

平成11年度厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）研究報告書
(H10-長寿-032)

心房細動の病態、発生機序の分子生物学的解明
と

新しい治療法の開発

心筋筋小胞体 Ca^{2+} 制御機構からのアプローチ

主任研究者；山口大学医学部内科学第二講座 教授 松崎益徳
分担研究者；山口大学医学部内科学第二講座 助手 大草知子
山口大学医学部内科学第二講座 助手 矢野雅文

厚生省科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

（総括、分担）研究報告書

慢性心房細動患者の心房筋における筋小胞体Ca²⁺制御蛋白（IP₃受容体）の変化に関する研究

主任研究者 松崎益徳、山口大学医学部内科学第二講座教授

分担研究者 大草知子、山口大学医学部内科学第二講座助手

研究要旨

慢性心房細動の病態に関与する心房筋細胞内の分子生物学的な詳細なメカニズムを解明する目的で、慢性AF患者の心房筋を用いて細胞内Ca²⁺動員機構の中心である筋小胞体(SR)のCa²⁺制御蛋白の一つであるIP₃受容体の変化を解析し、臨床データとの比較検討を行った。その結果、慢性心房細動を合併した僧帽弁膜疾患では、心房への機械的負荷はIP₃受容体の蛋白質や遺伝子発現量の増加を引き起こすことが示された。従来よりAFの発生、維持に心房細胞膜の電気生理学的特性の異常や細胞内Ca²⁺ overloadが論じられてきたが、本研究は細胞内のCa²⁺ handlingやCa²⁺制御因子の変化を直接証明した貴重な報告である。

分担研究者氏名、所属施設名、役職

大草知子、山口大学医学部内科学第二講座助手

矢野雅文、山口大学医学部内科学第二講座助手

A. 研究目的

心房細動(AF)は日常臨床で最もよく見かける不整脈である。AFが持続すると、心房筋の不応期が短縮し電気生理学的特性が変化してAFがより持続しやすくなること(AF begets AF)が報告されており、AFの心房筋における不応期短縮等の電気生理学的特性の変化はelectrical remodelingと呼ばれている。一方、細胞内Ca²⁺は心房細胞の興奮-収縮連関におけるsignal mediatorとして重要な役割を担っている。近年、細胞内Ca²⁺ホメオスタシスの異常が細胞膜の電気生理学的特性に変化をきたし、AFの発生、維持に関与すると報告されているが、その細胞内の分子生物学的な詳細なメカニズムは不明である。Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R)は細胞内Ca²⁺プールからのCa²⁺放出チャネルの一つである。ヒト不全心筋においては、もう一つのCa²⁺放出チャネルである筋小胞体 (SR)のryanodine receptor (RyR)の発現量が減少する一方で、IP₃Rの発現量が増加することが報告されており、細胞内Ca²⁺調節機構において重要な代償的变化と考えられている。

B. 研究方法

慢性AF患者の心房筋におけるIP₃R発現量の変化を検討した。手術中に得られた僧帽弁膜疾患を有する慢性AF患者(MF群、7名)及び洞調律患者(MN群、4名)、また対照として僧帽弁膜疾患のない洞調律患者(C群、5名)の右心房筋を用いてIP₃Rの蛋白質発現量をWestern blot法にて、mRNA発現量をRT-PCR法にて解析し、同時に心エコー及び心臓カテーテル検査より得られた臨床データとの比較検討を行った。また免疫組織染色を行い、IP₃Rの局所発現について検討した。さらにMF群のうち5名の左心房筋(LA)を用いて同様の解析を行った。

