

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590487

研究課題名(和文)線維化による心筋の機械的歪みが関与する心房細動発生機序の解明

研究課題名(英文)Role of fibrosis and mechanical stretch in the genesis of atrial fibrillation

## 研究代表者

田中 秀央 (Tanaka, Hideo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60236619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：頻拍性の不整脈のうち発生頻度の高い心房細動は、線維化など心房の形態異常が原因になると考えられているが、その詳細は不明である。本研究では1) 心房細動の発生源に実際に線維化が認められ易いか否か、2) 頻拍に伴って心房内のカルシウム動態が不均一化し易くなり、これが不均一な収縮(歪み)をもたらして心房細動の発生素地を形成する可能性があるか否かを、各々ラットの心房の興奮の高速蛍光イメージで検証を試みた。

研究成果の概要(英文)：This experimental study was conducted to test the possibility that regionally non-uniform mechanical stretch of atrial tissue with the adjacent fibrotic tissues contributes to genesis of atrial fibrillation (AF). By using fast fluorescence imaging of excitation patterns of the excised, perfused rat hearts, we found that 1) the culprit lesions of AF involve a significant increase in fibrosis and 2) rapid pacing of the atria exhibited spatiotemporally inhomogeneous calcium dynamics, both of which may lead to inhomogeneous atrial contractions and the resultant derangement of conduction.

研究分野：実験病理学

キーワード：心房細動 カルシウム 線維化 心房 ギャップ結合 心筋 興奮伝導

## 1. 研究開始当初の背景

頻脈性の不整脈のうち発生頻度の高い心房細動は、心房の拡大や線維化といった組織形態学的異常が背景となって生じることの多い心房内の興奮伝導異常である(引用文献)。しかしながら心房の組織形態学的異常が心房に如何なる機能異常をもたらして心房細動を惹起するかについては殆ど判っていない。我々はこれまでに生きた丸ごとの心臓における心筋細胞内のカルシウム動態を細胞レベルで可視化することによって、心筋のカルシウム動態異常が心室性不整脈の発生に深く関わっていることを明らかにしてきた(引用文献)。カルシウムイオンは心筋の電氣的興奮と収縮を仲立ちする重要な細胞内シグナルであり、その細胞内調節機構が障害されるとカルシウム動態異常とともに心筋に異常な電氣的興奮をもたらす。心房においても、心筋細胞のカルシウム動態に異常が生じると個々の心房筋細胞内・細胞間で時間的・空間的にカルシウム動態が不均一化し、収縮の不均一化から異常な興奮・伝導を惹起するものと予想される。とくに線維化を伴う心房組織では心筋と線維化組織との間に生じる基底の歪みがカルシウム動態を時間的・空間的に不均一化させ、不整脈の発生の素地を形成する可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、1) ラットの摘出灌流心を用いて心房の興奮伝導様式を高速で蛍光イメージングすることにより心房細動の発生起源を同定し、2) 同部に心房細動を起こしやすい組織形態学的異常が関わっているか否かを明らかにし、3) 実際に線維化組織周辺の心房筋に如何なるカルシウム動態異常を認めるかを検証することにより、心房細動の発生における心筋細胞の機械的歪みの関与を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ラットを全身麻酔下に開胸し心臓を摘出、直ちにランゲンドルフ灌流下に膜電位感受性色素 di-4-ANEPPS を負荷し、左右心房の心外膜側(15.9 mm x 13.6 mm)における膜電位感受性色素 di-4-ANEPPS の蛍光強度変化を高速取得(毎秒 500 コマ)することにより心房の興奮伝導様式を得、心房細動における興奮伝導様式を可視化解析した。心房細動は右心耳の電氣的高頻度駆動により誘発した。心房細動の蛍光観察後、心房はホルマリン固定の上組織学的解析を行い、心房細動の発生起源となる組織における線維化の程度、心筋密度、心筋の走行、ギャップ結合蛋白質コネキシン 43 の発現につき定量的に解析した。

(2) 心臓にカルシウム蛍光指示薬 fluo4-AM を灌流負荷し、高速共焦点レーザー顕微鏡を用いることにより心房内のカルシウム動態(100 コマ/秒)を細胞レベルの解析した。これにより、心房の高頻度駆動に伴うカルシウム動態の時間的・空間的变化を定量的に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) ラット摘出灌流心における心房細動の発生起源の探索とその組織解剖学的基盤の解明

ラット灌流心の心房を電氣的に高頻度駆動したところ、19 例のうち 15 例に心房粗細動が誘発された。いずれも左心房後壁と心房中隔を含む左心房天蓋部に伝導遅延が起こり、同部から興奮が心房全体に巡回(リエントリー)する心房粗細動の興奮伝導様式が観察された(図 1)。

