

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：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461055

研究課題名(和文)持続性心房細動における心房内異常電位の成因と機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of complex fractionated atrial electrograms in persistent atrial fibrillation

研究代表者

村越 伸行 (MURAKOSHI, Nobuyuki)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80447218

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)：連続性分裂電位(complex fractionated atrial electrogram; CFAE)は持続性心房細動の心内電位中の微小電位であり、電気的リモデリングの指標の一つである。心房筋・線維芽細胞混合培養を高頻度ペースングあるいはアンジオテンシンII処理すると、CFAE様電位が認められ、細胞内カルシウム過負荷を呈した。ナトリウム・カルシウム交換機構の発現亢進、カルシウム・カルモデュリン依存性キナーゼII、リアノジン受容体2、および筋小胞体Ca-ATPase(SERCA)2aの過活性化、およびコネクシン40の発現低下を認め、CFAEの形成・維持に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Complex fractionated atrial electrograms (CFAEs) are likely to be observed in the atrial electrocardiogram from patients with persistent atrial fibrillation. CFAE-like electrical activity was observed in atrial cardiomyocytes co-cultured with cardiac fibroblast after tachypacing stimulation or treatment with angiotensin II. Intracellular calcium overload was seen in such area, and calcium-handling molecules were dynamically altered. Sodium-calcium exchanger expression was increased, calcium/calmodulin-dependent kinase II, ryanodine receptor II, and sarcoplasmic reticulum ATPase 2a were hyperactivated, and gap junction protein connexin 40 expression was decreased, which were suggested to contribute to the formation and perpetuation of CFAE.

研究分野：循環器内科

キーワード：心房細動 不整脈 臨床心臓学 連続性分裂電位

1. 研究開始当初の背景

心房細動は最も頻度の高い不整脈疾患の一つであり、現在日本で約1%が罹患しており、約100万人の患者がいると推定される。生活の質や運動耐容能の低下、心不全の発症リスクの上昇をもたらすばかりでなく、心原性脳梗塞のリスクを5~6倍に増加させる。その結果、寝たきりの増加、医療コストの増加を引き起こし、生命予後を1.5~2.5倍に悪化させ、平均60歳の心房細動患者の15年死亡率は40%以上にも至るため、適切な予防と治療が必須である。心房細動のリズムの正常化を目的とした治療には薬物治療、電気的除細動、およびカテーテルアブレーション治療がある。抗不整脈薬による薬物治療はリズムを正常化し、洞調律を維持する作用を有しているが、逆に不整脈を起りやすくする副作用(催不整脈作用)も併せ持ち、多くの大規模試験で予後をかえって悪化させる可能性が示されている。

1998年、心房細動発生のトリガーの約9割が肺静脈起源であり、肺静脈-左心房間の伝導を電気的に隔離することで心房細動の根治が可能であることが報告され、その後肺静脈隔離術(pulmonary vein isolation: PVI)は心房細動の治療法として確立し、今や発作性心房細動に対するアブレーション治療は80%以上の症例で洞調律を維持できるようになった。しかし一方、持続性・慢性心房細動に対するアブレーション治療の洞調律維持率は約50~70%であり、まだ不十分と言わざるを得ない。心房細動の難治化・持続化を規定するのは左心房の電気的・構造的リモデリングであり、構造的リモデリングは病理学的には心房間質の線維化、臨床的には心房細動持続時間および左心房径が構造的リモデリングの進行を示唆する指標になる。一方、電気的リモデリングの臨床的指標として確立したものはない。

