

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591075

研究課題名(和文) 高血圧性心房電気的リモデリングに対する伸展活性化チャネル阻害による心房細動治療

研究課題名(英文) Atrial electrical remodeling in hypertension and diabetes mellitus

研究代表者

横式 尚司 (Yokoshiki, Hisashi)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：40360911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：左心房圧調節ラット灌流心を作成し、圧負荷条件下に、正常血圧心(WKY)と自然発症高血圧ラット(SHR)の心房細動誘発率を検討したが、有意差を見出すことができなかった。そのため、他の生活習慣病として、糖尿病に着目した。糖尿病モデルラットでは心房細動誘発率が有意に高く、誘発された心房細動の持続時間も延長していた。膜電位光学マッピングによる検討では、右房内の活動電位持続時間が延長しており、その空間的不均一性が有意に増大していた。また、伝導速度の低下ならびに伝導のばらつきも増大しており、糖尿病ラットの心房細動誘発性機序と考えられた。

研究成果の概要(英文)：As a hypertensive experimental animal, spontaneously hypertensive rats (SHR) were used. Using the Langendorff-perfused hearts, elevation of left atrial pressure did not increase the inducibility of atrial fibrillation in SHR compared to normotensive Wistar-Kyoto rats (WKY). On the other hand, the CaMKII autophosphorylation, which has been reported to play an important role in the genesis of atrial fibrillation, was significantly increased in SHR. In addition to hypertension, diabetes mellitus (DM) is an independent risk of atrial fibrillation. Therefore, DM was induced by streptozotocin in WKY. The duration of atrial tachyarrhythmia was longer in DM. The conduction velocity (CV) was decreased, and its heterogeneity was greater in DM. Average action potential duration of 80% repolarization (APD(80)) from four areas within the RA was prolonged, and the coefficient of variation of APD(80) was greater in DM than control, indicating the possible substrate for atrial fibrillation.

研究分野：循環器内科

キーワード：心房細動 伸展活性化チャネル 高血圧 糖尿病 膜電位光学マッピング カルシウムカルモジュリン 依存性タンパク質キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 心房細動基質としてのリモデリング
 心房細動が持続することにより、心房細動が発生し易くなることが報告されており、AF Begets AF (Wijffels, Allessie ら, Circulation 1995) として知られている。その原因として、短期的には心房不応期・活動電位持続時間の短縮、頻度依存性の心房不応期の不適応が挙げられており、心房筋の電気的リモデリングとして知られている。さらに、長期間にわたり心房細動が持続すると、心房は拡大し、心房の線維化といった組織学的変化が生じる。このような変化は伝導障害を引き起こすことになり、構造的リモデリングといわれている。特に、構造的リモデリングが生じると、心房細動の持続を助長し、悪循環をきたすだけでなく、可逆性が困難となるため、早期の介入が必要と考えられる。

(2) 心房リモデリングの誘発因子

AF Begets AF の概念が提唱されて以来、心房細動の実験的研究は、心房高頻度ペーシングによって生じる心房細動基質形成に関する報告が多数なされている。一方、臨床的には、心不全、高血圧といった基礎心疾患が背景にある場合、心房細動が発症しやすくなることが認識されているが、心不全モデル動物の心房筋では、むしろ活動電位持続時間・不応期が延長しているとの報告が散見される。さらに、臨床的に遭遇する頻度が最も高い高血圧を背景にした心房細動基質(以下、高血圧性心房電气的リモデリングと呼ぶ)に関する研究は極めて少なく、必ずしも統一した見解は得られていない。

(3) 高血圧における圧負荷伸展刺激が心房細動基質になるか?

高血圧患者が急性左心不全を発症すると、心房細動を合併し、心不全の軽快とともに心房細動も消失することは日常診療でしばしば遭遇する。すなわち、高血圧に罹患した心房筋に急性の左房圧上昇という修飾因子が加わると、心房細動発症基盤が形成されることが推測される。実験的には、(正常血圧の) 兎ランゲンドルフ灌流心にて心房に急性圧負荷を与えると、心房不応期の短縮ならびに心房細動の誘発性が高まることが報告されている (Bode et al, Circulation 2000) が、高血圧心における心房圧負荷の影響は検討されていない。さらに、心房圧負荷に伴う心房細動の誘発性は、伸展活性化チャネル (stretch-activated channel: SAC) の機能を阻害する Gd³⁺ や GsMTx-4 (クモ毒から抽出されたペプチド) にて抑制された (Bode et al, Circulation 2000; Nature 2001) が、圧負荷に伴う心房不応期の短縮は Gd³⁺ や GsMTx-4 にて影響を受けなかったことより、不応期短縮以外の機序が想定される。

2. 研究の目的

心房細動発症因子のひとつである高血圧において、線維化や心房拡大といった心房細動

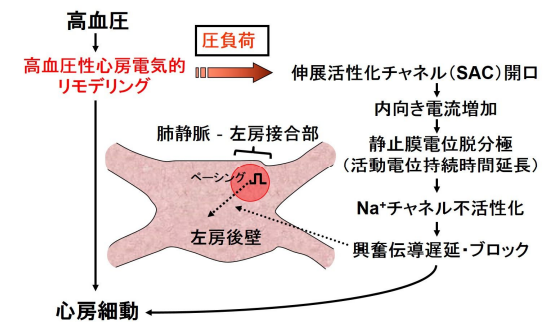
基質が形成される前の初期段階にて、細胞レベルでの心房筋の電気生理学的変調、すなわち、

(1) 高血圧性心房電气的リモデリングが生じているのか?

