
研究助成業績報告集

2023 年度 公募自由課題研究助成
山内進循環器病研究助成

公益財団法人 循環器病研究振興財団

* 目 次 *

| No | 研 究 課 題 | 研 究 者 | 頁 |
|----|---|-------|----|
| 1 | ヒト iPS 細胞モデルを用いたノンコーディング DNA 領域異常による遺伝性不整脈疾患の病態解明研究 | 相澤 卓範 | 1 |
| 2 | 徐脈性不整脈の重症化に心臓ナトリウムチャネルのカップリングが与える影響についての研究 | 加藤 浩一 | 5 |
| 3 | 難治性心房細動に対する新たなアブレーションターゲットの探索に関する研究 | 鎌倉 令 | 9 |
| 4 | リアノジン受容体のテトラマー構造安定化による心不全とそれに伴う致死的不整脈の治療法開発 | 中村 吉秀 | 14 |
| 5 | 胎児頻脈性不整脈の新規診断法および治療法の開発 | 三好 剛一 | 19 |

ヒト iPS 細胞モデルを用いたノンコーディング DNA 領域異常による遺伝性不整脈疾患の病態解明研究

京都大学医学部附属病院 循環器内科 医員
相澤卓範

I. 緒言

本邦では年間推定 5-10 万人が心臓突然死をきたしており、明らかな基礎疾患がないにも関わらず突然死に至る例も存在し、遺伝子異常の関与が報告されている。有効な治療法はデバイス植込み治療（心室細動に対する植込み型除細動器、徐脈に対するペースメーカー植込み）であるが、患者・家族の負担は大きく、医療経済的にも大きな問題となっており、新規治療法開発のニーズは高い。申請者らは、滋賀医科大学循環器内科、国立循環器病研究センターとの共同研究により、7000 例に及ぶ国内最大規模の遺伝性不整脈疾患ゲノムデータベースを構築し、解析を行ってきた。遺伝的素因に関して、QT 延長症候群は、遺伝子解析にて約 70%において病源性遺伝子変異が検出されるが、ブルガダ症候群では約 10-20%、早期再分極症候群は数%以下であり、多くの症例において遺伝的背景の原因が不明である。

近年、次世代シーケンシングによる遺伝子解析技術の飛躍的進歩により、多くの遺伝子変異（タンパクが翻訳されるコーディング領域）に加え、タンパク質コード領域以外（ノンコーディング領域）の変異も検出されるようになってきた。ノンコーディング DNA 領域の機能として、遺伝子発現調整や遺伝子 3 次元構造の保持、ノンコーディング RNA の産生などが挙げられるが、他の動物種では相同性の問題でモデル作製や機能解析が困難であり、残された未開拓の領域である。

本研究では、これまで未解明であったタンパク質ノンコード領域の変異が不整脈発症に及ぼすメカニズムを明らかにすることを目的とする。具体的には、遺伝性不整脈疾患家系における遺伝子解析において同定されたタンパク質非コード DNA 領域の異常に関して、ヒト iPS 細胞モデルの作製とその解析を行い、その発症機序を解明することである。

II. 対象・方法

4q25 ノンコーディング DNA 領域の遺伝子異常による家族性洞不全症候群家族洞不全症候群の iPS 細胞モデルを用いた解析

今回の研究対象は、日本の家族性洞不全症候群の大家系（図 1）であり、エクソーム解析結果を用いた連鎖解析により 4q25 領域近傍に locus が絞り込めたがコーディング領域には有意な遺伝子変異を認めなかった。フランスにも同様の家族性洞不全症候群の家系があり¹⁾、共同研究を行った。ノンコーディング DNA 領域を調べるために全ゲノムシーケンスを行ったところ、*PITX2* 遺伝子コーディング領域の遠位に、数万塩基対におよぶ欠損領域を非コーディング領域に同定した。既存のデータベースを組み合わせ合わせたバイオインフォマティクス解析では、同欠損領域に本領域内にあるクロマチン 3 次元構造を制御する“CTCF タンパク”が結合するモチーフが含まれており、さらにその遠位には *PITX2* 遺伝子の転写制御に関わると考えられるゲノム領域=シス調整領域の存在が疑われた。*PITX2* は主に左房に発現する一方で、右房では発現が抑制されており、洞結節の発生を負に制御すると考えられている。²⁾ 申請者らは仮説として、「本症例で同定されたノンコーディング領域の欠損領域には、3 次元クロマチン構造を維持する CTCF 結合モチーフが含まれ、その欠失により *PITX2* 遺伝子とシス調整領域の関係が変化することで *PITX2* の発現過剰洞結節領域の発生が抑えられていることが発症機序である」という仮説を立て、その立証を試みた。

申請者らは患者由来 iPS 細胞モデルを用いてノンコーディング DNA 領域の欠失が洞不全症候群を引き起こすメカニズムの解析を行った。具体的には、患者由来 iPS 細胞および同 CTCF 結合モチーフをノック

クアウトさせた iPS 細胞 (CTCF^{-/-}) を、コントロールとともに心筋細胞へ分化させ、その特性評価を行った。通常的心筋分化法では作業心筋である心室筋型、心房筋型、また、洞結節細胞型心筋細胞が混在したものが得られるが、近年、洞結節型心筋細胞に特異的に分化させる方法が報告された³⁾。申請者らはこれを最適化し⁴⁾、得られた心筋細胞の特性を評価した。

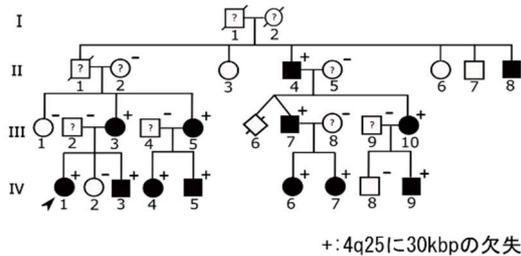


図1 家族性洞不全症候群の大家系の家系図:有病者 13 例(黒丸)、ペースメーカー植込み 5 例

III. 結果

申請者らは本仮説の検のために、患者由来 iPS 細胞に加え、3 万塩基対の欠損領域に含まれる CTCF 結合モチーフが重要であることを示すため CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集法を用いることで、同 CTCF 結合モチーフの両アレルノックアウト iPS 細胞 (CTCF^{-/-}=Homo-KO) を作製した (図 2)。

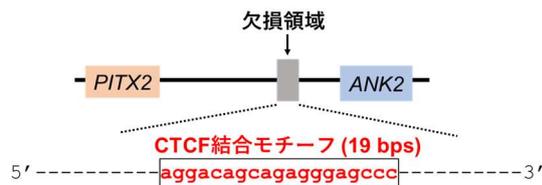


図2 欠損領域内の CTCF 結合モチーフ

続いて、iPS 細胞から洞結節型心筋細胞への分化法²⁾ (=SAN 法) について、心室筋型心筋細胞が主に得られる通常の方法 (=V 法) と得られた心筋細胞の性質を評価した (図 3)。それぞれの方法を用いて得られた心筋細胞の解析結果を図 4 に示す。SAN 法を用いた方法では V 法で得られた心筋細胞に比較し、有意に拍動数が多かった (図 4A)。SAN 法および V 法より得られた心筋細胞をパッチクランプ法にて心筋活動電位波形を記録したところ、それぞれ洞結節型細胞様および心室筋型細胞様の波形を得る

ことができた (図 4B)。また免疫染色法において NKX2-5 (作業心筋に高発現する) の陰性率が有意に高いことから、高率に洞結節様心筋細胞が作成できていると考えられた。また得られた心筋細胞の遺伝子発現に関して、SAN 法由来の心筋細胞は V 法由来と比較し、SHOX2、HCN4、TBX18、TBX3 遺伝子が高発現し、PITX2、NKX2-5、MYL2 遺伝子の発現が低く、洞結節型細胞の発現パターンを呈していた。以上より、申請者らは iPS 細胞より洞結節型心筋細胞を特異的に作成することができた。

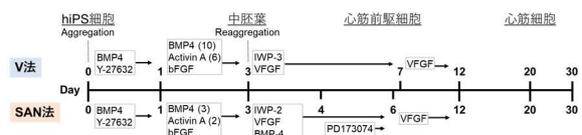


図3 心筋細胞分化プロトコール: V 法 (上)、SAN 法 (下)

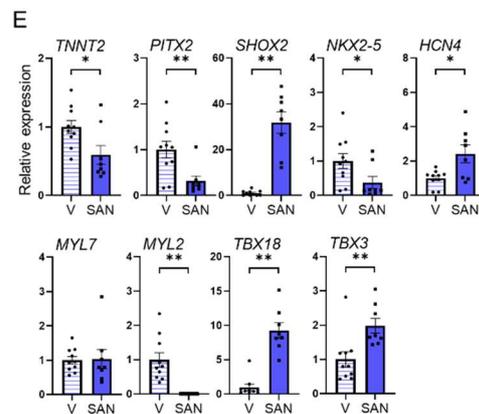
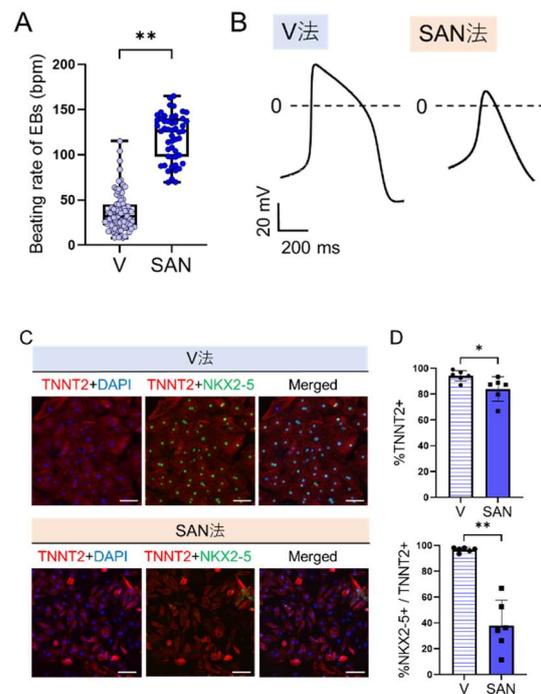


図4 iPS細胞由来心筋細胞特性:SAN法 vs. V法、拍動数A)、パッチクランプ法で記録された心筋活動電位波形B)、免疫染色法C)、心筋細胞率およびNKX2-5陽性心筋細胞率D)、RT-qPCRによる遺伝子発現E)

以上のようなSAN法を用い、コントロール、患者由来、Homo-KOのiPS細胞由来の分化心筋細胞を解析した。分化開始後30日目の時点では、拍動数は特にHomo-KO由来心筋細胞で低下傾向にあったものの(図5)、免疫染色法でのNKX2-5の陰性率は同程度であった。申請者らは、*PITX2*が胎生期初期に心臓領域に発現し、洞房結節の形成に関わる(負に制御する)点に注目し、iPS細胞の洞結節細胞への心筋分化過程における遺伝子発現を解析した。結果は、コントロールと比較して、患者およびHomo-KO iPS細胞において、*PITX2*が早期より過剰発現しており、洞房結節の形成異常に関連し得る遺伝子発現の変化が認められた(図6)。これらは、共同研究先において、患者由来の心筋細胞では、*PITX2*を含む近傍のクロマチン3次元構造が変化していること、また、今回の欠損領域に対応するDNA領域をノックアウトしたマウスモデルにおいて、特右房で*PITX2*過剰発現を認めており、申請者らの解析結果とともに仮説を裏付けるものであった。

