

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461074

研究課題名(和文)心室細動ストームの成立機序：カルモジュリンキナーゼの役割と治療標的としての可能性

研究課題名(英文)Role of CaMKII in an experimental model of ventricular fibrillation storm

研究代表者

辻 幸臣 (TSUJI, Yukio)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：60432217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：重篤な心臓不整脈疾患「反復する心室頻拍・細動(電気的ストーム)」を再現したモデル動物を用いて、電気的ストームを光学マッピングで可視化するとともに、心筋組織の特性変化を解析した。このモデル動物は、心臓突然死をきたすQT延長症候群に類似した特徴をもつ。本研究により、トルサード・ド・ポアンツ型心室頻拍が病態特有な興奮伝播様式を示すこと、心室細動が渦巻き型興奮旋回波(マザーローター)によって維持されること、この病態に細胞内リン酸化酵素カルモジュリンキナーゼ(CaMKII)による電位依存性Naチャンネルの機能異常が重要な役割を果たしていることが判明した。心室細動の成立に関わる重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate mechanisms of ventricular tachycardia and fibrillation (VT/VF), we studied a rabbit model of electrical storm featuring multiple defibrillator-firings for repetitive VT/VF by electrical remodeling (QT-prolongation) due to chronic atrioventricular block. Optical mapping revealed that although a vortex-like reentrant activity called a rotor underlies both VT and VF, they have the rotor frequency and dynamics particular to themselves. VT resulted from a rotor in the distinctive manner, possibly explaining the ECG pattern of Torsades de Pointes (TdP), and VF was sustained by a high frequency stable rotor. Late Na-current was a major contributor to the substrate favoring TdP-related rotor, based on our findings that Na-channel Nav1.5 was hyperphosphorylated by Ca/calmodulin-dependent protein kinase II and that late Na-current blockade with lidocaine suppressed TdP. Conversion to a rapidly stationary rotor from a disease-specific rotor may be essential for VT-transition to VF.

研究分野：循環器内科学・不整脈学・心臓電気生理学

キーワード：心室細動 トルサード・ド・ポアンツ CaMKII 遅延ナトリウム電流

1. 研究開始当初の背景

(1) 心室細動 (VF) は、心臓突然死を引き起こす致死性不整脈である。VF が成立するには通常、心室性不整脈が発生し、それが VF へ移行・維持する段階を経るが、その成立機序は必ずしも明らかでなく、また、関与する分子基盤の知見も乏しい。

(2) 我々は、VF が繰り返し発生し植込み型除細動器 (ICD) が頻回作動する重篤な不整脈状態を呈する新しい実験モデル動物・VF ストーム家兎モデルを確立した。これまでに、その心室筋組織のカルシウム (Ca^{2+}) /calmodulin 依存性キナーゼ (CaMKII) が著しく亢進し、その標的である Ca^{2+} 制御蛋白・L 型 Ca^{2+} チャンネル、リアノジン受容体などの際立ったリン酸化異常が引き起こされていることを見出した。CaMKII が VF ストームの病態に重要な役割を果たしていることが示唆される。

2. 研究の目的

VF が心室不整脈から VF へ移行する成立過程を明らかにするために

(1) 高分解能光学マッピングシステムを用いて、VF ストーム家兎モデルにて自然発生する心室頻拍 (VT) /VF を可視化する。

(2) CaMKII のもう一つの重要標的である電位依存性ナトリウム (Na^+) チャンネルが、VF ストーム家兎モデルの病態に果たす役割・意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) VF ストーム家兎モデルの作成
このモデルは、完全房室ブロックを作成、ICD を埋め込むことで作成される。完全房室ブロック家兎モデルは、両心室肥大と著明な QT 時間延長を呈し、Torsades de Pointes 型の非持続性心室頻拍 (TdP) が高率に自然発生、VF へ移行し突然死する特徴を有する。ICD バックアップ、補充調律下に約 3 か月経過観察すると、すべてに VF エピソードが記録され、そのうち約半数の家兎が VF ストーム (定義: 24 時間内に 3 回以上の VF エピソード) に見舞われる。VF ストームに進展した家兎を使用し、以下の実験を行った。

(2) 摘出灌流心の光学マッピング
光学マッピングシステムを用いて、TdP と VF の興奮伝播様式を解析した。摘出ランゲンドルフ灌流心を膜電位感受性色素 (di-4-ANEPPS) で染色した後、心表面および心内膜面より膜電位を記録した。

(3) ウエスタンブロット

心室筋組織の抽出蛋白を用いて、CaMKII による Na^+ チャンネルのリン酸化状態を評価した。抗リン酸化 $\text{Na}_v1.5$ 抗体 (S571) は、Peter Mohler 教授 (オハイオ州立大学) から提供さ