(2) 急性左心不全でみられるような左房圧の上昇が、SAC を介した機序によって高血圧性心房電气的リモデリングを助長しうるのか?

(3) 高血圧性心房電气的リモデリングに圧負荷が加わると、SAC を介した内向き電流の増大により静止膜電位が脱分極し、心房筋の興奮伝導障害を引き起こすか?

という仮説を検証する。

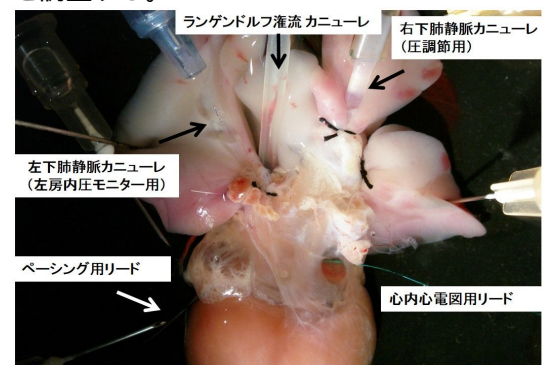


3. 研究の方法

SHR では12週齢にて十分な高血圧を呈していることから、16~18週齢の SHR を用いて、以下の実験を行う。なお、正常血圧心として同週齢の Wistar Kyoto ラット (WKY) を用いる。

(1) 左心房圧調節灌流心の作成

ラット摘出灌流心の右下肺静脈から圧調節用カニューレを、左下肺静脈から圧センサー用カニューレを挿入し、残りの肺静脈は結紮する。心内心電図記録ならびにペーシングを行うために、右室、左房中隔、左肺静脈 - 左房接合部に電極を留置する。圧調節用カニューレの圧を変化させることにより、左房圧を調整する。



(2) 圧負荷ラット灌流心における電気生理学的検査ならびに心房細動誘発性の検討

左房中隔、左肺静脈 - 左房接合部の2箇所における不応期を測定する。異なる基本刺激周期 (S1S1 = 300, 250, 200, 150, 100 ms) 下に期外刺激 (S2) を与えて、不応期を測定する。これにより、頻度依存性の不応期の特性が判明する。さらに、高頻度刺激法 (1:1 心房捕捉が得られる最短の刺激間隔まで

施行する)にて心房細動の誘発性を評価する。上記の検討を左房圧 0, 10, 15 mmHg の状態で行い、圧負荷の影響を検討する。なお、圧負荷を変化させた場合は、定常状態を得るために、約 3 分間経過後に各種検査を行う。

(3) 左心房圧負荷ラット灌流心の心房筋における膜電位光学マッピング

興奮伝播ならびに活動電位持続時間の検討

左心房圧調節灌流心を blebbistatin (5 μ M) にて不動化し、電位感受性色素 (di-4-ANEPPS, 2.5 μ M) で約 5 分間灌流することにより、膜電位光学マッピングを行う。左房中隔、左肺静脈 - 左房接合部の 2 箇所からペーシングを行い、刺激周期を徐々に短縮した際の左房後壁の横方向 (左房中隔からの刺激) 及び縦方向 (左肺静脈 - 左房接合部からの刺激) の伝導速度ならびに異方向性伝導 (anisotropic conduction) 特性を評価し、高血圧性心房電氣的リモデリングでの伝導障害を明らかにする。なお、この方法では不応期と相関する活動電位持続時間 (APD) の測定も同時に可能である。

伸展活性化チャネル (SAC) 阻害剤による高血圧性電氣的リモデリングの抑制効果の検討

SAC を非選択的に阻害する Gd³⁺ (50 μ M) ならびに streptomycin (100 μ M) に加えて、TRPM4 に対する選択的阻害剤 9-phenanthrol (100 μ M)、TRPC6 に選択性の高い GsMTx-4 (10 μ M) を用いて、高血圧性心房電氣的リモデリングならびに左心房圧負荷による影響が是正されるか否かを明らかにする。すなわち、高血圧心の心房細動発症基盤に關与する選択性の高い SAC が明らかになり、心房細動治療における新しい標的分子の解明につながることを期待される。

