

Table. 3 Calculation time and number of iterations in each process

	Calculation of χ [s]	Calculation of equilibrium in the microscopic model [s]	Total [s]	Iteration
GA	746	1296	2105	5
BFA	1251	372	1727	9
MSA	16	300	475	8

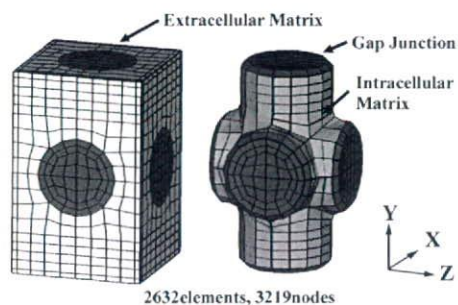


Fig. 7 FE meshes of microscopic model

parameter is adjusted at every time step to represent the contraction force. The deformation of the ventricle and microstructure in the diastole is shown in Fig. 9. The calculation time is 114[s/iteration], 456[s/step] and the number of iterations is about 4 for each step. In this analysis, dilation of the left ventricle by pressure and excitation contraction is generated as a result of the 6336 cardiomyocyte model, which shows the different electrical and mechanical behavior. The proposed methods thus enable us to deal with large scale problems.

Table. 4 Material constants for the cell model

	E [kPa]	ν
Gap Junction	10.0	0.3
Intracellular Matrix	5.0	0.3
Extracellular Matrix	0.1	0.3

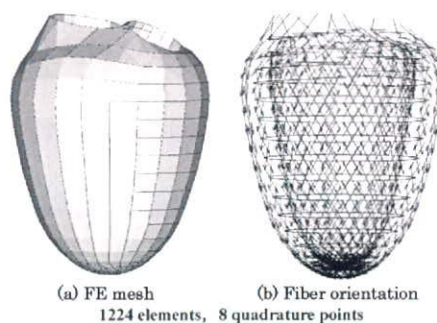


Fig. 8 FE meshes of macroscopic model

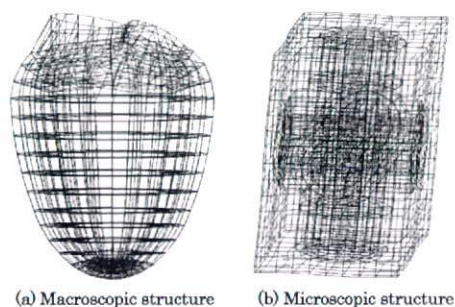


Fig. 9 Deformations in diastole

6. Conclusion

To reduce the computational cost of the nonlinear homogenization method, the two algorithms listed below were proposed.

(1) An algorithm which decreases the residual of each scale simultaneously using the block LU factorization.

(2) An algorithm which approximates the homogenization tangent stiffness using the mode superposition method to omit updating the Schur-Complement.

Both the Block LU factorization algorithm and the algorithm using mode superposition can drastically reduce the computational cost compared with the conventional method. Finally, the algorithm using mode superposition applied to the left ventricle of the heart with parallel computation was presented as an example of a large scale calculation.

Acknowledgment

This work was supported by Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency.

References

- (1) Terada, K. and Kikuchi, N., A class of general algorithms for multi-scale analyses of heterogeneous media, *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, 190, No. 40-41(2001), pp.5427-5464.
- (2) Matsui, K., Terada, K. and Yuge, K., Two-scale finite element analysis of heterogeneous solids with periodic microstructures, *Computers & Structures*, 82(2004) pp.593-606.
- (3) Takano, N., Ohnishi, Y., Zako, M. and Nishiyabu, K., Microstructure-based Deep-drawing Simulation of Knitted Fabric Reinforced Thermoplastics by Homogenization Theory, *International Journal of Solids and Structures*, 38(2001), pp.6333-6356.
- (4) Rohan, E., Sensitivity strategies in modelling heterogeneous media undergoing finite deformation, *Mathematics and Computers in Simulation*, 61(2003), pp.261-270.
- (5) Moulinec, H. and Suquet, P., A numerical method for computing the overall response of nonlinear composites with complex microstructure, *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, 157(1998), pp.69-94.
- (6) Yamamoto, M., Hisada, T. and Noguchi, H., Homogenization Method for Large Deformation Problem by Using Characteristic Deformation Mode Superposition (in Japanese), *Trans. Jpn. Soc. Mech. Eng.*, 67(2001), pp.1877-1884.
- (7) Okada, J. and Hisada, T., Homogenization Method for Mixed Finite Element Analysis of Incompressible Hyper-Elastic Materials (in Japanese), *Proceedings of the Conference on Computational Engineering and Science*, 11(2006), pp.79-82.
- (8) Okada, J. and Hisada, T., Homogenization Method for Mixed Finite Element Analysis of Incompressible Viscoelastic Materials (in Japanese), *Proceedings of the 19th Computational Mechanics Conference*, No.06-9(2006), pp.45-46.
- (9) Miehe, C., Schroder, J. and Schotte, J., Computational Homogenization Analysis in Finite Plasticity. Simulation of Texture Development in Polycrystalline Materials, *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, 171(1999), pp.387-418.
- (10) Terada, K. and Kikuchi, N., Introduction to the method of homogenization (in Japanese), Maruzen, 2003.
- (11) Terada, K., Saiki, I., Matsui, K. and Yamakawa, Y., Two-scale kinematics and linearization for simultaneous two-scale analysis of periodic heterogeneous solids at finite strain, *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering*, 192(2003), pp.3531-3563.
- (12) Yamada, T. and Matsui, K., Numerical Procedure for Nonlinear Multiscale Problems Based on Block Newton Method (in Japanese), *Proceedings of the Conference on Computational Engineering and Science*, 12(2007), pp.309-312.

機械的伸展に対する心筋組織の膜電位応答と その数理モデルによる不整脈シミュレーション

瀬尾 欣也*・稲垣 正司**・平林 智子*・日高 一郎**
杉町 勝**・杉浦 清了*・久田 俊明*

Novel Approach Combining Experiment and Simulation to Clarify the Mechanisms of Stretch-induced Arrhythmias

Kinya SEO,* Masashi INAGAKI,** Satoko HIRABAYASHI,* Ichiro HIDAKA,**
Masaru SUGIMACHI,** Seiryō SUGIURA,* Toshiaki HISADA*

Abstract Mechanical stress is known to alter the electrophysiological property of myocardium and may trigger fatal arrhythmias when an abnormal load is applied to the heart. We developed novel techniques combining experiment and simulation to elucidate the mechanisms of stretch-induced arrhythmias. We applied transient global stretch to arterially perfused rabbit right ventricular wall preparations. The distribution of strain (determined by marker tracking) and membrane potential (measured by optical mapping with the voltage-sensitive dye, di-4-ANEPPS) were simultaneously recorded while accounting for the motion artifact and the 3-D morphology of preparations was examined by the laser scanner. To further investigate the mechanisms of stretch-induced arrhythmogenicity, we performed a computer simulation based on finite element method (FEM). Although the uniform stretch was applied globally, the medium stretch (10~15%) initiated the excitation from a local spot. On the other hand, the large stretch ($\geq 20\%$) caused the synchronous excitation of entire preparation. Computer simulation based on the heterogeneous morphology creates the inhomogeneous strain distribution in response to the stretch, and the focal excitation was observed where the tissue thickness was thin. Our computer simulation also indicates that this focal excitation induced by the medium stretch develop to the stretch-induced spiral wave formation. The inhomogeneous structure of the ventricular wall modulated the globally applied stretch to create heterogeneous strain distribution. Global stretch of medium intensity, rather than intense one, may trigger the fatal arrhythmia.

Keywords: mechano-electric feedback, stretch-activated channels, optical mapping, heart simulation, spiral wave.

1. 序 論

心臓への機械的伸展がその電気生理学的挙動に影響を及ぼすことは古くから知られており, Mechano-Electric

Feedback (MEF) と呼ばれている[1]. 心不全や心筋梗塞に見られる心室壁へ異常な負荷のかかる病態において, MEF は正常な心拍リズムを乱す働きをしていると考えられている[2, 3]. このことは, 心筋梗塞モデル動物を用いた実験において, 梗塞部位と正常部位の境界付近が大きく伸展されることにより不整脈が誘発されるという報告からも支持されるが[4], 機械的伸展のより直接的な関与が示唆されるものに, 胸部打撲による突然死, 心臓震盪 (*commotio cordis*) がある. この突然死の犠牲者の多くは心臓に疾患を持たない若い健常者であり, 胸部打撲による肋骨・胸骨・心臓への損傷が見られない[5]. Link らは, 麻酔下のブタを使った実験で, 野球ボールによる胸部への打撲によって心室細動が誘発されることを明らかにしてお

生体医工学シンポジウム 2008 発表 (2008 年 9 月, 大阪)
2008 年 7 月 29 日受付, 2008 年 10 月 3 日改訂
Received July 29, 2008; revised October 3, 2008.

* 東京大学大学院新領域創成科学研究科
Department of Human and Engineered Environmental
Studies, Graduate School of Frontier Sciences, The
University of Tokyo

** 国立循環器病センター研究所循環動態機能部
Department of Cardiovascular Dynamics, National Car-
diovascular Center Research Institute

り、また、打撲のタイミング・強度・速度が不整脈誘発にどのように影響するかを網羅的に調べている[5].

MEF とそれに起因する不整脈の機序解明のため、これまでにウサギ・ヤギ・イヌなど、さまざまな動物種での実験が試みられてきた[6-8]. 一方細胞レベルの研究から、伸展により活性化される Stretch-Activated Channels (SACs) が MEF に深く関与していると考えられており、細胞レベルにおいても機械的刺激によって膜電位がどのように変化するかについて、刺激のタイミング・強度・速度を変えて網羅的に調べられている[9-12]. しかしながら、それら細胞レベルの電気生理学的応答と臓器レベルの不整脈の間の理解には已然として大きな溝があるのが現状である.

本研究では、伸展に対する膜電位応答という細胞レベルの現象が臓器レベルの不整脈誘発につながるには心室壁の不均質な形状が修飾因子(modulator)として重要な役割を果たしているとの仮説を立て、研究を進めた. この仮説を検討するため、ウサギ右室動脈灌流組織標本に対する光学的膜電位マッピングと、厚み形状を模擬した有限要素法に基づくコンピュータシミュレーションにより検討した. 我々はその結果、不均質な組織への伸展刺激によって空間的に不均一な膜電位変化が生じること、特に中程度の伸展刺激に対して不均一性が増強するため致死的不整脈誘発につながる可能性が高いことを示した.

2. 方 法

2.1 組織標本

日本白ウサギ ($n = 7$, 2.4 kg~2.9 kg) をベントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下で開胸し、心臓を素早く摘出した. その後、大動脈を Langendorff 灌流装置に接続し、Tyrode 溶液 (130 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.8 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose, and 24 mM NaHCO₃) を 66 mgHg で灌流した. 灌流液は 95% O₂-5% CO₂ でバブリングを行い、37°C, pH = 7.40 に調節した.

Tyrode 溶液を 10 分間流して静置させた後、右冠状動脈を切り離さないように注意して弁状に右室自由壁を切り出し、22 mm~20 mm 程度の長方形に整えた. 組織の両端はシアノアクリレート生体用接着剤 (Vetbond™; 3M, St. Paul, MN) でサポートに固定した. 左端のサポートを単軸伸展装置であるリニアモータ (ET-126A, Labworks Inc., Costa Mesa, CA, USA) に接続した. このリニアモータには、変位センサー (IW12, TWK-Elektronik, Dusseldorf, Germany) が装着されており、モータの作動距離をパーソナルコンピュータにフィードバックさせて目的の伸展刺激に調節することができる. 組織の灌流に対する伸展刺激の影響を極力抑えるため、機械的伸展方向を冠状動脈の走向と一致させた. 右端は力セン

サー (FORT-1000, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) に取り付け、伸展時の反射張力を測定した. 組織を張った状態にするため、反射張力が 10gf になる状態を 0% 伸展 (自然長) と定めた. このとき、組織の曲率は非常に小さいため、この条件で組織各所はほぼ均一な状態になっている. ジルコニア製ビーズ (直径 0.5 mm) を歪計測用の目印として組織表面に格子状 (縦 3 × 横 4, 計 12 個) に取り付けた. 電気刺激による計測部位への直接的影響を避けるため、2本の Ag-AgCl 電極を左室に取り付けてベーシングを加えた. この際、左室からの電氣的興奮は、右室と左室の連結部にある心筋を通して右室自由壁に伝導する. 右室自由壁に 3本の電極を取り付けて心電図を測定し、その心電図を基に電気刺激時の興奮、機械的伸展時の興奮の有無やタイミングを確認した. 測定される信号は 12 bit の AD 変換機によって 2 kHz にデジタル化されパーソナルコンピュータ (PC) のハードディスクに記録した.

