

心房細胞における心房筋の電氣的・構造的リモデリング
に関する分子生理学的検討

所属機関名 慶應義塾大学医学部

研究者名 三田村 秀雄

《研究の概要》

不整脈の中でもとくに高齢者において増加しつつある心房細動は、動悸や心不全症状を生じるだけでなく、脳梗塞の原因としても重要である。しかしこの不整脈の治療法は未だ確立されていない。これには、心房細動が持続すると、心房筋の電気的および構造的特性が徐々に変化、進行する、いわゆるリモデリング、とよばれる現象が関係している。そこで本研究では心房細動に伴うこの心房筋特有の電気的ならびに構造的リモデリングについて、電気生理学的、生化学的ならびに分子生物学的手法を用いて多角的に追求し、その変化する治療標的に対する有効かつ適切な治療方法を明らかにすることを目的とした。代表研究者のほかに5名の共同研究者が、最先端の手法を用いて心房細動に伴うイオン電流の変化、チャネル蛋白の変化、SRの変化、mitochondriaの変化、gap junctionの変化、さらには凝固因子の変化などを調べた。その結果、心房の高頻度刺激は様々なイオンチャネルの蛋白合成に影響を与えるが、とくに膜におけるCaチャネル蛋白のdownregulationに伴うCa電流の減少が不応期を短縮させ、またNaチャネル蛋白のdownregulationによるNa電流の減少と細胞間結合を司るコネクシンの変化が伝導様式を修飾して催不整脈的に作用することが明らかとなった。同時にミトコンドリアにおいても酸化的リン酸化の障害が進行し、細胞内のCaハンドリング機能にも影響が及んでいた。T型Caチャネル遮断薬やNaチャネル遮断薬、あるいはangiotensin IIの抑制薬などがこれらに拮抗する形で抗不整脈的に働く可能性が示唆された。一方、心房の高頻度刺激は、Ca電流の減少によって心房筋の収縮を低下させるほか、心房内皮や血管内皮における凝固因子の発現や血小板の活性化に影響を及ぼし、血栓形成を促し、脳梗塞発生に寄与することが示された。これに対してスタチンが改善作用を示すことも判明した。このように心房細動は心房筋細動の膜、内存する小胞体やミトコンドリア、周囲の細胞との結合蛋白、そして心内膜や凝固因子に至るまで心房の様々な構成要素を時間進行性に修飾し、複雑な電気的、機械的、凝固学的変化をもたらしていることが判明するとともに、それを抑制する薬理的アプローチの可能性が示された。

共同研究者の氏名、所属機関

研究者氏名	所属機関・役職	
三田村 秀雄	慶應義塾大学医学部 心臓病先進治療学 教授	研究計画の統括および心房電気生理の研究
児玉 逸雄	名古屋大学環境医学研究所 循環器分野 教授	高頻度刺激による心房 gap junction の変化
久留 一郎	鳥取大学大学院医学系研究科 機能再生医科学専攻 遺伝子再生医療学講座 再生医療学分野 教授	小胞体関連分解制御による心房細動治療法の開発
山下 武志	(財)心臓血管研究所 第三研究部 部長	心房高頻度興奮に伴うチャネル蛋白の変化
大草 知子	山口大学医学部 器官制御医科学講座 循環病態内科学 助手	高頻度刺激に伴う細胞間結合構成蛋白の変化とそのシグナル伝達系の検討
南野 哲男	大阪大学大学院病態情報内科学 医員	心房細動における可溶性 p-セレクチンの意義