(4) 組織学的検討

心房筋における線維化、炎症細胞浸潤の評価

灌流実験終了後に摘出心 (全体)、心房筋、心室筋の重量を測定する。また、心房筋を Masson trichrome にて染色し、線維化の程度を組織学的に定量する。Choisy ら (Hypertension 2007) によると 15 週齢前後の SHR の心房筋では線維化の程度はごく軽微であると報告されているが、我々のモデルでも確認し、本モデルが初期段階の心房細動モデル動物として採用できることを確認する。また、ヒツジ one-kidney, one-clip による高血圧モデルで報告 (Lau ら、Heart Rhythm 2010) されている炎症細胞浸潤の有無についても評価し、高血圧初期の共通した所見であるのか否かを明らかにする。

Gap junction チャネルの評価

細胞間の電氣的伝導を担う gap junction チャネルとして、コネキシンが知られている。とくに心房筋で機能しているコネキシン 40、43 に対するモノクローナル抗体にて免疫組織染色を行い、高血圧性心房電氣的リモデリ

ングの興奮伝導障害への関与について検討する。

4. 研究成果

左心房圧調節ラット灌流心を作成し、生理的な左房圧 (5 mmHg) ならびに圧負荷 (10 mmHg, 15 mmHg) 条件下に心房細動誘発率、持続時間について検討した。高血圧モデルとして用いた自然発症高血圧ラット (SHR) では、誘発された心房細動の持続時間が長い傾向はみられた。しかし、圧負荷を加えても、正常血圧心 (WKY) と比較して心房細動誘発率に有意差を見出すことができなかった。一方、心房細動基質の形成と密接に関連している CaMK II 活性が高血圧ラットで亢進していることを明らかにした (Mitsuyama H, Yokoshiki H, et al, Am J Physiol 307:H199-H206, 2014)。

そこで、疫学的に心房細動を発症しやすいことが知られている他の生活習慣病として、糖尿病に着目した。その結果、糖尿病モデルラットでは、生理的な左房圧 (5 mmHg 程度) 条件下にて、心房細動誘発率が有意に高く、誘発された心房細動の持続時間も延長していた。摘出心の膜電位光学マッピングによる検討では、糖尿病ラットにおいて、右房自由壁 (Free wall)、高位右房 (HRA)、低位右房 (LRA)、右心耳 (RAA) の活動電位持続時間 (APD) が延長しており、その空間的不均一性 (CoV: the ratio of SD to mean) が有意に増大していた。また、伝導速度の低下ならびに伝導のばらつきも増大していた。さらに、これらの電気生理学的特性は刺激頻度を増大させると、より顕著になることが判明し、糖尿病ラットの心房細動誘発性機序と考えられた (Watanabe M, Yokoshiki H et al, Am J Physiol 303: H86-H95, 2012)。さらに、糖尿病ラットの心房筋では、ギャップジャンクション蛋白であるコネキシン 43 の細胞膜上での配列異常があることを見出した (第 77 回日本循環器学会学術集会、2013 年 3 月 15 日、福岡)。

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 2 件)

Mitsuyama H, Yokoshiki H, Watanabe M, Mizukami K, Shimokawa J, Tsutsui H. Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II increases the susceptibility to the arrhythmogenic action potential alternans in spontaneously hypertensive rat. Am J Physiol 307:H199-H206, 2014. doi:10.1152/ajpheart.00387.2012. 査読有

Watanabe M, Yokoshiki H, Mitsuyama H, Mizukami K, Ono T, Tsutsui H. Conduction and Refractory Disorders in the Diabetic Atrium. Am J Physiol 303:H86-H95, 2012.

doi:10.1152/ajpheart.00010.2012. 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

Mitsuyama H, Yokoshiki H, Watanabe M, Mizukami K, Shimokawa J, Tsutsui H. Ca²⁺/calmodulin-Dependent Protein Kinase II Increases the Susceptibility to the Action Potential Alternans in Spontaneously Hypertensive Rat. American Heart Association Scientific Session 2013, 2013年11月20日, Dallas Convention Center (Dallas, USA) .

Watanabe M, Yokoshiki H, Mitsuyama H, Mizukami K, Tsutsui H. Remodeling of Gap Junction Proteins Might Lead to Conduction Disorders in the Diabetic Atrium. 第77回日本循環器学会学術集会、2013年3月15日、パシフィコ横浜(横浜市).

Watanabe M, Yokoshiki H, Mitsuyama H, Mizukami K, Tsutsui H. Arrhythmogenic Substrate in the Right Atrium from Streptozotocin-induced Diabetic Rats. 第76回日本循環器学会学術集会、2012年3月16日、福岡国際会議場(福岡市).

〔その他〕

北海道大学病院循環器内科不整脈・心臓電気生理学グループホームページ

http://cvhp.med.hokudai.ac.jp/research/r_group_1.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横式 尚司 (YOKOSHIKI HISASHI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：40360911

(2) 研究分担者

なし