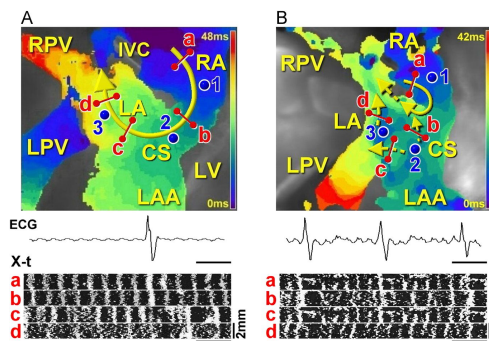


図1：ラット摘出灌流心の心房細胞における伝導様式の等時マッピング(上) 心電図(中) 心房内4領域の興奮 A(左)は粗動様パターン、B(右)は細動様パターンの例。

誘発された心房組織をホルマリン固定し組織学的解析を行ったところ、心房細動の発生起源と考えられた組織では心房筋密度の有意な低下と線維成分の増多が観察され(図2)、さらに心房筋走行の均一性の低下とギャップ結合蛋白質コネキシン43の分布異常が見出された。

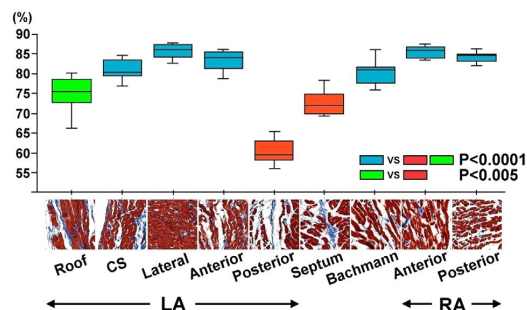


図2 各種心房内部位における線維化の程度。心房筋密度(上) Masson Trichrome 染色像(下)。左室の天蓋部、後壁、心房中隔に線維成分の増多を認めた。

これらの結果は、心房の伝導性や異方向性の低下を増強し、心房細動の発生に重要な役割を演じている可能性を示唆するものと考えられた。

以上、心房細動の巨視的な興奮伝導様式と組織学的解析から、心房細動の発生に心房局所の線維化が関与している可能性が明らかになった。なお心房に線維化が生じ易いとされる加齢心やストレプトゾトシン誘発糖尿病のラット心を用いて、同様に心房細動の誘発を試みたが、いずれの心臓においても細動

の易誘発性の有意な上昇や線維化の増強は見いだせなかった。

## (2) ラット摘出心における心房細胞内カルシウム動態異常

心房組織の機械的歪みを細胞レベルで捉えるため、高速共焦点レーザー顕微鏡を用いて心房のカルシウム動態を可視化・解析した。高速共焦点顕微鏡による心房筋組織のカルシウム動態解析では、低頻度興奮時に心房筋が細胞内・細胞間で時間的・空間的に均一なカルシウムトランジェントを示したのに対し、高頻度の興奮時には個々の細胞内でカルシウム波が発生、細胞間でカルシウム動態が非同期化し、しばしば一拍毎に交代するオルタナンス現象が観察されるなど、心房組織内でカルシウム動態が不均一化した(図3)。

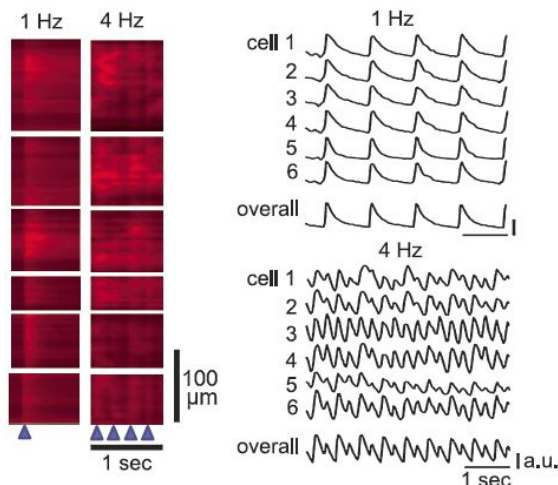


図3 心房筋細胞内カルシウム動態の興奮頻度依存性不均一化。(左)1Hzと4Hzの駆動時のカルシウム動態(X-t)イメージ。心房内の6つの異なる心房筋細胞のカルシウム濃度の蛍光強度変化。各細胞の長軸に沿った蛍光強度(縦軸 μm)を時間(横軸 t)に対して示した。赤の濃淡は各々カルシウム濃度の増減を反映している。(右)各細胞のカルシウム蛍光強度変化のプロファイル表示。1Hzでは均一なのに対し、4Hzでは個々の細胞が不均一なカルシウム動態を示しているがこれらを平均(overall)した巨視的な動態では、一拍毎に規則正しく交代性増減することがわかった。

