

マウスを用いた補体副経路の制御による心室細動抑制効果の検討

心臓性突然死は、突然予兆なく、心室細動が起こり心臓の活動を停止させる大変恐ろしい疾患である。本疾患は青壮年期に多く、本邦では年間 10 万人突然死が起こっていると考えられている。これまで世界中での様々な研究を経て、右室に特発性に線維脂肪変性が起こり、そこが不整脈起源となり、心室細動を起こし、突然死に至ることが分かってきた。しかし、右室限局性に線維脂肪変性を来すメカニズムは全く明らかではなく、そこへ介入することで心室細動が抑制できるのではないかと考えた。まず、成獣オスマウスの心臓を右室・左室・中隔に分離し、マイクロアレイで網羅的 mRNA 発現解析を行い、補体副経路が活性化していることがわかった。野生型と C3 ノックアウトマウスを用いて不整脈の誘発実験を行い、有意差はなかった。しかし、右室不全モデル (PAC) 作製を行うと補体副経路が更に活性化するため、野生型と C3 ノックアウトマウスの比較を行ったところ、野生型 PAC では心室細動が誘発されたが、C3 ノックアウトマウスの PAC では心室細動が誘発されなかった。メカニズムの一部として単離心筋細胞のカルシウムイメージングを行い、C3 ノックアウト PAC でカルシウム過負荷が見られなかった。よって、補体副経路の抑制は心室細動の新たな治療ターゲットになりうることが示唆された。

※	※※	※※	※※	※※※
伊藤 章吾	橋本 寿之	山川 裕之	中村 貴裕	伊藤 桂
※※※※	※	※※	※※	
矢田 浩崇	福本 義弘	福田 恵一	湯浅 慎介	

1. 緒 言

心臓性突然死は、突然予兆なく、心室細動が起こり心臓の活動を停止させる大変恐ろしい疾患であり、突然死に至る例や、死は避けられても神経学的後遺症を残す症例も多い。更に、本疾患は青壮年期に多く、本邦では年間 10 万人突然死が起こっていると考えられている。これまで世界中での様々な研究を経て、右室に線維脂肪変性が起こり、そこが不整脈起源となり、心室細動を起こし、突然死に至ることが分かってきた。しかし、右室に限局的に線維脂肪変性を来すメ

カニズムは全く明らかではない。実臨床では、疾患のメカニズムが分からないまま治療を行っており、このままでは治療成績の向上は得られないだろう。このため、心室細動の病態解明は、循環器研究者の急務である。もし特発性心室細動に対する薬物療法が創出されれば、心臓性突然死予防で用いられる植込み型除細動器が不要となり、デバイスに関する諸問題 (デバイス感染、誤作動、除細動に対する予期不安) から患者が解放されるだろう。さらに、心室細動を引き起こすような強い生理現象は心臓性突然死以外の心疾患へ関与している可能性があり、本現象を解明することで、他の心疾患に対する治療薬を創出できる可能性がある。

2. 目 的

マウス右室に特徴的な変化を解明し、催不整脈性との関連があるかを解明する。

※久留米大学医学部 内科学講座
心臓・血管内科部門

※※慶應義塾大学医学部 循環器内科

※※防衛医科大学病院 循環器内科

※※※国際医療福祉大学 三田病院循環器内科

3. 方法

- 12週齢の野生型オスマウスの心臓を部位ごとに分け、網羅的 m-RNA 発現解析 (Agilent® SurePrint Mouse GE 8x60k Ver.2.0) を行ない、発現変動遺伝子の抽出を Gene Spring (Agilent®) を用いて行った。得られた発現変動遺伝子のパスウェイ解析を、Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN®) で行った。
- in vitro*: 心筋細胞に対する補体副経路の作用を調べる目的で、胎仔ラット心室筋細胞に対して C3a リコンビナントタンパク投与を行った。
- in vivo*: 不整脈誘発として、マウスを腹腔内麻酔下で心窩部を小切開し、電極カテーテルを右室上に置き、食道カテーテルと挟み込んで、スティムレーターでプログラム刺激を与えた。健常マウスだけでなく、右心不全モデルマウスに対しても不整脈誘発を行った。右心不全モデルは、肺動脈縮窄 (PAC) を作製した。

4. 結果

1. 網羅的 m-RNA 発現解析

計 6 個体の野生型マウスを用いた。統計学的解析により約 950 種類の発現変動遺伝子を抽出できた。この発現変動遺伝子を、Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN®) を用いて解析し、右室では補体経路が活性化していることが示唆された。ネットワーク解析をみると、特に補体副経路に含まれる遺伝子が多く存在し、中でも Cfd が他部位の 25 倍以上と、著明に高発現であった。

