



Title	虚血性心不全モデルにおけるNeuropeptide Yと心室性不整脈に関する研究
Author(s)	甲谷, 次郎
Description	配架番号 : 2968
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16693号
Issue Date	2025-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16693
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98667
Type	doctoral thesis
File Information	KOYA_Jiro.pdf, 全文



学位論文

虚血性心不全モデルにおける Neuropeptide Y と

心室性不整脈に関する研究

(Neuropeptide Y and ventricular arrhythmias in
ischemic heart failure model)

2025 年 12 月

北海道大学

甲谷 次郎

学位論文

虚血性心不全モデルにおける Neuropeptide Y と
心室性不整脈に関する研究
(Neuropeptide Y and ventricular arrhythmias in
ischemic heart failure model)

2025 年 12 月

北海道大学

甲谷 次郎

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
1. 要旨	2 頁
2. 略語表	5 頁
3. 緒言	6 頁
4. 実験方法	10 頁
4.1 虚血性心不全モデルマウスの作製	10 頁
4.2 心エコー	11 頁
4.3 免疫組織化学染色	12 頁
4.3.1 マウス検体	12 頁
4.3.2 ヒト検体	13 頁
4.4 免疫組織蛍光染色	13 頁
4.5 免疫ブロット法	14 頁
4.6 カルシウムイメージング	17 頁
4.6.1 心筋細胞単離	17 頁
4.6.2 カルシウム色素染色	18 頁
4.6.3 落射蛍光顕微鏡	18 頁
4.6.4 共焦点レーザー顕微鏡	19 頁
4.7 電気生理学的記録	19 頁
4.7.1 心筋細胞単離	19 頁
4.7.2 ホールセルパッチクランプ法	19 頁
4.8 不整脈誘発性の検討	20 頁
4.8.1 ランゲンドルフ灌流心	20 頁
4.8.2 不整脈誘発性の評価	21 頁
4.9 統計学的検討	21 頁
5. 実験結果	22 頁
5.1 動物特性、心エコーデータ	22 頁
5.2 虚血性心不全モデルマウスにおける NPY と NE の発現	24 頁

5.3	NPY 及び TH のタンパク発現.....	26 頁
5.4	心筋層別の NPY 発現の組織学的評価.....	27 頁
5.5	虚血性心不全モデルにおける心筋 NPY 発現の経時的変化.....	29 頁
5.6	ヒト心筋における NPY 発現の評価.....	29 頁
5.7	星状神経節における NPY 発現の組織学的評価.....	31 頁
5.8	正常心モデルにおけるカルシウムウェーブの比較.....	33 頁
5.9	虚血性心不全モデルにおけるカルシウムウェーブの比較.....	35 頁
5.10	電気刺激によるカルシウムトランジェントへの NPY の影響の評価	36 頁
5.11	ホールセルパッチクランプ法による膜電位記録.....	37 頁
5.12	NPY 投与による心室性不整脈への影響	39 頁
6.	考察.....	41 頁
7.	総括及び結論.....	45 頁
8.	謝辞.....	47 頁
9.	利益相反	48 頁
10.	引用文献	49 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に受理された。

Jiro Koya, Temma Taro, Kei Kawakami, Fuyuki Karube, Zen-ichi Tanei, Masahiro Kawasaki, Kintaro Shimano, Shota Saito, Daishiro Tatsuta, Kotaro Nishino, Hiroyuki Natsui, Takahide Kadosaka, Taro Koya, Motoki Nakao, Masaya Watanabe, Kiwamu Kamiya, Toshiyuki Nagai, Shinya Tanaka, Fumino Fujiyama, and Toshihisa Anzai. Neuropeptide Y Drives Ventricular Arrhythmogenesis in Chronic Ischemic Heart Failure via Calcium Mishandling. *Heart Rhythm*.