心房内で観察される心房内異常電位:CFAEs(Complex Fractionated Atrial Electrograms: 連続性分裂心房電位)は持続性・慢性心房細動患者の心内電位中に連続的に記録される微小電位である。従来のPVIにCFAEsをターゲットにした局所電位ガイドアブレーションを追加すると持続性心房細動であっても高い治療効果が得られることが報告され、我々もCFAEsを標的としたアブレーションを通常のPVIに追加することによって、左心房機能が改善し、持続性心房細動患者の治療成績を向上させることができることを報告している。すなわちCFAEsは電気的リモデリングの進行した指標の一つであり、難治性心房細動の重要な治療ターゲットである。しかしCFAEsに関していくつか未知の問題が残されている、一つはCFAEsの判定は主観的判断に依存しており、客観的診断法は確立していないということ、またCFAEsの記録には心房内に電極カテーテルを挿入する必要がある、侵襲性があると

いうこと、さらに、CFAEsはマイクロリエントリーや撃発電位を反映した電位と推測されるものの、その成因が明らかでないことである。

2. 研究の目的

本研究は、細胞電気生理、心臓イメージング、および分子生物学的・病理学的解析を組み合わせ、CFAEs形成の成因・機序・過程を明らかにし、心房細動の持続性にどのように関わっているのかを解明することが目的である。さらに解明された知見をもとに心房細動に対する治療成績の向上と、さらには有効な予防的治療の確立につなげていくことが目的である。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた実験

① 心房筋・線維芽細胞混合培養による異常電位(連続性分裂電位)・興奮伝播様式の観察

ラット初代心房筋培養細胞を心筋線維芽細胞とともに多点平面電極上に培養した。1200Hzの心筋ペーシングした後、活動電位持続時間、局所電位、興奮伝播様式を多点電極記録システム MEA2100-Lite (Multichannel Systems) で記録した。

同様に心房筋細胞を線維芽細胞と混合して培養し、高頻度ペーシングをする群としない群に分けた。負荷開始6時間後、培養細胞にカルシウム感受性蛍光色素Fluo-4を添加し、高速イメージングシステム MiCAM02 (Brain Vision) で興奮伝播様式やカルシウム動態を可視的に解析した。

② 異常電位(連続性分裂電位)記録部位の遺伝子・タンパク発現の評価

長時間心房筋ペーシング後の心房筋線維芽細胞混合培養の異常電位を呈する部位および正常電位を呈する部位を回収し、RNAを抽出し、リアルタイムPCRで遺伝子発現を解析した。タンパクを抽出し、カルシウム調節タンパクであるCaMKII抗体、oxidized CaMKII抗体、Ryanodine receptor 2抗体、Serine2814-phosphorylated ryanodine receptor抗体を用いてWestern blottingを行い、タンパク発現を解析した。また、心房筋線維芽細胞混合培養を免疫染色し、connexin 40の発現を評価し、異常電位を記録する部位と正常部位との発現の相違を比較した。

(2) マウスを用いた実験

① マウス心房細動易誘発モデルの電気生理的評価

心房細動易誘発性モデルとして、野生型マウスに5週齢から13週齢までの8週間、高脂肪食を投与したマウスを使用した。対照として通常食を投与したマウスを用いた。頸静脈から多点電極カテーテルを挿入し、心房細動の誘発性・持続性を評価し、同時に心房細動

中の心内電位を記録した。また全身麻酔下でテレメトリー心電計を植込み、自然発生性の心房細動を観察し、持続性を評価した。

② マウス心房細動モデルにおける異常電位（連続性分裂電位）や興奮伝播様式の観察
心房細動モデルマウスのランゲンドルフ灌流心あるいは心房組織切片を、培養細胞を用いた検討と同様、多点平面電極システム、高速イメージング、および心房内異常電位自動判定システムを併用し、活動電位持続時間、局所電位、興奮伝播様式を記録し、心房内異常電位（連続性分裂電位）を同定した。

