

平成30年6月6日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461085

研究課題名(和文) Kv1.3 移入線維芽細胞による障害心筋の電氣的再生と逆リモデリング誘導の研究

研究課題名(英文) Reproduction of injured myocardium and introduction of reverse remodeling by implantation of Kv1.3 transfected fibroblast.

研究代表者

庭野 慎一 (NIWANO, SHINICHI)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：70282978

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)：in vivoモデルとして心不全ラットモデルを作成した。心筋傷害の程度、再現性、個体の死亡率から、イソプロテレノール皮下投与2日負荷、80mg/kg/dayを設定した。負荷後1週間で、組織学的には心筋の肥大と変性、間質の増殖、電気生理学的には、不応期の延長(平均52%)と活動電位持続時間の延長(MAP20で120%、MAP90で56%)を認めた。並行して生ずる液性因子として、CTGF、TGF-beta、MCP-1、IL-2があり、初期の炎症負荷が生じているものと推定された。線維芽細胞へのチャンネル移入のためのプラスミドを再設計し、Kv1.3の発現も改善したが、再現性が乏しかった。

研究成果の概要(英文)：As the in-vivo heart failure model, isoproterenol injection model was employed with dose of 80mg/kg/day for 2 days. Histological evaluation showed myocardial hypertrophy, degeneration and interstitial proliferation, and the electrophysiological evaluation found prolongation of effective refractory period (mean 52%) and MAP duration (120% MAP-20 and 56% MAP-90). Early step of inflammation was considered to play a role in these changes because increase of CTGF, TGF-beta, MCP-1, and IL-2 were found. By re-design of plasmid, transfection of Kv1.3 to the fibroblast was improved, but the reproducibility was still limited.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 イオンチャンネル 炎症 再生医療 リモデリング

1. 研究開始当初の背景

我々の先行研究により (Wakisaka, Niwano, et al. *Cardiovasc Res*, 2004)、心不全モデル動物 (Lewis Rat における自己免疫性心筋炎モデル) では、亜急性期に活動電位が延長し、細胞内 Ca 過負荷が生ずることで心筋傷害が助長されること、ならびにその活動電位延長に一過性外向き K チャネルの発現が低下する電気的リモデリングが関与していることが明らかになっていった。さらに我々の追加研究において、この不全心筋の活動電位延長を、K-ATP チャネル開口作用を持つ薬物によって薬理的に短縮することで、心筋収縮力が保持できることが実験的に確認できたことから (Niwano et al. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004, & Niwano, et al. *Int Heart J* 2012)、何らかの方法で活動電位短縮 (正常化) が計れば、心不全における心筋障害が防止できる可能性があるかと推論した。

Yankelson ら (*Circulation* 2008; 117: 720-31) は、イオンチャネル遺伝子を移入した線維芽細胞を移植することで心筋の活動電位が調節できることを報告し、Cell Therapy と定義していた。彼らは、心筋細胞にはほとんど発現していない Kv1.3 を線維芽細胞に移入し、その線維芽細胞を心筋に移植することで心筋細胞と線維芽細胞の電気的連結を招来し、結果的に心筋細胞と線維芽細胞の間に Electrotonic connection を実現した。我々の研究成果から、この Cell Therapy を利用した活動電位の短縮によって傷害され活動電位が異常になった部位を修復することが心機能保持に有用である可能性が推論された。

2. 研究の目的

本研究は、心不全で変化した活動電位を再生し正常化することで、心筋の逆リモデリングを誘導し、心不全や不整脈の基盤形成を制御するという方法論を実験的に検証することを目的とした。本研究では、イオンチャネル遺伝子を移入した線維芽細胞を移植することで、心筋の活動電位を正常化し、心機能保持と不整脈抑制を図るといった新しい方法論、すなわち Cell Therapy を検証するとともに、心不全と不整脈の新たな治療概念の確立を目指した。