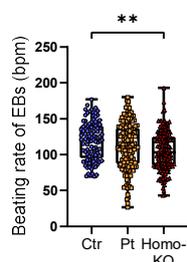


図5 iPS細胞由来洞結節様心筋細胞: コントロール vs. 患者由来 vs. CTCFホモノックアウト

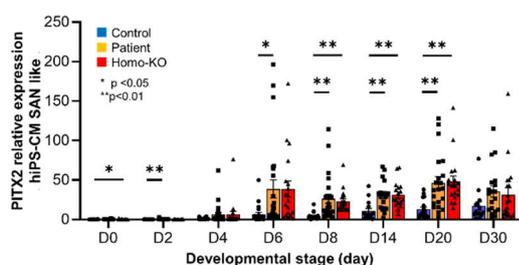


図6 iPS細胞由来洞結節様心筋細胞の分化過程における*PITX2*発現推移

現在、*PITX2*の過剰発現に関わる因子を同定するために、欠失領域近傍のノンコーディングRNA等の遺伝子発現を解析中である。

IV. 考察

今回申請者らは、iPS細胞を洞結節細胞に特異的に分化する方法を最適化、効率に洞結節型細胞を得ることにより、家族性洞不全症候群の発症メカニズムを解析した。本症例では3万塩基対異常の欠損領域を有し、更に同領域に含まれるクロマチン3次元構造を維持する特定のCTCF結合領域の欠失が重要であると考えられる。つまり、3次元構造の変化により*PITX2*遺伝子とその遠位にあるシス調整領域の関係性が変化することで*PITX2*の過剰発現を来し、その結果、本来*PITX2*が発現抑制されている右房での発現により洞結節領域の発生が阻害されることが発症機序として想定される(図6)。今回CTCF結合モチーフそれ自体は19塩基対にすぎないが、そのホモノックアウトモデルのiPS由来分化心筋細胞を解析したところ、患者由来iPS細胞とともに分化早期からの*PITX2*の過剰発現を示したことから、共同研究先の結果と併せてCTCF結合モチーフが重要と考える仮説の裏付けとなり、洞結節領域の発生が阻害されていることが強く支持された。一方で、分化後の心筋細胞の解析結果からは、特にHomo-KO由来iPS心筋細胞の拍動数が低く、徐脈の臨床像と一致するものの、その他遺伝子発現についてはいずれも低下傾向にあり、患者およびHomo-KO由来iPS細胞は洞結節様心筋細胞になりにくいという一面を反映している可能性はあるものの、その機序を十分に説明するには至らなかった。

今後の予定として、得られた分化心筋細胞を用い、RNAシーケンス解析を行うことで、*PITX2*の過剰発現に関わる遺伝子発現変化(ノンコーディングRNAを含む)を網羅的に捉え、生物学的経路およびプロセスを特定することで、洞不全症候群の発症機序を明らかにする方針である。また*PITX2*遺伝子は胎生期早期に発現し様々な臓器発生に関わることから、それぞれの発生に関連する調整領域が存在すると考えられ、中でも本症例のように洞不全症候群に関与する領域を同定することは重要である。事前のバイオインフォマティクス解析において関係性が変化しているであろう遺伝子発現調整領域中に、ノンコーディングRNAとともにいくつかのシス調整領域の候補が存在している。今後それらのノック

アウトモデルの解析や SAN 法を用いた分化心筋細胞における 3次元クロマチン構造および調整領域の活性=エピジェネティクスの変化を Hi-C 解析や ATAC-seq 解析などを用いることにより詳細なメカニズムが明らかとなれば、治療ターゲットの発見につながり患者診療に貢献できると考えている。

Cardiomyocytes Using Embryoid Bodies.
Methods Mol Biol. 2018 1816:79-92.

V. 結論

本研究では、4q25 領域の *PITX2* に関わるノンコーディング領域に大きな欠失を有する家族性洞不全症候群の大家系において、不整脈発症メカニズム解明のため各種解析を行い、欠失領域に含まれる 3次元クロマチン構造を維持する CTCF 結合モチーフの欠損が *PITX2* の遺伝子発現を亢進させ、洞房結節形成不全が引き起こされている可能性が示唆された。今後、さらに詳細なメカニズムを解析し、治療ターゲットの同定を目指す方針である。

VI. 研究協力者

牧山 武・京都大学大学院医学研究科・特定講師
村田 広茂・日本医科大学付属病院・病院講師
蒔田 直昌・国立循環器病研究センター・客員部長
大野 聖子・国立循環器病研究センター・部長
加藤 浩一・滋賀医科大学・助教
園田 桂子・国立循環器病研究センター・上級研究員
白井 学・国立循環器病センター・室長

VII. 参考文献

- 1) Le Scouarnec S, Bhasin N, Vieyres C, et al. Dysfunction in ankyrin-B-dependent ion channel and transporter targeting causes human sinus node disease. Proc Natl Acad Sci U S A 2008 105;40:15617-15622.
- 2) Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, et al. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. Circ Res 2007 100;3:354-362.
- 3) Protze SI, Liu J, Nussinovitch U, Ohana L, et al. Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. Nat Biotechnol. 2017 35;1:56-68.
- 4) Hatani T, Miki K, Yoshida Y. Induction of Human Induced Pluripotent Stem Cells to

徐脈性不整脈の重症化に心臓ナトリウムチャンネルのカップリングが与える影響についての研究

滋賀医科大学循環器内科・助教
加藤浩一

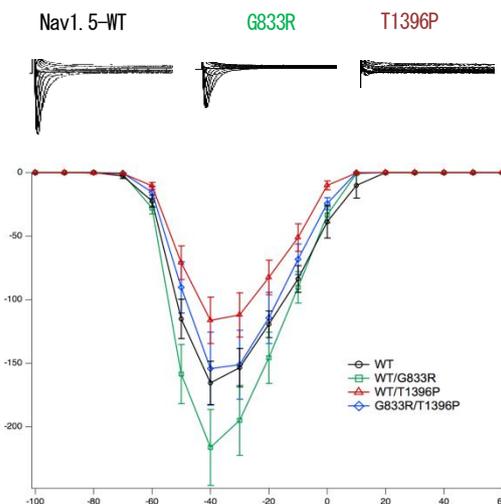
I. 緒言

心臓のナトリウムチャンネル(以下 Na^+ チャンネル)は、心室筋の活動電位第 0 相を形成する重要なイオンチャンネルで、これをコードする遺伝子 *SCN5A* の機能喪失変異はブルガダ症候群 (1) や進行性心臓伝導障害 (2) を、機能獲得変異は QT 延長症候群 (3) を引き起こす。いずれも重篤な不整脈疾患 (心臓 Na^+ チャンネル病) で、時に致死性である。これまで Na^+ チャンネルは、4 量体で細胞膜に発現するカリウムチャンネルと違って、単量体で発現するため単独で機能すると考えられていた。しかし、近年の研究により、2 分子の Na^+ チャンネルが相互に連携して、お互いの機能に影響を与えることが明らかとなってきた (チャンネルカップリング (4))。特に、機能喪失型変異のチャンネルの一部は、共発現した野生型チャンネルの電流までも抑制してしまうことが観察されており、これを Na チャンネルにおける Dominant negative (DN) 効果と呼んでいる (5)。また、心筋細胞が長軸方向に連結する部位: Gap junction は、Connexon43 チャンネルが心筋間の興奮伝播を担っているが、この周辺には Na^+ チャンネルが高密度に集簇しており (クラスターリング)、このクラスター形成にもカップリングが重要であるとの可能性が示唆されている (6)。我々はこれまで、徐脈疾患を呈した家系に同定された 2 種類の *SCN5A* 変異 (p.G833R と p.T1396P) の解析を行い、機能喪失変異 T1396P が DN 効果を持つこと、G833R 変異が「カップリングしない」こと、更に、これらの両方を Compound hetero で有するケースが、家系内でも重症となることを報告している (2022 アジア太平洋不整脈学会 APHRS2022: OP-237-2-SDC、図 1)。

本研究では、この二つの変異が、カップリングと DN 作用を通して互いにどのような影響を与えているのかについて、更に踏み込んで明らかにすることを目的とした。

図 1 徐脈家系に見つかった 2 種類の *SCN5A* 変異の電流密度:

T1396P は単独発現だとほぼ電流がない機能喪失型変異であるが、G833R はほぼ野生型に遜色ない電流密度を示す (上)。野生型に T1396P



を共発現した場合、電流密度が低下する (DN 作用)。一方 G833R にはそのような作用はない。T1396P と G833R を共に発現させた場合、DN 効果は確認できない。(下)

II. 対象・方法

電気生理学実験

培養細胞 HEK293 を用いて、2 種類の *SCN5A* 変異を組み込んだプラスミドを強制発現させ、パッチクランプ法にて電流測定を行った。今回、14-3-3 を介した Na チャンネル相互作用をキャンセルすると言われる Difopein のプラスミドを別途用意し、*SCN5A* と共発現させることでその電流変化や電位依存性の変化を確認した。

共免疫沈降実験

2種類の変異を有する SCN5A 変異プラスミドに、それぞれ HA 配列、FLAG 配列を標識として組み込み、共発現させた HEK293 細胞を用いて免疫沈降実験を行った。沈降には抗 HA 抗体と Dynabeads co-immunoprecipitation kit (Thermo) を用い、total protein および沈降後 protein の各々を電気泳動後 PVDF 膜へ転写、抗 FLAG 抗体で染色を行った。

III. 結果

Difopein による Na チャネルカップリングのキャンセル効果

これまでの報告により 14-3-3 を介した Na チャネルカップリングをキャンセルすることが可能なペプチド Difopein を共発現させて行った電気生理実験の結果を図に示す。T1396P による共発現した野生型チャネルの電流抑制効果、いわゆる Dominant-negative 効果は、Difopein を発現させることで明確にキャンセルされた。また、元々 DN 効果を示さない組み合わせ：WT+G833R, T1396P+G833R においては、この Difopein の存在は何らの電流増加効果を示す事はなかった (図 2)。

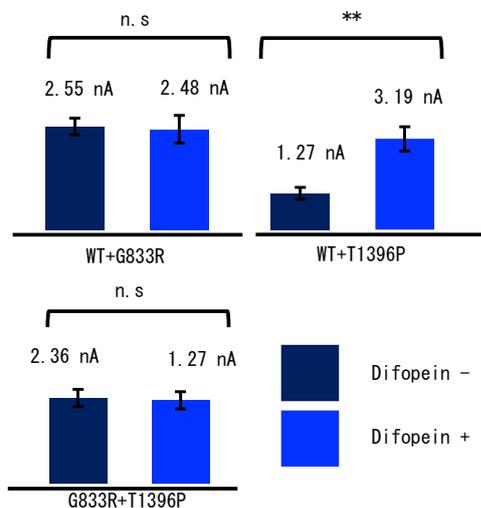


図 2 Difopein による DN 作用からのレスキュー: WT+T1396P の組み合わせで観察された電流抑制は、Difopein の存在下では見られない。もともと電流抑制がからない組み合わせでは、Difopein の有無は何らの影響を示さない。

続いて、T1396P による電位依存性の変化に対する Difopein の効果も確認した。図のように、T1396P の存在下では右方シフトしていた Steady state inactivation のカーブは、Difopein を発現させる事で左方に移動した(図 3)。さらに、T1396P により抑制さ

れていた Na 電流の早い減衰も、Difopein の存在により回復することが確認された (図 4)。

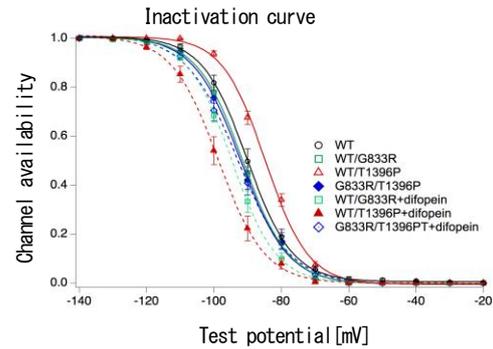


図 3 steady state inactivation curve: Difopein を共発現させると右方シフトが見られていた WT+T1396P の電位依存性 (△) は左方へ振れ戻る (▲)

