

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860617

研究課題名(和文)酸化ストレスによる不整脈基盤形成の機序解明とSema3Aによる電気的心筋再生療法

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of arrhythmia basement formation by oxidative stress and electrical myocardial regeneration therapy by Sema3A

研究代表者

黒川 早矢香 (KUROKAWA, Sayaka)

日本大学・医学部・専修指導医

研究者番号：60439130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、酸化ストレスにより誘発される不整脈への根本的治療法を実験的に検証することを目的としている。

心筋/骨格筋特異的スーパーオキシドジスムターゼ2ヘテロ欠損マウスを用いた実験では、心筋の過酸化状態が胎児蛋白を含むカリウムチャネル関連因子の発現を減少させ、電気的リモデリングを引き起こすことを明らかにし、研究成果は論文発表として報告した。さらに、イソプロテレノール(ISP)負荷不全心筋マウスモデルを用いて、胎児蛋白制御因子であるセマフォリン3Aによる治療介入実験を開始した。ISP負荷による心筋のリモデリングを確認し、今後セマフォリン3Aによる治療効果を検証する予定である。

研究成果の概要(英文)：This study aims to experimentally verify the fundamental therapy for arrhythmia induced by oxidative stress.

Experiments using heterozygous heart/muscle-specific manganese superoxide-deficient mice revealed that myocardial hyper-oxidative stress reduces the expression of potassium channel-related factors, including fetal protein, and causes electrical remodeling. The research results were reported as a paper presentation. In addition, we started a therapeutic intervention study with semaphorin 3A (Sema3A), a fetal protein regulator, using the isoproterenol (ISP)-loaded myocardial mouse model. We have confirmed myocardial remodeling due to ISP and we plan to verify the therapeutic effects of Sema3A.

研究分野：医歯薬学

キーワード：電気的リモデリング 酸化ストレス セマフォリン3A イソプロテレノール

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは動脈硬化、老化、心不全、虚血再還流障害の原因となることが報告されているが、酸化ストレスそのものがそれぞれの病態形成に果たす役割は十分には解明されていない。特に不整脈領域における酸化ストレスの影響や治療介入については未知であった。

私は器質的心疾患に起因しない酸化ストレスが心筋の電気的リモデリングと構造的リモデリングに及ぼす影響について検討するため、はじめにグルタチオン合成酵素であるγ-グルタミルシステインシンターゼ(γ-GCS)の阻害剤L-buthionine-sulfoximine(BSO)をSDラットに飲水より投与して作製した全身性過酸化ラットモデルを用いて実験を行った(Kurokawa S, et al. Circ J 2011; 75: 1386-1393)。BSO投与により、心筋の構造変化やサイトカインの変化なしにグルタチオンの抑制による全身の過酸化状態が引き起こされ、電気的にはMAPD(単相性活動電位持続時間)の延長とERP(有効不応期)の短縮による不整脈誘発性の亢進を認めた。さらに、その機序として蛋白レベルでのergの発現低下によるIKrの低下やSERCAの発現低下によるカルシウムの過負荷が関与すると考えられた。しかし、全身性過酸化モデルでは心筋での酸化ストレス負荷が不十分であり、酸化ストレスが心筋に及ぼす影響を検討するには限界があった。

前実験を経て、心筋への十分な酸化ストレス負荷のもとにその影響を検討するため、心筋により特化した過酸化状態を評価するモデルとして新たにBSO投与心筋/骨格筋特異的*Sod2*ヘテロ欠損マウス(H/M-*Sod2*^{-/-})モデルを作成した。スーパーオキシドジスムターゼ(superoxide dismutase: SOD)は活性酸素種の一種であるスーパーオキシド(O₂^{·-})を過酸化水素(H₂O₂)と酸素に変換する酸化ストレス消去系酵素の一つである。H/M-*Sod2*^{-/-}マウスは通常では表現型に野生種(WT)との差を認めないが、心筋虚血などの負荷状態では反応が過剰になることが知られている(Asimakis GK, et al. Circulation 2002; 105: 981-986)。私はこれにBSOを投与し、BSO投与後に後天的な心筋骨格筋特異的過酸化状態を生み出す酸化ストレス負荷モデルとしてBSO投与H/M-*Sod2*^{-/-}マウスモデルの作製に成功し、これを用いて酸化ストレスによる不整脈基盤の形成とその機序の解明を試みた。

