
中谷 晴昭. 第 3 章 心筋細胞 K^+ チャネルに対するペプリジルの作用. “循環器薬物治療実践シリーズ ペプリジルの基礎と臨床 上手に使うコツ” ライフメディコム 2013. 126(39-51)
Nakaya H. Basic research on nicorandil: history and future. “25th Nicorandil Scientific Meeting” ライフサイエンス社 2012. 15(13)
中谷 晴昭. 10 代謝疾患に対する薬物. “コメディカルのための薬理学 第 2 版” 朝倉書店 2012. 240(161-168)
中谷 晴昭. 第 2 章 不整脈 1 抗不整脈の薬の電気生理学的基盤と心室性不整脈の治療. “実験薬理学 実践治療薬” 金芳堂 2012. 372(191-200)
中谷 晴昭. 6 K^+ 電流. “不整脈学 Cardiac Arrhythmia” 南江堂 2012. 614(21-24)
中谷 晴昭. 概日リズムを考慮した抗不整脈薬の使い方. “不整脈+PLUS No.5” ライフサイエンス社 2012. 15(12-13)
中谷 晴昭. 総論 D. 抗不整脈薬, 各論 D. 心筋梗塞と不整脈, E. Brugada 症候群. “そうだったのか! 臨床に役立つ不整脈の基礎” メディカル・サイエンス・インターナショナル 2012. 199(50-67, 107-128)
中谷 晴昭, 松本 明郎. 基礎 3. 酸化ストレスと不整脈. “Medical Topics Series 不整脈 2011” メディカルレビュー社 2011. 224(37-42)
中谷 晴昭. 心不全に伴う不整脈の基礎と薬理学. “循環器薬物治療実践シリーズ X 心不全に伴う不整脈の治療戦略” ライフメディコム 2011. 105(9-17)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 晴昭 (NAKAYA, Haruaki)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：60113594

(2) 連携研究者

松本 明郎 (MATSUMOTO, Akio)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：60437308

西田 洋文 (NISHIDA, Hirohumi)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：80513043

(3) 研究協力者

霊園 良恵 (REIEN, Yoshie)
千葉大学・医学部・技術職員

丸山 浩央 (MARUYAMA, Hiroo)
千葉大学・医学部・技術職員

立花 知子 (TATIDANA, Tomoko)
千葉大学・大学院医学研究院・派遣技術
職員

鈴木 一正 (SUZUKI, Kazumasa)
千葉大学・大学院生