本研究の一部は以下の学会・研究会において発表した。

- 1) Jiro Koya, Taro Temma, Kei Kawakami, Masahiro Kawasaki, Kintaro Shimano, Shota Saito, Daishiro Tatsuta, Kotaro Nishino, Hiroyuki Natsui, Takahide Kadosaka, Taro Koya, Motoki Nakao, Masaya Watanabe, Toshihisa Anzai. Sympathetic neurotransmitter alteration in ischemic heart failure model: Implications for ventricular arrhythmogenesis. The 70th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society, 2024.7.19, Kanazawa, Japan.
- 2) Jiro Koya, Taro Temma, Kei Kawakami, Masahiro Kawasaki, Kintaro Shimano, Shota Saito, Daishiro Tatsuta, Kotaro Nishino, Hiroyuki Natsui, Takahide Kadosaka, Taro Koya, Motoki Nakao, Masaya Watanabe, Toshihisa Anzai. Sympathetic neurotransmitter alteration in ischemic heart failure model: Implications for ventricular arrhythmogenesis via calcium overload. The 16th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session, 2024 9.29, Sydney, Australia.

1.要旨

【背景と目的】

心不全パンデミックに伴い増加する虚血性心不全による心室性不整脈は致命的転帰となりうるため、その機序のさらなる理解や治療法の確立が望まれる。従来、交感神経活性により生じるノルエピネフリンとその受容体 (β 受容体) カスケードの結果生じる心筋細胞内カルシウムイオン濃度上昇が原因と考えられていたが、 β 受容体遮断薬を投与しても致死性不整脈を完全に抑制することは困難であった。そこで、交感神経活性でノルエピネフリン (NE) と共放出される神経ペプチドである Neuropeptide Y (NPY) に我々は着目した。NPY は 36 アミノ酸残基からなる神経ペプチドで、中枢・末梢神経に広く分布し、心臓に最も多く存在する神経ペプチドである。NPY は Y1 受容体を介してホスホリパーゼ C 回路を活性化させることによりイノシトール 3 リン酸を上昇させ、筋小胞体からのカルシウムを放出させ細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることが明らかになっている。最近、心筋梗塞患者で心室性不整脈が発生した患者群において有意に血漿中 NPY 値が高値であったことが報告された。また、動物モデルにおいて星状神経刺激による交感神経刺激において、 β 遮断薬に加えて Y1 受容体遮断薬を併用することにより心室細動閾値を上昇させたことが報告された。一方、慢性期の虚血性心不全において、NPY がカルシウム動態や不整脈作用を及ぼすかどうかについては明らかとなっていない。以上より、本研究では、「虚血性心不全において、交感神経活性化に伴い NPY 発現が変化し、カルシウム過負荷の状況をもたらし、心室性不整脈発生に関与している」と仮説を立てて、虚血性心不全モデルにおいて、NPY がカルシウム動態と心室性不整脈への影響を明らかにすることを目的とする。

【材料と方法】

C57BL/6J マウスの左冠動脈前下行枝を結紮し虚血性心不全モデルマウスを作製した。結紮 4 から 6 週間後のマウスを虚血性心不全モデルマウス (MI 群) とし、偽手術をしたマウスをコントロール群 (sham 群) とした。心エコーで心機能や心室内腔、壁厚を計測した。免疫組織蛍光染色・免疫組織化学染色において、心筋組織中や星状神経節における NPY や NE の発現を評価し、NPY とチロシンヒドロキシラーゼ (TH) タンパク質発現量をポリアクリルアミドゲル電気泳動法で評価した。また、ヒト剖検症例において陳旧性心筋梗塞患者 (prior MI 群) 及び非心臓疾患患者 (非心

臓疾患群)において、心筋の免疫組織化学染色を行い NPY の発現の差異について評価を行った。単離心筋細胞を用い、共焦点顕微鏡でカルシウムウェーブ、活動電位に伴う細胞質内全体のカルシウムイオン濃度の上昇であるカルシウムトランジェントを評価した。ランゲンドルフ灌流心で心室性不整脈の誘発性について評価を行った。ホールセルパッチクランプ法で細胞膜の活動電位発生を評価した。

