

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460288

研究課題名(和文) 心筋の不均一収縮に起因する局所的な活性酸素の産生が不整脈の発生に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Effect of regional increase in ROS on arrhythmia susceptibility in the myocardium with nonuniform contraction

研究代表者

三浦 昌人 (Miura, Masahito)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30302110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：不均一収縮を呈する病的な心筋においては、収縮力の低下した傷害心筋が心臓内に混在し、このような収縮力の低下領域は健康心筋のより強い収縮によって受動的に伸展させられる。また、心筋組織の伸展が一過性に活性酸素を産生させるとが知られている。本研究では、活性酸素の産生に着目し、このような収縮力低下領域における受動的な伸展が当該領域において局所的に活性酸素を産生し、この産生が当該領域から伝播するカルシウム波を促進すること、更に、撃発性不整脈の誘発することを解明した。

研究成果の概要(英文)：In diseased hearts, impaired muscle with reduced contractile strength is distributed throughout the hearts and is stretched by contractions of more viable neighboring muscle during the contraction phase. In addition, it has been reported that muscle stretch transiently increases the production of reactive oxygen species (ROS). The present study demonstrates that, focusing on the ROS production, the passive stretch of the impaired muscle regionally increases the ROS production, accelerate calcium waves arising from the impaired region, and causes triggered arrhythmias.

研究分野：臨床生理検査学

キーワード：活性酸素 細胞内カルシウム 不整脈

1. 研究開始当初の背景

陳旧性心筋梗塞や心筋症などの病的心筋においては、何らかの引き金によって一旦不整脈が発生すると、その後も頻繁に不整脈の発生を繰り返すことがしばしば経験され、"electrical storm"と呼ばれている。この原因としては交感神経の緊張などの自律神経系の関与が示唆されているものの詳細は不明である。このような病的心筋では、不均一な交感神経活性/蛋白発現/電気的興奮などによって障害部位において収縮力の低下が生じる。このため、病的心筋においては、このような障害部位の混在によって不均一な心筋収縮が生じ、これが不整脈の発生に関与することを我々は報告してきた。これは、心臓内に障害部位(梗塞などによる線維組織など)が混在する場合、健常心筋のより強い収縮とその後の弛緩によって、収縮力低下領域とその周辺では受動的な伸展とそれに引き続いた短縮が起こり、この弛緩期の短縮が、収縮蛋白からのカルシウム解離を引き起こし、これが筋小胞体からのカルシウム放出を誘発して不整脈の発生に関与するというものである。一方、近年 Lederer らは、単離心筋細胞の伸展が微小管を介した NADPH oxidase 2 (NOX2) の活性化によって活性酸素を産生させること、筋小胞体からの自発的なカルシウム放出であるカルシウム・スパーク頻度を増加させることを報告し(Prosser BL, et al. Science 2011; 333:1440-1445) 更に、心筋伸展の程度と周期の増加が活性酸素の産生量を増加させることを報告している(Prosser BL, et al. Cardiovasc Res 2013;98: 307-314)。我々も、多細胞心室筋を用いた心筋組織の伸展が活性酸素を産生することを報告している。このため、収縮力低下領域における収縮期の受動的な心筋伸展が、この領域において局所的に活性酸素を産生させ、不均一収縮を呈する病的心筋におけるカルシウム波伝播速度の増加や催不整脈

性亢進の一因となっている可能性がある。特に、頻脈性不整脈では、伸展周期の増大によってより多くの活性酸素が産生される危険性があり、その後の"electrical storm"の原因となっている可能性がある。しかし、不整脈の発生機序に関する研究の多くは、単離心筋細胞や薬剤等で拍動を停止した心臓を用いたものであり、心臓が収縮することによって初めて生じる収縮の不均一性に絡んだ不整脈の発生機序に関する研究は、大きく立ち遅れている。

2. 研究の目的

心筋伸展が活性酸素を産生させることから、収縮力低下領域の受動的な伸展もまた、その領域に活性酸素を産生させるのか、何がその産生量を決定するのかを明らかにする。次に、このような伸展によって局所的に産生された活性酸素が、カルシウム波の伝播や不整脈の発生に関与するのかを、まずはラットの不均一収縮モデルを用いて明らかにする。同時に、NOX2 ノックアウトマウスを用いた研究の可能性を探るため、マウスを用いた不均一収縮モデルの確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、ラット右心室より、多細胞心室筋であるトラベクラを摘出し、張力、サルコメア長、細胞内カルシウム画像、膜電位を記録した。2',7'-dichlorodihydro fluorescein (DCFH) は活性酸素による酸化ストレスによって 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) へと変換されるが、この DCF 蛍光を画像として記録することにより、活性酸素の心筋組織内における産生部位を特定する。心筋局所の収縮特性を変化させるために、心筋の局所領域を BDM で灌流する(ジェット幅 ~0.3 mm)。このようなラットの不均一収縮心筋モデルを用いて以下の研究を行った。