全ての実験は Guiding Principles for the Care and Use of Animals in the Field of Physiological Sciences approved by the Physiological Society of Japan and approved by the institutional committee を遵守して行った.

2.2 光学的膜電位マッピング

装置の模式図を図 1A に示す. 右室動脈灌流組織標本に対する膜電位計測方法は、既に報告されている摘出灌流心での膜電位計測法と同じ手法を用いた[13]. 以下簡潔に説明する. 組織を膜電位感受性色素 di-4-ANNEPS (5 μmol/l) を混入した Tyrode 溶液で 20 分間灌流する. その後、組織心外膜側を青色発光ダイオード (480 ± 10 nm) で励起し、その反射蛍光をダイクロイックミラーで分離後 2つのバンドパスフィルター (540 ± 20 nm, 680 ± 20 nm) を通して帯域を絞り、イメージンテンシファイアを通して信号を増幅させた後 CMOS カメラ (FASTCAM-Ultima, Photron, Tokyo, Japan) で測定した. 光学画像は 500 フレーム毎秒、解像度 256 × 256 で測定し、PC に保存した. 実験中、β 遮断薬や BDM (2,3-butanedione monoxime) などの心臓の収縮を止める薬剤は使用していない.

2.3 画像処理

伸展や心筋の収縮などの動きによるアーチファクトを測定した光学画像から除去するため、我々は独自に開発したモーション追跡技術とレシオ計算を適用した[13]. 簡潔に説明すると、モーション追跡技術については、伸展時の画像と静止時の参照画像において、目印であるビーズとその周辺の画像が一致する場所を相互相関法により探索し、その相対位置を高解像度で決定する. これらの位置情報は 2つの目的で使用される. 1つは、伸展時のビーズ間の距離を参照配置におけるビーズ間の距離で割ることにより、組織心外膜表面各所の歪を求めることに利用した. 2つ目

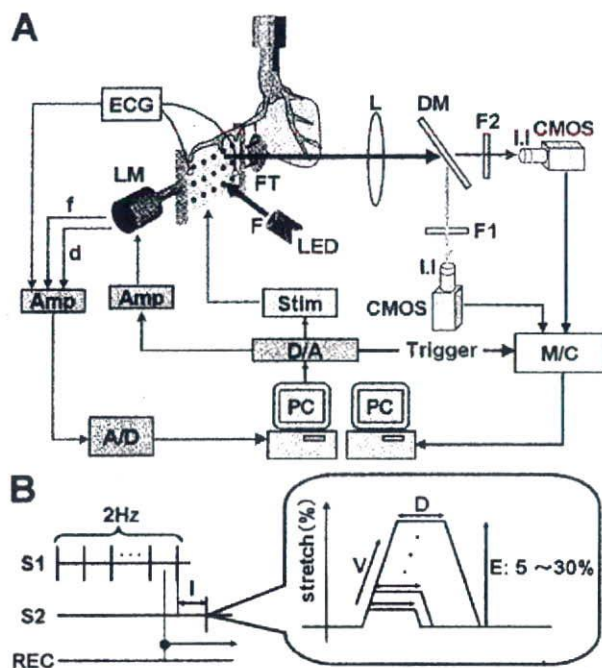


図1 実験装置

A: 実験装置の概念図。長方形に整えた右室自由壁の両端を組織サポートに接着固定し、それぞれを力センサー (FT)、リニアモータ (LM) に接続した。心電図 (ECG)、発生張力 (f)、リニアモータの駆動距離 (d) のアナログ信号をアンプで増幅させて (Amp)、AD 変換機 (A/D) を介してパーソナルコンピュータ (PC) に記録した。伸展刺激や電気刺激の出力信号は PC によって生成し、それらは DA 変換機 (D/A) を通して LM および電気刺激装置 (Stim) に送られる。光学的膜電位計測では、組織を青色発光ダイオード (LED) で励起し、その反射蛍光をダイクロイックミラー (DM) によって 2 波長に分離し、2 つのバンドパスフィルター (F1, F2) を通して波長帯を絞った。これらの光信号をイメージインテンシファイアー (LI) を通して CMOS カメラ (CMOS) で撮影し、PC のメモリコントローラ (M/C) に保存した。L: lens

B: 伸展手順。電気刺激 (S1: 2 Hz) を与えて組織の状態を安定させ、その後伸展刺激 (S2) を加えた。最後の S1 と S2 の時間間隔を 500 msec、伸展のプラトー (D) を 50 msec と一定にした。伸展の大きさ (E) は組織自然長の 5, 10, 15, 20, 25, 30% で与えた。

Fig. 1 Experimental setup.

A: Schematic representation of the experimental setup. Excised RV wall with its intact coronary artery was glued to a pair of tissue supports connected to a force transducer (FT) and a linear motor (LM). ECG, force (f) and displacement (d) signals were amplified (Amp) and recorded by an AD converter (A/D) and personal computer (PC). Stretch and electrical stimulation commands were generated by the PC and applied to LM and electrical stimulator (Stim) through a DA converter (D/A). For optical mapping, the tissue was illuminated by light emission diodes (LED). The fluorescent emission light was split by a dichroic mirror (DM) and narrowed down to the two frequency bands by appropriate filters (F1, F2). The optical images were captured by two independent CMOS

cameras (CMOS) with image intensifiers (LI) and stored in a memory controller (M/C) and PC. L: lens
B: Stretch protocol. A stretch pulse (S2) was preceded by a train of pulses (S1: 2 Hz) for stabilizing the tissue condition. The coupling interval between the last S1 and S2 was set to 500 ms, and the duration of stretch (D) was 50 ms. The amplitude of stretch (E) was set at 5, 10, 15, 20, 25 or 30% of the tissue length.

に、この位置情報を基に、伸展あるいは収縮により伴う組織の変形に対してアフィン行列を算出することが可能となる。このアフィン行列を用いることにより、変形時の画像の各点を参照配置に座標変換することができ、膜電位の一連の時間変化を算出し参照配置において表示することが可能になる。また波長 540 ± 20 nm の測定データを波長 680 ± 20 nm の測定データで割ることにより (レシオ計算)、光の経路方向の動きによるアーチファクト (光強度の変化によるアーチファクト) を取り除いた。アーチファクトを除去した光学画像に時空間フィルター処理を行い、最後に興奮の等時線図を作成した。

2.4 伸展方法

伸展刺激を与える手順については図 1B に示した。各測定で、一過性の伸展刺激 (S2) を与える前に、組織の状態を安定させるため 20 回の電気ペーシング (S1: 振幅 2 mA, 刺激時間 2 ms) を行っている。伸展刺激のプラトー (D) は 50 ms に固定し、伸展の大きさは組織全長の 5, 10, 15, 20, 25, 30% としてランダムに与えた。台形の電圧信号をリニアモータに入力し、伸展速度は 0.5% で一定にした。最後の S1 と S2 の間の連結時間 (I) は 500 ms で一定にした。この際、左室へ電気刺激による興奮が右室に伝わるのに時間がかかるが、ECG から 500 ms の連結時間は、組織が静止膜電位に落ちつくのに十分な時間であることを確認している。

2.5 三次元形状測定

光学的膜電位計測の後、組織標本を左室から切り離し、Tyrode 溶液で満たしたチャンバーの底にシアノアクリレート生体用接着剤 (Vetbond™; 3M, St. Paul, MN) を用いて接着固定した。心筋組織の辺の長さが、膜電位測定時と同じであること、乾燥による厚みの変化がないことを確認した。チャンバーを自動 XY ステージ (KST-50XY, Sigma Koki, Tokyo, Japan) の上に置き、心内膜表面をレーザー変位測定機 (LK-G30, Keyence, Osaka, Japan) で XY 方向に 0.5 mm 間隔で測定し、組織全体の厚み分布をマッピングした。レーザーの屈折による誤差は 0.005 mm 以下で無視できることを確認している。

2.6 データ分析

組織の興奮確率 (y) を伸展率および局所歪 (x) の関数として評価する際、次の 2 つのパラメータを持つロジスティック回帰曲線を用いた:

$$y = \frac{1}{1 + \exp(a + bx)}$$

但し a, b は回帰係数とする。

ガドリニウムの効果に関しては A repeated measures ANOVA を用いた。また Tukey's test によって有意差を検定した。データは、平均 ± S.E.M で表示し、p < 0.05 を統計的に有意であるとした。

2.7 コンピュータシミュレーション

伸展により誘発される不整脈の特徴やその機序をより詳細に検討するため、我々は有限要素法に基づいた独自の組織シミュレーションモデルを作成した[14]。このモデルでは、三次元の構造を 63 × 57 × 5 の要素で構成し、電気・機械現象の数理モデルを各要素に組み込んでいる。モデル形状はレーザー変位計で測定した実験データを基に簡略化して模擬し、不均一な厚み分布を再現した (22 × 20 × 2.5~3.5 mm)。この際、各部位の厚みは要素の大きさを変化させることにより調整している。線維方向も組み込み、心内膜側に肉柱に一致させる方向で走行させ (60 度)、心外膜側にかけて 30 度ずつ変化させた。心筋の膜電位変化には Luo-Rudy (LRd) モデルを[15, 16]、組織における興奮伝播にはモノドメインモデルを使用した[17]。MEF の挙動を再現する上では、Kohl らの SAC モデルを組み込ん

だ[18]。このモデルでは SACs のコンダクタンスが歪の関数になっている。また、この SAC モデルでは反転電位が -10 mV になるようにコンダクタンスを設定した。この SAC モデルを LR モデルと興奮収縮連関モデルに組み合わせることで、伸展長から細胞内への流入電流量を計算し、膜電位変化をシミュレートすることが可能になる。細胞内カルシウム濃度をクロスブリッジの形成及び収縮力の発生へと結び付けるためには、Negroni と Lascano らの興奮収縮連関モデルを使用した[19]。ここで計算される発生収縮力は Lin と Yin から超弾性体構成則のパラメータに変換される[20]。構成則は組織全体で均一であるとした。

3. 結 果

3.1 伸展強度による興奮パターンの変化

伸展刺激により興奮がどのように発生するかを明らかにするために、光学的膜電位マッピング装置を用いて膜電位の空間分布を計測した。図 2A は伸展強度による膜電位変化の典型例である。これらのデータはアフィン変換によって再構築されているため、それぞれの膜電位の経時変化は同一点での連続した変化を表している。小さな一軸方向伸展 (5%) を加えた際には、心筋組織は少し脱分極するだけで、活動電位は発生しなかった。(図 2A, 黒細線)。し

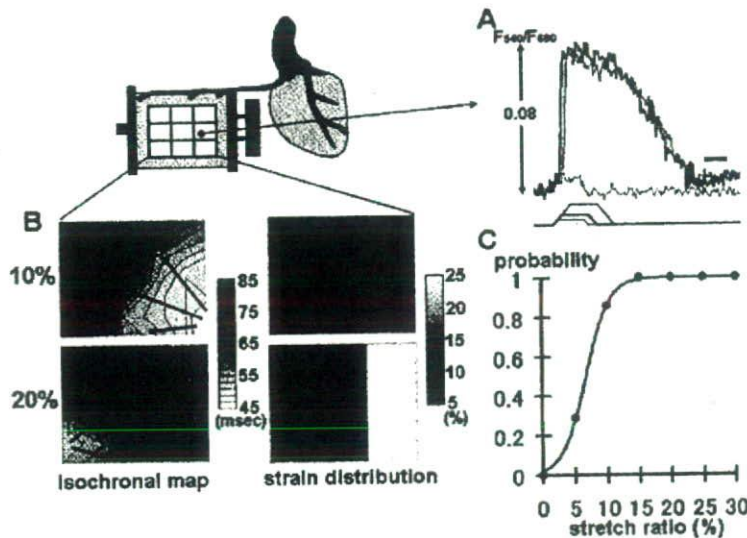


図 2 興奮パターンと不均一な歪分布
A : 様々な大きさの伸展に対する膜電位応答 (F_{540}/F_{680})。5% (黒細線), 10% (黒太線), 20% (灰太線) B : 左列 : 興奮伝播の等時線図。右列 : 局所歪の分布。上段 : 10% 伸展。下段 : 20% 伸展。 C : 伸展率に対する興奮の誘発率 (n = 7)。

Fig. 2 Excitation propagation pattern and inhomogeneous strain distribution.
A : The responses of ratiometric optical signals (F_{540}/F_{680}) in response to uniaxial stretch of various amplitudes (5 (thin black line), 10 (thick black line), 20 (thick gray line) %). B : Left column : Representative isochronal maps of a membrane potential showing the point of initial depolarization. Right column : Distribution of local strain. Upper panel : 10% stretch, lower panel : 20% stretch. C : The probability that the action potential develops in at least one region of the whole tissue as a function of global stretch (n = 7).