研究報告

I 研究目的

人口の高齢化に伴い、心房細動の罹患率は増加の一途をたどっている。本不整脈はしばしば動悸、息切れ、あるいは心不全を引き起こすため、高齢者の QOL 低下をもたらすことが知られるが、さらには心房内血栓形成を契機として脳梗塞の誘因として重要な役割を演じている。しかしながら心房細動の発生機序やその維持機構も十分に解明されておらず、満足できる治療法も確立されていない。その背景には心房細動が持続すると、心房筋の電気的および構造的特性が徐々に変化、進行する、いわゆるリモデリング、とよばれる現象がある。リモデリングの結果、不整脈はますます停止し難くなり、またもし停止し得たとしても再発しやすくなる。同時に心房の収縮能は低下し、また血液の凝固能は亢進するため、血栓が形成されやすくなり、脳梗塞の誘因となる。このように心房細動においては心臓の電気的、構造的病態が動的に変化するため、治療の標的も経時的に変化し、より抵抗性になる可能性がある。そこで本研究では心房細動に伴うこの心房筋特有の電気的ならびに構造的リモデリングについて、電気生理学的、生化学的ならびに分子生物学的手法を用いて多角的に追求し、その変化する治療標的に対する有効かつ適切な治療方法を明らかにすることを目的とした。これによって心房細動の本質が解明されると同時に、これまで難治性とされてきた心房細動の発症を抑制し、持続を困難とし、再発しにくくする新しい薬理学的アプローチ確立の一助となるものと考えている。

II 研究計画および材料と方法

本研究では、心房高頻度刺激を加え続けることによって心房のリモデリングを再現した動物モデルと、すでにリモデリングが進行していると考えられるヒト心房細動筋を用いて、心房細動に伴う電氣的ならびに構造的リモデリングの形成過程を、共同研究者6施設の特徴を活かして、電気生理学的、代謝学的、形態学的、凝固学的アプローチにより解析し、その治療への応用性を検討した。

三田村はイヌの心房に高頻度刺激モデルを用いて心房の電氣的リモデリングと機械的リモデリングの形成過程を調べ、次にそれらを抑制する標的チャンネルを追求した。久留はヒト心房筋および高頻度刺激を行ったラット及びマウス心房筋を用いて細胞代謝の面からリモデリングを検討した。細胞間応答に重要な役割を演じる gap junction 蛋白については、児玉がヒト心房筋、および高頻度刺激を加えたイヌ心房筋において焦点顕微鏡を用いた免疫組織化学法の技術を駆使して、コネクシンの発現分布や発現量を定量解析した。一方、大草はヒト心房筋を用いて細胞内のCa制御機構を調べるとともに、培養心筋細胞を用いて angiotensin II のコネクシンに与える影響を調べた。山下はラットの心房高頻度刺激にともなう種々のチャンネルや抗凝固因子の遺伝子発現について分析した。南野はヒト心房細動例の血小板機能や凝固因子を測定し、その薬理的抑制の可能性を追求した。

III 研究成果

三田村はイヌの心房高頻度刺激によるリモデリングの形成過程を観察するとともに、それらを抑制するチャンネルターゲットを検索した結果、L型Caチャンネル遮断薬の効果は一過性に過ぎず、T型Caチャンネル遮断薬の効果がより持続的であることを示した。久留は、心房細動合併例においてミトコンドリアにおける酸化的リン酸化の障害を指摘した。またNaチャンネル遮断薬が ubiquitin-proteasome 活性を制御して心房細動でのリモデリングにより減少した kv1.5 チャンネルを増加できる可能性を示唆した。児玉は心房細動例の心房筋のギャップ結合配列が不均一に変化しており、これが異方性伝導を促し不整脈に寄与している可能性を示唆した。大草は心房細動患者において RyR の発現低下と IP3R の増加を観察し、細胞内Caハンドリングに変化が生じていることを示した。また心筋細胞への高頻度電気刺激が、早期より angiotensin II を介して MAPK 系を活性化して Cx43 発現量を増加させることを示した。山下は、短時間の高頻度心刺激でも多様なイオンチャンネル蛋白の変化をもたらすことを示した。また同様の刺激や高血圧が、正常心房内皮に存在する凝固因子蛋白の発現を抑制することを明らかにした。南野は、心房細動例において NO 合成酵素活性の低下と血小板の活性化が生じていることを観察し、スタチンが凝固因子活性化を抑制することを示した。

IV 考察

本研究班では心房細動を進行性の病態としてとらえ、その電氣的・構造的変化の分子生理学的機序を追求し、さらにその治療への応用性についても検討した。その結果、様々な因子がこの不整脈の維持や、それに伴う血栓形成に貢献していることが判明した。心房の高頻度刺激は様々なイオンチャンネルの蛋白合成に影響を与えるが、とくにCa電流の減少が不応期を短縮させ、Na電流の減少とコネクシンの変化が伝導様式を修飾して不整脈作