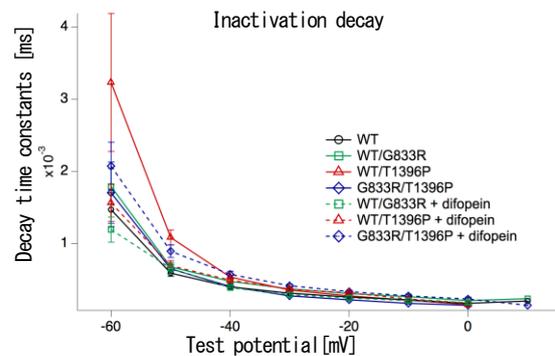


図 4 Time constant of Inactivation decay: Difopein を共発現させると、遅延していた WT+T1396P の減衰時間 (△) は回復する (▲) によって、この部分の実験結果のまとめとして、① Difopein は、T1396P による野生型チャネルへの DN 効果をキャンセルした。② DN 効果を持たない G833R 変異に対しては、Difopein は何らの作用を示さなかった。③ Difopein は T1396P がシフトさせた steady state inactivation の電位依存性を左方へと戻した。④ Difopein は、T1396P 存在下で抑制された野生型チャネルの Na 電流の早い減衰を回復させた。

共免疫沈降による Na ダイマー形成の確認と、Difopein および G833R 変異による影響

続いて Na チャネル同士のカップリングが共免疫沈降にても確認できるか、そしてそのパターンが変異 T1396P と G833R の間で異なるかについて確認した。図にあるように、共免疫沈降では T1396P, G833R 共に結合することが見て取れ、その強度に違いは見出せなかった。また、14-3-3 を介したチャネル間のカップ

リングをキャンセルした Difoepin を共発現させても、この結合の強度に違いは生じなかった。(図 5)

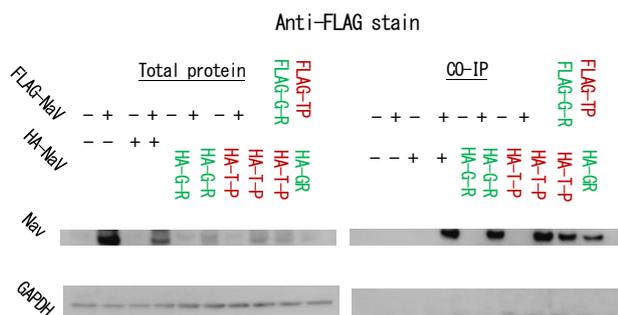


図 5 共免疫沈降実験: FLAG と HA でそれぞれ標識した変異ナトリウムチャンネルを共発現させ、抗 HA 抗体で沈降、抗 FLAG 抗体で染色した (右 CO-IP)。変異の種類によってナトリウムチャンネル同士の結合の程度に違いは見られなかった。

IV. 考察

本研究では、家族性の徐脈症候群の一家に二つの SCN5A 変異 T1396P・G833R を同定した。このうち、T1396P は明らかな機能喪失型変異であったが、G833R に関しては野生型と同等な機能を有することが見てとれた。T1396P は、機能喪失変異であると同時に共発現した野生型チャンネルの電流を抑制し、かつ電位依存性にも影響を与える DN 効果を有することが明らかとなった。一方、G833R 変異は、DN 効果による影響を受けることのないチャンネルを形成することが判明した。Difoepin を用いた実験から、T1396P が有する DN 効果は、14-3-3 を介したチャンネル間相互作用によるものであることが示された (coupled gating とする)。その一方、共免疫沈降実験では、Difoepin や G833R 変異の存在は二分子のチャンネル同士の結合に影響を与えていないことが示された。この結果の意味するところとして、Na チャンネル同士の物理的な結合 (=dimerization) は、14-3-3 を介した 1 箇所のみで起こっているのではなく、複数箇所を介したものであること、Difoepin によって coupled gating をキャンセルしても、dimerization そのものが失われるわけではないことが推察される。ただ、この推察には限界がある。すなわち、共免疫沈降実験はあくまで蛋白抽出後の検出実験であるため、生細胞の生理学的な条件下での dimerization を反映していない可能性である。このため、我々は次のステップとして、細胞膜表面に発現した 2 分子のチャンネル同士の近接性を in situ で検討する近接ライゲーシオンアッセイを予定している。

T1396P が共発現したチャンネルに及ぼす影響

今回の実験では、T1396P チャンネルが共に発現した野生型チャンネルの不活性化の電位依存性と減衰時間を変化させることが明らかとなった。その一方で、活性化曲線については不変であった。このことが示唆するのは、T1396P が及ぼす電位依存性の変化は、voltage sensor domain への影響ではなく、むしろチャンネルの Fast inactivation を司る構造、IFM motif などへの影響であるという点である。T1396P がどのように IFM motif の働きを阻害するのか、また、G833R チャンネルにおいては如何にして IFM motif への T1396P チャンネルの影響をキャンセルしているのかについて、今後さらに実験的に追求していく必要がある。

V. 結論

家族性の徐脈症候群の一家に同定された二つの SCN5A 変異 T1396P・G833R は、複雑な相互作用を介して心臓ナトリウム電流の密度のみならず、電位依存性にも影響を及ぼしていることが明らかとなった。2 変異を同時に有する患者が最も重症の表現型をとる誘因については、今回の実験のみでは十分明らかにはならなかった。今後さらなる実験を通して心臓ナトリウムチャンネルの二分子間相互作用の切り口から表現型へと繋がる知見が得られることが期待される。

VI. 研究協力者

田塾郁実・滋賀医科大学・専攻医
 牧山武・京都大学・特定講師
 大野聖子・国立循環器病研究センター・部長
 豊田太・滋賀医科大学・学内講師

VII. 参考文献

- 1) Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, et al. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*. 1998 19:39 2(6673):293-6. doi: 10.1038/32675. PMID: 952 1325.
- 2) Kyndt F, Probst V, Potet F, et al. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* 2001; 104: 3081-3086. PMID: 11748104
- 3) Wang Q, Shen J, Splawski I, et al. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 199

5; 80: 805-811. PMID: 7889574

- 4) Clatot J, Hoshi M, Wan X, Liu H, Jain A, Shinlapawittayatorn K, Marionneau C, Ficker E, Ha T, Deschênes I. Voltage-gated sodium channels assemble and gate as dimers. *Nat Commun.* 2017 12;8(1):2077. doi: 10.1038/s41467-017-02262-0. PMID: 29233994; PMCID: PMC5727259.
- 5) Clatot J, Ziyadeh-Isleem A, Maugenre S, Denjoy I, Liu H, Dilanian G, Hatem SN, Deschênes I, Coulombe A, Guicheney P, Neyroud N. Dominant-negative effect of SCN5A N-terminal mutations through the interaction of Na(v)1.5 α -subunits. *Cardiovasc Res.* 2012 1;96(1):53-63. doi: 10.1093/cvr/cvs211. Epub 2012 Jun 27. PMID: 22739120; PMCID: PMC3444234.
- 6) Dixon RE, Navedo MF, Binder MD, Santana LF. Mechanisms and physiological implications of cooperative gating of clustered ion channels. *Physiol Rev.* 2022 1;102(3):1159-1210. doi: 10.1152/physrev.00022.2021. Epub 2021 Dec 20. PMID: 34927454; PMCID: PMC8934683.

難治性心房細動に対する新たなアブレーションターゲットの探索に関する研究

—画像情報を利用した個別化アプローチとマーシャル静脈へのケミカルアブレーション—

国立循環器病研究センター心臓血管内科不整脈科
鎌倉 令

I. 緒言

心房細動は本邦の高齢者の 10%程度が罹患していることが推計されており、今後人口の高齢化に伴ってさらに増加することが予想されている。¹近年増加している脳梗塞、心不全の多くが心房細動と密接な関係があるため、心房細動の有効な治療法の開発は急務といえる。薬物治療のみでは心房細動の抑制率は 30%未満と不十分であり、アブレーション治療の発展が心房細動の治療成績の向上に大きく寄与すると言える。

発作性心房細動では、心房細動のトリガーとなる肺静脈をアブレーションにより電氣的に隔離する、“肺静脈隔離術”、を行うことで約 70-80%/年の洞調律維持が期待できる。しかし、発作性心房細動は年率 5%で持続化し、持続化すると心房の拡大・変形に伴い、肺静脈以外にも異常な不整脈基質が生じるようになる。持続性心房細動においては、肺静脈隔離術のみでは治療成功率が 50-60%/年程度と低く、難治例が多数存在する。²持続性心房細動になると、発作性心房細動よりも脳梗塞や心不全などの心血管イベントが増加することが報告されており³、近年早期の心房細動のリズムマネジメントにより、心房細動の持続時間(バーデン)を減らすことが、生命予後を改善することも報告されている。⁴しかしながら、持続性心房細動になってから心房細動が発見される例も多く、難治性心房細動に対して肺静脈隔離術に追加すべきアブレーション方法については、長年様々な手法が検討されてきたが、一貫した治療効果が示せていない。最新の各国の心房細動治療のガイドラインにおいても、肺静脈隔離術以外のアブレーション手法はクラス 2b 適応となっている。^{1,2}新しい効果的なアブレーション法の確立は重要な課題といえる。

我々はこれまで、心房細動患者において、解剖学

的特徴により肺静脈以外の心房細動起源の頻度が異なることを報告している。⁵このように、心房細動の起源には個人差があるため、アブレーション治療の成績向上のためには、一様なアプローチでは対応困難であり、個別化治療が必要であると考えている。個別化治療の一つとして、アブレーション術前に撮像した CT や MRI から、アブレーションのターゲットとなりうる解剖学的情報を抽出することで、患者個人に適切なアブレーションを提供できる可能性があると考えている。また近年、これまでアプローチが困難であった心外膜側に存在する心筋構造や自律神経節が心房細動の発生・維持に関与していることが明らかとなっており、これらの問題を克服したアブレーション手法の有用性を示すことができれば、難治性心房細動において新たな治療方針を提案できる可能性があると考えている。

本研究では、①画像情報を利用した個別化アプローチの有用性を検討すること、具体的には左房天蓋部に存在する心筋内脂肪組織が線状焼灼の成功率に与える影響について検討すること、②心外膜側に存在し、心房細動の発生や維持に関与していることが報告されているマーシャルへ静脈へのケミカルアブレーションの有用性・安全性の検討すること、を目的とした。

II. 対象・方法

①左房天蓋部線状焼灼における心筋内脂肪組織の与える影響について

左房天蓋部線状焼灼は肺静脈隔離に追加することで、持続性心房細動のアブレーションの治療成績を向上させる可能性があるが⁶、不完全な線状焼灼は医原性心房頻拍の原因となる可能性がある。近年の病理組織学的検討により、左房天蓋部には

septopulmonary bundle と septoatrial bundle という 2 つの筋束が走行しており、2 つの筋束の間には脂肪組織が介在している症例があり、脂肪が高周波焼灼の際に熱伝導を妨げて、貫壁性の焼灼層の形成を困難としている可能性があることが報告された。⁷今回、心房細動に対するカテーテルアブレーション術前に造影 CT を行い、左房心筋内脂肪の有無が、左房天蓋部焼灼の成功率に影響するかについて、後ろ向きに検討した。

左房天蓋部線状焼灼を行った患者を対象に ADAS3D LA software (ADAS3D Medical, Barcelona, Spain)を用いて左心房内膜と外膜をトレースし、左房壁厚マップを作成後に、心内膜と心外膜間の左房壁内に存在する Hounsfield 値-180 から 0 に分布する組織を心筋内脂肪と定義した。⁸アブレーションは CARTO3 システムを用いて行い、焼灼は 1 点あたり、40W で ablation index が 450 以上を指標に通電を行い、通電ポイント間の距離は 4mm 以内で連続的に線状焼灼を行った。CT 画像と CARTO3 システムで得られた左房マッピングを統合して、線状焼灼部位における心筋内脂肪の有無を確認し、左房天蓋部線状焼灼の成功率と、焼灼部位の壁厚や心筋内脂肪の有無について検討した。