かしながらより大きな伸展では (10~15%), 閾値に至るまでは5%伸展と同様膜電位が上昇するが、その後、局所からの興奮誘発が観察された (図2A, 黒太線, 図2B, 上左図)。さらに大きな伸展 (>= 20%) では、組織の複数個所あるいは広い領域からの興奮誘発が観察された (図2A, 灰太線, 図2B, 下左図)。図2Cは組織の興奮発生確率 (全組織の少なくとも一部で興奮が生じる確率) と伸展率の関係を示したものである。このグラフから伸展率が5~10%の間に急激な興奮確率の変化が確認できる (n = 7)。以上の結果から、興奮はある一定以上の伸展強度で生じるものの、その興奮パターンは異なっていることが示された。

3.2 伸展誘発性期外興奮と局所歪の関係

次に伸展により誘発される興奮の発生箇所と局所歪の関係を評価した (n = 7)。歪分布は組織を9つに分割したそれぞれの領域で平均値を算出し、グレースケールで表示している。異なる強度の伸展刺激を加えた際の歪分布と、それに対応する膜電位の等時線図の一例を図2Bに示す。両者の比較から、興奮は大きな歪箇所から誘発される傾向にあることが示唆された (上段：下右領域 14%歪, 下段：

下左領域 14%, 上右 2 領域 23%・24%歪)。この傾向はすべての実験における局所歪みと興奮発生確率の関係をまとめた図3Aによっても確認された (n = 7)。さらにこの伸展誘発性の興奮に対する SACs の関与を調べるため、SACs の阻害薬であるガドリニウム投与時の 15% 伸展刺激に対する応答を調べた。コントロール (CTRL) はガドリニウムが加えられる前の 15% 伸展に対する応答である。ガドリニウムは伸展誘発性の興奮を 71.4% 抑制し、またそれを washout することにより興奮は伸展により再び誘発された (図3B, n = 7; p < 0.01 vs. control 及び washout)。

3.3 不均一な組織形状と歪分布

実験から不均一な興奮パターンが不均一な歪分布に由来することが確認できた。この不均一な歪分布が如何にして生じるのかを確認するため、組織形状を模擬した数値組織モデルを作成した。測定した不均一な三次元厚み形状 (図4A) は、図4Bのように簡略化してモデル化した。この作成した組織形状モデルに対して実験と同様の方法で伸展刺激 (10%) を加えてそのときの歪分布を計算すると、歪は厚みの薄い箇所が大きくなることを確認できた (図4C)。

3.4 伸展により誘発される致死的不整脈

我々はさらに、これらの不均一な興奮パターンが致死的不整脈にどのようにして進展するかを調べた。このシミュレーションでは、電気刺激を右端に加えて先行興奮を発生させ、その 150~230msec 後の各タイミング (5msec 間隔で条件を変化させる) で実験と同様に左端から様々な大きさ (5, 10, 15, 20, 25, 30%) の伸展刺激を加え始め、致死的不整脈誘発の条件を網羅的に調べた (図5)。このプロトコールは正常の心拍に続いて様々な coupling interval で急激な伸展が加えられた状況を模擬しており commotio cordis の発生する状況を再現している。

その結果、小さな伸展刺激 (5%) では、タイミングによらず興奮は誘発されなかったのに対し、中程度の伸展刺激 (10%) をあるタイミング (210 msec 後) で加えた際には下右部の厚みの薄い局所から興奮が誘発され (250 msec 時)、それがスパイラル・ウェイブに発展した (図6A)。さらに大きな伸展刺激 (20%) では、興奮が広域から誘発され (250 msec)、それらはその後 410 msec に消失した (図6B)。横軸を伸展長、縦軸を伸展タイミングとして、スパイラル・リエントリ誘発の有無をプロットしたものが図6Cである。これらの結果から、大きな伸展刺激ではなく、むしろ中程度の伸展刺激を再分極相の適切なタイミングで加えた際に、致死的不整脈が誘発されることが示唆された。また、致死的不整脈を誘発する伸展刺激強度は非常に限られた範囲の強度であることが示唆された。

4. 考 察

本研究では、細胞レベルの MEF が如何にして臓器レベ

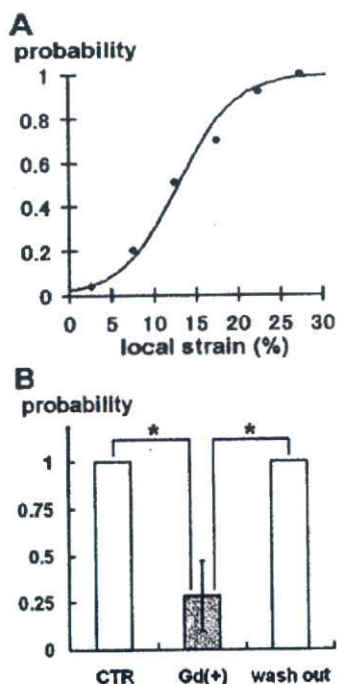


図3 伸展による興奮と薬剤による効果

A: 局所における伸展誘発性興奮の発生確率と歪との関係 (n = 7)。B: 15% 伸展における伸展誘発性興奮に対するガドリニウムの効果 (n = 7)。*p < 0.01。

Fig. 3 Excitation by stretch and modulation by the drug.

A: The relation between the probability of stretch-induced excitation in the local area and the strain in the corresponding area (n = 7). B: The effect of Gd³⁺ on the probability of stretch-induced excitation on 15% stretch (n = 7). *p < 0.01.

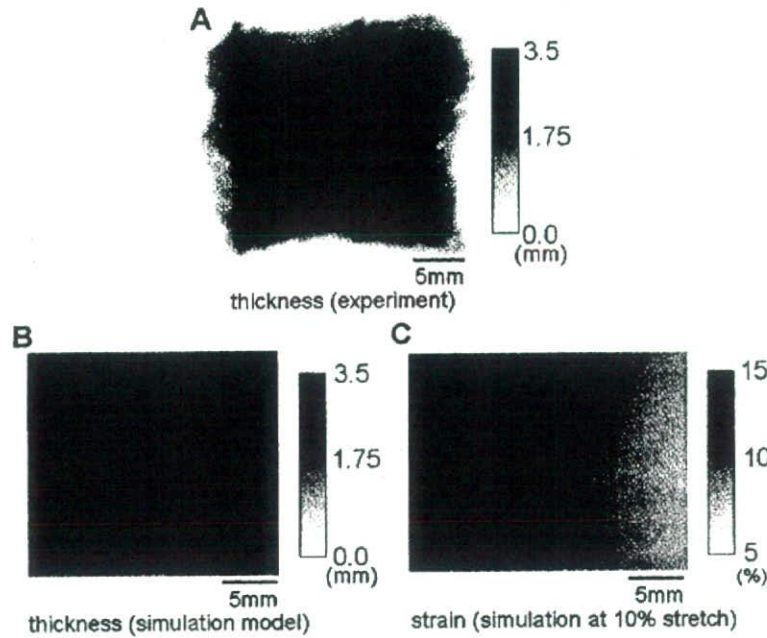


図 4 不均一な組織形状モデルと歪分布
 A: 組織の厚み分布. B: 組織の有限要素モデル (心内膜側から見た図). C: 組織モデルへの 10% 伸展に対する歪分布
 Fig. 4 Heterogeneous morphology in cardiac tissue model and its strain distribution.
 A: A representative case of wall thickness distribution (laser-scanned data). B: Schematic presentation of the simulation model based on finite element method.
 C: Strain distribution in response to 10% of global stretch to the tissue model.

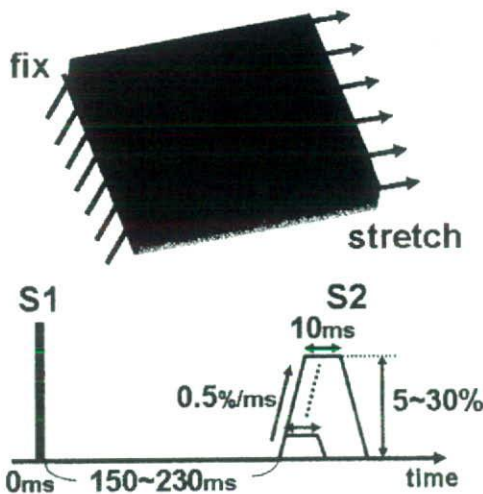


図 5 解析条件
 A: 心内膜側から見て、左端を固定し、右端から伸展刺激を与えた。伸展刺激 (S2) を電気刺激 (S1) 後の様々なタイミング (coupling interval) で与えた。
 Fig. 5 Simulation protocol.
 A: The left-side of the edge of the 3-D tissue model was fixed (hatched lines) and the other side of the edge was stretched as indicated by arrows according to the protocol (inset) (seen from the endocardium). Stretch (S2) was applied after the preceding electrical stimulus (S1).