4. 研究成果

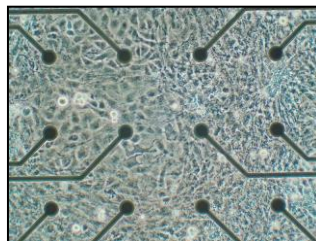
(1) 培養細胞を用いた実験

ラット初代心房筋細胞を採取し、コラーゲンコートした多電極付ディッシュ上に心房由来線維芽細胞との混合培養を行った（図 1）。1200Hz の高頻度ペーシングを行った細胞と行わなかった細胞で自発活動電位、プログラム刺激下での活動電位、伝導速度を記録した。高頻度ペーシング群では活動電位持続時間の短縮が認められ、一部に連続性分裂電位様波形が認められた（図 2）。同様の波形は angiotensin II (AII) 1 μ M 処理 24 時間後にも認められた。

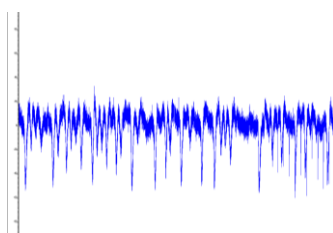
同部位は細胞内カルシウム過負荷を示し、Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) mRNA の発現増加、自動能に関わる IK1 channel をコードする Kir2.1 mRNA、および gap junction に関わる connexin 40 の発現低下が認められた。一方、心房細動発症に重要な役割を果たしているカルシウムハンドリングに関わる遺伝子：リアノジン受容体タイプ 2 (RyR2)、筋小胞体カルシウム ATPase (SERCA2a)、ホスホランパン (PLB) の各 mRNA 発現は有意な変化は認められなかった。

AII 刺激した細胞と非処理細胞から抽出した RNA の遺伝子発現解析を行うと、カルシウムハンドリング関連遺伝子 (NCX、RyR2、SERCA2a、PLB) の発現は同様の所見であり、さらに NADPH oxidase subunit である p22phox の発現が亢進していた。また AII 刺激した細胞と非処理細胞から抽出したタンパクを Western blotting で解析した結果、oxidized Ca/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII)、および Ser2814-phosphorylated RyR2 の発現が AII 刺激群で有意に亢進していた。

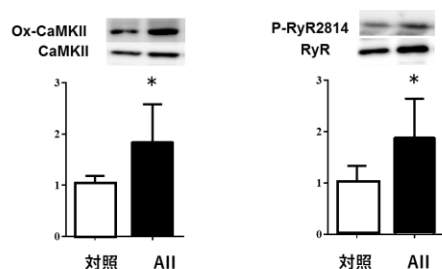
免疫染色では心筋細胞間に connexin 40 の発現が認められたが、高頻度ペーシング群および AII 投与群では connexin 40 の発現低下および発現の偏在化が認められた（図 4）。



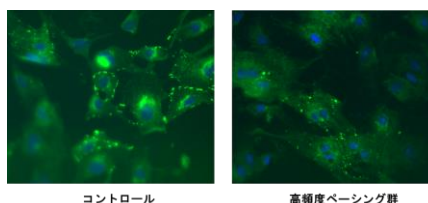
(図 1) 多電極ディッシュ上の心房筋・線維芽細胞



(図 2) 心房筋・心筋線維芽細胞混合培養の高頻度ペーシング後の連続性分裂電位様波形



(図 3) 培養細胞における Western blotting (左: oxidized CaMKII、右 Ryanodin receptor (RyR2) (Ser2814-phosphorylated))

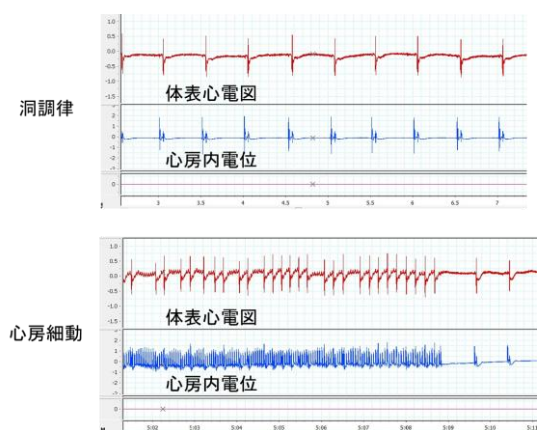


(図 4) 培養心房におけるコネクシン 40 の免疫染色 (左: 対照、右: 高頻度ペーシング)