②肺静脈隔離完成後の再発性心房細動例におけるマーシャル静脈へのケミカルアブレーションの有効性と安全性の検討

マーシャル静脈は左心耳と左肺静脈間の心外膜側に位置する静脈で、マーシャル静脈周辺の筋束が心房細動の発生や維持に重要な役割を果たすことが以前から報告されていたが、通常の内臓側からの高周波焼灼ではアプローチが困難であった。マーシャル静脈内にエタノールを注入し化学的に心筋を壊死させるケミカルアブレーションの手法が報告され、近年持続性心房細動に対する初回アブレーションにおける有効性が報告されているが⁹、これまで標準治療である肺静脈隔離術が完成後の再発性心房細動例におけるケミカルアブレーションの有効性については十分な報告はない。

今回我々は 61 例の肺静脈隔離完成後に再発を来した難治性心房細動に対してケミカルアブレーションを施行し、有効性と安全性を検討した。ケミカルアブレーションは右大腿静脈から可変型シース (Abbott, Agilis シース) と JR4 カテーテルを用いて冠

静脈にアプローチし(図 1A)、0.014 ワイヤ(フォルテグロウメディカル)をマーシャル静脈内に挿入後(図 1B)、1.5-2.5mm のバルーン(Boston、イメージ PTCA バルーンカテーテル)をマーシャル静脈起始部に留置後(図 1C)、マーシャル静脈を閉塞してエタノール 2.5ml を 2 回にわけて投与した(図 1D-F)。¹⁰

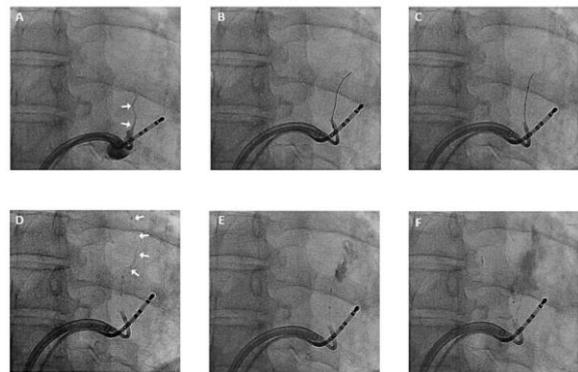


図1 ケミカルアブレーションの実際
詳細は本文を参照

Ⅲ. 結果

①左房天蓋部線状焼灼における心筋内脂肪組織の与える影響について

左房天蓋部線状焼灼を行った連続 33 例(平均年齢 60.9±12.5 歳、男性 29 例)で検討を行った。20 例(61%)で 1 回の線状焼灼でブロックラインが完成したが(成功群)、残りの 13 例(39%)では 1 回の線状焼灼ではブロックラインが完成せず、広範な焼灼を要した(不成功群)。成功群と不成功群間で、body mass index、左房径には有意差は認めず、4mm 以上の壁厚を有する頻度にも有意差は認めなかった(成功群 vs. 不成功群、15% vs. 5%、p=0.55)。一方で、不成功群で有意に心筋内脂肪が存在する症例が多かった(成功群 vs. 不成功群、5% vs 54%、p=0.0011)(図 2)。

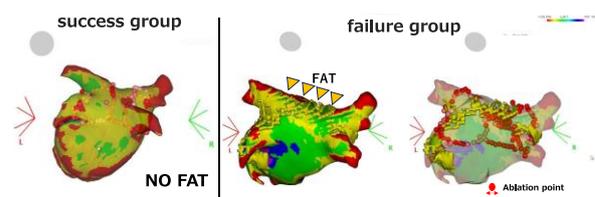


図2 左房壁厚マップと心筋内脂肪
成功群(左)では心筋内脂肪は認めず、1本の線状焼灼で天蓋部のブロックラインが完成した。一方不成功群(右)では、線状焼灼を行う左房天蓋部に心筋内脂肪沈着があり、1本の線状焼灼ではブロッ

クラインが完成せず、広範なアブレーションを必要とした。

②難治性心房細動におけるマーシャル静脈へのケミカルアブレーションの有効性と安全性の検討

110例のケミカルアブレーションを当院で行った症例のうち、肺静脈隔離が完成していたにも関わらず心房細動が再発した61例において、マーシャル静脈へのケミカルアブレーションを含む追加アブレーションの有効性、安全性について検討した。平均年齢 66.0 ± 10.8 歳、男性42例で、ケミカルアブレーションを行う前のアブレーション回数の中央値は2回であった。 278.2 ± 187.9 日のフォローアップ期間中に38例(62.3%)において心房性不整脈の再発を認めず、再発があっても45例(73.4%)において、術前より心房細動の頻度が減少し洞調律維持が可能となった。さらに、初回のアブレーションで左房後壁隔離を施行後に再発した症例のうち、左後壁隔離が完成していた症例が28例あり、その症例においてもケミカルアブレーション後に12例(43%)において 307.8 ± 208.6 日のフォローアップ期間中に心房性不整脈の再発を認めず、再発を認めても15例(54%)において術前より心房細動の頻度が減少し洞調律維持が可能となった。1例で入院期間の延長が必要となった軽度の心嚢液貯留、1例で保存的加療により軽快した右大腿静脈穿刺部動静脈瘻を認めたが、致命的な合併症は認めなかった。

IV. 考 察

①画像情報を用いた心房細動アブレーションの個別化アプローチについて

これまで左房天蓋部線状焼灼は肺静脈隔離術だけでは根治が難しい難治性心房細動に対して多く施行されてきた。しかしながら、線状焼灼の成功率は70%程度で、近年の病理組織学検討により、心房心筋内に介在する脂肪組織の存在が、高周波焼灼による貫壁性の焼灼層の完成を妨げている可能性が示唆されており⁷、線状焼灼の完成には、焼灼後に心外膜側に残存した伝導を指標とした左房後壁への追加通電が半数以上の症例で必要であることも報告されている。¹¹従来は、事前に線状焼灼が困難かを予測する方法がなかったため、線状焼灼後に不完全な焼灼ラインにより医原性の心房性不整脈に悩まされることも臨床の現場では多く遭遇していた。また、左房後壁は食道が近接しており、広範な焼灼は致命的

な合併症である心房食道瘻を引き起こすリスクがある。

近年、造影CTやMRIから得られた画像情報を再構築し、カテーテルアブレーション時に使用する3次元マッピングシステムに搭載できる画像システムが開発され、不整脈診療に活用されている。本研究は、その一つであるADAS3ソフトウェアを用いることで、心筋内脂肪の有無と、左房天蓋部線状焼灼ラインの対比が可能となった。本研究により、心筋内脂肪の存在する部位で線状焼灼を行うと成功率が低下することが示唆された。これまでの心筋内脂肪に着目した研究としては、持続性心房細動例において、発作性心房細動例や非心房細動例と比較して心筋内脂肪沈着が多かったという報告はあるが、実際のアブレーション戦略と対比した研究はこれまで存在しない。⁸心筋内脂肪の有無で左房天蓋部線状焼灼を行うべき患者の選択や焼灼部位の選択が可能となれば、術前に個別に最適な治療法や治療部位を提案できる可能性がある。本研究の結果の一部は2024年5月に米国ボストンで開催されるHeart Rhythmにて発表予定で、今後症例数をさらに増やして論文化を予定している。

②難治性心房細動におけるマーシャル静脈へのケミカルアブレーションの有効性と安全性の検討

肺静脈隔離術だけでは根治が難しい難治性心房細動に対する治療戦略も未だ確立されたものはない。肺静脈隔離術に追加するべきアブレーション方法について、これまで心房内線状焼灼、異常電位焼灼、自律神経節焼灼など様々な手法が検討されてきたが、一貫した治療効果が示せておらず、本邦や海外のガイドラインにおいても肺静脈隔離術以外のアブレーション戦略はクラス2b適応である。¹²近年これまでアプローチが困難であった心外膜側の心筋が心房細動の発生や維持に関与していることが報告されており、これらをターゲットとした治療が新たな心房細動アブレーションの治療成績改善に寄与する可能性がある。

マーシャル静脈は左心耳と左肺静脈間の心外膜側に位置する静脈で、動物実験モデルでは静脈周囲に存在する複雑な心筋構造が心房細動の維持に重要な役割を果たしていることが報告されている。¹²さらに、マーシャル静脈周辺には豊富な自律神経叢が存在し、心房の電気生理学的特性を修飾することで心房細動の発生にも関与する。¹³マーシャル静脈は心

外膜側に位置するため、これまで通常のアブレーションではアプローチが困難であったが、エタノール注入により静脈周辺の筋束を化学的に壊死させる、“ケミカルアブレーション”、が Valderrabano らによって提唱され、マーシャル静脈周辺の心房筋や自律神経叢に対する治療が可能となった。¹⁴2020年にはアメリカを中心とした多施設前向き無作為化試験にて、ケミカルアブレーションを通常のアブレーションに追加することで、持続性心房細動に対する初回アブレーションの治療成績を向上させることが報告された。⁹しかしながら、これまで通常のアブレーション後の再発性心房細動に対するマーシャル静脈へのケミカルアブレーションの効果については報告がない。

本研究では、単施設観察研究であるものの、中央値2回のアブレーション後で肺静脈隔離が完成後も心房細動が再発し、薬物療法下であっても洞調律の維持が困難であった61例の難治性心房細動例が、ケミカルアブレーションを含む追加アブレーションにより62%で再発を認めず、例え再発があっても73%の症例で洞調律の維持が可能となった。さらに難治性と思われる左房後壁隔離完成後も洞調律維持が困難な28例においても、43%で再発がなく、54%で洞調律維持が可能となった。心房細動は持続化すると塞栓症、心不全などの心血管イベントが増加するため、近年心房細動の持続化を予防することが重要であると考えられている。⁴本研究の結果は、ケミカルアブレーションを追加する治療戦略が、これまで治療が難しかった難治性心房細動例の新たなターゲットとなることを示唆するものと考えられる。また、安全性についても、致死的な合併症も認めなかった。これまで、欧米の報告では、ケミカルアブレーションは約90%で施行可能であり、心タンポナーデなどの致死的な合併症が約1%で発生することが報告されており¹⁰、日本人においても同様の安全性が期待できることが示唆された。今後の課題として、より多くの症例で長期間にフォローアップを行い、ケミカルアブレーションの有効性が期待できる症例の同定を行うことが必要である。

V. 結論

造影CTを用いた心筋内脂肪の評価は左房天蓋部線状焼灼の成功率の術前予測に有用であり、医原性心房頻拍の原因となる不十分な線状焼灼を避けることができる可能性がある。画像情報を組み入れたアブレーションは、患者ごとに最適な治療法や治療部位

を提案できる可能性がある。

マーシャル静脈へのケミカルアブレーションはこれまで洞調律維持が困難であったアブレーション後の再発性心房細動において、有効な治療となる可能性がある。

VI. 研究協力者

草野研吾・国立循環器病研究センター・副院長
樗木祥子・国立循環器病研究センター・専門修練医
小川智哉・国立循環器病研究センター・専門修練医
藤崎智札・国立循環器病研究センター・研修医
宮本絢一郎・国立循環器病研究センター・研修医

VII. 参考文献

1. Nogami A, Kurita T, Abe H, et al. JCS/JHRS 2019 guideline on non-pharmacotherapy of cardiac arrhythmias. *J Arrhythm.* 2021;37(4):709-870.
2. Joglar JA, Chung MK, Armbruster AL, et al. 2023 ACC/AHA/ACCP/HRS Guideline for the Diagnosis and Management of Atrial Fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation.* 2024;149(1):e1-e156.
3. Steinberg BA, Hellkamp AS, Lokhnygina Y, et al. Higher risk of death and stroke in patients with persistent vs. paroxysmal atrial fibrillation: results from the ROCKET-AF Trial. *Eur Heart J.* 2015;36(5):288-296.
4. Kirchhof P, Camm AJ, Goette A, et al. Early Rhythm-Control Therapy in Patients with Atrial Fibrillation. *N Engl J Med.* 2020;383(14):1305-1316.
5. Oka S, Yamagata K, Nishii T, et al. Structural characteristics of patients with superior vena cava foci initiating atrial fibrillation: Analysis with electrocardiogram-triggered computed tomography. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2023;34(3):556-564.