3. 研究の方法

この研究では以下の4つのステップを計画した。ラット心不全モデルの再現性と電気的・生理学的評価法の確立、移植に用いる Kv1.3 + Kir2.1 移入線維芽細胞ラインの作成、Kv1.3 + Kir2.1 移入線維芽細胞移植による電気的・組織学的な効果の評価。ラット心不全モデルへの Kv1.3 + Kir2.1 移入線維芽細胞移植という介入による効果の評価、である。は当初の予定を変更し、イソプロテレノール負荷による心不全ラット (SD rat) を用いた。予定していた自己免疫性心筋炎モデルの心筋傷害が不均一でかつ再現性に優れていな

いことから、本研究の基礎モデルとして不適切と判断した結果である。イソプロテレノールは特定量の腹腔内投与負荷によって一過性の急激な心拍数増加を来し、急速な Ca 過負荷によって心内膜を中心とした心筋傷害を引き起こす。しかし、その至適投与方法は実験モデルによって異なっているため、我々もその投与量を設定することから実験を開始した。イソプロテレノール負荷量ならびに期間を検討し、負荷後の生存率が高くかつ心筋傷害の再現性の高い用量を設定した。電気生理学的評価は、心筋刺入白金電極で電気生理検査を行って評価した。電気刺激はプログラム刺激装置を用い、拡張期閾値の2倍の強度で刺激した。計測項目は、心室筋の有効不応期、心室内伝導時間、単相性活動電位 (MAP) の持続時間で、プログラム刺激の早期刺激の短縮は 2msec 間隔で短縮した。単相性活動電位は、心内電位記録の低周波フィルターを一時的に OFF にすることで記録し、活動電位立ち上がり (0 相) から再分極までの時間を MAP 持続時間 (MAPD) として計測した。MAPD は 20% 回復時間、90% 回復時間を各々 MAPD20, MAPD90 として計測し、各々再分極相早期および終末期の指標とした。電気生理学的指標は、基本周期長 180msec, 150msec, 120msec 各々において評価し、各指標の頻度依存性も評価した。は pBICEP-CMV-1 ベクター系を用い、Kv1.3 および Kir2.1 遺伝子を NIH-3T3 線維芽細胞ラインへ共発現させた。発現の有無を、蛍光抗体法で確認した。については、Kv1.3 および Kir2.1 遺伝子を NIH-3T3 線維芽細胞ラインへ共発現させ、その発現を、蛍光抗体法による組織学的確認、およびパッチクランプ法による生理学的確認を予定した。結果的に組織学的確認は出来たが、K⁺電流の発現が十分でなく、生理学的確認が出来なかった。要因として、Kv1.3 発現が不十分な不安定である可能性が推測され、さらにベクターを再設計する必要性を考慮していた。については、で確認できたモデル動物に線維芽細胞を移植し、活動電位の変化と心機能の推移を検討する予定としていた。

4. 研究成果

(1) 心不全モデルラットの作成: イオンチャネル移入線維芽細胞を移植し、心機能改善を確認するための in vivo モデルとして心不全ラットモデルを作成した。予定していた自己免疫性心筋炎モデルの心筋傷害が不均一でかつ再現性に優れていないことから、本研究の基礎モデルとして不適切と判断し、イソプロテレノール負荷による心不全モデルを採用した。イソプロテレノールは腹腔内投与し、1 日負荷、2 日負荷、ならびに 20-150mg/kg/day の用量を用い、個体の生存率、心機能、心筋組織変化ならびに心室筋の電気生理学的特性を評価した。まず 1 日負荷では心不全の発症に個体差が大きく、かつ評

価できる変化が少なかったため、2日負荷が適切であると判断した。イソプロテレノールの用量としては100mg以上では死亡率が50%を超え、また50mg以下では有意な心筋の変化を認める個体が30%以下であったため、80mg/kg/dayが適当であると判断した。

