

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591039

研究課題名(和文)心房細動の電氣的・構造的基質に対するPPAR 活性化とAT-II受容体遮断の効果

研究課題名(英文)Effect of PPAR-gamma activation and AT-II receptor blockade on electrical and structural substrate of atrial fibrillation.

研究代表者

西田 邦洋(Nishida, Kunihiro)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：40591631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ビーグル犬を placebo群と irbesartan群の2群に分け、各薬剤の投与下で毎分400回の心房高頻度刺激を4週間施行した。4週間の心房高頻度刺激により、左室機能は両群で同等に低下した。Placebo群で見られた心房細動持続時間の延長は、irbesartan群では抑制された。心房不応期の短縮は両群で同等であった。組織学的検討では、irbesartanによる線維化などの心房の構造的リモデリングの抑制が確認された。Irbesartanは心房高頻度刺激心房高頻度刺激モデルにおいて、線維化などの心房の構造的リモデリングを抑制し、心房細動持続時間の延長を抑制した。

研究成果の概要(英文)：Irbesartan possesses angiotensin receptor blocking and peroxisome proliferator activated receptor gamma activating properties, and has demonstrated protective effect against atrial fibrillation (AF) in various situations. The effects of irbesartan were determined in a canine atrial tachypacing model. Beagles were subjected to atrial tachypacing for 4 weeks and either placebo (control dogs) or irbesartan (irbesartan dogs) was given through the study period. After 4 weeks of tachypacing, left ventricular diastolic dimension increased and left ventricular ejection fraction decreased for similar extent in both groups. AF duration increased in control dogs, but this change was suppressed in irbesartan dogs. AF inducibility also had a tendency to be suppressed in irbesartan dogs. Atrial effective refractory period was similarly shortened in both groups. Irbesartan suppressed AF development despite similar extent of left ventricular dysfunction in a canine atrial tachypacing model.

研究分野：心房細動

キーワード：心房細動 リモデリング

1. 研究開始当初の背景

- A. 臨床背景

心房細動は臨床で最も高頻度に遭遇する頻脈性不整脈疾患である。その頻度は加齢とともに増加し人口の高齢化に伴い今後のさらなる増加が予測される。心房細動の発症は心血管合併症のリスクの増加や生命予後の悪化に関連するが、抗不整脈薬による心房細動の停止および予防には大きな限界があり治療の有効性は未だに不十分である。治療成績向上のために発症機序のさらなる解明が不可欠である。心房細動の発症において心房の機能的および組織学的な変化“リモデリング”が重要な役割を持つ。発症機序の上流に位置する心房リモデリングを抑制し心房細動発症を予防する“アップストリーム治療”の効果が期待がもたれる。

- B. 動物実験モデルにおける心房細動基質

心房細動の発症において電気生理学的および組織学的な変化(すなわち電気的および構造的リモデリング)が重要な役割を持つ。心房高頻度刺激によるイヌ心房頻拍モデルは心房の電気的リモデリングにより心房細動を発症する。すなわち、細胞内カルシウム(Ca^{2+})過負荷を契機にカルモジュリン、カルシニューリン、活性化 T 細胞核内因子(NFAT)などのシグナルを介して L 型 Ca^{2+} チャネルなどの細胞膜イオンチャネルの発現が変化する。本モデルでは高頻度心室応答による心不全を抑制する目的で房室ブロックが作成され心室心拍数は心室ペースングにより一定に保たれる。

一方で心室高頻度刺激によるイヌ心不全モデルは心房の構造的リモデリングにより心房細動を発症する。アンジオテンシン(AT)-II やトランスフォーミング成長因子(TGF)- β などのサイトカインが刺激となり心房組織に線維化が生じ、興奮伝導が不均一に障害される事でリエントリーや細動様興奮の維持基盤となる。AT 変換酵素阻害薬による AT 系の抑制が心不全モデルにおける心房線維化と心房細動発症を抑制する事が確認されている。