これらの結果から心房では、高頻度の興奮に伴って筋小胞体からのカルシウムの放出が不

均一になり、その結果心房に不均一な収縮（機械的歪み）をもたらす可能性が示唆された。さらに線維化の顕著な心房組織では、心房筋細胞のカルシウム動態や収縮性の不均一性がより一層顕著になり、その結果心房細動の易発生性が高まる可能性が示唆される。

心房細動の発生における心筋の機械的歪みの関与を支持する直接的な証拠は得られなかったが、心房の巨視的な興奮伝導様式の解析、心房各部の組織形態学的解析、心房の細胞レベルのカルシウム動態解析を統合することにより、線維成分の豊富な心筋組織では、心房の収縮・拡張機能に歪みが増強し、心房細動の発生基盤を形成する可能性があると考えられる。

#### < 引用文献 >

Iwasaki Y, Nishida K, Kato T, Nattel S. Atrial fibrillation pathophysiology: implication for management. *Circulation* 2011, 124: 2264–2274.

Tanaka H, Takamatsu T. Spatiotemporal visualization of intracellular  $Ca^{2+}$  in living heart muscle cells viewed by confocal laser scanning microscopy. *Acta Histochem Cytochem* 2003, 36, 193 – 204.

Fujiwara K, Tanaka H, Mani H, Nakagami T, Takamatsu T. Burst emergence of intracellular  $Ca^{2+}$  waves evokes arrhythmogenic oscillatory depolarization via the  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  exchanger: simultaneous confocal recording of membrane potential and intracellular  $Ca^{2+}$  in the heart. *Circ Res.* 2008, 103: 509-18..

Takamatsu T. Arrhythmogenic substrates in myocardial infarct. *Pathol Int.* 2008, 58:533-43

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] 計 7 件

Hiroki Mani, Hideo Tanaka, Tetsuya Adachi, Masaya Ikegawa, Ping Dai, Naohisa Fujita, Tetsuro Takamatsu. How does the  $Ca^{2+}$ -paradox injury induce contracture in

the heart? – A combined study of the intracellular  $Ca^{2+}$  dynamics and cell structures in perfused rat hearts – *Acta Histochem Cytochem*, 査読有, 48 巻, 2015, 1 – 8 DOI: 10.1267/ahc.14059.

Dai P, Harada Y, Miyauchi H, Tanaka H, Kitano S, Adachi T, Suzuki T, Hino H, Takamatsu T. Combining TGF- $\beta$  signal inhibition and connexin43 silencing for iPSC induction from mouse cardiomyocytes. *Sci Rep*, 査読有, 4 巻, 2014, 7323-1 - 7323-7 DOI: 10.1038/srep07323

Hideo Tanaka, Tetsuya Adachi, Yoshihisa Yamaoka, Mayoko Takahashi, Tetsuro Takamatsu. Formation of contraction bands of heart muscle cells by spatially high-resolution ablation of beta-dystroglycan via multiphoton excitation-evoked CALI, *Cardiovasc res*, 査読有, 103 巻, 2014, S88 DOI: 10.1093/cvr/cvu091.160

Akiko Hamaoka-Okamoto, Chinatsu Suzuki, Tomoyo Yahata, Kazuyuki Ikeda, Norio Nagi-Miura, Naohito Ohno, Yoshinori Arai, Hideo Tanaka, Tetsuro Takamatsu, Kenji Hamaoka. The involvement of the vasa vasorum in the development of vasculitis in animal model of Kawasaki disease. *Pediatr Rheumatol*, 査読有, 12 巻, 2014, 1-12 DOI: 10.1186/1546-0096-12-12.

Yamaoka Y, Harada Y, Sakakura M, Minamikawa T, Nishio S, Maehara S, Hamano S, Tanaka H, Takamatsu T. Photoacoustic microscopy using ultrashort pulses with two different pulse durations. *Opt Express*, 査読有, 22 巻, 2014, 17063 – 17072 DOI : 10.1364/OE.22.017063.

Yan Jiang, Hideo Tanaka, Taka-aki Matsuyama, Yoshihisa Yamaoka, Tetsuro Takamatsu, Pacing-induced non-uniform  $Ca^{2+}$  dynamics in rat atria revealed by

rapid-scanning confocal microscopy, Acta Histochem Cytochem, 査読有, 47 巻, 2014, 59 – 65 DOI : 10.1267/ahc.14014.

Taka-Aki Matsuyama, Hideo Tanaka, Tetsuya Adachi, Yan Jiang, Hatsue Ishibashi-Ueda, Tetsuro Takamatsu, Intrinsic histoanatomic basis of the left atrium for reentrant excitation causing atrial fibrillation/flutter in rats, Heart Rhythm, 査読有, 10 巻, 2013, 1342 - 1348 DOI:10.1016/j.hrthm.2013.04.021.

