

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659140

研究課題名（和文）不整脈モデルを用いたイオンチャネルを制御する活性酸素産生酵素新規分子種の機能解析

研究課題名（英文）A study on the role of NOX1/NADPH oxidase in cardiac arrhythmia

研究代表者

矢部 千尋 (YABE CHIHIRO)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70150571

研究成果の概要（和文）：

心房細動の発症に活性酸素種が Ca^{2+} や K^{+} チャネルの機能調節を介して関与する可能性が示されている。一方、敗血症の病態においては心房不整脈の易誘発性が知られる。研究者らは敗血症モデルの心臓において活性酸素産生酵素 NADPH オキシダーゼの新規分子種 NOX1 の発現が誘導され、心筋細胞のアポトーシスに寄与することを見出したことから、本研究では NOX1 が心房性不整脈の発生に関与しているか否かを、*Nox1* 遺伝子欠損マウスを用いて検討した。

研究成果の概要（英文）：

Reactive oxygen species (ROS) have been implicated in the pathogenesis of atrial fibrillation by affecting ion channels of cardiomyocytes. In animal model of sepsis, susceptibility to cardiac arrhythmia is augmented. Since we previously demonstrated that a novel isoform of superoxide-generating NADPH oxidase, NOX1, was up-regulated in septic heart to elicit cardiomyocyte apoptosis, a possible involvement of NOX1 in the development of cardiac arrhythmia was investigated using mice deficient in *Nox1*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：病態分子薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：循環器・高血圧、不整脈、チャネル、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

循環器系のシグナル分子である活性酸素種 (ROS) は膜タンパクや細胞内分子に直接作用してその構造や機能を変化させることから、心筋イオンチャネルの活性を制御している可能性がある。

NADPH オキシダーゼは生体内における ROS の主要産生源であり、古くから好中球に局在し生体防御に関わることが知られていた。近年その触媒サブユニット NOX のホ

モログが見出され、非食細胞型の新規分子種 NOX1 が発見された。NOX1 の発現は他のホモログに比し低いものの刺激を受けると強い発現誘導が起こる特徴がある。

申請者らは生活習慣病の病態において NOX1 が血圧上昇や組織の酸化的ストレス充進に中心的に寄与することを明らかにしてきた。最近、NOX1 由来の ROS が蛋白キナーゼ (PKC) のシステイン残基のジスルフィド結合形成を介しその膜移行を促進し、侵

害刺激受容チャネル TRPV1 を活性化することで痛覚過敏を引き起こすことを見出したことから、NOX1 由来の ROS が広くイオンチャネルの活性を制御しているのではないかと考えた。

実際、心房細動の発症に NADPH オキシダーゼ由来の ROS の関与が報じられており、さらに電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDCC) が ROS による PKC の活性化を介して正に制御されていること、 Ca^{2+} 依存性 K^+ (BK) チャネルが膜カベオラにおいて NADPH オキシダーゼと共存し、ROS による負の制御を受けていることが相次いで報告されている。

2. 研究の目的

以上の知見をもとに本研究では NOX1 が(1)不整脈の発生に関与する、(2) VDCC ならびに BK チャネル活性を制御する可能性について、独自に作出した遺伝子欠損マウス (Nox1KO) とその初代培養細胞を用いて明らかにすることとした。

3. 研究の方法

C57BL/6N の遺伝的背景を有する Nox1KO マウスと対照となる野生型マウス (WT マウス) の 8-10 週齢 (雄) マウスを用いた。敗血症を誘発するため lipopolysaccharide: LPS (Escherichia coli O111:B4, 25mg/kg; Sigma, St. Louis, MO, USA) を腹腔内に投与し、6 時間後に電気生理学的実験を行った。

(1) 心電図記録

腹腔内に urethan (2mg/kg) を投与し、麻酔下に体表面心電図の I 誘導の記録を行った。心電図記録は Power Lab (AD Instruments, Castle Hill, Australia) を介してコンピューターに保存し、解析用ソフト (version 6; AD Instruments) を用いて解析を行った。

(2) Langendorff 灌流心

ex vivo において心臓の電気生理学的特性を評価した。腹腔内に urethan (2g/kg)、右内頸静脈に heparin (300UI/kg) を投与した後、開胸し、すばやく心臓を取出して、大動脈に灌流用カニューレを挿入して Langendorff 灌流装置に装着した。灌流液には Krebs-Henseleit 液 (37°C) を用い、大動脈から一定圧 (80mmHg) で灌流した。Krebs Henseleit 液の組成は、NaCl 119mM、KCl 4.8mM、 KH_2PO_4 1.2mM、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2mM、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2.5mM であり、95% O_2 -5% CO_2 で平衡状態にした。心臓は灌流開始後 10 min 以上自己拍動で定常化した後に、記録用白金電極を左心耳と心尖の心外膜表面に接着させ、刺激白金電極を右心耳の心外膜表面