れた。抗 $\text{Na}_v1.5$ 抗体 (Alomone)、抗リン酸化 Akt1/2/3 抗体 (Santa Cruz)、抗 Akt1/2/3 抗体 (Santa Cruz) の一次抗体を使用した。バンド強度は GAPDH (Fitzgerald) で標準化し、定量評価された。

(4) 遅延 Na^+ 電流阻害の効果検証

Na^+ チャンネルの機能異常により生じる遅延 Na^+ 電流の増加が、この家兎モデルの催不整脈性に関与するのかを生体中心 (in-vivo) で検証した。ケタミン + キシラジン麻酔下に、心電図モニターを 1 時間実施し、リドカイン 2 mg/kg 静注による抗不整脈効果を観察した。薬物用量は、既知の報告に基づき決定された。リドカイン 2 mg/kg 静注は、活動電位立ち上がり相に影響を及ぼすことなく遅延 Na^+ 電流が抑制されることが示されている。

4. 研究成果

(1) TdP と VF の可視化

光学マッピングにて、TdP の特徴的な興奮伝播様式と、VF の駆動源・渦巻き型興奮旋回波 (マザーローター) を捉えることに成功した。その詳細は、未発表のため割愛する。

(2) 遅延 Na^+ 電流阻害による抗不整脈効果

リドカイン 2 mg/kg の静注による遅延 Na^+ 電流阻害が、QT 時間を短縮、反復発生する TdP を完全に抑制した。この所見は、遅延 Na^+ 電流がこのモデルの催不整脈性に大きく寄与していることを意味する。

(3) CaMKII による Na^+ チャンネル過リン酸化

遅延 Na^+ 電流は催不整脈電流で、その増加によって、早期・遅延後脱分極 (EAD/DAD) が惹起されやすくなる。遅延 Na^+ 電流の増加は、先天性 QT 延長症候群 3 型のみならず、最近、肥大型心筋症、心不全、心筋梗塞、薬剤性 QT 延長症候群など様々な疾患で指摘されている。その増加の機序として、CaMKII による Na^+ チャンネルの過リン酸化、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) シグナルの減弱、という 2 つの翻訳後修飾が知られている。VF ストーム家兎モデルにおける遅延 Na^+ 電流増加の原因は、どちらか、または両者によるものかを検証した。心室筋組織では、チャンネルサブユニット $\text{Na}_v1.5$ が CaMKII によって過リン酸化されていること、 $\text{Na}_v1.5$ の発現が増加することが判明した。一方、活性型であるリン酸化 Akt 発現には変化がなかったことから、PI3K/Akt シグナルの関与は否定的であった。遅延 Na^+ 電流の増加は、CaMKII による機能異常によって引き起こされることが示唆された。

まとめ

(1) CaMKII による Na^+ チャンネルの過リン酸化に伴う機能変化が、重大な催不整脈特性を引き起こすことを、VF ストーム家兎モデルでも証明することができた。CaMKII に加え、 Na^+

チャンネルなどの標的蛋白は、重症不整脈の治療標的となり得ると考えられる。

(2) VF は、VT から複数のランダムにさまよう興奮波へ変性 (degeneration) することではなく、病態特有の基質から発生する VT が、マザーローターへ転換 (conversion) することで成立すると考えられる。

(3) 今後の研究にて、マザーローターへの転換が促進される因子を同定・探索していく予定である。

<引用文献>

Tsuji Y, Hojo M, Voigt N, El-Armouche A, Inden Y, Murohara T, Dobrev D, Nattel S, Kodama I, Kamiya K. Ca²⁺-related signaling and protein phosphorylation abnormalities play central roles in a new experimental model of electrical storm. *Circulation* 123:2192-2203, 2011.

Yamazaki M, Avula U, Berenfeld O, Kalifa J. Mechanistic comparison of “nearly missed” versus “on-target” rotor ablation. *J Am Coll Cardiol Clin Electrophysiol* 1:256-269, 2015.

Yamazaki M, Honjo H, Nakagawa H, Ishiguro YS, Okuno Y, Amino M, Sakuma I, Kamiya K, Kodama I. Mechanisms of destabilization and early termination of spiral wave reentry in the ventricle by a class III antiarrhythmic agent, nifekalant. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H539-548, 2007.

Tsuji Y, Opthof T, Yasui K, Inden Y, Takemura H, Niwa N, Lu Z, Lee JK, Honjo H, Kamiya K, Kodama I. Ionic mechanisms of acquired QT prolongation and torsades de pointes in rabbits with chronic complete atrioventricular block. *Circulation* 106:2012-2018, 2002.

Tsuji Y, Zicha S, Qi XY, Kodama I, Nattel S. Potassium channel subunit remodeling in rabbits exposed to long-term bradycardia or tachycardia: discrete arrhythmogenic consequences related to differential delayed-rectifier changes. *Circulation* 113:345-355, 2006.