C. 研究結果

1)IP₃Rの蛋白質発現量は、MF群ではMN群に比べ有意に

増加し(MF群 vs MN群、 0.77 ± 0.25 vs 0.36 ± 0.18 、 $p < 0.05$)、同時にMN群ではC群(0.11 ± 0.09)に比べ有意に増加していた($p < 0.05$)。2) IP₃Rの mRNA発現量は、MF群ではC群に比べ有意に増加していた(MF群 vs C群、 0.023 ± 0.004 vs 0.014 ± 0.005 、 $p < 0.05$)。3) IP₃Rの蛋白質およびmRNAの発現量は左房径と肺動脈楔入圧の上昇に伴い高値を示したが、右房圧の上昇に伴う発現量の増加は認めなかった。4)MF群及びMN群ではIP₃Rの過剰発現を細胞質内および核膜上に認めた。5)LAでは IP₃Rの蛋白質(0.34 ± 0.29)及びmRNA(0.015 ± 0.011)の過剰発現は認められなかった。

D. 考案と結論

慢性的な心房への機械的負荷は心房筋IP₃Rの発現量をup-regulateし、AFの合併でその発現量がさらに増加した。この結果より、慢性AF患者においては、IP₃Rの増加はRyRやCa²⁺-ATPaseの変化に伴う代償性変化であり、心房筋の電気生理学特性を修飾し、AFを惹起、維持する可能性が推測された。さらに、心房への負荷の程度が増大し径の拡大をきたすと、この代償機構に破綻が生じることが示唆された。

F. 研究発表

1. 学会発表

1)Up-regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression in the atrial tissue of patients with chronic atrial fibrillation, 72nd Scientific Session of AHA, Atlanta, 1999

2)慢性心房細動患者の心房筋では inositol 1,4,5-trisphosphate receptorはup-regulateされている、第47回日本心臓病学会学術集会、横浜、1999

研究要旨

頻脈誘発性犬心不全モデルにおいては、心収縮能、拡張能の低下に対応して、心筋筋小胞体（SR）の機能異常（ Ca^{2+} 放出チャンネルであるリアノジン受容体数の減少、 Ca^{2+} -ATPase 活性の低下、 Ca^{2+} 取り込み、および放出能の低下）を認めた。しかしながら、心不全時には左室弛緩予備能は保たれており、その機序として、 Ca^{2+} -ATPase の cAMP に対する感受性の増加が示された。

A. 研究目的

心房細動が長期に続くと心房は拡大し、心房収縮力は低下する。心房細動→心房筋不全という関係は、高頻度心室刺激→心室筋不全という関係に酷似していると考えられるため、補足実験として、頻脈誘発性心不全時における心機能及び心筋筋小胞体 Ca^{2+} 制御機能の変化を検討し、心房細動時の心筋障害メカニズムの解明を目指した。

B. 研究方法

犬心不全モデルは、3週間の高頻度右室ペーシング（250/分）により作成し、ペーシング3週後に麻酔下で心行動態を測定した後、心筋からSRを含むミクロソーム分画を精製し、以下の点を検討した。

(A) SRの Ca^{2+} 放出、取り込み機能：
ストップフロー装置を使用して Ca^{2+} の放出能（ Ca^{2+} 放出トリガーとしてリアノジン受容体の特異的ligandであるポリライシンを使用）を測定した。

(B) リアノジン受容体結合能の検討：
[³H]リアノジンをを用いて膜ろ過法によりレセプターの最大結合能(Bmax)、親和性(Kd)を測定した。

さらに、心不全治療薬としてドブタミンとPDE阻害薬のミルリノンの左室収縮、拡張能に及ぼす効果を検討した。また屠殺後左室心筋 crude homogenate を精製し、 Ca^{2+} -ATPase 活性、cAMP濃度を、さらにSRの Ca^{2+} 取り込み能も測定し、ドブタミンとミルリノンのこれらSR機能に及ぼす効果を比較検討した。

C. 研究結果

(1) 心不全時のSR機能変化
不全心筋SR(F)では Ca^{2+} 取り込み機能の低下(C: 9.8 ± 1.8 vs F: 5.8 ± 1.8 nmol/mg, $p < 0.05$)に加えて、ポリライシンによる急速な Ca^{2+} 放出速度の著明低下を認めた。さらにリアノジン受容体数(Bmax)も減少していた(C: 3.1 ± 1.5 vs F: 0.7 ± 0.2 pmol/mg, $p < 0.05$)が親和性(Kd)は不変であった(C: 1.1 ± 0.3 vs F: 1.0 ± 0.3 nM, $p < 0.05$)。