一方、セマフォリン3A(Sema3A)は胎児の神経細胞で広く発現し、神経細胞軸索の成長過程に作用しシナプスの形成に關与する蛋白として発見された(Kolodkin AL, et al. Prog Brain Res 1998; 117: 115-132. Goshima Y, et al. Jpn J Pharmacol 2000; 82: 273-279. Bagri A, et al. Cell 2003; 113: 285-299)。Sema3Aは骨再生においては破骨細胞の分化

抑制と骨芽細胞の分化促進を同時に行うことで骨保護作用を示し(Hayashi M, et al. Nature 2012; 485:69-74)、新規治療薬となる可能性が報告された。心臓領域ではSema3Aが交感神経系の形成に關与し心室性不整脈や突然死を誘発すること(Ieda M, et al. Nat Med 2007; 13: 604-612)や、心筋梗塞ラットモデルの梗塞領域でKChIP2やKv4.2の発現低下を改善し電気的リモデリングを減弱させることが報告されているが(Wen HZ, et al. Tohoku J Exp Med 2011; 225: 51-57)、酸化ストレスで生じる不整脈基盤に対する治療効果は明らかではない。私は心筋の過剰な酸化ストレスにより引き起こされる電気的リモデリングを胎児蛋白制御因子であるSema3Aが逆リモデリングにより電気的に再生するという仮説に基づき、新たな心筋の電気的再生療法への道を切り開くため、Sema3Aによる治療介入実験を計画した。

2. 研究の目的

老化や心不全の原因となる酸化ストレスが、不整脈基盤を形成し催不整脈性を亢進させることを証明し報告する。

さらに、Sema3Aによる治療介入を行い、酸化ストレスによる心筋の電気的・構造的・機能的リモデリングに対する胎児蛋白制御因子による心筋再生療法という新たな治療概念を実験的に証明する。

3. 研究の方法

(1) BSO投与H/M-*Sod2*^{-/-}マウスモデルでの実験

まず、心筋特異的な過酸化状態における不整脈基盤の形成を検証するため、BSO投与H/M-*Sod2*^{-/-}マウスを用いて実験を行った。9週令のH/M-*Sod2*^{-/-}マウスと野生種のマウスにBSO 1.5 mmol/kgまたは生理食塩水を1日2回ずつ7日間腹腔内投与し、8日目(day 7)に電気生理学検査や心筋検体の採取を行った。BSO投与H/M-*Sod2*^{-/-}マウス(H/M-*Sod2*^{-/-}+BSO)、BSO投与野生種マウス(WT+BSO)、生食投与H/M-*Sod2*^{-/-}マウス(H/M-*Sod2*^{-/-} control)、生食投与野生種マウス(WT control)の4群で各評価項目を比較した。

(2) ISP負荷不全心筋マウスモデルでの実験

研究開始当初はBSO投与H/M-*Sod2*^{-/-}マウスモデルにSema3Aを投与し、その治療効果を検証することを検討していたが、酸化ストレスに限局せずにより全般的な心筋障害に対するSema3Aによる心筋再生療法への道を検証する必要があると考え、交感神経系の過負荷により生じる不全心筋マウスモデルとして新たにイソプロテレノール(ISP)負荷マウスモデルを確立してSema3Aによる治療効果を検討することとした。

野生種のマウスにISP負荷を行い、ISP負荷不全心筋マウスモデルを作製した。さらに

ISP 負荷不全心筋マウスに Sema3A の静脈内投与を行い、心筋の電氣的・構造的・機能的リモデリングとその治療効果を評価する。

ISP 負荷不全心筋マウスモデルの作製

9 週令の C57BL/6J マウスに ISP を 1 日 1 回 14 日間、腹腔内に投与する。ISP の投与量は 0 mg/kg/日から 640 mg/kg/日までに設定し、各群の体重の変化や死亡率、電気生理学的検査 (MAPD・ERP)、心エコー図 (左室径・左室収縮能) を評価し、Sema3A による治療介入実験に適した不全心筋モデルを作製する。