ルの不整脈に至るかを明らかにするために、ウサギ右室の動脈灌流組織標本を用いた実験とコンピュータシミュレーションを組み合わせた医工学的アプローチにより検討した。実験においては膜電位分布と歪分布を同時に計測し、組織における興奮の発生パターンと歪分布との関係を明らかにした。さらに、厚み形状に基づいた数理組織標本モデルによるシミュレーションから、厚みの不均一性によって歪の不均一性が発生すること、また、中程度の伸展刺激時に生じる局所からの興奮が致死的不整脈に発展する可能性を示した。

4.1 伸展時の光学的膜電位マッピング

光学的膜電位マッピングはその高い空間解像度から不整脈研究に広く利用されているが、多くの研究では機械的あるいは薬剤により心臓の動きを停止させて計測が行われてきた [21, 22]。その理由は、心臓の動きにより蛍光強度が変化すること、また、輝点の位置がずれることにより各点の時系列な膜電位算出が難しくなることである。本研究では、2つの方法により、心臓 (心筋組織) の動きにより生じるアーチファクトを除去し、心筋伸展時の組織表面各点の膜電位の経時変化を正確に算出することを可能にした。まず、光路方向の動きによる光強度の振れ (モーションアーチファクト) を 2 波長の蛍光強度の比を計算することにより除去した。次に、ピーズマーカの動きを追跡して

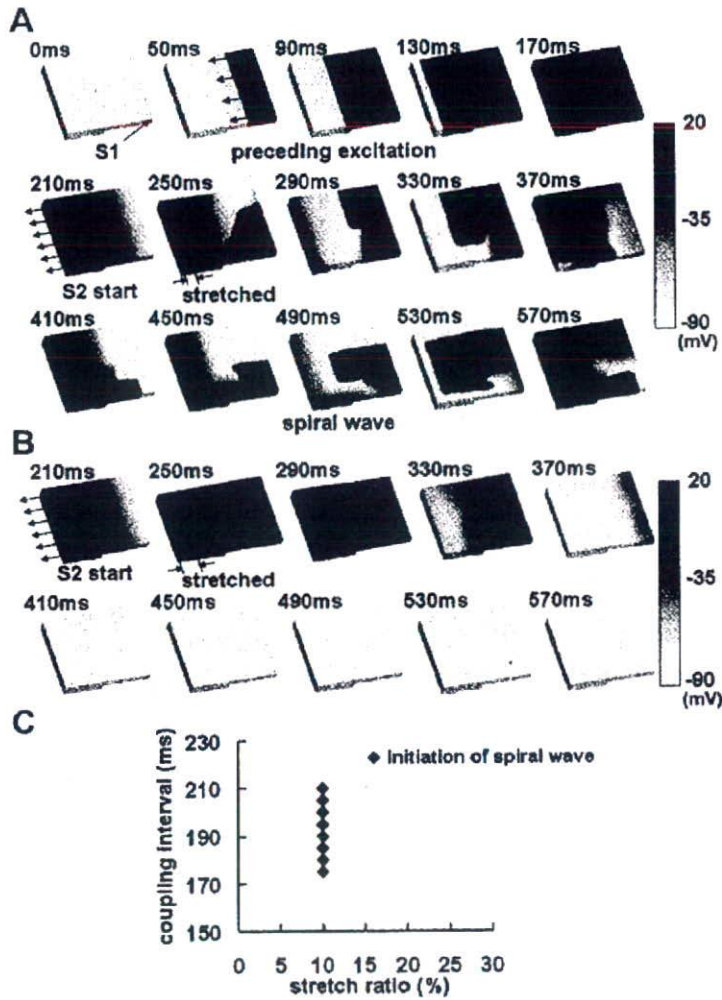


図6 伸展による致命的不整脈誘発のシミュレーション
 A：中程度の伸展刺激（10％）に対する組織モデルの応答。B：大きな伸展刺激（20％）に対する組織モデルの応答。C：伸展率と伸展タイミングに対するスパイラル・ウェーブ誘発の有無。

Fig. 6 Simulation of stretch-induced fatal arrhythmia.
 A: Excitation of the tissue model in response to intermediate(10%)stretch. B: The response to a large (20%) stretch (both A and B are seen from the epicardium). C: Initiation of spiral wave formation in accordance with stretch ratio and/or coupling interval.

アフィン行列を求めることにより、伸展時あるいは収縮時の組織各点の位置を参照配置に座標変換することを可能とし、膜電位の連続した変化を算出することに成功している。図2Aに見られるように、これらの方法によった再構築された伸展による活動電位は、ガラス電極を用いて測定した活動電位波形と同様のものであった。Fascianoらはカエルの組織標本に対して一軸伸展を加え、そのときの局所の電気活動を2つのガラス電極を用いて測定しているが[23]、計測点が2点に限られるため、伸展時の詳細な興奮パターンを知ることはできない。これに対し、我々の開発した光学的膜電位マッピング法は哺乳動物の組織標本において伸展時のより詳細な膜電位マッピングを可能にした。

4.2 不均一な組織形状による細胞応答の修飾

Zengらはラット単離心筋細胞において、ガラス管を用いた吸引による伸展時に細胞内へ流入する電流量を測定し、またそれらがガドリニウムにより阻害されることを確認している[24]。彼らはまた、10%の伸展によって心筋細胞の興奮が発生することも報告している。この興奮閾値については研究によってばらつきがあるが、ラット(>20%) [25, 26]、モルモット(20~25%) [27]、カエル(15%) [28]の単離心筋細胞などの報告がある。今回の組織レベルの実験で確認された局所歪に対する興奮確率の曲線(図3A)では、非興奮から興奮への遷移が上記の細胞レベルの実験と同程度の範囲で起きていることが確認でき

た。我々はさらに組織標本を用いた実験から、伸展刺激と興奮パターンについて興味深い関係を得た。すなわち組織全体に均一な伸展刺激を加えているにも関わらず、興奮はほとんどの場合局所の歪の大きな箇所から生じ、膜電位の反応は不均一になることが示された(図2B)。コンピュータシミュレーションから、そのような歪の不均一性は不均一な組織形状に由来し、興奮は厚みの薄い箇所から生じていることも示された(図5A)。これまでのMEFに関するシミュレーションでは、MEFだけを考慮して興奮収縮連関まではモデルに組み入れられていなかったが[29, 30]、近年、Nashらが不整脈時の心臓の機械現象と電気現象を結びつける手法を提案した[31]。しかしながら、この手法では、電気現象モデルとしてFitzHugh-Nagumoモデルを使用しており、多くの生理学的詳細が考慮されていない。本研究では、生理学的な詳細を組み入れた電気-機械統合型モデルによるシミュレーションに成功している。

以上から、我々は機械的伸展刺激に対する致死的不整脈誘発の機序として次のように考察した。すなわち、(1)心筋組織厚みの不均一性が(2)SACsが活性化される部位と活性化されない部位の不均一性を生み(3)組織内に興奮領域の端点をもつような局所的興奮断片を発生させ(4)それが持続的なスパイラル・ウェイブに発展すると考える。(1)から(2)への繋がり、組織厚みの薄い箇所歪が大きいというシミュレーション結果(図4)と、歪の大きな箇所膜電位変化が大きいという実験結果(図2A)から示されている。また、(2)から(3)については、局所的な歪の大きな箇所から興奮が誘発され(図2B上段)これが、先行興奮と干渉して端点をもつ興奮断片に発展するが、この発展するか否かは組織形状に大きく依存する。本シミュレーションのように先行興奮が組織を右から左に伝播する際には、伸展により組織下左部から誘発される局所興奮は、不応期による左方への伝播が障害され、上方にのみ伝播することにより興奮断片が発生する。すなわち、先行興奮波が水平方向に伝播する場合においては、上下での不均一な組織構造が興奮断片誘発の条件となり、逆に垂直方向に伝播する場合は、左右での不均一性がその条件になると考えられる。(3)で発生した興奮断片が(4)の持続的なスパイラル・ウェイブに発展するか否かは、組織サイズや活動電位持続時間(action potential duration; APD)に大きく依存する。組織サイズについては、マウスの心臓を用いた実験から100 mm²以下の小さな組織でも持続的なスパイラル・ウェイブが生じることが確認されており[32]、またシミュレーションによる研究から、コアよりも僅かに大きい組織サイズでスパイラル・ウェイブが持続することが示唆されている[33]。このことから、本実験及びシミュレーションの組織サイズは持続的なスパイラルの基盤として成立すると考えられる。また、コアの安定性にはAPD restitution curveの傾きが重要であるとされるが

[34]、機械的伸展がこれに与える影響として、これまでにブタの心臓において、一時的な大動脈閉塞がAPD restitution curveの傾きを増加させると報告されている[35]。このことから、機械的伸展負荷が増大することにより、局所から生じるスパイラル・ウェイブが分裂し、心室細動の本態とされるmultiple waveletに発展する可能性も示唆される。しかしながら、このmultiple waveletが発生するには、単一スパイラル・ウェイブの持続に必要な組織長の6倍の大きさが必要であるとされており[36]、本研究の組織サイズでmultiple waveletが生じるかは今後検討すべきところである。

我々はさらにシミュレーションを進め、大きな伸展よりむしろ中程度の伸展が大きな膜電位反応の不均一性をもたらしその結果生じる局所からの興奮が、スパイラル・リエントリに進展することを示した(図6B)。

シミュレーションの解析条件と同様に、組織右端に電極を貼り付けて電気刺激(S1)を与え、S1-S2間隔を190, 200, 210, 220 msecの4つの条件で、10, 15, 20%伸展刺激に対する心筋組織の膜電位計測を試みた(データは提示していない)。しかしながら、持続的なスパイラル・ウェイブを観察するには至らなかった。右室組織に直接刺激電極を差しこみながら繰り返し伸展刺激を行うと次第に電極周辺から組織が傷んでくるため、実験ではシミュレーションのように様々な条件で網羅的に調べることができなかった。シミュレーション結果(図6C)から示唆されるように、スパイラル・ウェイブは非常に狭い範囲の伸展率でのみ誘発される。実験での粗い調査では誘発条件に合致する状況を再現することができなかったため、スパイラル・ウェイブが誘発されなかったと推測される。

4.3 臨床的意義

中程度の機械的刺激が心室壁に加わった際に、厚みの薄い局所から興奮が誘発され、さらに他からの電氣的興奮など別の条件が加わると、その伸展による興奮は致死的不整脈に発展し得る。興味深いことに、Linkらはブタの胸部打撲による心臓震盪の実験で、心室細動の誘発率が中程度の胸部打撃時に最大になることを示しているが[5]、これまでこれが何故起きるのかは説明できていなかった。我々の報告から、不均一な組織構造が組織に一様に加えられた中程度の機械的刺激を修飾して局所からの興奮を誘発し、それが心臓震盪の発生機序に関与しているのではないかと考えられる。

心室壁の不均一な構造は陳旧性心筋梗塞における不整脈の発生にも関与しているのではないかと考えられる。Bogenらは心筋梗塞後の菲薄化した梗塞部と健常部の境界面に大きな機械的負荷がかかることを報告しており[37]、さらにJosephsonらはこれら境界面が不整脈発生の起点となっていることを報告している[38]。臨床例においても、電気生理学検査で心室頻拍が誘発される確率は心室瘤のある症

例で有意に高く、さらにこの誘発率は予後にも関係していると Iesaka らにより報告されている[39]。また、Calkins らは、心室の拡張による不応期の短縮は健常部より梗塞部で大きいとしており、またこのような現象は完全に線維化した部分では起こらず、梗塞部位における心筋細胞の残った部分で顕著であるとしており[40]、残存心筋細胞の SACs の影響が強く示唆される。以上の観点から、陈旧性心筋梗塞の病態においては、収縮期の心内圧の増加は菲薄化した機能的な境界部位の心筋を大きく伸展させ、不整脈誘発を促進させている可能性がある。

いずれの場合においても、不均一な組織構造が心内圧の上昇による心臓全体の伸展を修飾することによって不均一な歪分布を生み、MEF を通して、不整脈の発生基盤となる電気的不均一性を生むのではないかと考えられる。

5. 課題とまとめ

扁平な組織標本を使用することによって局所の歪を容易に評価することが可能になるが、これらの歪みを直接 in vivo での圧容積負荷や胸部刺激による心室壁の変形につなげることは難しい。しかしながら、in vivo における膜電位計測は困難であるという問題も存在し、より高度な膜電位測定技術が必要とされる。シミュレーションにおいては、Kohl らの SAC モデルを採用したが[18]、このモデルでは SACs のコンダクタンスは細胞長軸方向の伸展率に対する関数としてのみモデル化されている。現在のところ、細胞短軸方向の伸展に対する SACs の応答は不明であり、MEF の機序とそれに関係する不整脈について、より詳細な研究が必要であると考えられる。

まとめとして、本研究では心室組織を用いた実験とシミュレーションを組み合わせたことによって機械的刺激により誘発される不整脈の発生機序を検討した。組織への一様な伸展刺激は、不均一な組織形状により修飾されて、不均一な興奮を生むことが確認された。特に中程度の伸展刺激時にはこの効果が顕著となり局所からの興奮誘発が確認され、それが致死的不整脈に発展することが示唆された。

謝辞 本研究は、科学研究費(18650129)、厚生労働科学研究費(医療機器開発推進研究事業)、日本学術振興会特別研究員奨励費、財団法人日本心臓財団若年研究者研究奨励費による助成の下で行われた。