2. *in vitro* 解析

右室で補体経路の活性化と、Cfd が高発現していた結果から、C3a が局所的に強く作用している可能性を考えた。ラット胎仔初代培養心室筋細胞 (NRVM) に対して、C3a リコンビナントタンパクを投与したところ、MAP キナーゼのリン酸化の増強を認め、このリン酸化の増強は C3aR のノックダウンで減弱した。これより、心筋細胞に対して C3a は C3aR を介して特異的に細胞内シグナルカスケードのリン酸化を介し、不全心筋様に変化することがわかった。我々は次に、C3a リコンビナントタンパクを投与した NRVM を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。統計学的解析を行い、ストレス応答性 MAP キナーゼパスウェイの JNK が活性化している可能性が分かった。さらに、複数種類のケモカインの発現量が C3a 投与によって有意

に増加することが分かった。つまり、補体 C3a は心筋細胞に対して傷害性に作用することがわかった。

3. *in vivo* 解析

補体 C3-Cfd-C3a 経路を阻害することによって心室性不整脈を抑制できるか検討した。C3-Cfd-C3a 経路の阻害方法として、C3 ノックアウトマウスと C3aR 受容体アンタゴニスト (SB290157) を使用した。

まず、野生型 (WT) マウスにおいて、電極カテーテルを用いて心室 (RV 心外膜側) でプログラム刺激を行ったところ、持続性心室頻拍の誘発率は低かった。そこで、右心不全モデルマウス (PAC) を作製し、不整脈誘発実験を行うこととした。WT PAC マウスではプログラム刺激によって持続性心室頻拍が 100% 誘発されたが、C3KO PAC マウスでは心室頻拍の誘発率は 0% だった。

次に PAC を作成後から SB290157 を投与し続け、14 日後に不整脈誘発実験を行ったところ、VT は 50% の個体にしか生じなかった。(図 1)

4. 単離心筋細胞を用いたカルシウムイメージング

PAC マウスで催不整脈性が高く、C3KO PAC マウスでは催不整脈性が抑制されるメカニズムを解明する目的で RV と LV 双方の心筋を単離し、カルシウムイメージングを行った。その結果、特に PAC を行ったマウスの WT 群と C3KO 群を比較すると、小胞体が

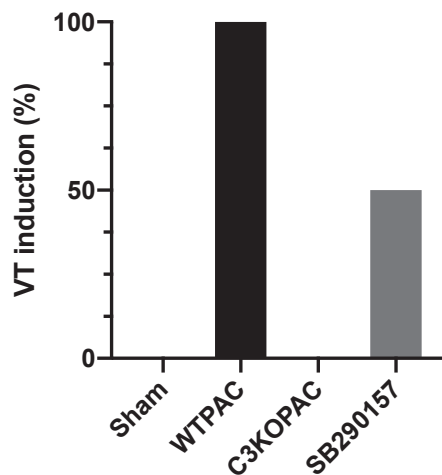


図 1 野生型の PAC マウスでは VT が誘発されたが、PAC マウスであっても C3 ノックアウトと SB290157 投与群では有意に VT の発生率が抑制された。

らのカルシウムスパークの速さと数が C3KO 群で低下していた。このことは、心筋細胞単位で催不整脈性が C3KO PAC で低下していると考えられた。(図 2, 3)

考 察

本研究で、①右室で Cfd が多く存在していた、② C3a タンパク投与によって心筋細胞は不全心筋の特性を獲得した、③ C3-C3a を阻害することで PAC モデルにおいては催不整脈性が減弱した、④ C3 ノックアウトマウスの PAC モデルではカルシウム過負荷が改善した、という知見が得られた。

RV と LV の心筋細胞の性質の違いについての報告は限られている。Ikeda¹⁾らは RV の方が急性の圧負荷に対して ROCK2 発現上昇が急峻であるため、右室心筋の方が負荷脆弱性が強いと述べている。このように

特定の分子の働きによって左右の心室筋がそれぞれ特有の性質を有している可能性は大いにあると考えられる。本研究で特に右心不全モデルで、C3-C3a を阻害すると PAC モデルでの催不整脈性が減弱した。特定の分子の介入によって心不全時の心室頻拍が減少した治験は興味深いが、細胞内分子の相互作用については明らかにできなかった点もあり、さらに解析を進めたい²⁾。

また、PAC モデル時の不整脈を抑制することはできたが、自然発生的な心室性不整脈の差異については検討することができなかった。マウスの心拍数は 500bpm 程度であり、頻脈性不整脈の自然発生を検証することは難しい。C3-Cfd-C3a 経路の阻害と特発性心室細動の関連の有無について、実臨床で得られた血液などの検体を用いて、更に深く検証を進めたいと考