に装着させた。心電図は生体電気増幅器 (AVB-10, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) で増幅し、アナログ信号のデジタル信号変換器 PowerLab を用いて変換し、コンピューターに保存して解析ソフトで解析した。

(3) 摘出心臓の電気生理学的特性の評価
心房性不整脈の易誘発性は、電気刺激装置 (SEN-7203, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) を用いてプログラム刺激を行って検討した。刺激強度は刺激閾値の 2 倍とした。まず 20 発の連続基本刺激 S1 を 100msec の周期長で加えた後に、21 発目に早期刺激 S2 を加えた (extra stimulation)。S2 は反応しなくなるまで 2msec ずつ短縮させ、反応しなくなった最長の S1-S2 間隔を有効不応期として、二回繰り返し計測した。また、基本刺激の最後の刺激から心房波の頂点までの時間を伝導時間と定義し、計測した。続いて、心房性不整脈を誘発するために 2 秒間のバースト頻回刺激を行った。最初の頻回刺激の周期長は 40msec とし、20msec まで 2msec 毎漸減させた。一連の頻回刺激を 3 回繰り返したが、定常化させるためにそれぞれの間に 5 分間の休止期間をとった。プログラム刺激後 3 連発以上の心房性期外収縮が観察されたときに心房性不整脈誘発と定義した。

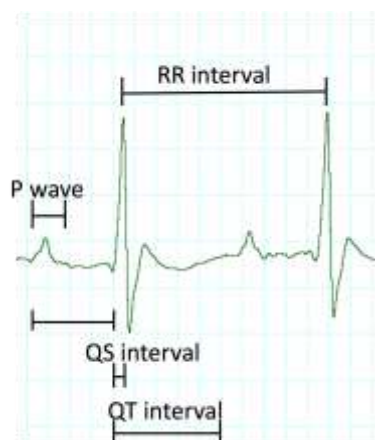
(4) 統計

一元配置分散分析 (多重比較検定として Scheffe' s test を用いた)、繰り返しのある二元配置分散分析、フィッシャーの直接確率計算法を用い、 $P < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

WT マウスおよび Nox1KO マウスのそれぞれ LPS 投与群、非投与群について電気生理学的検討を加えた。それぞれの実験群の心電図各パラメーターについては、Fig.1 に示されるような定義によって計測した。

Fig. 1



RR 間隔、P 波長、PR 間隔、QS 間隔の各群において有意差は認めなかったが、QT 間隔については、WT マウスおよび Nox1KO マウス群と比較して、LPS を投与した Nox1KO マウス群 (Nox1 KO/LPS) で有意な延長が認められた。また、P 波長は LPS を投与することによって有意に延長した (Table 1)。

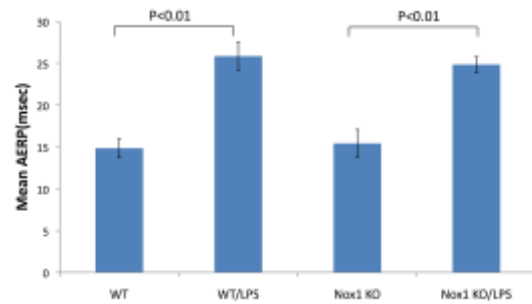
Table 1

	RR(msec)	HR(/min)	P wave(msec)	PR(msec)	QS(msec)	QT(msec)
WT	97.9±2.6	615.8±16.8	14.0±1.3	37.0±1.6	10.4±0.3	55.3±1.0
WT/LPS	109.1±2.4	551.3±11.9	21.4±2.4	38.6±1.4	11.1±0.6	63.5±1.5
Nox1 KO	99.3±4.9	612.8±29.2	16.0±1.3	37.7±1.4	11.3±0.6	56.6±2.3
Nox1 KO/LPS	149.7±4.9	462.5±52.0	25.8±6.4	45.7±5.2	11.2±0.67	71.9±3.4