文 献

1. Lab MJ: Mechanoelectric feedback (transduction) in heart: concepts and implications. *Cardiovasc Res.* **32**(1): 3-14, 1996.
2. Dean JW, Lab MJ: Arrhythmia in heart failure: role of mechanically induced changes in electrophysiology. *Lancet.* **1**(8650): 1309-1312, 1989.
3. Goldstein S: Toward a new understanding of the mechanism and prevention of sudden death in coronary heart disease. *Circulation.* **82**(1): 284-288, 1990.
4. Coronel R, Wilms-Schopman FJ, deGroot JR: Origin of ischemia-induced phase 1b ventricular arrhythmias in pig hearts. *J Am Coll Cardiol.* **39**(1): 166-176, 2002.
5. Link MS, Maron BJ, Wang PJ, VanderBrink BA, Zhu W, Estes NA, 3rd: Upper and lower limits of vulnerability to sudden arrhythmic death with chest-wall impact (commotio cordis). *J Am Coll Cardiol.* **41**(1): 99-104, 2003.
6. Chen RL, Penny DJ, Greve G, Lab MJ: Stretch-induced regional mechanoelectric dispersion and arrhythmia in the right ventricle of anesthetized lambs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **286**(3): H1008-1014, 2004.
7. Hansen DE, Craig CS, Hondeghem LM: Stretch-induced arrhythmias in the isolated canine ventricle. Evidence for the importance of mechanoelectrical feedback. *Circulation.* **81**(3): 1094-1105, 1990.
8. Lerman BB, Burkhoff D, Yue DT, Franz MR, Sagawa K: Mechanoelectrical feedback: independent role of preload and contractility in modulation of canine ventricular excitability. *J Clin Invest.* **76**(5): 1843-1850, 1985.
9. Hu H, Sachs F: Stretch-activated ion channels in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* **29**(6): 1511-1523, 1997.
10. Ruknudin A, Sachs F, Bustamante JO: Stretch-activated ion channels in tissue-cultured chick heart. *Am J Physiol.* **264**(3 Pt 2): H960-972, 1993.
11. White E: Length-dependent mechanisms in single cardiac cells. *Exp Physiol.* **81**(6): 885-897, 1996.
12. Zabel M, Koller BS, Sachs F, Franz MR: Stretch-induced voltage changes in the isolated beating heart: importance of the timing of stretch and implications for stretch-activated ion channels. *Cardiovasc Res.* **32**(1): 120-130, 1996.
13. Inagaki M, Hidaka I, Aiba T, Tatewaki T, Sunagawa K, Sugimachi M: High resolution optical mapping of cardiac action potentials in freely beating rabbit hearts. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 5. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2004, pp. 3578-3580.
14. Hirabayashi S, Inagaki M, Hisada T: Effects of wall stress on the dynamics of ventricular fibrillation: A simulation study using a dynamic mechanoelectric model of ventricular tissue. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **19**(7): 730-739.
15. Faber GM, Rudy Y: Action potential and contractility changes in $[Na^+]_i$ overloaded cardiac myocytes: a simulation study. *Biophys J.* **78**(5): 2392-2404, 2000.
16. Luo CH, Rudy Y: A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ Res.* **74**(6): 1071-1096, 1994.
17. Holden AV, Panfilov AV: *Modeling Propagation in Excitable Media*, Wiley, Chichester, 1997, pp. 65-99.
18. Kohl P, Day K, Noble D: Cellular mechanisms of cardiac mechano-electric feedback in a mathematical model. *Can J Cardiol.* **14**(1): 111-119, 1998.
19. Negroni JA, Lascano EC: A cardiac muscle model relating sarcomere dynamics to calcium kinetics. *J Mol Cell Cardiol.* **28**(5): 915-929, 1996.
20. Lin DH, Yin FC: A multiaxial constitutive law for mammalian left ventricular myocardium in steady-state barium contracture or tetanus. *J Biomech Eng.* **120**(4):

- 504-517, 1998.
21. Efimov IR, Huang DT, Rendt JM, Salama G: Optical mapping of repolarization and refractoriness from intact hearts. *Circulation*. **90**(3): 1469-1480, 1994.
 22. Wang NC, Lee MH, Ohara T, Okuyama Y, Fishbein GA, Lin SF, Karagueuzian HS, Chen PS: Optical mapping of ventricular defibrillation in isolated swine right ventricles: demonstration of a postshock isoelectric window after near-threshold defibrillation shocks. *Circulation*. **104**(2): 227-233, 2001.
 23. Fasciano RW 2nd, Tung L: Factors governing mechanical stimulation in frog hearts. *Am J Physiol*. **277**(6 Pt 2): H2311-2320, 1999.
 24. Zeng T, Bett GC, Sachs F: Stretch-activated whole cell currents in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **278**(2): H548-557, 2000.
 25. Nishimura S, Kawai Y, Nakajima T, Hosoya Y, Fujita H, Katoh M, Yamashita H, Nagai R, Sugiura S: Membrane potential of rat ventricular myocytes responds to axial stretch in phase, amplitude and speed-dependent manners. *Cardiovasc Res*. **72**(3): 403-411, 2006.
 26. Nishimura S, Seo K, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, Nagai R, Sugiura S: Responses of single-ventricular myocytes to dynamic axial stretching. *Prog Biophys Mol Biol*. **97**(2-3): 282-297, 2008.
 27. Kamkin A, Kiseleva I, Isenberg G: Stretch-activated currents in ventricular myocytes: amplitude and arrhythmogenic effects increase with hypertrophy. *Cardiovasc Res*. **48**(3): 409-420, 2000.
 28. Tung L, Sliz N, Mulligan MR: Influence of electrical axis of stimulation on excitation of cardiac muscle cells. *Circ Res*. **69**(3): 722-730, 1991.
 29. Garry A, Kohl P: Mechanical induction of arrhythmias during ventricular repolarization: modeling cellular mechanisms and their interaction in two dimensions. *Ann N Y Acad Sci*. **1015**: 133-143, 2004.
 30. Vetter FJ, McCulloch AD: Mechanoelectric feedback in a model of the passively inflated left ventricle. *Annals of Biomedical Engineering*. **29**(5): 414-426, 2001.
 31. Nash MP, Panfilov AV: Electromechanical model of excitable tissue to study reentrant cardiac arrhythmias. *Prog Biophys Mol Biol*. **85**(2-3): 501-522, 2004.
 32. Vaidya D, Morley GE, Samie FH, Jalife J: Reentry and fibrillation in the mouse heart. A challenge to the critical mass hypothesis. *Circ Res*. **85**(2): 174-181, 1999.
 33. Qu Z: Critical mass hypothesis revisited: role of dynamical wave stability in spontaneous termination of cardiac fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **290**(1): H255-263, 2006.
 34. Qu Z, Xie F, Garfinkel A, Weiss JN: Origins of spiral wave meander and breakup in a two-dimensional cardiac tissue model. *Ann Biomed Eng*. **28**(7): 755-771, 2000.
 35. Horner SM, Dick DJ, Murphy CF, Lab MJ: Cycle length dependence of the electrophysiological effects of increased load on the myocardium. *Circulation*. **94**(5): 1131-1136, 1996.
 36. Winfree AT: Electrical turbulence in three-dimensional heart muscle. *Science*. **266**(5187): 1003-1006, 1994.
 37. Bogen DK, Rabinowitz SA, Needleman A, McMahon TA, Abelmann WH: An analysis of the mechanical disadvantage of myocardial infarction in the canine left ventricle. *Circ Res*. **47**(5): 728-741, 1980.
 38. Josephson ME, Harken AH, Horowitz LN: Endocardial excision: a new surgical technique for the treatment of recurrent ventricular tachycardia. *Circulation*. **60**(7): 1430-1439, 1979.
 39. Iesaka Y, Nogami A, Aonuma K, Nitta J, Chun YH, Fujiwara H, Hiraoka M: Prognostic significance of sustained monomorphic ventricular tachycardia induced by programmed ventricular stimulation using up to triple extrastimuli in survivors of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. **65**(16): 1057-1063, 1990.
 40. Calkins H, Maughan WL, Weisman HF, Sugiura S, Sagawa K, Levine JH: Effect of acute volume load on refractoriness and arrhythmia development in isolated, chronically infarcted canine hearts. *Circulation*. **79**(3): 687-697, 1989.

瀬尾 欣也 (セオ キンヤ)

2004年大阪大学基礎工学部卒業, 2006年東京大学大学院新領域創成科学研究科修士課程修了。現在, 東京大学大学院新領域創成科学研究科博士課程に在学中。2008年より日本学術振興会特別研究員 (DC2)。

専門分野: 心臓生理学, 生体力学。

所属学会: 日本循環器学会, 米国心臓協会 (AHA), 国際心臓研究学会 (ISHR)。



稲垣 正司 (イナガキ マサシ)

1987年千葉大学医学部卒業。1991年国立循環器病センター内科心臓部門レジデント, 1996年国立循環器病センター研究所循環動態機能部研究員を経て, 現在, 国立循環器病センター研究所循環動態機能部室長。

専門分野: 循環器病学, 不整脈学。

所属学会: 日本循環器学会, 日本心電学会, 日本内科学会。



平林 智子 (ヒラバヤシ サトコ)

2003年東京大学工学部卒業, 2008年東京大学大学院新領域創成科学研究科博士課程修了。現在, 東京大学大学院新領域創成科学研究科・日本学術振興会特別研究員 (PD)。

専門分野: 有限要素法, 生体力学。

所属学会: 日本機械学会, 日本循環器学会。



日高 一郎 (ヒダカ イチロウ)

2000年東京大学大学院教育学研究科博士課程満期退学 (身体教育学)。2001年国立循環器病センター研究所循環動態機能部流動研究員を経て, 現在, 同研究所派遣研究員 (医療機器センター)。

専門分野: 循環器系モデリング。

所属学会: 日本生体医工学学会。



杉町 勝 (スギマチ マサル)

1984年九州大学医学部卒業。1992年国立循環器病センター研究所循環動態機能部室長を経て、現在、国立循環器病センター研究所循環動態機能部部长，同心臓内科部長併任，大阪大学大学院医学研究科連携大学院教授併任。



専門分野：循環器病学，循環生理学，循環調節，循環バイオニック医学。

所属学会：日本生体医工学会，日本循環器学会，日本内科学会，日本循環制御医学会。

杉浦 満了 (スギウラ セイリョウ)

1982年東京大学医学部卒業。1995年東京大学医学部附属病院助手を経て，2002年より東京大学大学院新領域創成科学研究科教授。



専門分野：心臓病学，心臓生理学，心臓シミュレーション。

所属学会：日本循環器学会，日本心臓病学会，日本生体医工学会，国際心臓研究学会 (ISHR)，Fellow of American Heart Association。

久田 俊明 (ヒサダ トシアキ)

1973年早稲田大学工学部機械工学科卒業，1979年東京大学大学院工学系研究科博士課程修了 (工学博士)。1979年東京大学生産技術研究所助手，1985年東京大学工学部助教授，1988年東京大学先端科学技術研究センター助教授，1993年東京大学工学部教授を経て，現在，東京大学大学院新領域創成科学研究科教授。



専門分野：連続体力学，非線形有限要素法，流体構造連成解析。

所属学会：日本機械学会，日本循環器学会。

Local Delivery of Imatinib Mesylate (STI571)–Incorporated Nanoparticle Ex Vivo Suppresses Vein Graft Neointima Formation

Satoshi Kimura, MD; Kensuke Egashira, MD, PhD; Kaku Nakano, PhD; Eiko Iwata, PhD; Miho Miyagawa, PhD; Hiroyuki Tsujimoto, PhD; Kaori Hara, PhD; Yoshiaki Kawashima, PhD; Ryuji Tominaga, MD, PhD; Kenji Sunagawa, MD, PhD

Background—Clinical outcome of surgical revascularization using autologous vein graft is limited by vein graft failure attributable to neointima formation. Platelet-derived growth factor (PDGF) plays a central role in the pathogenesis of vein graft failure. Therefore, we hypothesized that nanoparticle (NP)-mediated drug delivery system of PDGF-receptor (PDGF-R) tyrosine kinase inhibitor (imatinib mesylate: STI571) could be an innovative therapeutic strategy.