【結果】

MI 群は sham 群と比較して、左室の拡大と収縮率低下を認め、心重量、肺重量の増加を認めた。マウスモデルの MI 群において、梗塞領域の心筋では NE の発現が sham 群と比較して有意に低下しているにもかかわらず、NPY 発現は有意に上昇した。NPY タンパク質発現量は MI 群で有意に増加し、TH タンパク質発現量は MI 群で有意に低下した。心臓交感神経の上流にある星状神経節における NPY 発現および TH 発現は、両群間において有意差を認めなかった。ヒト剖検症例で、prior MI 群と非心臓疾患群で左室心筋における NPY 発現は、マウスモデルの所見と同様に MI 群で NPY 発現が上昇していることが確認された。虚血性心不全マウスの単離心筋細胞で、NPY 投与群において、拡張期のカルシウムウェーブを認める細胞の割合、1 細胞あたりで認められるカルシウムウェーブの平均回数が増加した。NPY に加え、NPYY1 受容体遮断薬 BIBO3304 を添加すると、拡張期のカルシウムウェーブを認める細胞の割合、1 細胞あたりで認められるカルシウムウェーブの平均回数は有意に低下した。虚血性心不全マウスにおけるランゲンドルフ灌流心で、NPY 投与群では心室期外収縮の平均回数と非持続性心室頻拍及び心室性二段脈を含む複雑性心室期外収縮を認めた割合が有意に上昇した。これに BIBO3304 を添加すると、心室期外収縮の平均回数と複雑性心室期外収縮を認めた割合は有意に低下した。虚血性心不全マウスの単離心筋細胞を用いたパッチクランプ法で電気刺激を与えたのちの 60 秒間に 1 細胞あたりで認められる遅延後脱分極の回数は NPY を添加した群で有意に上昇した。

【考察】

本研究では、虚血性心不全モデルにおいて心筋組織中の梗塞・境界領域を中心に NPY 発現が上昇していることを明らかにした。NPY は心筋梗塞急性期には心筋リモデリングの抑制効果などで正の作用を有している可能性が報告されているが、今回の我々の慢性期モデルではその上昇が遷延しており不整脈基質として負の作用を

有している可能性が示唆された。また、我々のマウスモデルで観察された傾向と同様に、陳旧性心筋梗塞患者のヒト心筋標本で NPY 発現の上昇を初めて示した点から、虚血性心不全の慢性期における NPY がヒトの治療標的となりうることを示唆している。また、同モデルにおいて、NPY 負荷によりカルシウムウェーブの形成と心室性不整脈の惹起を明らかとして、これらは NPY Y1 受容体遮断薬によって抑制可能であった。これらは、NPY Y1 受容体やその下流にあるイノシトール 3 リン酸受容体の発現変化などによる機能的変化が影響している可能性がある。カルシウム過負荷が遅延後脱分極や不整脈発生の主な原因であることを考えると、NPY は特に虚血性心不全において、細胞内カルシウムイオン濃度を是正することにより心室性不整脈を抑制する有効な治療標的である可能性が考えられる。さらに、カルシウム過負荷は不整脈発生に寄与するだけでなく、心不全を悪化させ、心筋線維化とリモデリングを促進する。したがって、今回の知見は、NPY が不整脈の治療と心不全の管理の両者において重要な役割を果たす可能性を示唆している。

【結論】

虚血性不全心モデルにおいて、梗塞心筋領域を中心に NPY 発現は上昇しており、NPY 刺激によりカルシウム過負荷を介して遅延後脱分極が発生し心室性不整脈の増加をもたらしたが、NPY Y1 受容体拮抗薬においてその効果を抑制した。虚血性不全心患者において、NPY シグナルに着目した治療戦略は心室性不整脈治療の新たな選択肢になることが期待される。