**P<0.01 vs. WT/LPS

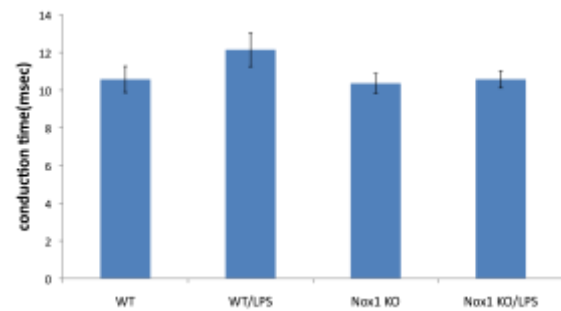
Langendorff 灌流心において、心房有効不応期は、WT マウスおよび Nox1KO マウスともに LPS を投与することによりむしろ有意に延長した (Fig. 2)。

Fig.2



この時、どの実験群においても伝導時間に有意差は認めなかった (Fig. 3)。

Fig.3



Langendorff 灌流心における心房性不整脈の易誘発性は、LPS 非投与の WT マウス群で高く、LPS 投与の WT マウス群 (WT/LPS)、LPS 非投与の Nox1KO マウス群 (Nox1 KO)、LPS 投与の Nox1KO マウス群 (Nox1 KO/LPS) では LPS 非投与の WT マウス群に比し、心房性不整脈の易誘発性という点で

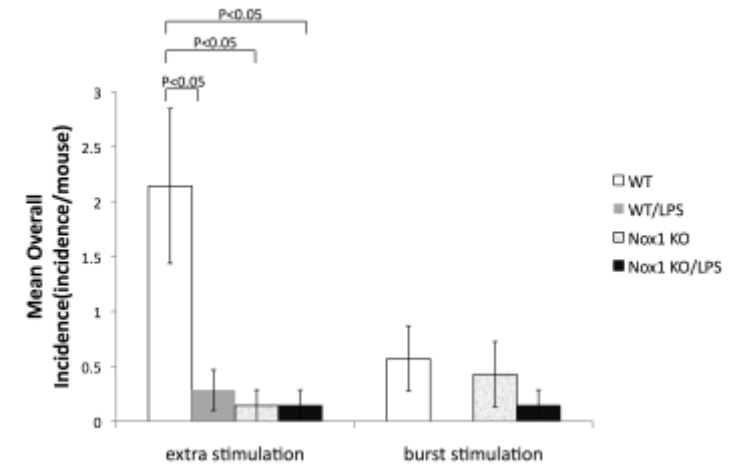
低かった (Table 3, Fig.4)。

Table 3

	WT	WT/LPS	Nox1 KO	Nox1 KO/LPS
extra stimulation	6/7	2/7	1/7*	1/7*
burst stimulation	3/7	0/7	2/7	1/7

*P<0.05 vs. WT

Fig.4



LPS の投与により活動電位、不応期の短縮が起り、心房性不整脈が起りやすくなるという今までの報告と異なり、WT マウス群で LPS の投与によりむしろ心房性不整脈は起きにくくなった。その理由としては、今までの研究に用いられていた実験動物種、LPS 投与量や投与からの時間等いくつかの要因は考えられるものの、現段階では不明である。WT マウス群において LPS の投与によりむしろ心房性不整脈は起きにくくなったことの一理由として、心房有効不応期の延長が挙げられるかもしれない。

WT マウス群に比して Nox1KO マウス群において心房性不整脈が誘発しにくかった。LPS 投与前における心房有効性不応期の基礎値、およびの LPS 投与後の心房有効性不応期の延長はWTマウス群と差がなく、それ以外の機序が考えられたが、伝導時間にも有意の差はなく、今回の研究からはその原因は不明である。LPS の投与により、WT マウスおよび Nox1KO マウス群両群で体表面心電図において P波の延長が認められた。しかしながら、刺激波から心房波頂点までの測定で得られた伝導時間には延長が観察されなかった。

Nox1KO マウス群でも LPS を投与することにより心房有効不応期が延長しているが、WT マウス群での LPS 投与の反応と差異は

無かった。心電図において Nox1KO マウス群の LPS 投与後に QT 時間が延長していたが、LPS投与後の RR 間隔の延長が一部関与している可能性が考えられた。

今回の研究において、LPS投与により、心房性不整脈の易誘発性が高まるという現象は認められず、従来の報告とは一致するものではなかった。また、Nox1KO マウス群では WT マウス群に比して、LPS 投与前の段階で心房性不整脈の易誘発性が低下していることはあったが、それ以外で LPS に対する反応等で WT マウス群との差異は認められなかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢部 千尋 (YABE CHIHIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 70150571

(2) 研究分担者

岩田 和実 (IWATA KAZUMI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号 : 60305571

松本 みさき (MSATSUMOTO MISAKI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 80533926

張 嘉 (CHOU KA)

京都府立医科大学・医学研究科・プロジェクト研究員

研究者番号 : 50599222