今回の研究計画では高頻度心室応答を伴う長期心房高頻度刺激イヌ心房細動モデルを使用する。本モデルでは房室ブロックは作成されず、心房頻拍と同時に高頻度心室応答による心不全を発症するため、上記の心房頻拍モデルにおける電気的リモデリングと心不全モデルにおける構造的リモデリングの双方の変化が出現し、より持続の長い心房細動が確認される。AT 変換酵素阻害薬や AT-II 受容体拮抗薬(ARB)が本モデルにおいて電気的リモデリングを抑制せずに構造的リモデリングのみを抑制して心房細動の持続を短縮する事が示されている。我々は最近の研究によって、TGF- β 1 阻害薬のトラニラスト

が本モデルにおける電気的リモデリングと構造的リモデリングの双方を抑制する事を確認した。

- C. ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)と心房細動の関連

本邦の地域住民を対象としたコホート研究においてメタボリック症候群と心房細動発症リスク増加との関連が示されている。チアゾリジン誘導体の標的でもある PPAR は脂肪細胞の分化を調節する転写因子でありメタボリック症候群の病態に重要な役割を持つ。PPAR は単球やマクロファージで核内因子(NF)- κ B などの転写因子を阻害して炎症性サイトカインの発現を抑制し、血管平滑筋では TGF- β 1 や血小板由来増殖因子(PDGF)の刺激による細胞増殖反応を抑制する。

家兎心不全モデルを用いた研究では PPAR 活性化と ARB の双方が構造的リモデリング進展と心房細動発症を抑制した。しかしながら、PPAR 活性化の電気的リモデリングに対する効果は未だに検討されていない。また上記研究では PPAR 活性化と ARB の併用効果と各単独効果の間に有意な差はなかった。しかしながら、電気的リモデリングと構造的リモデリングの双方を有する、高頻度心室応答を伴う長期心房高頻度刺激イヌ心房細動モデルにおける、PPAR 活性化と ARB の相乗効果の有無は未だに明らかでない。

2. 研究の目的

本研究は、イヌ疾患モデルを用いて心房細動の電気的および構造的基質の進展抑制における、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)活性化とアンジオテンシン(AT)-II 受容体遮断(ARB)の相乗効果を確認し、その機序を電気生理学、組織学的、および分子生物学的に明らかにし、その成果によって心房細動の発症機序の解明および今後の心房細動治療の発展に寄与する事を目的とする。

(1) 高頻度心室応答を伴う長期心房高頻度刺激イヌ心房細動モデルの心房細動の発症抑制における PPAR 活性化と ARB の併用効果を、既に有効性が示されている ARB 単独治療と比較しその優位性を立証する。

(2) 電気的リモデリングの指標である心房有効不応期や興奮伝導速度などの電気生理学的指標、および構造的リモデリングの指標である線維化やコネクシン分布などの組織学的指標を検討し、それぞれの進展に対する各治療の抑制効果を検討する。

(3) 細胞膜イオンチャネルや線維化関連マーカーに加えて、リモデリングの進展に関与する各種のサイトカイン、転写因子、細胞内

シグナル伝達因子などの遺伝子および蛋白の発現をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法とウエスタンブロット法によって定量評価し、心房細動リモデリングの進展機序と各治療の作用機序を分子生物学的に解明する。

3. 研究の方法

ビーグル犬 24 頭を 偽薬対照群、ARB-PPAR (+)群、非心房刺激偽手術群、の3群に分ける。全ての動物に全身麻酔化で心房ペースメーカーを植え込む。偽薬対照群、ARB-PPAR (+)群では各薬剤投与下で毎分400回の心房高頻度刺激を4週間施行する。非心房刺激偽手術群ではペースメーカーは作動させず心房高頻度刺激は行わない。試験期間中は経時的に心臓電気生理検査および心臓超音波検査の指標を測定する。試験終了時には開胸下でさらに詳細な電気生理学的評価を行った後に心房組織を採取する。採取した心房組織を用いて組織学的および分子生物学的な評価を行う。