Methods and Results—Uptake of STI571-NP normalized PDGF-induced cell proliferation and migration. Excised rabbit jugular vein was treated ex vivo with PBS, STI571 only, FITC-NP, or STI571-NP, then interposed back into the carotid artery position. NP was detected in many cells in the neointima and media at 7 and 28 days after grafting. Significant neointima was formed 28 days after grafting in the PBS group; this neointima formation was suppressed in the STI571-NP group. STI571-NP treatment inhibited cell proliferation and phosphorylation of the PDGF-R- β but did not affect inflammation and endothelial regeneration.

Conclusions—STI571-NP–induced suppression of vein graft neointima formation holds promise as a strategy for preventing vein graft failure. (*Circulation*. 2008;118[suppl 1]:S65–S70.)

Key Words: nanotechnology ■ drug delivery system ■ grafting ■ platelet-derived factors ■ signal transduction

Clinical outcome of surgical revascularization using autologous vein graft is limited by vein graft failure resulting from accelerated neointima formation; 30% to 50% of vein grafts fail within 10 years.¹ Because platelet-derived growth factor (PDGF), expressed by proliferating vascular smooth muscle cells (VSMCs) and infiltrating monocytes, plays a central role in the pathogenesis of vein graft failure,² targeted molecular blockade of PDGF signaling is a potential strategy for preventing vein graft failure. Imatinib mesylate (STI571),³ a potent inhibitor of the c-Abl tyrosine kinase (TK), the c-Kit receptor kinase, and the PDGF-R TK, is approved for the treatment of patients with chronic myeloid leukemia. It has been shown that c-Kit–positive progenitor cells can differentiate into α -actin–positive VSMCs and may contribute to neointima formation after vascular injury.⁴ It has also been reported that c-Abl TK is involved in angiotensin II–induced VSMC hypertrophy.⁵ In contrast, STI571 has been shown to have little antiproliferative effects on endothelial cells.⁶ These data suggest that STI571 appropriately inhibits neointima formation without negative effects on endothelial regeneration/vascular healing, and thus provide a

rationale for the use of STI571 as a VSMC-selective molecular targeting drug in the prevention of neointima formation associated with vein graft failure.

STI571 has been reported to inhibit balloon injury–induced neointima formation in rats⁷ when dosages beyond the clinical norm were used (50 mg/kg per day). In contrast, STI571 had no effect on neointima formation in rabbits when administered in a clinically relevant dosage (10 mg/kg per day).⁸ Recent clinical studies in humans have detected no beneficial effects of oral administration of STI571 (600 mg/d for 10 days)⁹ on in-stent restenosis. These data suggest that systemic administration of STI571 at clinical dosages may not be sufficient to antagonize PDGF-induced vascular responses at the site of vascular injury. It has been suggested that STI571 administered at standard dosages (400–800 mg/d) may not reach sufficient serum concentrations (maximum concentration: $<10 \mu\text{mol/L}$) to function as an inhibitor of PDGF-R signaling.¹⁰ Furthermore, long-term administration of STI571 causes cardiac mitochondrial dysfunction that results in cardiotoxicity and ventricular dysfunction.¹¹

From the Department of Cardiovascular Medicine (K.E., K.N., E.I., M.M., K.S.) and Surgery (S.K., R.T.), Graduate School of Medical Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan; Hosokawa Powder Technology Research Institute (H.T., K.H.), Osaka, Japan; and the School of Pharmaceutical Science (Y.K.), Aichi Gakuin University, Aichi, Japan.

Presented at the American Heart Association Scientific Sessions, November 4–7, 2007, Orlando, Fla.

The online Data Supplement can be found with this article at <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/CIRCULATIONAHA.107.740613/DC1>.

Correspondence to Kensuke Egashira, MD, PhD, Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. E-mail egashira@cardiol.med.kyushu-u.ac.jp

© 2008 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.740613

Therefore, preventing vein graft failure via STI571-mediated PDGF-R signaling blockade requires an efficient local drug delivery system. Ex vivo local delivery of drugs or genes to the vein has been used as a clinically relevant approach. We have recently developed bio-absorbable polymeric nanoparticles (NP) formulated from the polymer polyethylene-glycol (PEG)-modified poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA).^{12,13} PEG-PLGA NP offers the advantages of safety, efficient intracellular delivery of different classes of therapeutic agents, and the capacity for sustained intracytoplasmic release.^{14,15} Therefore, we hypothesized that STI571-incorporated NP could be an innovative therapeutic strategy for preventing vein graft failure. We investigated whether our NP-based drug delivery system worked as an intracellular ex vivo delivery system to the excised vein, and whether blockade of PDGF-R TK by STI571-incorporated NP suppressed vein graft neointima formation in vivo.

Materials and Methods

Preparation of PEG-PLGA NP

PEG-PLGA NP encapsulated with fluorescence marker or STI571 was prepared using an emulsion solvent diffusion method, as previously reported.^{12,13} Additional details can be found in the online Data Supplement.

Cellular Uptake and Intracellular Distribution of NP In Vitro

We cultured rat aortic smooth muscle cells (SMCs) and evaluated the cellular uptake of PEG-PLGA NP by fluorescence microscopy. Additional details can be found in the online Data Supplement.

Measurement of In Vitro FITC Release Kinetics From NP

To measure FITC release kinetics, FITC-NP (n=8) was immersed in Tris-EDTA buffer, and the released FITC from NP was measured.

Cell Proliferation, Migration, Cytotoxicity, and TUNEL Assay

We cultured human coronary artery SMCs and evaluated proliferation, migration,¹⁶ cytotoxicity, and apoptosis. Additional details can be found in the online Data Supplement.

Experimental Animal Models

Male Japanese white rabbits (KBT Oriental, Tokyo, Japan) weighing 2.5 to 3.0 kg were fed a high-cholesterol diet for 2 weeks before the operation. Animals were anesthetized, a midline neck incision was made, and an approximately 3-cm segment of the jugular vein was dissected free; all side branches were ligated. The vein segments were gently flushed, and placed in a buffer alone (n=11) or in a solution containing either FITC-encapsulated PEG-PLGA NP at 0.5 mg/mL (n=11), STI571-encapsulated PEG-PLGA NP at 0.5 mg/mL containing STI571 at 100 μ mol/L (n=11), or STI571 alone at 100 μ mol/L (n=11) for 30 minutes at room temperature. The treated vein segments were interposed into ipsilateral carotid arteries in an end-to-side fashion. The animals were maintained on the same high-cholesterol diet throughout experimental period.

All animals received aspirin at 20 mg/d from 3 days before the graft procedure until euthanasia. After venous blood samples were taken, animals were killed with a lethal dose of anesthesia on days 7 (n=5 each) and 28 (n=6 each). The vein grafts were harvested, flushed with saline, and used for histopathologic, immunohistochemical, and biochemical studies.

Ex Vivo NP Delivery in Human Vein

Segments of internal thoracic vein were obtained from patients undergoing coronary arterial bypass surgery. Additional details can be found in the online Data Supplement.

Histopathologic and Immunohistochemical Analysis

Tissue sections from the grafts were harvested and prepared for analysis. Additional details can be found in the online Data Supplement.

Western Blot Analysis

Protein was extracted from cultured VSMCs or frozen vein graft tissues. Western blot analysis was performed with antibodies against human PDGF-R- β , phospho-PDGF-R- β , phosphotyrosine, phospho-p44/42 MAPK (ERK 1/2), ERK 1/2, c-Abl TK, or actin (additional details can be found in the online Data Supplement).

Statistical Analysis

Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis of differences was performed by ANOVA and Bonferroni's multiple comparison tests. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

The authors had full access to the data and take full responsibility for its integrity. All authors have read and agree to the manuscript as written.

Results

In Vitro Cell Uptake and Intracellular Distribution of NP and NP Release Kinetics In Vitro

When incubated with rat aortic and human coronary artery SMCs, the fluorescence-encapsulated NP showed excellent capacity of intracellular distribution (Figure 1A). In contrast, no fluorescence was detected when the SMCs were incubated with blank NP or fluorescent molecules only. A large fraction (>90%) of the NP rapidly entered into the cells, and this incorporation rate sustained until 24 hours (Figure 1B). An endocytosis inhibitor (chlorpromazine hydrochloride) attenuated the NP-mediated intracellular incorporation of fluorescence (supplemental Figure I). Fluorescence confocal microscopic study revealed the intracellular retention of NP (Figure 1C). Transmission electron microscopy of the cellular cross-sections revealed the intracellular localization of NP at 1 hour of incubation (Figure 1D).

An analysis of the in vitro FITC release kinetics from FITC-NP showed an early burst of FITC release such that approximately 40% of the total amount ultimately released was present on day 1, followed by sustained release of the remaining FITC over the next 28 days (Figure 1E).

In Vitro Effects of STI571-NP on PDGF-Induced Proliferation and Migration of VSMCs and on Receptor Phosphorylation

As reported by other investigators,^{6,17} non-NP-STI571 attenuated PDGF-induced proliferation and migration in a dose-dependent manner (Figure 2A and B). STI571 at a concentration of 10 μ mol/L prevented the PDGF-induced cell proliferation and migration. The PEG-PLGA NP-containing STI571 at 10 μ mol/L also prevented the PDGF-induced responses of VSMCs (Figure 2A and B). Results of a TUNEL assay showed no detectable increase in STI571-induced increase in apoptotic cells (data not shown). Results of a

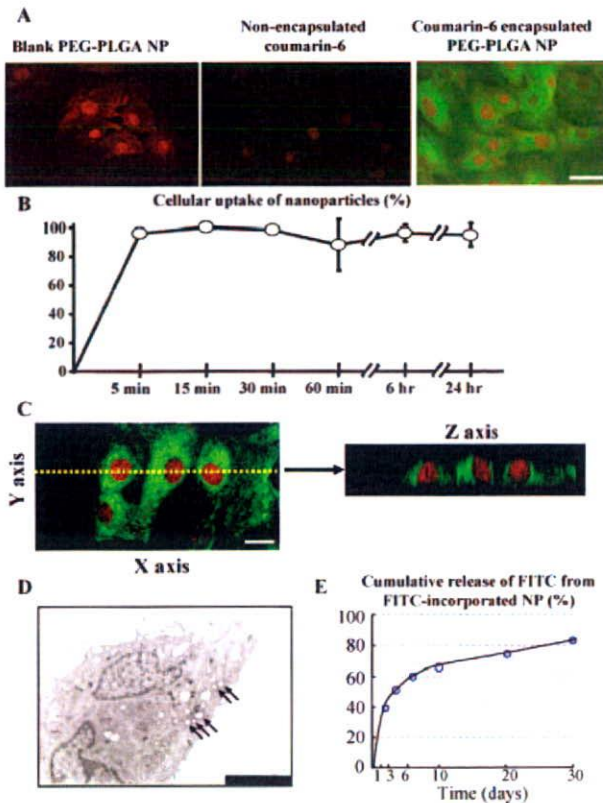


Figure 1. In vitro cellular uptake and intracellular distribution of NP. A, Fluorescence microscopic pictures of rat aortic SMCs incubated with blank PEG-PLGA NP, nonencapsulated coumarin-6, and coumarin-6-encapsulated PEG-PLGA NP (0.5 mg/mL) for 60 minutes. Nuclei were counterstained with propidium iodide (PI). Scale bar=200 μ m. B, In vitro time course of the percentage of cellular uptake of NP (100 \times fluorescence-positive cells/total cells per field) are shown. Data are mean \pm SEM (n=4). C, Confocal fluorescence microscopy photographs (left: an X-Y axis image, right: a Z axis image of cross-sections from yellowish dashed line displayed on an X-Y axis image) of rat aortic SMCs incubated with medium containing coumarin-6-encapsulated NP at 0.5 mg/mL. Coumarin-6 fluorescence is green. Nuclei are stained red. Scale bar=10 μ m. D, Transmission electron microscopic picture of cross-section of human coronary artery SMCs incubated with NP for 60 minutes. Arrows indicate NP in the cytoplasm. Scale bar=500 nm. E, In vitro time course of cumulative FITC release from the FITC-incorporated NP (n=8 each). The percentage of incremental quantities of released FITC was plotted against time.

cytotoxicity assay showed that human coronary artery SMCs incubated with blank PEG-PLGA NP at a concentration of 1 mg/mL remained 100% viable relative to control (data not shown).