(2)心筋に生ずる変化の定量：今回の検討では、心室筋組織の解剖学的変化ならびに電気生理学的特性変化を評価した。上記負荷の後1週間経過観察して個体を評価したが、組織学的には心筋の肥大と一部の变性、間質の増殖を認めた。電気生理学的には、不応期の延長(平均52%)と活動電位持続時間の延長(MAP20で120%、MAP90で56%)を認めた。心筋有効不応期はコントロールに比して心不全モデルで延長する傾向を認めた。有意差を認めたのは基本周期長180msecのみであり、MAPの変化と解離する要因は明らかではなかった。心室内伝導時間は心不全モデルで延長した(基本刺激周期長/延長平均%：各々180msec/160%、150msec/190%、120msec/220%)。組織学的炎症および間質線維化が、有効不応期よりも心室内伝導速度により直接的に影響している結果であると考察された。

(3)並行する液性因子の評価：上記変化に並行して生ずる液性因子の評価を行った。有意な上昇を認めたのは、CTGF(平均210%)、TGF-beta(平均320%)、MCP-1(平均180%)、IL-2(平均260%)であり、初期の炎症負荷が生じているものと判断された。

(4)移植のための線維芽細胞の作成：予定しているチャンネル移入のためのプラスミドを再作成した。結果的に前回まで発現が不良であったKv1.3も発現するようになったが、再現性が乏しく、さらに改良が必要と考えられた。Kv1.3およびKir2.1遺伝子をNIH-3T3線維芽細胞ラインへ共発現させ、その発現を、蛍光抗体法による組織学的確認、およびパッチクランプ法による生理学的確認を予定した。結果的に組織学的確認は出来たが、K⁺電流の発現が十分でなく、生理学的確認が出来なかった。要因として、Kv1.3発現が不十分な点し不安定である可能性が推測され、さらにベクターを再設計する必要性を考慮していた。

(5)付加の実験として、抗酸化作用を示し得るリナグリプチンを治療的に投与する実験を開始した。パイロット的研究では、不応期延長が抑制される傾向が確認されており、その効果と機序について追加的検討を予定している。これまでの検討では、リナグリプチンの多面的作用としての抗酸化作用が組織変性を抑制して、間質線維化を抑制していることが有力な機序と推定された。

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 1 件)

Kurokawa S, Niwano S, Niwano H, Ishikawa S, Murakami M, Kosukegawa T, Masaki Y, Tamaki H, Toda T, Noda Y, Shimizu T, Izumi T. Cardiomyocyte-derived Mitochondrial Superoxide Causes Myocardial Electrical Remodeling by Down-regulating Potassium Channels and Related Molecules *Circ J*, 査読有、2014; 78: 1950-59.

〔学会発表〕(計 3 件)

Ishizue N, Niwano S, Nakamura H, Igarashi T, Fujiishi T, Yoshizawa T, Oikawa J, Kishihara J, Murakami M, Fukaya H, Niwano H, Ako J. Linagliptin, a DPP-4 Inhibitor, Suppresses the Electrical Remodeling in Isoproterenol-induced Myocardial Injury Model in Rat. *J Arrhythmia* 2015; suppl-454.

Ishizue N, Niwano S, Nakamura H, Igarashi T, Fujiishi T, Yoshizawa T, Oikawa J, Kishihara J, Murakami M, Fukaya H, Niwano H, Ako J. Linagliptin, a DPP-4 Inhibitor, Suppresses the Electrical Remodeling and Myocardial Injury in Isoproterenol-induced Myocardial Injury Model in Rat. *Eur Heart J* 2015; suppl-

Oikawa J, Niwano S, Niwano H, Nakamura H, Igarashi T, Fujiishi T, Ishizue N, Yoshizawa T, Kishihara J, Satoh A, Murakami M, Fukaya H, Tamaki H, Ako J. Anti-oxidant component suppresses the construction of arrhythmogenic substrate in the isoproterenol induced acute myocardial injury. *Circ J* 2016, Program of 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society PE-708. 3/20

〔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

庭野 慎一 (NIWANO, Shinichi)
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：70282978

(2) 研究分担者

庭野 裕恵 (NIWANO, Hiroe)
北里大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：00293233