(2) 心不全における、強心薬の心収縮、拡張能およびSR機能に及ぼす効果

ドブタミンあるいはミルリノンの急性投与に際

して、収縮性の指標である左室圧最大微分値(+dP/dt)は心不全では軽度増加にとどまりしており収縮予備能の低下が示された。しかしながら左室拡張性の指標である左室圧降下の時定数(Tau)はこれらの強心薬投与に際して、ドブタミンでは正常心と同程度に、またミルリノンでは心不全のほうが正常心に比しよりTauは短縮した。この結果より心不全では拡張予備能は保たれていることが示された。

心筋 Crude homogenate におけるSR Ca^{2+} -ATPase 活性は正常に比し心不全で低下していた(0.31 ± 0.02 vs 0.54 ± 0.03 μ M Pi/min/mg, $p < 0.01$)。またcAMPレベルも心不全で約50%減少していた(13.6 ± 1.5 vs 24.3 ± 1.5 pmol/mg protein, $p < 0.01$)。ドブタミン、ミルリノンのいずれに対しても、 Ca^{2+} -ATPase (Y軸) - cAMP (X軸) 関係は心不全で左方移動しており、心不全時、 Ca^{2+} -ATPase のcAMPに対する感受性が増加していることが示された。とくにミルリノンは低濃度で、ドブタミンより著明に Ca^{2+} -ATPase 活性を増加した。

D. 考察および結論

従来より、心筋収縮に先行する細胞内 Ca^{2+} トランジェントは心収縮、拡張性に関わる重要な因子であり、 Ca^{2+} トランジェントの上行脚は主にSRからのリアノジン受容体を介する Ca^{2+} 放出により規定されると考えられている。従って、今回示した頻脈誘発性心不全時の Ca^{2+} 放出能の障害は心収縮性の低下に深く関与していると考えられる。また、心不全では収縮予備能は低下しているが拡張予備能は保たれており、その原因として心不全時、SR Ca^{2+} -ATPase のcAMPに対する感受性が増強していることが示唆された。これらの結果は、心房細動時の心筋収縮、拡張障害にもSR機能障害が重要な役割を担う可能性を示唆し、将来、SR機能を改善することにより、心房細動になりにくくする、あるいは心房細動持続時の徐細動後心筋収縮不全を軽減しうる可能性も示唆する。

F. 研究発表

Yano M, Ohkusa T, Matsuzaki M, et al. Altered stoichiometry of FKBP versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca^{2+} leak through ryanodine receptor in heart failure. American Heart Association. 72th Annual Meeting, Nov, 1999, Atlanta, U.S.A.

19990207

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ regulatory proteins in the atrial tissue of patients with chronic atrial fibrillation.

Ohkusa T, Ueyama T, Yamada J, Yano M, Fujumura Y, Esato K, Matsuzaki M

J Am Coll Cardiol 1999 Jul ; 34(1) : 255-63

Mechanism of preserved positive lusitropy by cAMP-dependent drugs in heart failure.

Tanigawa T, Yano M, Kohno M, Yamamoto T, Hisaoka T, Ono K, Ueyama T, Kobayashi S, Hisamatsu Y, Ohkusa T, Matsuzaki M

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000 Feb ; 278(2) : H313-20

Abnormal Ca²⁺ release from cardiac sarcoplasmic reticulum in tachycardia-induced heart failure.

Yamamoto T, Yano M, Kohno M, Hisaoka T, Ono K, Tanigawa T, Saiki Y, Hisamatsu Y, Ohkusa T, Matsuzaki M

Cardiovasc Res 1999 Oct ; 44(1) : 146-55