Qiu XS, Chauveau S, Anyukhovskiy EP, Rahim T, Jiang YP, Harleton E, Feinmark SJ, Lin RZ, Coronel R, Janse MJ, Opthof T, Rosen TS, Cohen IS, Rosen MR. Increased late sodium current contributes to the

electrophysiological effects of chronic, but not acute, dofetilide administration. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 9:e003655, 2016.

Belardinelli L, Giles WR, Rajamani S, Karagueuzian HS, Shryock JC. Cardiac late Na⁺ current: Proarrhythmic effects, roles in long QT syndromes, and pathological relationship to CaMKII and oxidative stress. *Heart Rhythm* 12:440-448, 2015.

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3件)

辻 幸臣. CaMKII と不整脈. 心電図 36:296-301, 2016. (査読無)
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=dn4eleca/2016/003604/003&name=0296-0301j&UserID=133.45.235.22>

辻 幸臣, Harrell DT, 石川 泰輔, 蒔田直昌. 遺伝性不整脈疾患に伴う electrical storm: プルキンエ細胞の電気生理学的特殊性. 心電図 35:104-115, 2015. (査読無) DOI:
<http://doi.org/10.5105/jse.35.104>

Tsuji Y, Ishikawa T, Makita N. Molecular mechanisms of heart failure progression associated with implantable cardioverter-defibrillator shocks for ventricular tachyarrhythmias. *J Arrhythmia* 30:235-241, 2014. (査読有) DOI:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.joa.2014.04.003>

[学会発表](計10件)

辻 幸臣. 致死性不整脈に対する除細動器ショック治療の病態生理学的意義. 名古屋大学平成28年度基盤医学特論. 2016.9.16. 名古屋大学環境医学研究所(愛知県・名古屋市)

辻 幸臣. 心室細動ストームと心臓プルキンエ線維. 名古屋大学平成27年度基盤医学特論. 2016.2.12. 名古屋大学環境医学研究所(愛知県・名古屋市)

辻 幸臣. 遺伝性不整脈疾患に伴う電気的ストーム: プルキンエ細胞の電気生理学的特殊性. Expert Conference of Arrhythmia in Nagoya vol. 4. 2015.9.8. 名古屋東急ホテル(愛知県・名古屋市)

Tsuji Y, Harrell DT, Ishikawa T, Makita N. Translational perspective on pathophysiology of frequent

ICD-shocked ventricular tachyarrhythmias. Panel Discussion 6 in the Joint Meeting of the 30th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society and the 32nd Annual Meeting of the Japanese Society of

Electrocardiology. 2015.07.31. 国立京都国際会館(京都府・京都市)

辻 幸臣. 遺伝性不整脈疾患に伴う電気的ストーム: プルキンエ細胞の電気生理学的特殊性. HEIAN Forum 2015. 2015.7.31. メルパルク京都(京都府・京都市)

Tsuji Y. Electrical storm: pathophysiological insights and therapeutic consequences. Asian Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session 2014. 2014.11.1. ニューデリー(インド)

Tsuji Y, Ishikawa T, Makita N. Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in atrial and ventricular remodeling and arrhythmias. Symposium 9 in the Joint Meeting of the 29th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society and the 31st Annual Meeting of the Japanese Society of

Electrocardiology. 2014.07.24. ザ・プリンスパークタワー東京(東京都・港区) 辻 幸臣, 石川 泰輔, 蒔田 直昌.

Electrical storm in inherited arrhythmia syndromes. 学術諮問委員会提言シンポジウム. 第29回日本不整脈学会・第31回日本心電学会合同学術集会. 2014.7.23. ザ・プリンスパークタワー東京(東京都・港区)

Tsuji Y. Electrical storm: Translational perspective on pathophysiology and therapy. Korean Heart Rhythm Symposium 2014. 2014.06.14. キョンギド(韓国)

Tsuji Y, Makita N. Is Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II involved in ventricular fibrillation degeneration? Symposium 46 in the 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan.

2014.3.18. 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 幸臣(TSUJI, Yukiomi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師
研究者番号: 60432217

(2) 研究分担者

本荘 晴朗(HONJO, Haruo)
名古屋大学・環境医学研究所・准教授
研究者番号: 70262912

山崎 正俊(YAMAZAKI, Masatoshi)
東京大学・大学院工学系研究科・特任研究員
研究者番号: 30627328

(3) 連携研究者

蒔田 直昌(MAKITA, Naomasa)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授
研究者番号: 00312356

(4) 研究協力者

ドブレブ ドブロミア(DOBREV, Dobromir)
ナッテル スタンレー(NATTEL, Stanley)