[学会発表] 計 14 件

田中秀央, 姜艶, 足達哲也, 松山高明, 山岡禎久, 高松哲郎 心房の構造に起因する不整脈源性基盤 - カルシウム動態の時空的不均一性 -, 第 55 回日本組織細胞化学会学術集会, 2014 年 9 月 27 日, 松本市

松山高明, 田中秀央, 大平卓, 植田初江, 高松哲郎 梗塞心の致死性不整脈発生におけるプルキンエ線維の役割-第 55 回日本組織細胞化学会学術集会, 2014 年 9 月 27 日, 松本市

田中秀央, 顕微鏡の上手な使い方 第 39 回組織細胞化学講習会 (招待講演) 2014 年 8 月 7 日, 大津市

Hideo Tanaka, Tetsuya Adachi, Yoshihisa Yamaoka, Mayoko Takahashi, Tetsuro Takamatsu. Formation of contraction bands of heart muscle cells by spatially high-regional ablation of beta-dystroglycan via multiphoton excitation-evoked CALI. Frontiers in cardiovascular Biology (FCVB2014), 2014 年 7 月 5 日, Barcelona, Spain

松山高明, 田中秀央, 足達哲也, 姜艶, 植田初江, 高松哲郎 ラット心房筋の不整脈原性  $Ca^{2+}$  動態 - 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 26 日, 広島市

田中秀央, 足達哲也, 高橋麻矢子, 山岡禎久, 高松哲郎 心筋  $\beta$ ジストログリカンの破綻はカルシウム濃度上昇を伴って収縮帯形成をもたらす, 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 26 日, 広島市  
田中秀央, なぜ不整脈は起こるのか - 心筋機能分子の動態の可視化からその起源を探る - 第 11 回東京心臓病理フォーラム (招待講演) 2014 年 3 月 8 日 東京都

田中秀央, 足達哲也, 姜艶, 橋本恵美, 高松哲郎 梗塞境界部を起源とする不整脈の発生基盤 - 心筋・筋線維芽細胞間ギャップ結合の空間的不均一性の関与 - 第 102 回日本病理学会秋期特別総会 2013 年 11 月 21 日 - 2013 年 11 月 22 日 甲府市

田中秀央, 足達哲也, 姜艶, 高松哲郎 心房組織・線維芽細胞組織間の不均一なギャップ結合コミュニケーションは催不整脈性を増強する 第 30 回日本心電学会学術集会 2013 年 10 月 11 日 - 2013 年 10 月 12 日 青森市

Taka-Aki Matsuyama, Hideo Tanaka, Tetsuya Adachi, Yan Jiang, Hatsue Ishibashi-Ueda, Tetsuro Takamatsu. Intrinsic left atrial histoanatomy as the basis for reentrant excitation causing atrial fibrillation/flutter in rats. 37<sup>th</sup> International Congress of Physiological Sciences (IUPS2013). 2013 年 7 月 21 日 - 2013 年 7 月 26 日 Birmingham, UK

Tetsuya Adachi, Yan Jiang, Hideo Tanaka, Emi Hashimoto, Tetsuro Takamatsu. Generation of reentrant arrhythmias by spatially non-uniform gap-junction connection with myofibroblasts in rat cultured myocyte monolayers. 37<sup>th</sup> International Congress of Physiological Sciences (IUPS2013). 2013 年 7 月 21 日 -

2013年7月26日 Birmingham, UK  
Hideo Tanaka, Arrhythmogenic intracellular calcium waves in the heart imaged by rapid-scanning confocal microscopy. The 77<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (招待講演)  
2013年3月15日 - 2013年3月17日 横浜  
松山高明、田中秀央、足達哲也、姜艶、植田初江、高松哲郎 内在性心房細動基質の探索 - 健常ラット心の光学的マッピングと組織解析による統合的検討 - 第29回日本心電学会学術集会 2012年10月12日 2012年10月13日 千葉  
Taka-Aki Matsuyama, Hideo Tanaka, Tetsuya Adachi, Yan Jiang, Hatsue Ishibashi-Ueda, Tetsuro Takamatsu. Intrinsic histological basis for the preferential excitation of atrial fibrillation/flutter in rat hearts. 14<sup>th</sup> International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. 2012年8月26日 - 2012年8月29日 京都

[図書] (計1件)

田中秀央、山岡禎久、中西印刷、顕微鏡の上手な使い方、2014、127 - 134.

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ : <http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pcr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 秀央 (TANAKA, Hideo)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号 60236619

(2) 研究分担者

足達 哲也 (ADACHI, Tetsuya)  
湊川短期大学・教授  
研究者番号 60345014

(3) 連携研究者

松山 高明 (MATSUYAMA, Taka-aki)  
国立循環器病研究センター・医員  
研究者番号 40349113