4. 研究成果

(1) 心筋伸展がカルシウム波伝播速度に与える影響の解明

心筋伸展による活性酸素とカルシウム波伝播速度の増加

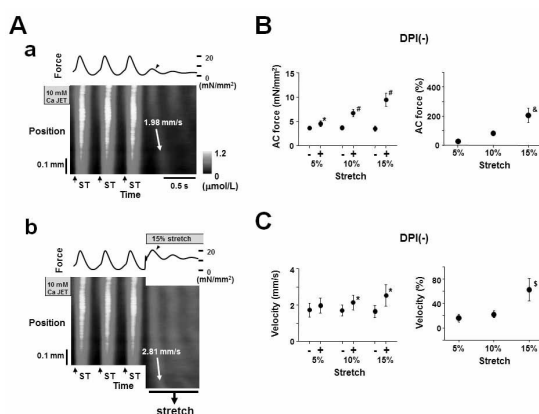


図. 伸展による後収縮とカルシウム波伝播速度の変化 (M Miura, et al. JMCC 2015;84:162-169 より改変)
A: 7.5 秒間電気刺激の最期の 3 拍とその後のカルシウム波の実例。a: 信金伸展なし、b: 15% 心筋伸展あり。上段に張力、下段に細胞内カルシウム変化を示す。B: 伸展時の後収縮の変化。C: 伸展時のカルシウム波伝播速度の変化。

収縮蛋白のカルシウム親和性の増加が、カルシウム波に与える影響を明らかにするために、カルシウム波の伝播中に 5、10、15% の伸展を加えた。図 Aa のように、高頻度電気刺激後に高カルシウム液局所灌流領域において、細胞内カルシウムの上昇が起こり、これが 1.98mm/s の速さで心筋組織をカルシウム波として伝播した。15% の心筋伸展によって後収縮の大きさは増大し、伝播速度も 2.81mm/s へ増加した (図 Ab)。データのまとめを図 BC に示す。後収縮の大きさは、5、10、15% の伸展によって増大し、増大の程度は 15% 伸展では 5% に比べ有意に大きかった。同様に、カルシウム波の伝播速度は伸展によって増加し、増加の程度は 15% 伸展では 5% に比べ有意に大きかった。この結果は、心筋伸展はその程度に応じて、収縮蛋白のカルシウム親和性を増大させること、カルシウム波の伝播速度を増加させることを示した。

心筋伸展がその程度に応じて ROS 産生を増加させることは単離心筋細胞で報告されている (Prosser BL, et al. Science 2011; 333:1440-1445)。トラベクラにおいても同じような産生が生じているかどうかを明らかにするために、5%、10%、15% 伸展時の

DCF 蛍光の変化を記録した。心筋の伸展によって DCF 蛍光は増加し、その変化量は伸展の程度に応じて増加した。NOX 阻害薬の DPI 存在下では、伸展による DCF 蛍光の増加は抑制された。このことは、心筋伸展が NOX の活性化を介して ROS を産生させること、伸展の程度に応じて ROS 産生を増加させることを示唆する。

このような伸展による ROS 産生の増加が、収縮蛋白のカルシウム親和性の増加とカルシウム波の伝播速度の増加に関与するかどうかを明らかにするために、DPI 処理後に同様の伸展を加えた。DPI 処理後は、伸展によって後収縮の増大がみられたにも関わらず、カルシウム波伝播速度の増加は見られなかった。更には、伸展の程度による伝播速度変化の違いも見られなかった。この結果は、伸展による ROS の産生が、図に見られたカルシウム波伝播速度の増加に関与すること、収縮蛋白のカルシウム親和性の増加には関与しないことを示し、更に、伸展による収縮蛋白のカルシウム親和性の増加がカルシウム波伝播速度の増加に関与しないことを示唆する。

カルシウム増感薬によるカルシウム波伝播速度の変化

SCH00013 は、細胞内カルシウム値を変化させずに、発生張力を増加させることにより、収縮蛋白のカルシウム親和性を増大させることが示唆される。DPI の前処理によってこの発生張力の増加が抑制されることにより、この SCH00013 による収縮蛋白のカルシウム親和性の増大が、NOX2 を介した ROS 産生によって引き起こされることが示唆される。このような SCH00013 による収縮蛋白のカルシウム親和性の増大が、カルシウム波伝播速度に与える影響を明らかにするために、SCH00013 の投与前後で後収縮の大きさとカルシウム波伝播速度を記録した。