2.略語表

ANOVA: analysis of variance

APD₉₀: action potential duration at 90% repolarization

BSA: bovine serum albumin

BW: body weight

CICR: calcium induced calcium release

DAD: delayed afterdepolarization

LV: left ventricle

LVEDD: left ventricular endo-diastolic diameter

LVESD: left ventricular endo-systolic diameter

IP₃: inositol trisphosphate 3

NE: norepinephrine

NPY: neuropeptide Y

NSVT: non-sustained ventricular tachycardia

PLC: phosphoinositide-specific phospholipase C

RyR: ryanodine receptor

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis

TBS: tris-buffered saline

TBST: tris-buffered saline with Tween 20

TH: tyrosine hydroxylase

3.緒言

心不全患者の激増を迎える我が国において、虚血性心疾患の有病率が増加していると報告されており (Shiba *et al*, 2011)、虚血性心不全に対する治療法の開発は喫緊の課題である。その中でも、虚血性心不全による心室性不整脈は致死的な転帰となりうるため、その治療法の開発は極めて重要である (Moss *et al*, 2002; Steinbeck *et al*, 2009; Solomon *et al*, 2005)。β 遮断薬は、心筋梗塞後の虚血性心不全における心室性不整脈の予防に有効である (McMurray *et al*, 2005)。これらの心室性不整脈は、β 受容体シグナル伝達を介して細胞内カルシウム過負荷を引き起こす心筋梗塞後の交感神経活性化が大きく関与しているからである (Meredith *et al*, 1991; Curran *et al*, 2007)。しかし、一部の心室性不整脈はβ 遮断薬による最適な治療を行っても抵抗性を示すことが報告されており (Chatzidou *et al*, 2018)、虚血性心不全における心室性不整脈に関与する新たな経路を同定する必要性が強調されている。

不整脈の発生機序には三つの成因がある。一つ目は何らかの異常により洞結節以外で自発性の活動電位が発生する異所性自動能、二つ目は興奮伝播回路が形成され巡回するリエントリー、そして最後に活動電位の発生から再分極終了直後までにおきる一過性の脱分極である激発活動である。激発活動には、活動電位のプラトー相あるいは再分極相から発生する早期後脱分極 (early after depolarization, EAD) または活動電位再分極終了後に出現する遅延後脱分極 (delayed after depolarization, DAD) の二つに分類される。

DAD は、細胞内カルシウム過負荷をきたす状態において、ナトリウム-カルシウム交換輸送体 (sodium/calcium exchanger, NCX) を介した脱分極として出現する。このようなカルシウム過負荷をきたす原因のひとつとして心筋梗塞後などの過度な交感神経活性化が知られている。活動電位に伴い電位依存性カルシウムチャネルを介して細胞内に流入したカルシウムが、リアノジン受容体 (ryanodine receptor, RyR) に結合して小胞体から細胞質へのカルシウム放出 (calcium induced calcium release, CICR) を引き起こす。細胞質に放出されたカルシウムは、細胞外への流出や、筋小胞体カルシウム ATP アーゼ (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA2) によって小胞体へ再取り込みされることで、拡張期の細胞内カルシウムイオン濃度は低下する。SERCA2 の機能はホスホランバンによって調節され、ホスホランバンのリン酸化によって SERCA2 の機能は亢進する。この心筋細胞内のカルシウム生理的制御をカル

シウムハンドリングと呼ぶ (Ciofalo & Thomas, 1965)。この CICR が次々と伝播する現象はカルシウムウェーブと呼ばれ、DAD の機序の一つとされている。

交感神経活性化に伴いノルエピネフリンが上昇し β 受容体活性化を介して cAMP 依存性プロテインキナーゼとプロテインキナーゼ A の活性化をもたらす。これらは、L 型カルシウムチャネルでの細胞外からのカルシウム取り込みを増加させ、ホスホランバンのリン酸化により SERCA の活性化をもたらし小胞体でのカルシウム取り込みが亢進する。また、プロテインキナーゼ A の活性化は RyR の過リン酸化をもたらし小胞体からのカルシウム異常漏出をもたらし、カルシウムウェーブを引き起こすことによって最終的に激発活動による心室性不整脈が生じうる (図 3-1)。