Western blot analysis showed that in human coronary artery SMCs, PDGF-induced phosphorylation of PDGF-R- β was suppressed by STI571 at 10 μ mol/L as well as by STI571-NP (Figure 2C).

Efficacy of NP-Mediated Drug Delivery System to Vein Grafts

Ex vivo incubation of NP with excised rabbit jugular vein or human internal thoracic vein for 30 minutes resulted in high SMC uptake in the media and in some cells in the adventitia

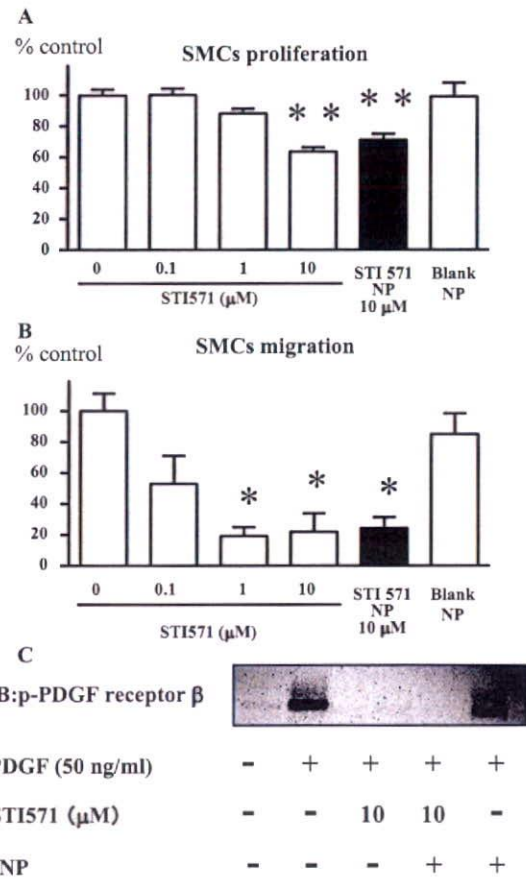


Figure 2. In vitro effects of STI571-encapsulated PEG-PLGA NP on PDGF-induced proliferation and migration of SMCs and on PDGF-R- β phosphorylation. A, Effects of STI571 and STI571-NP on PDGF-stimulated proliferation of human coronary artery SMCs. Data are mean \pm SEM (n=6 each). ***P*<0.001 vs PDGF-induced response. Data are percentage changes from PDGF-induced responses (100%). B, Effects of STI571 and STI571-NP on PDGF-stimulated migration of rat aortic SMCs. Data are mean \pm SEM (n=6 each). **P*<0.01 vs PDGF-induced response. C, Effects of STI571 and STI571-NP on PDGF-induced PDGF-R- β phosphorylation and in human coronary artery SMCs. These Western blot experiments were repeated 3 times; results from all 3 trials were similar and representative results are shown.

(supplemental Figure IIA and IIB). After 7 days of grafting in rabbits when a thin neointima was formed, FITC-positive cells were detected in the neointima and media (% positive area: 51 \pm 9%). After 28 days, many FITC-positive cells were still noted in the neointima and media (% positive area: 12 \pm 5%). In contrast, no FITC immunoreactivity was noted in veins incubated with PBS.

Effects of STI571-NP on Vein Graft Failure in Rabbits

As we previously reported,¹⁸ significant neointima developed 28 days after grafting in animals interposed with control PBS-treated vein grafts. Ex vivo treatment with STI571-NP, but not with STI571 only or FITC-NP, markedly attenuated neointima formation at day 28 (Figure 3).

Increased monocyte infiltration and PCNA-positive proliferating cells were observed in the intima-media and adventi-

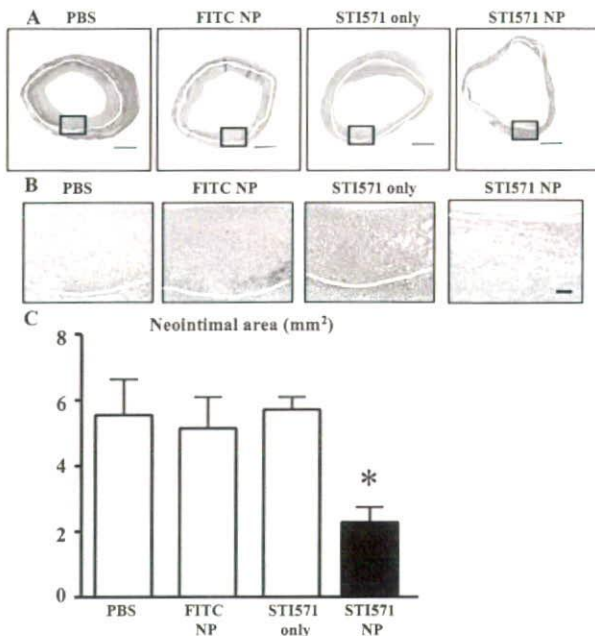


Figure 3. Effects of ex vivo treatment with STI571-NP on vein graft neointima formation in rabbits. A, Low-powered micrographs of whole vessel cross-sections of vein grafts from PBS-, FITC-NP-, STI571 only-, and STI571-NP-treated vein grafts after 28 days, stained with Elastica Van Gieson. White line shows internal elastic lamina. Scale bar=1 mm. B, Expanded high-powered microphotographs from boxed area in A. Scale bar=100 μ m. C, Effects of STI571-NP on neointima area 28 days after grafting (n=6 each). * P <0.05 vs PBS-treated group.

tia at 7 and 28 days after grafting (supplemental Figure IIIA). No effects on inflammatory changes were noted in STI571-NP-treated vein graft (supplemental Figure IIIB). In contrast, treatment with STI571-NP, but not with FITC-NP or STI571 only, markedly attenuated the number of PCNA-positive cells observed on day 7 (supplemental Figure IIIC). There were no significant differences in endothelial cell linings among the 4 groups at 7 and 28 days after grafting (supplemental Figure IIID). There were no significant differences in serum cholesterol levels after 4 weeks among the 4 groups (data not shown).

Effects of STI571-NP on PDGF, PDGF-R, PDGF-R Phosphorylation, and MAPK Pathway

Immunohistochemical studies showed that no PDGF was detected in normal veins. In contrast, intense immunohistochemical staining for PDGF was noted in vein graft tissues 7 days after grafting. There were no significant differences in the degrees of the positive staining area among the 4 groups (supplemental Figure IV). Western blot analysis showed that ex vivo treatment with STI571-NP, but not with STI571 only or FITC-NP, markedly attenuated expression of PDGF-R protein and phosphorylation of PDGF-R kinase, phosphorylation of ERK1/2, and c-Abl TK, at 7 days after grafting (Figure 4A through 4C).

Discussion

We demonstrated for the first time that PEG-PLGA NP is an excellent system for intracellular delivery of molecular tar-

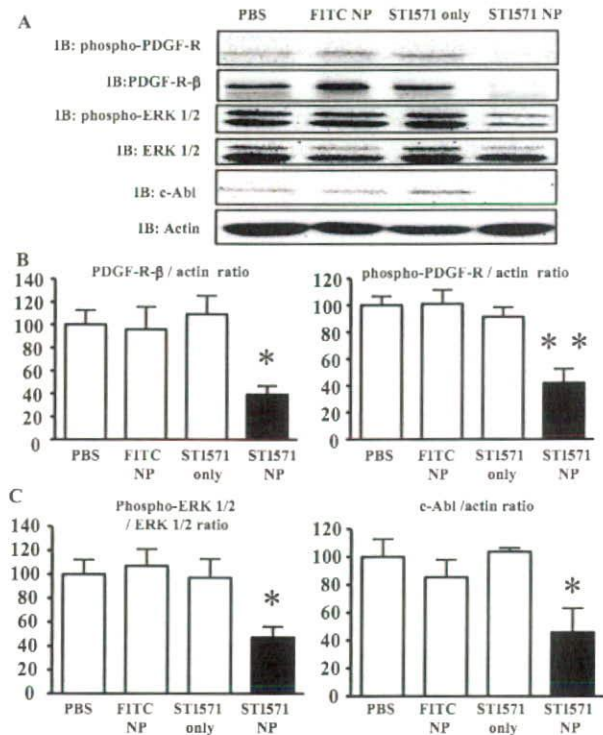


Figure 4. Effects of STI571-NP on the expression of phospho-PDGF-R, PDGF-R- β , phospho-ERK 1/2, MAP kinase (ERK 1/2), c-Abl TK, and actin, 7 days after grafting. A, Immunoblots are representative of 5 individual vein grafts from each group, showing identical results. B, Densitometric analysis of PDGF-R- β and phosphorylation expression (n=5 each). Data are expressed as percent change from PBS group (100%). * P <0.05 vs PBS-treated group. ** P <0.01 vs PBS-treated group. C, Densitometric analysis of phospho-ERK 1/2 and c-Abl TK expression (n=5 each). Data are expressed as percent change from PBS group (100%). * P <0.05 vs PBS-treated group.

geting drugs in excised veins. This NP system is bio-absorbable polymer with a long history of safe use in medical applications. Therefore, this system may represent a novel NP-mediated drug delivery system to prevent vein graft failure.

We showed that the NP was endocytosed rapidly by VSMCs and was retained stably in the intracellular space. Impressive ex vivo delivery of NP into human veins suggests that this NP-mediated drug delivery system can be applied to clinical settings for humans. An important finding was that long-term retention of NP in neointima and medial cells of vein grafts was detected until day 28. After cellular uptake of NP, NP slowly releases encapsulated drugs or genes into the cytoplasm as PLGA is hydrolyzed, resulting in an intracellular drug delivery. The bio-absorption time of PLGA in the body can be controlled by changing material make-up of PLGA, thus the function of the intracellular drug delivery system can be modified. Therefore, (1) this NP-mediated drug delivery system works as an excellent ex vivo delivery system for the excised vein; and (2) this system provides an effective means of delivering drugs or genes that target intracellular proteins involved in the pathogenesis of vein graft neointima formation.

We selected STI571 because this compound is known to target the PDGF-R TK (see Introduction). NP-incorporated with STI571 attenuated the proliferation of human VSMCs in vitro and the formation of vein graft neointima formation in vivo, both of which are known to be associated with the inhibition of the target molecules of STI571 (PDGF-R TK, c-Abl TK) and downstream signal of PDGF-R (ERK). NP-incorporated with STI571 did not affect endothelial regeneration process after vein grafting. In preliminary experiments, tissue concentrations of STI571 were measured immediately after and 6 hours after incubation of excised veins with STI571-NP by HPLC system, which showed under the limit of detection (1 ng/mL). Although the precise intracellular concentration and distribution of STI571 is unclear, our present data (Figures 2 and 4) provide evidence that (1) STI571-incorporated NP may block PDGF-R signaling possibly via slow release of STI-571 into the cytoplasm as NP is hydrolyzed; and (2) PDGF-R signaling blockade by NP-incorporated with STI571 is a means for treating vein graft neointima formation in vivo.