SCH00013 投与によって後収縮は増大し、カ

ルシウム波伝播速度は増加した。この結果は、SCH00013 による収縮蛋白のカルシウム親和性の増大が後収縮を増大させ、カルシウム波伝播速度を増加させることを示唆した。

次に、NOX を介した ROS の関与をみるために、DPI 前処理を行い、SCH00013 による収縮蛋白のカルシウム親和性の増大を抑制すると、SCH00013 による後収縮の増大は抑制され、更に、SCH00013 によるカルシウム波伝播速度の増加も抑制された。この結果は、SCH00013 による後収縮の増大とカルシウム波伝播速度の増加に、ROS 産生が関与することを示した。

(2) 局所的な活性酸素の産生がカルシウム波と不整脈の発生に果たす役割の解明

心筋収縮と活性酸素の産生

0.7mM カルシウム液では電気刺激によって発生張力は増加し、20mM BDM、0.2mM カルシウム液の投与によって発生張力は低下した。0.7mM カルシウム液において DCF 蛍光量の空間的な変化は、電気刺激によって心筋全体で増加し、20mM BDM、0.2mM カルシウム液では、心筋全体で低下した。トラベクラ中央部 1mm の平均 DCF 蛍光量は、0.7mM カルシウム液では電気刺激によって有意な増加を示し、20mM BDM、0.2mM カルシウム液では 0.7mM カルシウム液に比べて有意な低下を示した。一方、プレビスタチン投与では電気刺激による発生張力が低下したにもかかわらず、平均 DCF 蛍光量は 0.7mM カルシウム液に比べて有意な低下を示さなかった。これらの結果は、電気刺激による心筋収縮は ROS 産生を増加させること、BDM と低カルシウムはこの電気刺激による ROS 産生を抑制するのに対し、プレビスタチンは抑制しないことを示した。

不均一収縮と局所的な ROS 産生

プレビスタチンの局所灌流は、BDM や低カルシウム液の局所灌流と同様に灌流部位におけるサルコメアを受動的に伸展させ、更

に、プレビスタチン灌流部位の DCF 蛍光量を 0.5mm 離れた非灌流部位に比べて有意に増加させた。プレビスタチンの有無で ROS 産生は変化しないことから、これらの結果はプレビスタチンの局所灌流が灌流部位における心筋の受動的な伸展によって ROS 産生を増加させることを示唆する。一方、BDM 局所灌流部位では、BDM 局所灌流部位から 0.5mm 離れた非灌流部位に比べて電気刺激直後の ROS 産生は有意に減少した。このような部位による ROS 産生の差は BDM 局所灌流を停止した状態では生じなかった。低カルシウム液の局所灌流においても同様に、灌流部位では非灌流部位に比べて電気刺激終了直後に有意な ROS 産生の減少が見られた。この変化は BDM 局所灌流と同様に局所灌流を行わない心筋には生じなかった。

マウスを用いた不均一収縮モデルの確立

マウスにおいて実験に使用可能なトラベクラは 10 匹に 1 個以下であると報告されているが、我々は 48 匹のマウスにおいて 26 個のトラベクラを摘出し、張力と細胞内カルシウムを測定した。マウスにおけるトラベクラは細胞外カルシウムの上昇によって張力とピーク細胞内カルシウムが上昇し、ラットのトラベクラと同様の変化を示した。高カルシウム液のカルシウム液灌流によってカルシウム波が誘発され、その伝播速度は 1.5mm/s であった。このように、マウスのトラベクラを用いた実験モデルを確立したことにより、今後 NOX2 ノックアウトマウスを用いた研究が可能となった。

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 4 件)

1. Daniels RE, Haq KT, Miller LS, Chia EW, Miura M, Sorrentino V, McGuire JJ, Stuyvers BD. Cardiac expression of ryanodine receptor subtype 3; a strategic component of intracellular

- Ca²⁺ release system in Purkinje fibers of large mammalian heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;104: 31–42. 査読有
2. Miura M, Nagano T, Murai N, Taguchi T, Handoh T, Satoh M, Miyata S, Miller L, Shindoh C, Stuyvers BD. Effect of carbenoxolone on arrhythmogenesis in rat ventricular muscle. *Circ J.* 2016; 80: 76-84. 査読有
 3. Ellawindy A, Satoh K, Sunamura S, Kikuchi N, Suzuki K, Minami T, Ikeda S, Tanaka S, Shimizu T, Enkhjargal B, Miyata S, Kobayashi K, Taguchi Y, Handoh T, Kobayashi K, Nakayama K, Miura M, Shimokawa H. Rho-kinase Inhibition during Early Cardiac Development Causes Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35:2172-84. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305872. 査読有
 4. Miura M, Taguchi Y, Nagano T, Sasaki M, Handoh T, Shindoh C. Effect of myofilament Ca²⁺ sensitivity on Ca²⁺ wave propagation in rat ventricular muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 84:162-169. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.04.027. 査読有