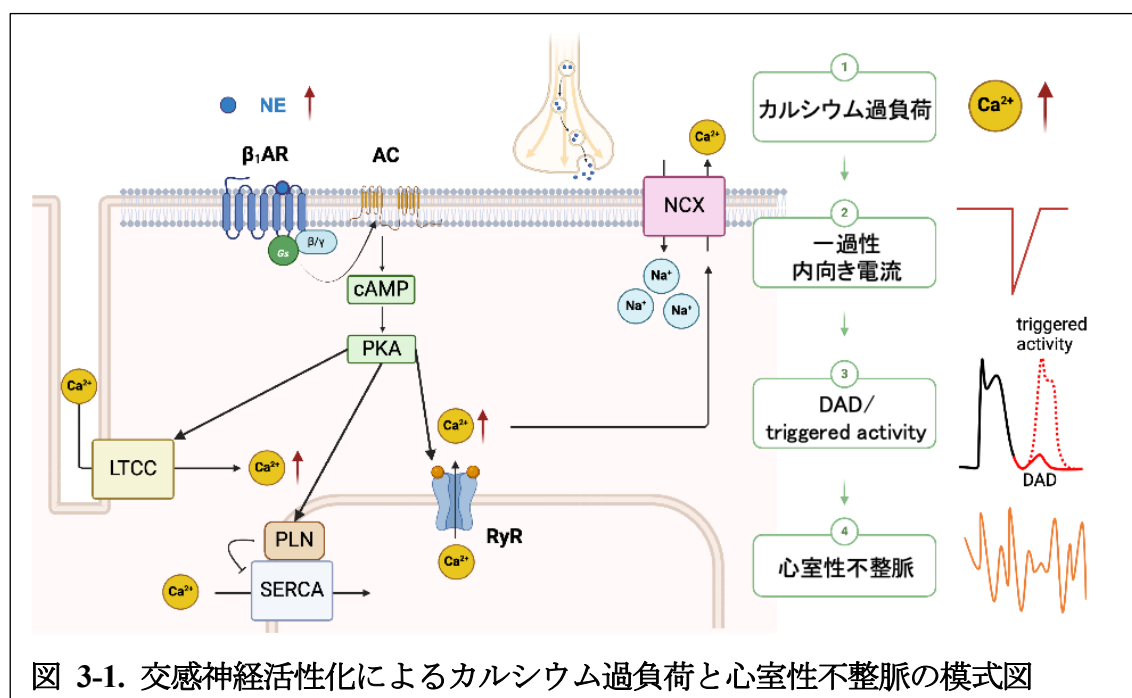
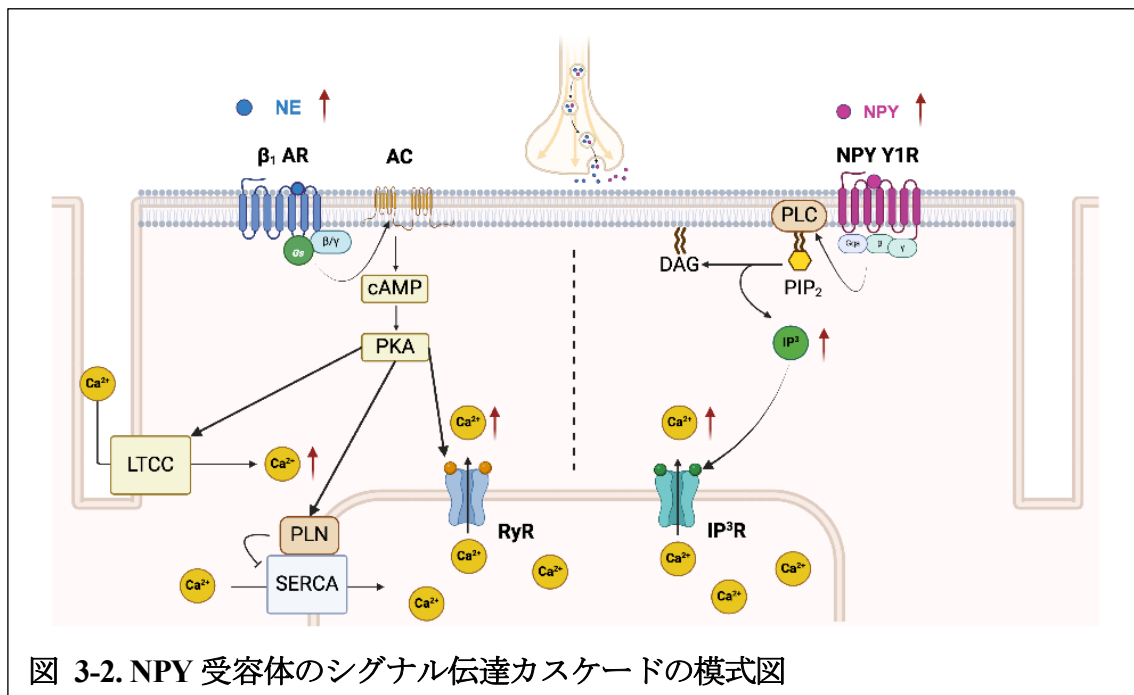