実験プロトコール

全ての動物に全身麻酔化で心房ペースメーカーを植え込む。偽薬対照群、ARB-PPAR (+)群では各薬剤投与下で毎分400回の心房高頻度刺激を4週間施行する。非心房刺激偽手術群ではペースメーカーは作動させず心房高頻度刺激は行わない。各薬剤投与は術後1週から開始、心房高頻度刺激は術後2週から開始し、それぞれ6週まで継続する。1週から6週まで1週毎に心房高頻度刺激を中断し洞調律下で心臓電気生理検査と心臓超音波検査を施行する。6週には開胸下でさらに詳細な電気生理学的評価を行った後に動物を安楽死させ心房組織を採取してホルマリン標本と急速凍結標本を保存する。

使用薬剤と投与量

ARB-PPAR (+)群ではARB作用とPPAR活性化作用を併せ持つイルベサルタンを50mg/kg/dayで投与する。薬剤の投与量は過去に報告された動物実験のデータを基に決定した。

心臓電気生理検査と心臓超音波検査

心臓電気生理検査では心房刺激による心房細動誘発率、誘発された心房細動の持続時間、心房有効不応期、興奮伝導速度などの指標を測定する。また心房細動の細動波をデジタル記録し高速フーリエ変換による細動波周波数解析を行う。心臓超音波検査では左室拡張および収縮末期径、左室駆出分画、左房径、左房面積などの指標を測定する。

組織学的評価および分子生物学的評価

採取した心房組織のマッソン・トリクロム染色を行い間質の線維化を定量評価し、免疫染色によりコネクシンの発現量と分布を評価する。PPAR と AT-II、および各種のサイ

トカイン、線維化関連マーカー、細胞膜イオンチャネルなどの発現をPCR法による遺伝子発現解析およびウエスタンブロット法による蛋白発現解析を用いて評価する。

動物必要数の算出根拠

同様の実験系を用いた過去の研究から、統計的に有意な結果を得るためには各群6頭から7頭のデータが必要と推定される。しかし技術的な問題によりデータが得られない個体の出現の可能性も考慮し各群8頭、3群で24頭の実験が必要と推定する。

4. 研究成果

4週間の心房高頻度刺激により、左室機能は両群で同等に低下した(左室拡張末期径LVDdはplacebo群で31.5mm、irbesartan群で27.8mm、 $p=NS$ 、に拡張、左室駆出分画LVEFはplacebo群で24.3%、irbesartan群で23.7%、 $p=NS$ 、へと低下)。Placebo群で見られた心房細動持続時間の延長は、irbesartan群では抑制された(心房細動持続時間、placebo群で 26.3 ± 11.0 s、irbesartan群で $1.60.9$ s、 $P=0.02$)。心房細動誘発率の上昇はirbesartanによってやや抑制される傾向があったが、placeboと比較して有意な差はなかった(心房細動誘発率、placebo群で $20.0 \pm 2.0\%$ vs. irbesartan群で $70.0 \pm 3.6\%$ 、 $P=0.08$)。心房不応期の短縮は両群で同等であった。Irbesartanは心房高頻度刺激心房高頻度刺激モデルにおいて心房細動持続時間の延長を抑制した。心房線維化の組織学的な評価では、irbesartanによる線維化などの心房の構造的リモデリングの抑制が確認された。心房有効不応期などの電気生理学的指標への影響はplaceboと差がなかったことから、線維化などの心房の構造的リモデリングを抑制し心房細動持続時間を短縮したと考えられた。さらに分子生物学的検討も行い心房細動リモデリングの細胞内伝達機序や薬剤の詳細な作用機序を検討した。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

1. 片岡直也, 西田邦洋, 坂本 有, 山口由明, 水牧功一, 井上 博. イヌ心房高頻度刺激モデルにおいてイルベサルタンは左室収縮能とは独立して心房細動を抑制する. 第30回日本心電学会学術集会; 2013 Oct 11-12; 青森.

2. Kataoka N, Nishida K, Yamaguchi Y, Sakamoto T, Mizumaki K, Inoue H. Irbesartan prevents development of atrial fibrillation independent of the left ventricular dysfunction in a canine atrial tachypacing model. 第77回日本循環器学会学術集会; 2013 Mar 15-17; 横浜.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西田 邦洋 (NISHIDA Kunihiro)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：40591631

(3)連携研究者

井上 博 (Inoue Hiroshi)

富山大学・事務局・理事・副学長

研究者番号：60151619