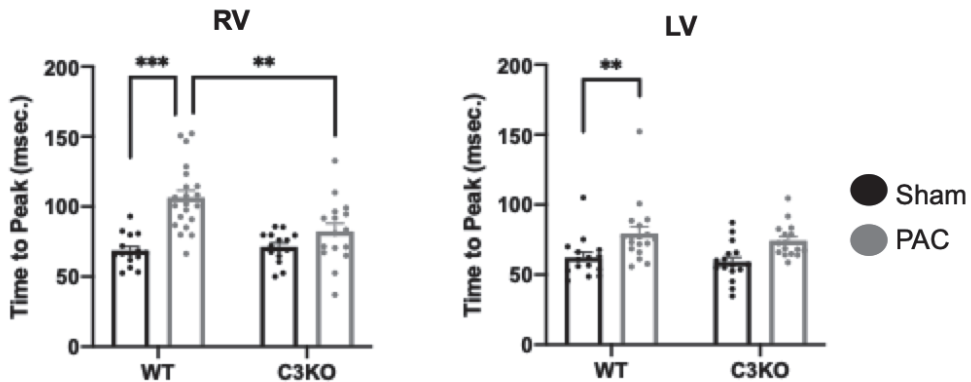


図 2 PAC を行うと、右室由来の単離心筋細胞で有意に細胞内カルシウムリリースの強さが抑制された。

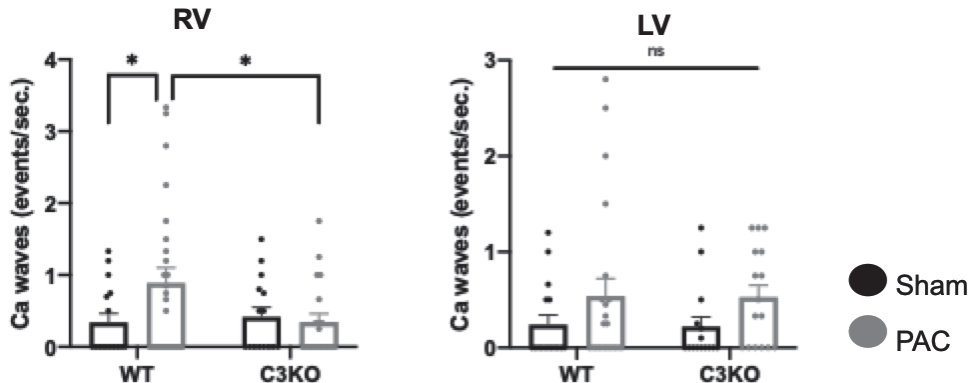


図 3 PAC を行うと、右室由来の単離心筋細胞で有意に細胞内カルシウムリリースの頻度が抑制された。

えている。

現在、補体経路に対する分子標的療法の開発が進み、Cfdを阻害する小分子化合物まで登場している。本研究を通じ、Cfd阻害が、右心不全に効果のある治療法に応用されることがわれわれの目標である。単一の分子を標的とした心室細動に対して有効な治療法も無いのが現状であり、この課題を克服する第一歩となるよう、さらに研究を遂行させたい。

結 論

補体経路を阻害することによって、右心不全マウスモデルの催不整脈性を抑制できた。

謝 辞

この研究は公益財団法人 榊原記念財団の2020年度第18回榊原記念研究助成を受けました。研究の遂行に当たり多大なるご支援を賜りましたことに、深謝申

上げます。

文 献

- 1) Ikeda S, Satoh K, Fukumoto Y, Sakata Y, Shimokawa H, et al. Crucial role of rho-kinase in pressure overload-induced right ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34: 1260-71.
- 2) Ito S, Hashimoto H, Yamakawa H, Nakamura T, Ito K, Yada H, Fukumoto Y, Fukuda K, Yuasa S, et al. The complement C3-complement factor D-C3a receptor signalling axis regulates cardiac remodelling in right ventricular failure. *Nature Communications* 2022; 13: 5409.

THE INVESTIGATION FOR SUPPRESSION OF VENTRICULAR FIBRILLATION
BY SUPPRESSION OF ALTERNATIVE COMPLEMENT PATHWAY

※ Shogo ITO, ※※ Hisayuki HASHIMOTO, ※※ Hiroyuki YAMAKAWA, ※※ Takahiro NAKAMURA,
※※※ Kei ITO, ※※※※ Hirotaka YADA, ※ Yoshihiro FUKUMOTO, ※※ Keiichi FUKUDA,
※※ Shinsuke YUASA

※ Division of Cardio-Vascular Medicine, Department of Internal Medicine,
Kurume University School of Medicine
※※ Department of Cardiology, Keio University School of Medicine
※※※ Department of Cardiology, National Defense Medical College
※※※※ Department of Cardiology, International University of Health and Welfare,
Mita Hospital

【Abstract】

Sudden cardiac arrest is the main cause of death in middle-aged people. Actually, almost 100,000 sudden cardiac death is occurred annually, therefore the investigation to solve sudden cardiac arrest is one of the mission of researchers in cardiovascular medicine. Among several clinical researches, fatty-fibro change was observed in RV of patients with idiopathic VF. However, the mechanisms of fatty-fibro change in RV were not fully investigated. Then, we tried to reveal the differential expressed genes in mice RV to investigate the cause of fatty-fibrotic change. In consequence, alternative complement pathway was activated in mice RV. To reveal the relationship between alternative complement pathway and arrhythmogenicity, programmed electrical stimulation were delivered on mice ventricular epicardium. After programmed electrical stimulation, C3KO and C3a receptor antagonist were suppressed VT induction. Similarly, C3KO and C3a receptor antagonist suppressed calcium overload in isolated cardiomyocytes isolated from RV. Accordingly, suppression of alternative complement pathway was novel therapeutic target of idiopathic VF.