Inflammatory-proliferative changes have been shown to play a central role in the pathogenesis of vein graft neointima formation. In early stages, the neointima lesion has an inflammatory nature characterized by mononuclear cell infiltration, followed by VSMC proliferation.¹⁹ We recently reported that blockade of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by adenovirus-mediated ex vivo transfer of 7ND gene to autologous vein grafts suppressed neointima formation in dogs.¹⁸ We also have demonstrated that MCP-1 plays a central role in neointima formation following arterial mechanical injury.^{20,21,22} In a previous study,¹⁸ we showed that blockade of MCP-1 attenuated both inflammation (monocyte infiltration) and proliferation (appearance of proliferating VSMC) in vein grafts. In contrast, data from this study show that NP-mediated delivery of STI571 reduced PDGF-induced proliferation but not inflammation, suggesting that (1) PDGF-mediated proliferative changes might be located downstream of inflammatory changes, or (2) the mechanism of action of STI571-mediated inhibition of proliferation might be distinct from that of anti-MCP-1-mediated attenuation of proliferation and inflammation. If STI571 and anti-MCP-1 treatment exert their effects through different pathways, it would be interesting to examine whether combined blockade of PDGF and MCP-1 would have additive inhibitory effects on vein graft failure.

Expression of PDGF is known to be low in normal blood vessels, but mechanical forces stimulate SMC expression and release of PDGF, and induce PDGF-R phosphorylation (activation).²³ We show here that PDGF and the phosphorylation levels of its receptor were up-regulated in vein grafts. STI571-incorporated NP did not affect increased PDGF expression, but it did suppress the protein expression of PDGF-R, PDGF-R kinase, and c-Abl TK in vivo. This could suggest the presence of a positive-feedback loop that, in the absence of STI571, potentiates PDGF-mediated proliferation in vein grafts. It is also possible that reduced PDGF-producing cells (PCNA-positive cells) in the vein graft or blockade of multiple intracellular kinases might have contrib-

uted to the beneficial effects of STI571-incorporated NP on vein graft neointima formation in vivo.

One limitation in the present study is that only single dose of STI571-NP was examined. It is practically difficult to obtain the dose-response relationship of this NP system in small animals, because the dose-response relation of STI571 and polymer needs to be examined. For translation of our present findings into clinical medicine, further studies are therefore needed to define a dose-response relation in large animal models.

In conclusion, blockade of PDGF signaling by STI571-incorporated NP-inhibited proliferation of VSMCs in vitro and suppressed vein graft neointima formation in vivo. This NP-mediated drug delivery system provides an innovative and clinically feasible therapeutic strategy for preventing vein graft failure.

Sources of Funding

This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (19390216, 19650134) from the Ministry of Education, Science, and Culture, Tokyo, Japan and by Health Science Research Grants (Research on Translational Research and Nano-medicine) from the Ministry of Health Labor and Welfare, Tokyo, Japan.

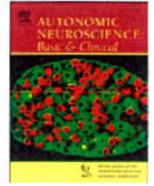
Disclosures

Dr Egashira holds a patent on the results reported in the present study. The other authors report no conflicts.

References

1. Fitzgibbon GM, Kafka HP, Leach AJ, Keon WJ, Hooper GD, Burton JR. Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:616–626.
2. Schachner T, Laufer G, Bonatti J. In vivo (animal) models of vein graft disease. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006;30:451–463.
3. Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate—a new oral targeted therapy. *Nat Med*. 2002;346:683–693.
4. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002;8:403–409.
5. Ushio-Fukai M, Zuo L, Ikeda S, Tojo T, Patrushev NA, Alexander RW. cAbl tyrosine kinase mediates reactive oxygen species- and caveolin-dependent AT1 receptor signaling in vascular smooth muscle: role in vascular hypertrophy. *Circ Res*. 2005;97:829–836.
6. Hacker TA, Griffin MO, Guttormsen B, Stoker S, Wolff MR. Platelet-Derived Growth Factor Receptor Antagonist STI571 (Imatinib Mesylate) Inhibits Human Vascular Smooth Muscle Proliferation and Migration In Vitro but Not In Vivo. *J Invasive Cardiol*. 2007;19:269–274.
7. Myllarniemi M, Frosen J, Calderon Ramirez LG, Buchdunger E, Lemstrom K, Hayry P. Selective tyrosine kinase inhibitor for the platelet-derived growth factor receptor in vitro inhibits smooth muscle cell proliferation after reinjury of arterial intima in vivo. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1999;13:159–168.
8. Leppanen O, Rutanen J, Hiltunen MO, Rissanen TT, Turunen MP, Sjoblom T, Bruggen J, Backstrom G, Carlsson M, Buchdunger E, Bergqvist D, Alitalo K, Heldin CH, Ostman A, Yla-Herttuala S. Oral imatinib mesylate (STI571/gleevec) improves the efficacy of local intravascular vascular endothelial growth factor-C gene transfer in reducing neointimal growth in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*. 2004;109:1140–1146.
9. Zohlhofer D, Hausleiter J, Kastrati A, Mehilli J, Goos C, Schuhlen H, Pache J, Pogatsa-Murray G, Heemann U, Dirschinger J, Schomig A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial on restenosis prevention by the receptor tyrosine kinase inhibitor imatinib. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1999–2003.
10. Peng B, Hayes M, Resta D, Racine-Poon A, Druker BJ, Talpaz M, Sawyers CL, Rosamilia M, Ford J, Lloyd P, Capdeville R. Pharmacoki-

- netics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Oncol*. 2004;22:935–942.
11. Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand JB, Force T. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med*. 2006;12:908–916.
 12. Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H, Kawashima Y. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int J Pharm*. 1999;187:143–152.
 13. Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, Hino T, Niwa T. Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998;45:41–48.
 14. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*. 2004;377:159–169.
 15. Panyam J, Zhou WZ, Prabha S, Sahoo SK, Labhasetwar V. Rapid endolysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *Faseb J*. 2002;16:1217–1226.
 16. Nakano K, Egashira K, Tada H, Kohjimoto Y, Hirouchi Y, Kitajima S, Endo Y, Li XH, Sunagawa K. A third-generation, long-acting, dihydropyridine calcium antagonist, azelnidipine, attenuates stent-associated neointimal formation in non-human primates. *J Hypertens*. 2006;24:1881–1889.
 17. Chen Z, Lee FY, Bhalla KN, Wu J. Potent inhibition of platelet-derived growth factor-induced responses in vascular smooth muscle cells by BMS-354825 (dasatinib). *Mol Pharmacol*. 2006;69:1527–1533.
 18. Tatewaki H, Egashira K, Kimura S, Nishida T, Morita S, Tominaga R. Blockade of monocyte chemoattractant protein-1 by adenoviral gene transfer inhibits experimental vein graft neointimal formation. *J Vasc Surg*. 2007;45:1236–1243.
 19. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation*. 1998;97:916–931.
 20. Usui M, Egashira K, Ohtani K, Kataoka C, Ishibashi M, Hiasa K, Katoh M, Zhao Q, Kitamoto S, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits restenotic changes (neointimal hyperplasia) after balloon injury in rats and monkeys. *Faseb J*. 2002;16:1838–1840.
 21. Egashira K, Zhao Q, Kataoka C, Ohtani K, Usui M, Charo IF, Nishida K, Inoue S, Katoh M, Ichiki T, Takeshita A. Importance of monocyte chemoattractant protein-1 pathway in neointimal hyperplasia after periarterial injury in mice and monkeys. *Circ Res*. 2002;90:1167–1172.
 22. Ohtani K, Usui M, Nakano K, Kohjimoto Y, Kitajima S, Hirouchi Y, Li XH, Kitamoto S, Takeshita A, Egashira K. Antimonocyte chemoattractant protein-1 gene therapy reduces experimental in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits and monkeys. *Gene Ther*. 2004;11:1273–1282.
 23. Wilson E, Mai Q, Sudhir K, Weiss RH, Ives HE. Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF. *J Cell Biol*. 1993;123:741–747.



Activation of Rho-kinase in the brainstem enhances sympathetic drive in mice with heart failure

Koji Ito¹, Yoshikuni Kimura¹, Yoshitaka Hirooka^{*}, Yoji Sagara, Kenji Sunagawa

Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2007

Received in revised form 23 June 2008

Accepted 24 July 2008

Keywords:

Heart failure

Sympathetic nervous system

Brain

Rho

ABSTRACT

Rho-kinase is involved in the pathogenesis of hypertension and left ventricular remodelling after myocardial infarction (MI). In an earlier study, we had demonstrated that Rho-kinase in the brainstem contributes to hypertensive mechanisms via the sympathetic nervous system; however, it is not known whether Rho-kinase in the brainstem also contributes to sympathetic nerve activation after MI.

Male Institute of Cancer Research mice (8–10 weeks old) were used for the study. Two days before coronary artery occlusion (MI group), the left ventricular function was estimated by echocardiography. Following this, Y-27632 (0.5 mM, 0.25 μ l/h), a specific Rho-kinase inhibitor, or a vehicle was intracisternally infused in the mice using an osmotic mini-pump. Nine days after coronary artery occlusion, we evaluated the 24-hour urinary norepinephrine excretion (U-NE) as a marker of sympathetic nerve activity. Ten days after coronary artery occlusion, we measured organ weight and evaluated Rho-kinase activity in the brainstem by measuring the amount of phosphorylated ezrin/radixin/moesin proteins, one of the substrates of Rho-kinase. The control group underwent a sham operation. Rho-kinase activity, U-NE, and lungs and liver weight were significantly greater in the MI group compared with the control group. Left ventricular size increased and percent fractional shortening decreased in the MI group compared with the control group. Y-27632 significantly decreased Rho-kinase activity and attenuated the increase in U-NE after MI.

These results demonstrate that Rho-kinase is activated in the brainstem after MI and that the activation of this pathway is involved in the resulting enhanced sympathetic drive.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Patients with heart failure present with a variety of physiologic abnormalities, including high levels of sympathetic nerve activity (Mark, 1995; Zucker et al., 1995; Middlekauff and Mark, 1998). The sympathetic nervous system is activated early in the course of heart failure (Francis et al., 1990), and sympathetic and humoral activation precede the onset of clinically recognizable heart failure (Benedict et al., 1996). Sympathetic nerve activation, which changes to adjust to a reduction in cardiac function, also contributes to the adverse outcomes of decompensated heart failure. In fact, accumulating evidence indicates that β -blockers are one of the most effective drugs for the treatment of patients with chronic heart failure (Waagstein et al., 1993; Bristow et al., 1994; Packer et al., 1996). Furthermore, plasma norepinephrine levels increase and correlate with mortality in patients with heart failure (Cohn et al., 1984; Rector

et al., 1987). Based on these observations, it can be concluded that activation of the sympathetic nervous system plays an important role in the progression of heart failure; however, the detailed mechanisms of this process are not clear. Therefore, studies of the pathophysiology of heart failure have extensively focused on sympathetic nervous system activation.

The brainstem has several cardiovascular centres, such as the nucleus tractus solitarius (NTS), caudal ventrolateral medulla (CVLM), and rostral ventrolateral medulla (RVLM; Dampney et al., 1994). In recent articles, we had reported that activation of the Rho/Rho-kinase pathway in the brainstem contributes to hypertensive mechanisms and baroreflex dysfunction, in several hypertensive models, via the sympathetic nervous system (Ito et al., 2003, 2004a,b, 2005a,b, 2006). It is not known, however, whether this pathway is involved in the enhanced sympathetic nervous system activity associated with heart failure. Therefore, the aim of this study was to determine whether the activation of the Rho/Rho-kinase pathway in the brainstem contributes to enhanced sympathetic nerve activity in heart failure. For this purpose, we evaluated Rho-kinase activity in the brainstem of mice with heart failure (myocardial infarction [MI]) after left coronary artery (LCA) occlusion. Furthermore, we examined the effects of an intracisternal infusion of a Rho-kinase inhibitor on sympathetic nerve activation in mice with heart failure.

^{*} Corresponding author. Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. Tel.: +81 92 642 5360; fax: +81 92 642 5374.

E-mail address: hyoshi@cardiol.med.kyushu-u.ac.jp (Y. Hirooka).

¹ These authors equally contributed to this study.