6. Segan L, Chieng D, Prabhu S, et al. Posterior Wall Isolation Improves Outcomes for Persistent AF With Rapid Posterior Wall Activity: CAPLA Substudy. *JACC Clin Electrophysiol*. 2023;9(12):2536-2546.
7. Pambrun T, Duchateau J, Delgove A, et al. Epicardial course of the septopulmonary bundle: Anatomical considerations and clinical implications for roof line completion. *Heart Rhythm*. 2021;18(3):349-357.
8. Saglietto A, Falasconi G, Soto-Iglesias D, et al. Assessing left atrial intramyocardial fat infiltration from computerized tomography angiography in patients with atrial fibrillation. *Europace*. 2023;25(12).
9. Valderrabano M, Peterson LE, Swarup V, et al. Effect of Catheter Ablation With Vein of Marshall Ethanol Infusion vs Catheter Ablation Alone on Persistent Atrial Fibrillation: The VENUS Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2020;324(16):1620-1628.
10. Kamakura T, Derval N, Duchateau J, et al. Vein of Marshall Ethanol Infusion: Feasibility, Pitfalls, and Complications in Over 700 Patients. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2021;14(8):e010001.
11. Kistler PM, Chieng D, Sugumar H, et al. Effect of Catheter Ablation Using Pulmonary Vein Isolation With vs Without Posterior Left Atrial Wall Isolation on Atrial Arrhythmia Recurrence in Patients With Persistent Atrial Fibrillation: The CAPLA Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2023;329(2):127-135.
12. Morita H, Zipes DP, Morita ST, Wu J. Isolation of canine coronary sinus musculature from the atria by radiofrequency catheter ablation prevents induction of atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2014;7(6):1181-1188.
13. Baez-Escudero JL, Keida T, Dave AS, Okishige K, Valderrabano M. Ethanol infusion in the vein of Marshall leads to parasympathetic denervation of the human left atrium: implications for atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(18):1892-1901.
14. Valderrabano M, Chen HR, Sidhu J, Rao L, Ling Y, Khoury DS. Retrograde ethanol infusion in the vein of Marshall: regional left atrial ablation, vagal denervation and feasibility in humans. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2009;2(1):50-56.

リアノジン受容体のテトラマー構造安定化による心不全とそれに伴う致死的不整脈の治療法開発

—リアノジン受容体結合カルモジュリンの重要性—

山口大学医学部附属病院 第二内科 助教
中村 吉 秀

I. 緒言

申請者らは、点突然変異・交感神経系の過緊張・酸化ストレスなどの先天的・後天的因子に起因して RyR2 内の N-terminal (1-600a.a)-central (2000-2500 a.a.)間のドメイン連関障害 (zipping→unzipping) → CaM 解離→Ca²⁺漏出という一連の現象が生じ、心不全やカテコラミン誘発性心室頻拍 (CPVT) が誘導されること、また悪性高熱症 (骨格筋型 RyR1 の点突然変異病) の特効薬であるダントロレンが、RyR1 のみならず RyR2 内の domain 連関障害も是正し CaM 解離を抑制し Ca²⁺漏出を阻止し、心不全・CPVT を抑制することを報告してきた(図 1)。

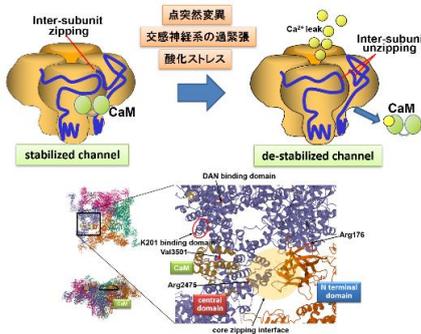


図 1 心不全・致死的不整脈の発症要因としてのリアノジン受容体機能異常と 3D cryo-EM 構造

点突然変異または交感神経系の過緊張・収縮期圧負荷に起因して RyR2 から CaM が解離し、心不全や致死的不整脈を誘導する。

RyR には様々な修飾蛋白があるがその中でカルモジュリン(CaM)は非常に重要な修飾蛋白であると考えている。申請者らは RyR に結合した CaM はチャンネル制御ドメインからチャンネル孔へシグナルを伝達する transmitter の役割をしていると考えた。申請者らの教室では右心室高頻度刺激心不全モデルにおいてチャンネル制御ドメインの unzip に伴い CaM の RyR に対する親和性が低下していることを示し 1)、CaM

の N 末端に Gly-Ser-His の 3 つのアミノ酸をつけた GSH-CaM は RyR2 に高親和性を示し、不全心筋の Ca²⁺ハンドリングを改善することも示した 2)。ヒト CPVT 型 R2474S ノックインマウス(KI マウス)において CaM の N 末端に Gly-Ser-His の 3 つのアミノ酸をつけた GSH-CaM は RyR2 に高親和性を示し、R2474S KI mouse 単離心筋細胞の Ca²⁺ハンドリングを改善し、Delayed after depolarization (DAD)を減少させることを示した 3)。申請者ら以外で RyR に結合した CaM の重要性についての研究は多く、Meissner らは RyR の 3 つのアミノ酸を変異させ CaM が結合しにくい変異 RyR を持った KI mouse は心肥大から心不全を経て著明に寿命が短くなることを示した 4)。さらに最近 CaM の突然変異により CaM が RyR に結合しにくくなり CPVT を生じることが報告された 5)。

このような背景のもと、RyR2 の CaM 結合ドメイン(CaMBD)に 1 アミノ酸変異を組み込んだ変異ペプチドを多数スクリーニングした結果 CaM の結合親和性が著しく高まるアミノ酸変異を発見した。この変異ペプチドは分子間結合試験においても確かに CaM に対する親和性が高いことが確認できた。この知見をもとに、RyR2 上の CaM 結合ドメイン内で 1 アミノ酸のみを変異させることにより CaM の結合親和性が格段に高まる変異を組み込んだ knock-in (KI)マウス: RyR2 V3599K KI マウスを作成することに成功した (図 2) 6)。

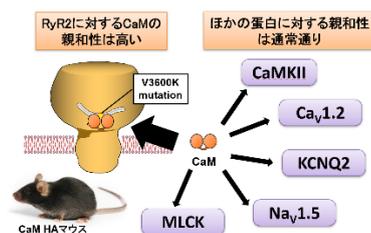


図 2 RyR2 V3599K KI マウスにおいて CaM は RyR2 に

たいしてのみ抗親和性

このマウスは RyR2 の CaMBD のみに変異が加えられているので、CaM の他の蛋白質に対する親和性は変化していないのが特徴的である。本マウスは海外でも注目され、本マウスによる CaM の親和性を in silico で解析した報告もなされた 7)。

II. 対象・方法

【実験 1】RyR2 V3599K KI マウスでの TAC 作成後の左室機能、心筋細胞収縮能、Ca²⁺放出能、RyR2-CaM 連関、心肥大シグナル伝達、催不整脈性、生存率の解析：

RyR2 V3599K KI マウスに対して TAC 作成 4、8 週間後に心エコーにて左室径・壁厚、fractional shortening を計測した後、テレメトリーを埋め込み、24 時間の心電図監視およびエピネフリン/運動負荷による不整脈誘発試験を行う。さらに、心筋細胞を単離培養し以下を計測する；①Ca²⁺ transient、SR Ca²⁺ content、Ca²⁺ spark、cell shortening；②anti-CaM, anti-GRK5, anti-HDAC4,5, anti-p-HDAC4,5 の抗体を用いた免疫染色による CaM, HDAC, GRK5 の核・細胞質内分布、リン酸化 HDAC の割合および心肥大遺伝子 (BNP, c-fos, c-jun) の発現；③蛍光ラベルした recombinant CaM(F-CaM)の細胞内導入による RyR2 に対する CaM 結合能。

【実験 2】RyR2 V3599K KI マウスでの心筋梗塞 (MI)作成後の左室機能、心筋細胞収縮能、Ca²⁺放出能、RyR2-CaM 連関、心肥大シグナル伝達、催不整脈性、生存率の解析：

LAD 結紮による心筋梗塞 (MI) 負荷をマウスに適用し、左室機能、心筋細胞収縮能、Ca²⁺放出能、RyR2-CaM 連関、心肥大シグナル伝達、生存率を解析する。その際、(RyR2 V3599K KI による) 遺伝的および (ダントロレンによる) 薬理的な CaM 解離抑制の、心機能・催不整脈性・予後に及ぼす効果を検討する。テレメトリーを埋め込み、24 時間の心電図監視およびエピネフリンによる VT 誘発試験を行う。

【実験 3】two-hit HFpEF モデルマウスにおける拡張障害と不整脈の検討：

High fat diet(HFD)+L-Name 内服による two-hit 拡張障害モデルマウスを作成し、ダントロレン慢性 (内服) 投与 WT マウス、および、RyR2 V3599K KI マウスにおいて、心エコーによる左室収縮・拡張機能、単離心筋細胞での心筋細胞収縮能、Ca²⁺放出能、RyR2-CaM 連関、心筋組織の心肥大シグナル伝達、

ER ストレス応答を検証する。さらに、単離心筋細胞を用いて不整脈器質としての Ca²⁺ spark や spontaneous Ca²⁺ transient を測定する。

III. 結果

【実験 1】RyR2 V3599K KI マウスは TAC 術後 2 週間においても 8 週間においても左室の肥大とリモデリングを強く抑制した(図 3)。

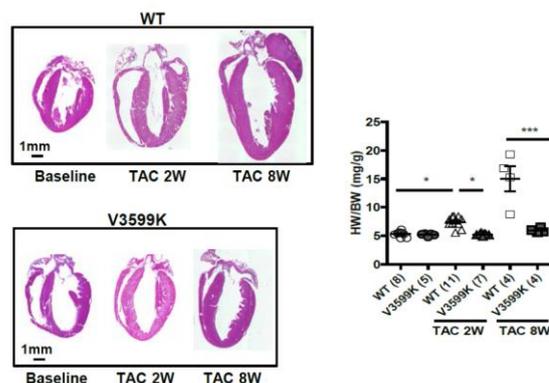


図 3 V3599K 変異の TAC 後左室肥大リモデリング

RyR2 V3599K KI マウスと WT マウスの TAC 術後の予後比較では、RyR2 V3599K KI マウスの生存率は WT マウスに比べ明らかに改善していた(図 4)。ECG モニタリングの結果明らかな不整脈出現頻度に差はなく、本モデルによる予後改善はリモデリング予防による心不全の抑制効果が大きいものと考えられた。

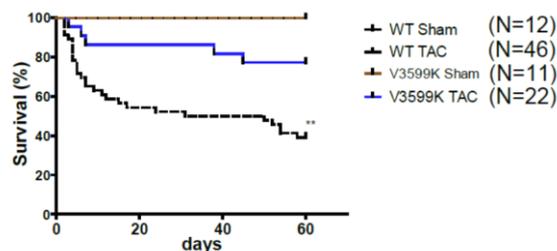


図 3 V3599K 変異の TAC 後予後

【実験 2】WT マウスに対するダントロレン慢性投与群(MI-WT+DAN)、RyR2 V3599K 群 (MI-V3599K) ともに、MI 作成後にみられるカテコラミン負荷誘発性の心室頻拍は生じず、左室リモデリング、心筋細胞肥大も抑制され、予後は著明に改善した(図 4)。