心筋治療に適切な Sema3A 投与量の設定

骨再生の分野では 1 mg/kg の Sema3A を週 1 回 4 週にわたって静注することで治療効果が得られることが報告されているが (Hayashi M, et al. Nature 2012; 485:69-74)、心筋治療に適切な Sema3A の投与量は不明である。骨再生の投与量を参考に濃度や投与頻度・投与期間の異なる Sema3A 投与群を設定し、体重の変化や死亡率、電気生理学的検査、心エコー図を評価し、適切な Sema3A の投与量を設定する。

ISP 負荷不全心筋マウスモデルにおける Sema3A による治療介入の評価

電気生理学検査・心エコー図、心筋のカリウムチャンネルを中心としたイオンチャンネルやカルシウムハンドリングに関わる因子を mRNA ならびに蛋白発現のレベルで評価し、ISP 負荷不全心筋モデルにおけるリモデリングとこれに対する Sema3A の治療効果を検証する。

4. 研究成果

(1) BSO 投与 H/M-*Sod2*^{-/-} マウスモデルでの実験

H/M-*Sod2*^{-/-} マウスでは心筋にて *Sod2* の低下を認め、BSO 投与では心筋総グルタチオンが低下していた。BSO 投与 H/M-*Sod2*^{-/-} マウスでは、心筋ミトコンドリアにおいて O₂^{·-} や H₂O₂ は過剰状態となり、結果として血清中の d-ROM も上昇していた。免疫染色では O₂^{·-} を反映する DHE 染色、H₂O₂ を反映する DCF-DA 染色にて BSO 投与 H/M-*Sod2*^{-/-} マウスの心筋での酸化ストレス過剰状態が証明され、モデルとしての妥当性が示された (図 1)。

電気生理学検査では BSO 投与 H/M-*Sod2*^{-/-} マウスで MAPD や ERP の上昇を認め、心筋特異的な酸化ストレスの作用で電氣的リモデリングが生じていることを明らかにした (図 2)。さらに、この電氣的リモデリングには Kv4.2 のみならず、胎生期に Kv チャンネルの発現と生理活性を制御する蛋白である KChIP2 の発現低下が関与することを証明した (図 3)。

以上により、全身性酸化ストレスのみならず、心筋特異的な酸化ストレスにおいても不整脈基盤が形成されることを本実験にて証明した。研究成果は論文発表の形で公表した (Kurokawa S, et al. Circ J 2014; 78(8): 1950-1959)。また、論文は Circulation Journal 誌編集長の注目論文として Medical

Tribune 誌で紹介された (Medical Tribune, vol. 47, No. 35, p15)。

しかし、本実験では酸化ストレスにより生じた不整脈基盤に対する治療介入については言及しておらず、さらなる検討が必要と考えられた。

図 1 BSO 投与 H/M-*Sod2*^{-/-} マウスモデルにおける酸化ストレスの評価

	Total glutathione (nmol/g)	d-ROM (U.CARR)	O ₂ ^{·-} formation [Relative chemiluminescence intensity (%)]	H ₂ O ₂ formation (pmol/min/mg)
H/M- <i>Sod2</i> ^{-/-} +BSO	2.1±0.5*	124.9±3.2†	131±12†	421±24*
WT+BSO	2.1±0.5*	126.1±6.6	98±11	337±9
H/M- <i>Sod2</i> ^{-/-} control	12.4±1.0	109.3±3.5	114±14	354±25
WT control	12.5±0.4	108.3±4.4	100±16	325±33

*p<0.05 vs. WT control, †p<0.05 vs. H/M-*Sod2*^{-/-} control, ‡p<0.05 vs. WT+BSO.