用に貢献していることが明らかとなった。同時にミトコンドリアにおいても酸化的リン酸化の障害が進行し、細胞内の Ca ハンドリング機能にも影響が及んでいた。T 型 Ca チャネル遮断薬や Na チャネル遮断薬、あるいは angiotensin II の抑制薬などがこれらに拮抗する形で抗不整脈的に働く可能性が示唆された。一方、心房の高頻度刺激は、Ca 電流の減少によって心房筋の収縮を低下させるほか、心房内皮や血管内皮における凝固因子の発現や血小板の活性化に影響を及ぼし、血栓形成を促すことが示された。これに対してスタチンが改善作用を示すことも判明した。本研究により心房細動においては心房筋細胞の膜、内在する小胞体やミトコンドリア、周囲の細胞との結合蛋白、そして心内膜や凝固因子に至るまで心房の様々な構成要素を時間進行性に修飾し、複雑な電氣的、機械的、凝固学的変化をもたらしていることが判明するとともに、それを抑制する薬理的アプローチの可能性が示された。

V 研究成果の発表

1. Sato T, MITAMURA H, Kurita Y, Takeshita A, Shinagawa K, Miyoshi S, Kanki H, Hara M, Takatsuki S, Soejima K, Ogawa S: Recovery of electrophysiological parameters after conversion of chronic lone atrial fibrillation depends on its duration. *Int J Cardiol* 79: 183-189, 2001
2. Sato T, MITAMURA H, Kurita Y, Takeshita A, Shinagawa K, Miyoshi S, Kanki H, Hara M, Ogawa S: Electropharmacologic effects of pilsicainide, a pure sodium channel blocker, on the remodeled atrium subjected to chronic rapid pacing. *J Cardiovasc Pharmacol* 38: 812-820, 2001
3. Shiroshita-Takeshita A, MITAMURA H, Shinagawa K, Sato T, Kurita Y, Kanki H, Takatsuki S, Hara M, Ogawa S: Discordant temporal changes in electrophysiological properties during electrical remodeling and its recovery in the canine atrium. *Jpn Heart J* 43: 167-181, 2002
4. Kurita Y, MITAMURA H, Shiroshita-Takeshita A, Yamane A, Ieda M, Kinebuchi O, Sato T, Miyoshi S, Hara M, Takatsuki S, Ogawa S: Daily oral verapamil before but not after rapid atrial excitation prevents electrical remodeling. *Cardiovasc Res* 54: 447-455, 2002
5. Shinagawa K, MITAMURA H, Ogawa S, Nattel S: Effects of inhibiting Na/H exchange or angiotensin converting enzyme on atrial tachycardia-induced remodeling. *Cardiovasc Res* 54: 438-446, 2002
6. Koura T, Hara M, Takeuchi S, Ota K, Okada Y, Miyoshi S, Watanabe A, Shiraiwa K, MITAMURA H, Kodama I, Ogawa S: Anisotropic conduction properties in canine atria analyzed by high-resolution optical mapping: preferential direction of conduction block changes from longitudinal to transverse with increasing age. *Circulation* 105:2092-2098, 2002
7. Shiroshita-Takeshita A, MITAMURA H, Sato T, Shinagawa K, Kurita Y, Kanki H, Takatsuki S, Hara M, Ogawa S: Preserved effects of potassium channel blockers in the pacing-induced remodeled canine atrium: a comparison between E4031 and