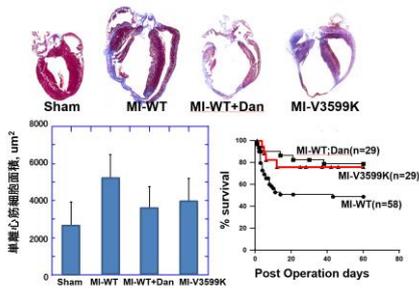


図4 ダントロレン慢性投与およびV3599K変異の心筋梗塞後左室リモデリング・心筋細胞肥大への影響

またエピネフリンによるVT誘発試験を行ったところ、WTマウスではVTが高頻度に誘発されたのに対し、RyR2 V3599K KIマウスにおいてはほとんど誘発されなかった(図5)。

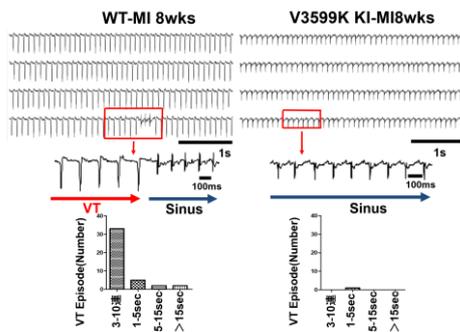


図5 心筋梗塞(MI)マウスにおけるエピネフリンVT誘発試験

【実験3】two-hit HFpEFモデルマウスにおける拡張障害モデルにおいて、ダントロレン慢性(内服)投与WTマウス、RyR2 V3599K KIマウスともに、コントロールのtwo-hit拡張障害WTマウスに比し、心重量の低下、運動耐容能、およびE/E'の改善を認めた(図6)。

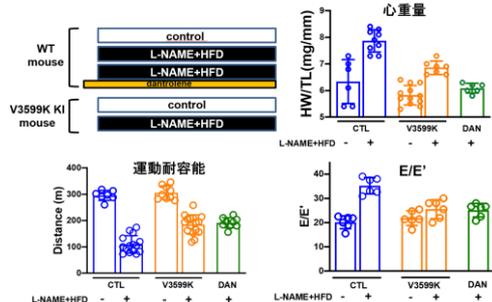


図6 V3599K変異、およびダントロレンのtwo-hit拡張不全モデルマウスへの影響

ダントロレン慢性投与WTマウス、RyR2 V3599K KIマウスともに、コントロールのtwo-hit拡張障害WTマウスに比し、心重量の低下、運動耐容能、およびE/E'の改善を認めた

さらに、単離培養心筋細胞を用い、不整脈器質としてのspontaneous Ca²⁺ transientを測定したところ、two-hit HFpEFモデルマウスに比べ、ダントロレン慢性(内服)投与WTマウス、RyR2 V3599K KIマウスともにspontaneous Ca²⁺ transientの減少を認めた(図7)。

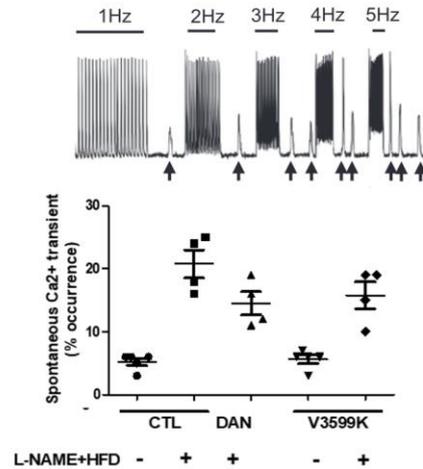


図7 単離心筋細胞におけるspontaneous Ca²⁺ transientの頻度比較

さらにこの不整脈器質としてのspontaneous Ca²⁺ transientの原因としてRyR2からのCaMの解離とそれに伴うRyR2からのCa²⁺ leakが認められるかを検証するため、免疫染色で、Z-line上のCaMを免疫染色で評価した。その結果two-hit HFpEFモデルマウスではZ-line上のCaMの減少と閾内集積がみられたが、ダントロレン慢性(内服)投与WTマウス、RyR2 V3599K KIマウスともに改善を認めた(図8)。

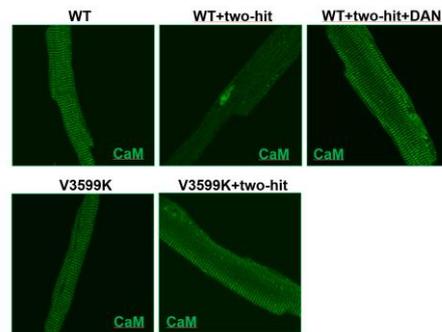


図8 単離心筋細胞におけるCaMの免疫染色

Ca²⁺ sparkもtwo-hit HFpEFモデルマウスに比べ、ダントロレン慢性(内服)投与WTマウス、RyR2 V3599K KIマウスともにCa²⁺ spark頻度の減少を認めた。

IV. 考察

申請者らの教室では RyR1 RyR2 の疾患関連突然変異の分布から、N-terminal domain と centr domain の domain 関連仮説を作成した 8),9)。それは intra-subunit での domain 関連を想定していたが近年 cryo 電顕による高精細な分子構造が解明され 10)、N-terminal domain と centr domain の domain 関連は inter-subunit の domain 関連であり、CaM はその関連を支える位置に結合していることが明らかになった。さらにわれわれが特定していたダントロレンと K201 の2つの RyR 安定化薬の結合部位 11),12) もその inter-subunit 関連部位の比較的近くに位置していることも明らかになった(図9)。

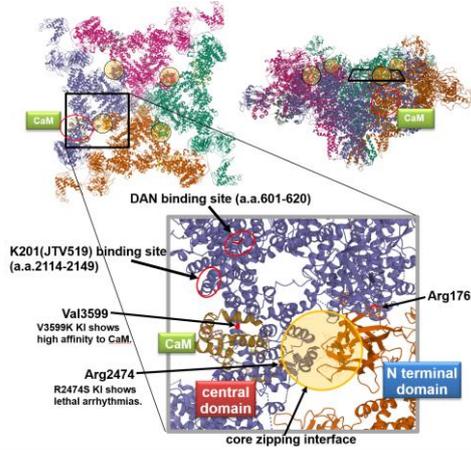


図9 RyR2の inter-subunit の domain 関連

このことから申請者は RyR2 のテトラマー構造安定化に修飾蛋白である CaM が非常に有用であると考え、それを証明するため、RyR2 の CaM 結合ドメイン(CaMBD)に1アミノ酸変異を組み込み、CaM に対する親和性が高い RyR2 を組み込んだ RyR2 V3599K KI mouse を作成した 6)。ダントロレンも CaM の解離を抑制し RyR2 のテトラマー構造安定化を示すことが確認できた。この RyR2 のテトラマー構造安定化という新しい治療コンセプトは、心不全、心肥大、そしてそれに伴う致死的不整脈を同時に加療できる治療法となると考えられる(図10)。

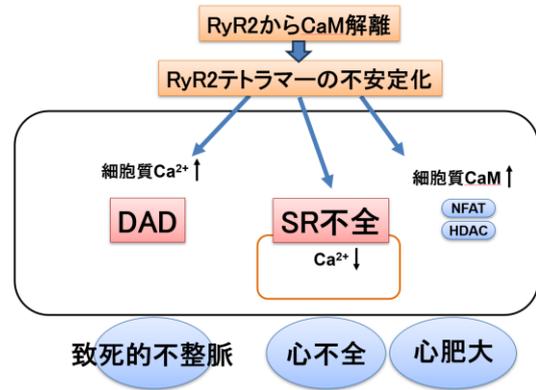


図10 RyR2の inter-subunit の domain 関連

実際に申請者らのモノクローリン誘発肺高血圧モデルラットでの研究においても、ダントロレンの慢性投与は右室機能の改善と不整脈抑制をもたらすことを確認した 13)。

V. 結論

CaM の RyR2 からの解離抑制による RyR2 のテトラマー構造安定化は心肥大、心不全、そしてそれに伴う致死的不整脈の有効な治療戦略となりうる。

VI. 研究協力者

山本健・山口大学大学院医学系研究科・教授
小田哲郎・山口大学医学部附属病院・講師

VII. 参考文献

- 1) Ono M, Yano M, Hino A, Suetomi T, Xu X, Susa T, Uchinoumi H, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M. Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca(2+) release in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2010 Sep 1;87(4):609-17.
- 2) Hino A, Yano M, Kato T, Fukuda M, Suetomi T, Ono M, Murakami W, Susa T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M. Enhanced binding of calmodulin to the ryanodine receptor corrects contractile dysfunction in failing hearts. *Cardiovasc Res.* 2012 Dec 1;96(3):433-43.
- 3) Fukuda M, Yamamoto T, Nishimura S, Kato T, Murakami W, Hino A, Ono M, Tateishi H, Oda

- T, Okuda S, Kobayashi S, Koseki N, Kyushiki H, Yano M. Enhanced binding of calmodulin to RyR2 corrects arrhythmogenic channel disorder in CPVT-associated myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 May 23;448(1):1-7.
- 4) Yamaguchi N, Takahashi N, Xu L, Smithies O, Meissner G. Early cardiac hypertrophy in mice with impaired calmodulin regulation of cardiac muscle Ca release channel. *J Clin Invest.* 2007 May;117(5):1344-53.
 - 5) Nyegaard M, Overgaard MT, Søndergaard MT, Vranas M, Behr ER, Hildebrandt LL, Lund J, Hedley PL, Camm AJ, Wettrell G, Fosdal I, Christiansen M, Børglum AD. Mutations in calmodulin cause ventricular tachycardia and sudden cardiac death. *Am J Hum Genet.* 2012 Oct 5;91(4):703-12.
 - 6) Nakamura Y, Yamamoto T, Kobayashi S, Tamitani M, Hamada Y, Fukui G, Xu X, Nishimura S, Kato T, Uchinoumi H, Oda T, Okuda S, Yano M. Ryanodine receptor-bound calmodulin is essential to protect against catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *JCI Insight.* 2019 Jun 6;4(11):e126112.
 - 7) Greene D, Barton M, Luchko T, Shiferaw Y. Computational Analysis of Binding Interactions between the Ryanodine Receptor Type 2 and Calmodulin. *J Phys Chem B.* 2021 Sep 30;125(38):10720-10735.
 - 8) Yamamoto T, El-Hayek R, Ikemoto N. Postulated role of interdomain interaction within the ryanodine receptor in Ca(2+) channel regulation. *J Biol Chem.* 2000 Apr 21;275(16):11618-25.
 - 9) Ikemoto N, Yamamoto T. Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors. *Front Biosci.* 2002 Mar 1;7:d671-83.
 - 10) Gong D, Chi X, Wei J, Zhou G, Huang G, Zhang L, Wang R, Lei J, Chen SRW, Yan N. Modulation of cardiac ryanodine receptor 2 by calmodulin. *Nature.* 2019 Aug;572(7769):347-351.
 - 11) Paul-Pletzer K, Yamamoto T, Ikemoto N, Jimenez LS, Morimoto H, Williams PG, Ma J, Parness J. Probing a putative dantrolene-binding site on the cardiac ryanodine receptor. *Biochem J.* 2005 May 1;387(Pt 3):905-9.
 - 12) Yamamoto T, Yano M, Xu X, Uchinoumi H, Tateishi H, Mochizuki M, Oda T, Kobayashi S, Ikemoto N, Matsuzaki M. Identification of target domains of the cardiac ryanodine receptor to correct channel disorder in failing hearts. *Circulation.* 2008 Feb 12;117(6):762-72.
 - 13) Tanaka S, Yamamoto T, Mikawa M, Nawata J, Fujii S, Nakamura Y, Kato T, Fukuda M, Suetomi T, Uchinoumi H, Oda T, Okuda S, Okamura T, Kobayashi S, Yano M. Stabilization of RyR2 maintains right ventricular function, reduces the development of ventricular arrhythmias, and improves prognosis in pulmonary hypertension. *Heart Rhythm.* 2022 Jun;19(6):986-997.