Total glutathione: n=5 in each group.

d-ROM: H/M-*Sod2*^{-/-}+BSO: n=10, WT+BSO: n=12, H/M-*Sod2*^{-/-} control: n=9, WT control: n=10.

O₂^{·-} formation: H/M-*Sod2*^{-/-}+BSO: n=14, WT+BSO: n=13, H/M-*Sod2*^{-/-} control: n=12, WT control: n=11.

H₂O₂ formation: H/M-*Sod2*^{-/-}+BSO: n=7, WT+BSO: n=7, H/M-*Sod2*^{-/-} control: n=6, WT control: n=6.

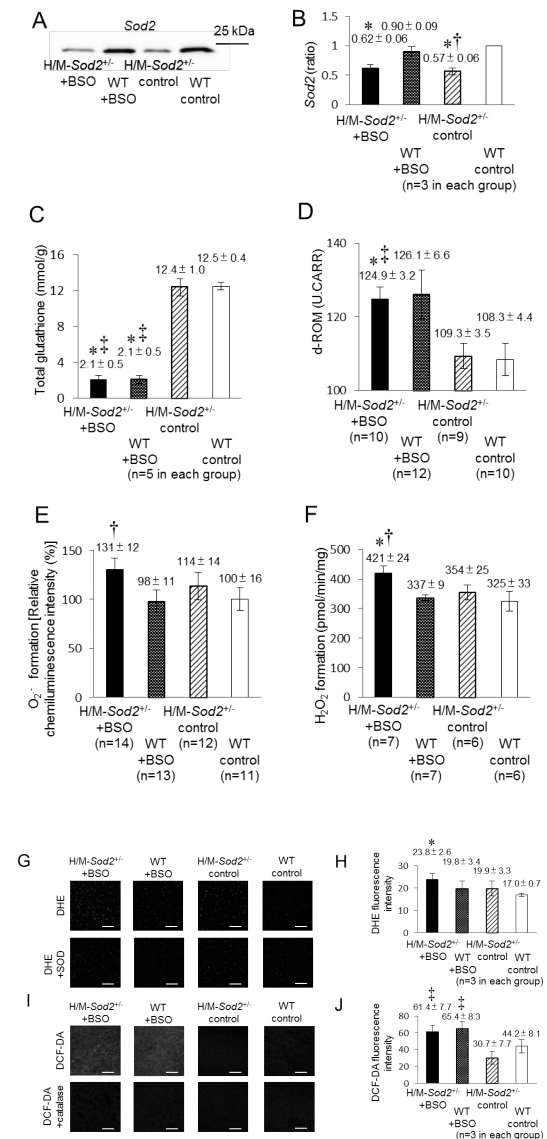


図 2 BSO 投与 H/M-*Sod2*^{-/-} マウスモデルにおける電気生理学的評価

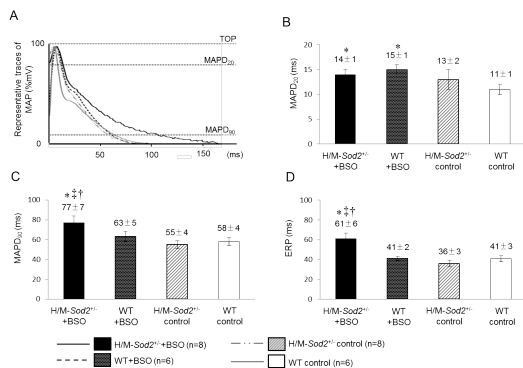
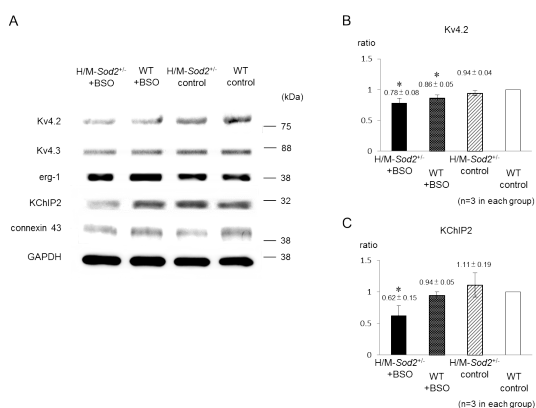