- azimilide . Cardiovasc Pharmacol 41: 678-685, 2003
8. Kinebuchi O, MITAMURA H, Shiroshita-Takeshita A, Kurita Y, Ieda M, Ohashi N, Fukuda Y, Sato T, Miyoshi S, Hara M, Takatsuki S, Nagumo M, Ogawa S: Oral verapami attenuates the progression of pacing-induced electrical and mechanical remodeling of the atrium. Circ J 68: 494-500, 2004
 9. Kinebuchi O, MITAMURA H, Shiroshita-Takeshita A, Kurita Y, Ohashi N, Tanimoto K, Fukuda Y, Ieda M, Sato T, Miyoshi S, Hara M, Takatsuki S, Nagumo M, Ogawa S : Temporal patterns of progression and regression of electrical and mechanical remodeling of the atrium. Int J Cardiol (in press)
 10. 杵渕修、三田村秀雄、竹下晃子、栗田康生、大橋成孝、谷本耕司郎、福田有希子、家田真樹、佐藤俊明、三好俊一郎、高月誠司、原幹、南雲美也子、小川聡：心房高頻度刺激による心房筋の電気的および機械的リモデリングの形成過程。不整脈 18:481-489, 2002
 11. 大橋成孝、三田村秀雄、谷本耕司郎、福田有希子、杵渕修、栗田康生、三好俊一郎、高月誠司、原幹、小川聡：T型Caチャンネル遮断薬エホニジピンによる心房電気的リモデリングの抑制。心電図 23: 323-331, 2002
 12. Tsuboi M, Hisatome I, Morisaki T, Tanaka M, Takeda S, Shimoyama M, Ohtahara A, Igawa O, Shigemasa C, Kuroda H, Ohgi S, Nanba E. Mitochondrial DNA deletion associated with the reduction of adenine nucleotides of human atrium and atrial fibrillation. Eur J Clin Invest 2001; 31: 489-496
 13. Ahmed GU, Hisatome I, Kurata Y, Makita N, Tanaka Y, Tanaka H, Okamura T, Sonoyama K, Furuse Y, Kato M, Yamamoto Y, Ogura K, Shimoyama M, Miake J, Sasaki N, Ogino K, Igawa O, Yoshida A, Shigemasa C. Analysis of moricizine block of sodium current in isolated guinea-pig atrial myocytes. Atrioventricular difference of moricizine block. Vascul Pharmacol 2002; 38: 131-141
 14. Emdad L, Uzzaman M, Takagishi Y, Honjo H, Uchida T, Severs NJ, Kodama I, Murata Y. Gap junction remodeling in hypertrophied left ventricles of aortic-banded rats: Prevention by angiotensin II type 1 receptor blockade. J Mol Cell Cardiol 2001; 33: 219-231
 15. Honjo H, Boyett MR, Coppin SR, Takagishi Y, Opthof T, Severs NJ, Kodama I. Heterogeneous expression of connexins in rabbit sinoatrial node cells: correlation between connexin isotype and cell size. Cardiovasc Res 2002; 53: 89-96
 16. Honjo H, Boyett MR, Niwa R, Inada S, Yamamoto M, Mitsui K, Horiuchi T, Shibata N, Kamiya K, Kodama I. Pacing-induced spontaneous activity in myocardial sleeves of pulmonary veins after treatment with ryanodine. Circulation 2003; 107: 1937-1943
 17. Yamada J, Ohkusa T, Yano M, Ueyema T, Kobayashi S, Hamano K, Esato K, Matsuzaki M. Up-regulation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor expression in

- atrial tissue, in patients with chronic atrial fibrillation. J Am Coll Cardiol 2001; 37: 1111-1119
18. Yoneda T, Kihara Y, Ohkusa T, Iwanaga Y, Inagaki K, Takeuchi Y, Hayashida W, Ueyama T, Hisamatsu Y, Fujita M, Hatac S, Matsuzaki M, Sasayama S. Calcium handling and sarcoplasmic-reticular protein functions during heart-failure transition in ventricular myocardium from rats with hypertension. Life Sci. 2001; 70: 143-57
 19. Yamada J, Ohkusa T, Nao T, Ueyama T, Yano M, Kobayashi S, Hamano K, Esato K, Matsuzaki M. [Up-regulation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor expression in atrial tissue in patients with chronic atrial fibrillation] J Cardiol. 2002; 39: 57-8
 20. Nao T, Ohkusa T, Hisamatsu Y, Inoue N, Matsumoto T, Yamada J, Shimizu A, Yoshiga Y, Yamagata T, Kobayashi S, Yano M, Hamano K, Mtsuzaki M. Comparison of expression of connexin in right atrial myocardium in patients with chronic atrial fibrillation versus those in sinus rhythm. Am J Cardiol 2003; 91: 678-683
 21. Yamashita T, Sekiguchi A, Iwasaki YK, Sagara K, Hatano S, Iinuma H, Aizawa T, Fu LT. Thrombomodulin and tissue factor pathway inhibitor in endocardium of rapidly paced rat atria. Circulation 2003; 108: 2450-2452