胎児頻脈性不整脈の新規診断法及び治療法の開発

国立成育医療研究センター 臨床研究センター・研究員
三好 剛一

I. 緒言

胎児頻脈性不整脈は1~2 万分娩に1 例と稀であるが、30-40%が心不全より胎児水腫に進行するため、出生後の神経発達予後も見据えた慎重な周産期管理が求められる。胎児頻脈性不整脈に対する胎児治療として、抗不整脈薬の経胎盤的治療が多数報告され、その有効性についてはコンセンサスが得られているが、確立したプロトコルがないという問題点があった。そこで日本胎児不整脈班では、本邦における胎児頻脈性不整脈の全国調査及び文献レビューの結果に基づき、胎児頻脈性不整脈に対する胎児治療プロトコルを立案、世界初となる多施設共同臨床試験(厚生労働省、先進医療 B) を実施し、胎児治療の有効性及び安全性を示してきた (JACC 2019)。当該研究成果は日本小児循環器学会ガイドラインに掲載され、現在、胎児治療に用いる抗不整脈薬 (ジゴキシン、ソタロール、フレカイニド) について、適応拡大に向けた申請準備を進めているところであり、胎児頻脈性不整脈に対する胎児治療の医療現場への実装に向けて、症例登録体制等の管理体制の整備が求められている。

胎児不整脈は胎児心不全の主要な原因である。胎児心不全は、胎児超音波検査に基づいて診断されるが、特に胎児頻脈性不整脈の存在下ではその診断精度に限界があることから、より客観的かつ精度の高い診断マーカーが望まれている。これまで我々の研究班では、胎児心不全の診断に活用できる母体血中バイオマーカーの開発を目指して探索的研究を実施し、母体血中サイトカイン類を解析した結果、胎児心不全時に母体血中で炎症性サイトカインや血管新生関連因子が変化することを見出した。母体血中の胎児心不全バイオマーカーの候補因子として TNF- α 、VEGF-D、HB-EGF が同定され、3 つを組み合わせた場合に、感度 100%、特異度 80.3%、AUC=0.90 であった (AJOG 2019)。

本研究では、胎児頻脈性不整脈に対する経胎盤的

治療の医療現場への実装に向けて、抗不整脈薬の使用実態、問題点、及び予後を明らかにするためのレジストリデータベースを構築する。また、胎児頻脈性不整脈の発現時における胎児心不全の重症度を反映するバイオマーカーを確立することで、胎児頻脈性不整脈に対する新たな管理方法を提案したい。

II. 対象・方法

胎児心疾患レジストリの研究体制を基盤として、以下の研究を遂行する (図 1)。

1. 胎児頻脈性不整脈の症例登録体制の整備：レジストリの構築

日本胎児心臓病学会の協力を得て胎児心疾患 (先天性心疾患及び不整脈) レジストリの構築を行う。

① 研究実施体制の整備

全国の主要周産期施設に所属する日本胎児心臓病学会代議員、胎児心エコー認証医による症例登録体制を整備する。

症例登録施設の要件としては、日本胎児心臓病学会の会員の所属施設、胎児心エコーレベル 2 検査の実施施設、日本小児循環器学会の修練施設、小児心臓手術の実施施設の 4 項目をすべて満たした施設 (約 80 施設) を想定しており、本邦における胎児診断例の 80~90% (日本胎児心臓病学会の胎児心エコー検査登録より) を網羅できると概算されることから、年間に胎児不整脈 200 例 (うち胎児頻脈性不整脈 20 例程度) の登録が見込まれる。

② データベースの構築

ナショナルセンターの REDCap システムを用いてデータベースを構築・運用する。

主要評価項目：生後 1 ヶ月の生存割合 (新生児生存)

副次評価項目：生後 1 歳 6 ヶ月、3 歳時の頻脈性不整脈の再発、治療の有無、神経発達異常の有無、胎児治療の有無 (臨床試験の治療プロトコルの浸透度)、その奏効割合、母児への副作用

③ 既存データベースとのデータリンケージ

日本産科婦人科学会の周産期 DB、NCD、DPC、医科レセプトなどの既存の公的データベースと連結可能なデータ構造を設計する。

2. 胎児心室頻拍の全国調査研究

調査方法：胎児心疾患レジストリで構築した基盤を利用して、全国の主要周産期・小児循環器専門施設を対象として一次調査を実施し、胎児心室頻拍の診断・管理の経験を有する医師に対して二次調査を実施する。

目標症例数：本研究は探索的研究であり、実施可能性を重視して目標症例数を設定した。胎児頻脈性不整脈は2万妊娠に1例と報告されており、心室頻拍はそのうちの5%とすると、本邦の分娩数が年間約80~100万件で推移していることから、胎児心室頻拍は10年間で20~25例と推定される。

3. 胎児心不全のバイオマーカー探索

「胎児頻脈性不整脈に対する経胎盤的抗不整脈薬投与に関する臨床試験(厚労科研、先進医療B、2010~2017年)」において登録した50例を対象として、胎児治療中(妊娠中~後期)及び治療後(産褥期)に採取・保管した母体血清を用いて、サイトカイン類を測定し、胎児頻脈性不整脈の有無及び胎児心不全の重症度との関連性について検討する。経胎盤的治療中に、胎児超音波所見に加えて、母体血中サイトカイン類の変化を経時的にみることで、胎児頻脈性不整脈の治療効果の予測や胎児心不全の重症度判定における客観的評価法の確立を目指す。

4. 胎児心不全胎盤における病理組織学的解析及び遺伝子発現解析

予備的検討として、胎児心不全胎盤で、病理組織学的解析及びDNAマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。胎盤の病理組織学的解析として、9つの所見(絨毛の成熟度、絨毛の浮腫、絨毛の線維化、絨毛膜羊膜炎、絨毛血管症、フィブリン沈着、絨毛膜下血腫、梗塞、絨毛血管内の有核赤血球)について評価した。

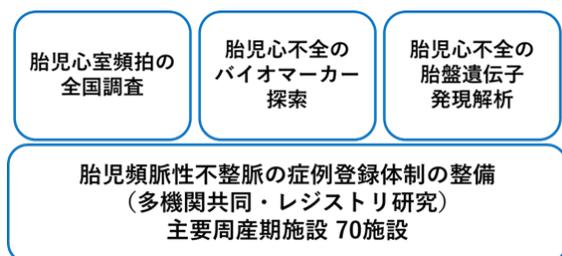


図1 胎児不整脈レジストリ構築及び関連研究

Ⅲ. 結果

1. 胎児頻脈性不整脈の症例登録体制の整備：レジストリの構築

日本胎児心臓病学会内にWGを立ち上げ、理事会及び代議員会の承認を得た上で、学会の事業として胎児心疾患レジストリの構築を進めた(図2)。

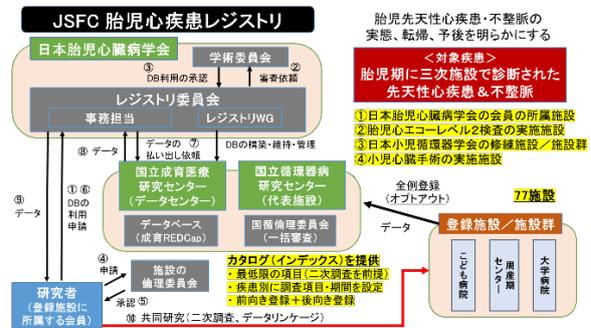


図2 胎児心疾患レジストリ(日本胎児心臓病学会)

登録症例の対象は、胎児期に三次施設で診断された胎児先天性心疾患・不整脈で、疑い症例も含めた全例登録とした。胎児頻脈性不整脈については、心室拍数180bpm以上が持続する上室頻拍、心房粗動、心室頻拍とした。

本レジストリは、症例ベースのカタログ(インデックス)を提供することを基本コンセプトとして、必要最低限の項目(二次調査、データリンクを前提とした項目)に絞り、疾患別に調査項目・追跡期間を差別化し、前向きに10年間分の症例登録に加え、後向きに5年間分を登録する計画とした。

参加施設は、胎児診断の精度やデータの質を担保するために三次施設に限定した。具体的な要件としては、日本胎児心臓病学会の会員の所属施設、胎児心エコーレベル2精査の実施施設、日本小児循環器学会の修練施設、小児心臓手術の実施施設の4項目をすべて満たすこととし、全国の主要周産期・小児循環器専門施設(三次施設)77施設から成る症例登録体制を確立した。胎児頻脈性不整脈に関しては、これらの施設で紹介されることから、ほぼ全症例の集積が可能と考えられた。

研究計画書は、代表施設である国立循環器病研究センターの倫理委員会へ中央一括審査を申請して、データセンターを国立成育医療研究センターに設置し成育REDCapを用いてデータ収集・管理を実施することとした(図3)。生後1ヶ月の生存割合(新生児生存)を主要評価項目として、その他、胎児頻脈性不整脈に対する胎児治療(国内臨床試験の治療プロトコルの浸透度)、出生後の不整脈と治療を収集

することとした。それ以降の予後や詳細なデータについては、二次調査やデータリンクにより収集して研究利用する計画とした。

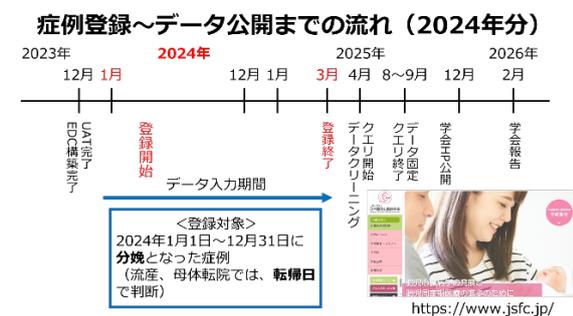


図3 症例登録～データ公開までの流れ

2. 胎児心室頻拍の全国調査研究

胎児心臓病学会の学術委員会及び国立成育医療研究センターの倫理委員会の承認を得て、胎児心疾患レジストリで構築した症例登録体制を利用して、全国の主要周産期・小児循環器専門施設を対象とした一次調査を開始したところである。今後、胎児心室頻拍症例を有する施設に対して二次調査を実施し、本邦における胎児心室頻拍の出現状況及び予後などの実態を明らかにし、胎児心室頻拍診断における特徴的な所見を特定し、胎児心室頻拍に対して本邦で実施されている胎児治療の実態から胎児治療の有効性及び安全性を確認する予定である。

3. 胎児心不全のバイオマーカー探索

胎児頻脈性不整脈に対する国内臨床試験（厚労科研、先進医療 B、2010～2017 年）において胎児治療中に採取・保管した母体血清を用いて、サイトカイン類（Bio-Plex Pro Human Cancer Biomarker Panels 1 and 2 (Bio-Rad, Hercules, CA)、計36種）及びホルモン類（hCG、hPL）を測定し、胎児治療中の経時的な変化を観察したところ、hCG と Angiotensin-2 において、胎児頻脈性不整脈の病態及び心不全の重症度と良好な相関性が確認された（論文投稿中）。

胎児頻脈性不整脈の持続時は胎児心不全の重症度スコア（Cardiovascular profile score：低いほど心不全は重度）が増悪するのと並行して hCG と Angiotensin-2 が著明に上昇、胎児治療が奏効して胎児頻脈性不整脈が消失した後は胎児心不全の重症度スコアが改善するのと並行して hCG と Angiotensin-2 が著明に低下した（図 4）。