図 3 BSO 投与 H/M-*Sod2*^{-/-} マウスモデルにおける心筋イオンチャネル関連因子の蛋白発現



(2) ISP 負荷不全心筋マウスモデルでの実験
ISP 負荷不全心筋マウスモデルの作製

ISP 640 mg/kg/日の投与では単回投与でもすべてのマウスが 10 分以内に死亡し、ISP 560 mg/kg/日の連続投与では開始から 1 週間以内にすべてのマウスが死亡した。ISP 480 mg/kg/日投与群では 2 週間後もマウスは生存していたが、心エコー図では左室拡張末期径 (LVd) の拡大と左室駆出率 (LVEF) の低下を認め (図 4・5)、電気生理学検査では単相性活動電位 20%回復時間 (MAPD₂₀) の延長を認めた (図 6)。よって、ISP 負荷マウスモデルが不全心筋での電氣的・構造的・機能的リモデリングを検証するのに適したモデルであることを実証した。

図 4 心エコー図

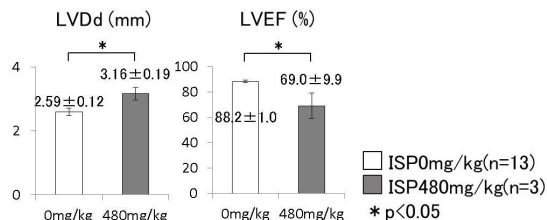


図 5 左室短軸像 M モード

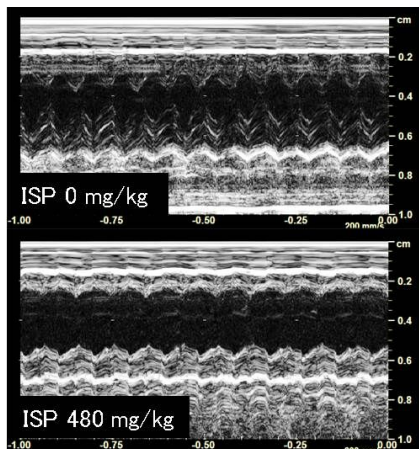
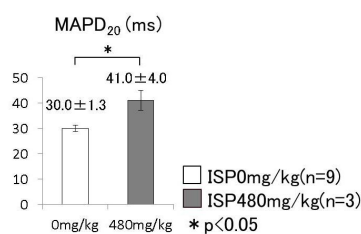


図 6 電気生理学検査



心筋治療に適切な Sema3A 投与量の設定
ISP 負荷不全心筋マウスモデルにおける Sema3A での治療介入の評価

(2) で示された ISP 負荷不全心筋マウスモデルでの病態形成の機序として、心筋のカリウムチャネル関連因子やカルシウムハンドリングに関する因子が影響していることが予想された。今後心筋治療に適した Sema3A の投与量を検証した上で、心筋の電氣的・構造的・機能的リモデリングに対する治療効果の機序を定量的リアルタイム RT-PCR やウエスタンブロット法で評価し、mRNA および蛋白発現のレベルで解明する。さらに Sema3A の治療効果を交感神経系の機能的あるいは組織学的な側面から評価するため、血中カテコラミンの測定や免疫染色を行い評価することも計画している。

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 1 件)

(1) Kurokawa S, Niwano S, Niwano H, et al. Cardiomyocyte-derived mitochondrial superoxide causes myocardial electrical remodeling by downregulating potassium channels and related molecules. Circ J 2014; 78(8): 1950-1959. 査読有. <http://doi.org/10.1253/circj.CJ-13-1587>

〔その他〕

(1) ~ 心筋特異的酸化ストレスマウス ~ ミ

トコンドリア由来スーパーオキシドが電
気的リモデリングを惹起, Medical Tribune,
vol. 47, No. 35, p15, 2014年8月28日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒川 早矢香 (KUROKAWA, Sayaka)

日本大学・医学部・専修指導医

研究者番号: 60439130