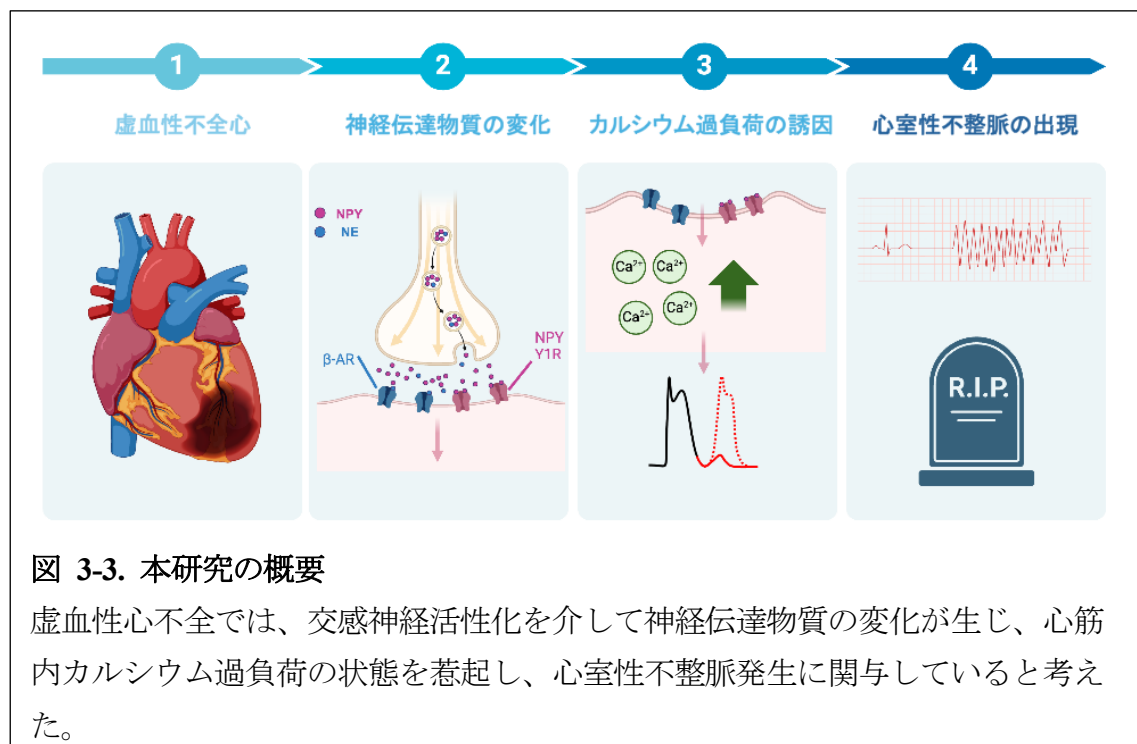