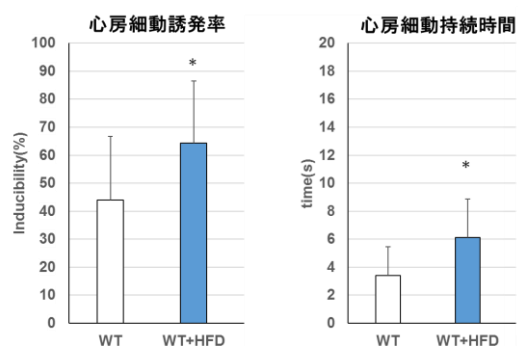
(2) マウスを用いた実験

野生型マウスに 5 週齢から 8 週間、高脂肪食 (脂質 60%) または通常食 (脂質 5%) を与えた。8 週後、マウスの体重および皮下・内臓脂肪量は、高脂肪食群で有意に増加した。野生型マウス・高脂肪食マウスに対し頸静脈的に多電極カテーテルを右心房に挿入し、電気生理検査および心房細動誘発を行った。3000bpm、15 秒間の高頻拍ペーシングの後、

図5下のような心房細動が誘発され、数秒間で自然停止した。高脂肪食マウスでは、通常食マウスと比較し心房細動誘発率の上昇および持続時間の延長が認められた(図6)。リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析では、高脂肪食マウスの心房において、カルシウムハンドリングに関わる RyR2、SERCA2a、PLBの各 mRNA 発現は通常食マウスの心房に比較して低下する傾向が認められた。



(図5)マウスにおける心房細動の誘発
(高頻度ペーシング後に心房細動が誘発される。上：洞調律時の体表心電図および心房内電位、下：心房細動時の体表心電図および心房内電位)



(図6)マウス心房細動誘発率および持続時間
(左：心房細動誘発率、右：心房細動持続時間)

(考察・総括)

心房筋・心筋線維芽細胞混合培養を高頻度ペーシングあるいはアンジオテンシン II 処理すると、持続性心房細動で認められる連続性分裂電位(CFAEs)様の波形を観察することができた。同部位では細胞内カルシウム過負荷を示し、カルシウムハンドリングに関わる分子の変化を認めた。NADPH oxidase を含む酸化ストレスの亢進により、カルシウム調整機構の指揮の役割を有する CaMKII が酸化型優位となり、その下流にある RyR2 および SERCA2a が過活性化すること、また NCX 発現が亢進することにより、細胞内カルシウム過

負荷状態となり、結果として心房細動における CFAEs が出現・持続する可能性が示唆された。しかしながら実際の生体における所見とは相反するところもあり、生体での解析を進めるとともに、持続性心房細動の抑制のためには CFAEs のさらなる病態の解明と有効な化合物のスクリーニングを行っていく必要があり、さらに研究を進める予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村越 伸行 (MURAKOSHI, Nobuyuki)
筑波大学 医学医療系 講師
研究者番号：80447218

(2) 研究分担者

青沼 和隆 (AONUMA, Kazutaka)
筑波大学 医学医療系 教授
研究者番号：10375488

五十嵐 都 (IGARASHI, Miyako)
筑波大学 医学医療系 講師
研究者番号：20633126

(3) 連携研究者

許 東洙 (XU, Dongzhu)
筑波大学 医学医療系 助教
研究者番号：20616651

野上 昭彦 (NOGAMI, Akihiko)
筑波大学 医学医療系 教授
研究者番号：80708602

(4) 研究協力者

山上 文 (YAMAGAMI, Fumi)
筑波大学人間総合科学研究科博士課程 3年
馮 鐸 (FENG, Duo)

筑波大学人間総合科学研究科博士課程 3年