〔学会発表〕(計 19 件)

1. Carbenoxolone increases arrhythmias under the modulation of mitochondrial K_{ATP} channels. Tetsuya Handoh, Masahito Miura, Chiyohiko Shindoh. 第 63 回日本不整脈心電学会学術大会(札幌、札幌コンベンションセンター)平成 28 年 7 月 16 日
2. Elevation of glucose increases arrhythmias under Ca²⁺ overload in rat myocardium with nonuniform contraction. Tetsuya Handoh, Masahito

- Miura, Chiyohiko Shindoh. 第 63 回日本不整脈心電学会学術大会(札幌、札幌コンベンションセンター)平成 28 年 7 月 17 日
3. Blockade of connexin43 by carbenoxolone increases arrhythmias under modulation of mitochondrial K_{ATP} channels. Masahito Miura, Tetsuya Handoh, Taiki Hasegawa, Riho Ozawa, Chiyohiko Shindoh. 89th AHA meeting (米国、New Orleans) 2016 Nov 13
 4. Regional ROS Produced by Paradoxical Muscle Stretch during Contraction Increases Arrhythmia Susceptibility in Rat Myocardium with Nonuniform Contraction. Masahito Miura, Tetsuya Handoh, Yuhto Taguchi, Chiyohiko Shindoh. 37th Annual Scientific Sessions of Heart Rhythm Society (米国、San Francisco) 2016 May 7
 5. Regional ROS production by paradoxical muscle stretch during contraction causes arrhythmias in the myocardium with nonuniform contraction. Yuhto Taguchi, Masahito Miura, Tetsuya Handoh, Chiyohiko Shindoh. 第 80 回日本循環器学会(仙台、仙台国際センター)平成 28 年 3 月 19 日
 6. Blockade of connexin43 increases arrhythmogenesis under the modulation of mitochondrial K_{ATP} channels. Tetsuya Handoh, Masahito Miura, Yuhto Taguchi, Chiyohiko Shindoh. 第 80 回日本循環器学会(仙台、仙台国際センター)平成 28 年 3 月 18 日
 7. Regional ROS production mediates arrhythmia susceptibility in rat

- myocardium with nonuniform contraction. Yuhto Taguchi, Masahito Miura, Tetsuya Handoh, Chiyohiko Shindoh. 第30回日本不整脈学会・第32回日本心電学会学術集会合同学術大会（京都、国立京都国際会館）平成27年7月29日
8. Myofilament Ca²⁺ sensitivity cannot modulate Ca²⁺ wave propagation in intact rat cardiac trabeculae. Tetsuya Handoh, Masahito Miura, Yuhto Taguchi, Chiyohiko Shindoh. 第30回日本不整脈学会・第32回日本心電学会学術集会合同学術大会（京都、国立京都国際会館）平成27年7月29日
9. Effect of high glucose on arrhythmia susceptibility in rat myocardium with nonuniform contraction. Tetsuya Handoh, Masahito Miura, Yuhto Taguchi, Chiyohiko Shindoh. 第79回日本循環器学会（大阪、大阪国際会議場）平成27年4月24日
10. High Glucose Concentration Increases Arrhythmia Susceptibility under Conditions of Ca²⁺ Overload in Rat Myocardium with Nonuniform Contraction. Tetsuya Handoh, Masahito Miura, Yuhto Taguchi, Minami Satoh, Chiyohiko Shindoh. 88th AHA meeting (米国、Orlando) 2015 Nov 9
11. Paradoxical Muscle Stretching during Contraction Regionally Increases ROS Production in Rat Myocardium with Nonuniform Contraction. Yuhto Taguchi, Masahito Miura, Tetsuya Handoh, Minami Satoh, Chiyohiko Shindoh. 88th AHA meeting (米国、Orlando) 2015 Nov 9
12. Regional ROS production causes Ca²⁺ waves in the myocardium with

nonuniform contraction. Yuhto Taguchi, Masahito Miura, Yuka Kato, Tetsuya Handoh, Mai Sasaki, Chiyohiko Shindoh. 87th AHA meeting (米国、Chicago) 2014 Nov 16

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者

三浦 昌人 (MIURA MASAHIITO)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30302110