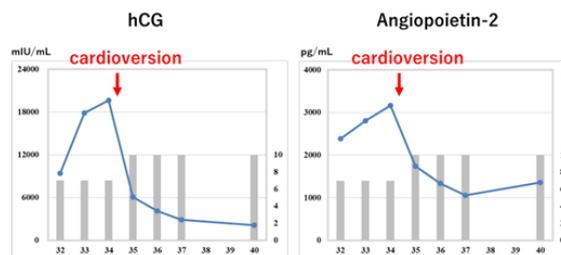


図4 胎児治療奏効例

一方で、胎児治療が無効で、胎児頻脈性不整脈が持続し、胎児心不全の重症度スコアが経時的に増悪するのと並行して hCG と Angiotensin-2 が上昇した（図 5）。

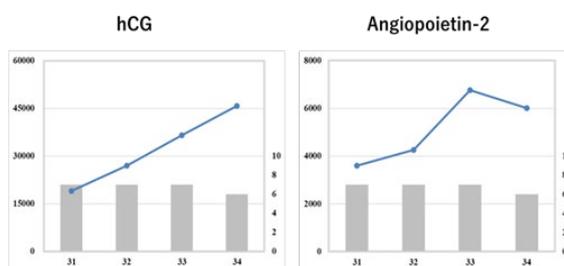


図5 胎児治療無効例

母体血清中 hCG と Angiotensin-2 のいずれも、胎児頻脈性不整脈の病態及び胎児心不全の重症度をほとんどタイムラグなく鋭敏に反映しており、実臨床への応用が可能と考えられた。また、胎児超音波検査に基づく胎児心不全の重症度スコアと比べて、定量的な評価が可能な分、より客観的かつ精緻な評価ができると推察された。

4. 胎児心不全胎盤における病理組織学的解析及び遺伝子発現解析

胎児先天性心疾患・不整脈を有する単胎 168 例（心不全なし・軽度 140 例、中等度 15 例、重度 13 例）及び重症例と在胎週数をマッチングした正常単胎 52 例を対象として、胎盤の肉眼的・顕微鏡的異常所見と胎児心不全の重症度との関連性を検討した（Circ J. 2023）。

胎児先天性心疾患・不整脈の胎盤において、胎児心不全の重症化に伴い、絨毛の浮腫、未熟な絨毛や異型絨毛、有核赤血球等の組織学的変化が認められた（図 6）。特に、高度の浮腫と有核赤血球は、重度心不全症例でのみ認められた。胎児先天性心疾患・不整脈の胎盤及び臍帯では、臍帯辺縁付着等の肉眼的異常所見の発現割合が高かったが、それらと胎児心不全の発症や重症度との関連性は認めなかった。

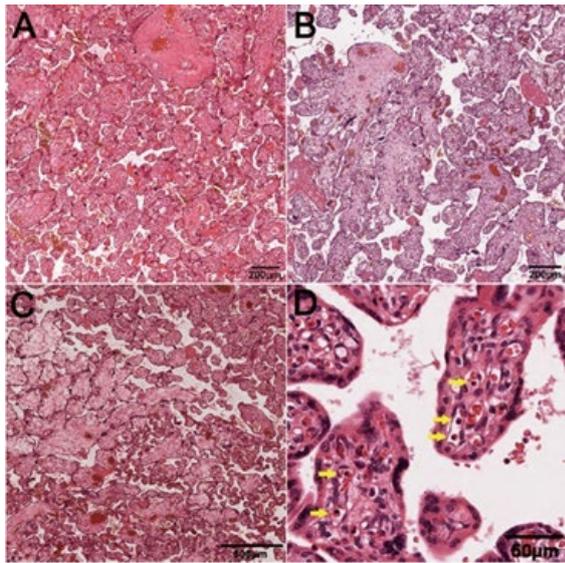


図6 A 中間型絨毛、B 異型絨毛、C 絨毛浮腫、D 絨毛血管内の有核赤血球 (黄色の矢印) いずれも HE 染色

これらの所見は、在胎週数をマッチングしたコントロール群よりも高度かつ高頻度に認めており、胎児心不全に起因する早産に伴う変化ではなく、胎児心不全の重症化に伴う変化が示唆された (図7)。

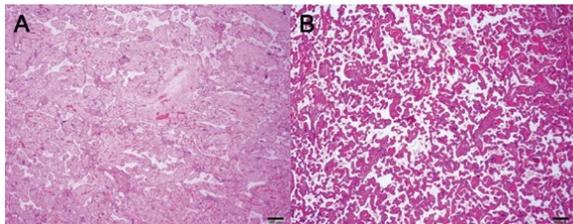


図4 A 胎児重症心不全の胎盤 (高度に不均一で浮腫状の絨毛)、B 正常胎児の胎盤 (成熟した終末絨毛) いずれも HE 染色

また胎児治療 (経胎盤的抗不整脈薬投与) により胎児心不全が改善した症例では高度の組織学的変化は認めなかったことから、これらの所見は胎児心不全に伴う二次的な変化と推察された。

胎児心不全群5例 (重症2例、中等症3例) 胎児治療奏効群3例 (胎児頻脈性不整脈に対して胎児治療が奏効し胎児心不全が改善した症例)、コントロール群4例 (胎児心不全を有さない正常胎児) の胎盤絨毛組織及びDNAを用いて、マイクロアレイ解析を予備的に実施した。胎盤絨毛組織の遺伝子発現は、IL18、TGF β 1、IRF1 など一部のサイトカインにおいて、胎児心不全で低下し、胎児治療により胎児心不全が改善することによって正常コントロールと同等のレベルまで改善することが示された (論文投稿中)。

IV. 考察

全国の主要周産期・小児循環器専門施設をカバーした胎児心疾患 (先天性心疾患・不整脈) レジストリの構築・運用により、胎児頻脈性不整脈に関する胎児治療の実態把握及び予後解明が可能となる。疾患の希少性から臨床研究や臨床試験の実施が難しい領域であり、悉皆性及び信頼性の高いレジストリDBを構築することで、全国ベースでの臨床研究の推進、さらには臨床試験における計画立案、外部対照や製販後調査への利活用も期待される。1つの国全体をカバーした胎児不整脈のレジストリはこれまでなく、国際的にも極めて重要なものと位置付けられる。将来的なデータ利用に際しては、既存のDBとのデータリンクが重要であり、本レジストリをハブとして、日本産科婦人科学会の周産期登録DB、日本小児循環器学会の心疾患登録DB、DPC、医科レセプト等とリンクすることにより、中長期予後の追跡を可能とする大規模リンクデータベースを構築する予定である。

これまでの臨床研究や臨床試験は、胎児頻脈性不整脈の大部分を占める上室頻拍と心房粗動が対象であり、さらに稀だが重篤性が高い胎児心室頻拍については、自然歴も十分に解明されてなく、胎児不整脈領域における残された課題の1つであった。胎児心疾患レジストリの基盤を利用した一次調査に引き続き、二次調査を実施することで、胎児心室頻拍の実態の解明及び管理指針の策定が期待される。

胎児頻脈性不整脈の病態及び胎児心不全の重症度を鋭敏に反映する母体血中バイオマーカーが同定され、胎児治療の効果判定にも応用可能と考えられた。今後、妊娠週数等の異なるデータセットでの再現性を確認することで、臨床応用を進めていきたい。

また、胎児胎盤循環と母体循環は、基本的には独立して恒常性が保たれているが、胎児水腫が進行すると胎盤浮腫と共に母体にも胸腹水や皮下浮腫を生じるミラー症候群が知られており、相互に影響を与えていると考えられるが、胎児頻脈性不整脈に伴う胎児心不全の胎児胎盤循環及び母体循環への影響については不明な点が多い。本研究から胎児心不全時に特異的な病理組織学的変化が明らかになったが、胎児心不全時に胎盤で生じる遺伝子発現変化を明らかにすることで、母体・胎盤循環の病態解明、さらには胎児心不全を反映する母体血中の新規バイオマーカー開発へとつなげていきたい。

V. 結論

全国の主要周産期・小児循環器専門施設をカバーした胎児心疾患レジストリを構築できた。胎児頻脈性不整脈については、ほぼ全症例が登録されることが見込まれ、本レジストリを基盤として二次調査や既存のDBとデータリンケージすることにより、胎児心不全時の母体・胎盤循環の病態解明、及び新規診断法や治療法の開発につながることを期待される。

VI. 研究協力者

吉松 淳・国立循環器病研究センター・産婦人科部長
松井彦郎・東京大学病院・小児科准教授

金 基成・国立成育医療研究センター・循環器科医長
永田 弾・九州大学病院・小児科講師

石井陽一郎・大阪母子医療センター・小児循環器科
副部長

加地 剛・徳島大学病院・産婦人科准教授

前野泰樹・聖マリア病院・第4診療部副病院長

細田洋司・信州大学医学部・分子病態学准教授

VII. 参考文献

- 1) Miyoshi T, Matsuyama TA, Nakai M, Miyazato M, Yoshimatsu J, Hatakeyama K, Hosoda H. Abnormal Microscopic Findings in the Placenta Correlate With the Severity of Fetal Heart Failure. *Circ J.* 2023; 87(4): 560-8.
- 2) Miyoshi T, Maeno Y, Matsuda T, Ito Y, Inamura N, Kim KS, Shiraishi I, Kurosaki K, Ikeda T, Sago H; Japan Fetal Arrhythmia Group. Neurodevelopmental outcomes after antenatal therapy for fetal supraventricular tachyarrhythmias: 3-year follow-up of a multicenter trial. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2023; 61(1): 49-58.
- 3) Miyoshi T, Hosoda H, Miyake A, Sakaguchi H, Kitano M, Kurosaki KI, Shiraishi I, Nakai M, Nishimura K, Miyazato M, Kangawa K, Yoshimatsu J, Minamino N. Utility of perinatal natriuretic peptide for predicting neonatal heart failure. *Pediatr Int.* 2022; 64(1): e15231.
- 4) Miyoshi T, Hosoda H, Minamino N. Significance of Atrial and Brain Natriuretic Peptide Measurements in Fetuses With

Heart Failure. *Front Physiol.* 2021; 12: 654356.

- 5) Miyoshi T, Hosoda H, Kurosaki KI, Shiraishi I, Nakai M, Nishimura K, Miyazato M, Kangawa K, Yoshimatsu J, Minamino N. Plasma natriuretic peptide levels reflect the status of the heart failure in fetuses with arrhythmia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2021; 34(12): 1883-9.
- 6) Miyoshi T, Maeno Y, Hamasaki T, Inamura N, Yasukochi S, Kawataki M, Horigome H, Yoda H, Taketazu M, Nii M, Hagiwara A, Kato H, Shimizu W, Shiraishi I, Sakaguchi H, Ueda K, Katsuragi S, Yamamoto H, Sago H, Ikeda T; Japan Fetal Arrhythmia Group. Antenatal Therapy for Fetal Supraventricular Tachyarrhythmias: Multicenter Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2019; 74(7): 874-85.
- 7) Miyoshi T, Hosoda H, Nakai M, Nishimura K, Miyazato M, Kangawa K, Ikeda T, Yoshimatsu J, Minamino N. Maternal biomarkers for fetal heart failure in fetuses with congenital heart defects or arrhythmias. *Am J Obstet Gynecol.* 2019; 220(1): 104.e1-15.
- 8) Miyoshi T, Hosoda H, Miyazato M, Kangawa K, Yoshimatsu J, Minamino N. Metabolism of atrial and brain natriuretic peptides in the fetoplacental circulation of fetuses with congenital heart diseases. *Placenta.* 2019; 83: 26-32.