図 3-1. 交感神経活性化によるカルシウム過負荷と心室性不整脈の模式図

神経ペプチド Y (NPY) は 36 残基のペプチドアミドで、心臓に最も多く存在する神経ペプチドであり、交感神経活性化に伴いノルエピネフリンと共放出される (Tatemoto, 1982)。NPY は、生理的状态において細胞内カルシウムトランジェントの増大、ホスホリパーゼ C (PLC) 回路を介してイノシトール 3 リン酸 (inositol trisphosphate, IP3) を増加させ、小胞体上の IP3 受容体からのカルシウムリークをもたらし、NCX を介した DAD の発生させることにより心室性不整脈を惹起することが明らかとなっている (Heredia *et al*, 2005) (図 3-2)。



一方で、虚血性心不全において、NPY がカルシウム動態や催不整脈性を及ぼすかどうかについては明らかとなっていない。そこで本研究では、「虚血性心不全において、交感神経活性化に伴い NPY 発現が変化し、カルシウム過負荷の状況をもたらし、心室性不整脈発生に関与している」と仮説を立て、その作用機序について検証を行うことを目的とした（図 3-3）。



4.実験方法

本研究の全実験は、北海道大学医学部医学研究科東南研究棟 ES4-201 室（承認番号 2021-010）で行った。また、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」および「国立大学法人北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定」を遵守した。本研究計画は北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に承認された（自主臨床試験課題名：病的心における Neuropeptide Y と心室性不整脈に関する後向き研究—[臨床研究番号：自 024-0082]）。研究参加への同意取得には、オプトアウト方式を用いた。本研究はヘルシンキ宣言を遵守し、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に基づき研究内容の情報を公開した。

4.1 虚血性心不全モデルマウスの作製

雄性 10~12 週齢の C57BL/6J マウス（体重 22~26 g）の心臓の左冠動脈前下行枝を結紮して心筋梗塞を作成した。術前にマウスの体重を測定し、塩酸メドメジン 0.3 mg / kg BW、ミダゾラム 4.0 mg / kg BW、酒石酸ブトルファノール 5.0 mg / kg BW の 3 種混合麻酔薬を腹腔内投与し（Kawai *et al*, 2011）、十分な麻酔深度になったことを確認した。70%アルコールで消毒を行い、実体顕微鏡下で手術を行った。手術台に臥位で四肢と尾をテープで固定し、気管挿管のために切歯を絹糸で牽引し頸部を進展位で固定した。頸部正中を皮膚切開の後に、顎下腺と気管前筋を展開した。気管の直線形状を保ち、23 ゲージのポリエチレンチューブを挿入した。半透明のチューブが気管軟骨を通過することを確認した。その後、従量式実験動物人工呼吸器（SN-480-7x2T, Shinano, Tokyo, Japan）に接続し、毎回 110 回、1 回換気量 0.4 ml で人工呼吸を開始し、送気時に前胸部が良好に挙上していることを確認した。

左前胸部を皮切し、大胸筋と小胸筋を牽引して温存し、肋間筋を露出した。第 4 肋間で肋間筋を切開した後に開胸器で視野を展開して心臓を確認した。心膜を切開した後に心臓を半時計方向に旋回させて左冠動脈の走行を確認し、左心耳下縁から 1 mm 程度遠位で 7-0 シルク縫合糸を使用して器械結びを行った。冠動脈結紮後に結紮部遠位の心筋が赤から白色へ色調変化を確認することで、心筋の虚血性変化を確認した。肋間を 7-0 シルク縫合糸（ELP M6-80B2, Akiyama-seisakusyo, Tokyo, Japan）で肋間縫合、4-0 シルク縫合糸（Sof silk™ VS-709, Covidien, Dublin, Ireland）で閉創し、手術を終了した。コントロール群のマウスには sham 手術を施した。これは上記一

連の手技から左冠動脈結紮術を除いた処置を行った。

術後は麻酔からの回復が得られるまで 37°Cの保温パッドで保温を継続しながら待機した。抜管までの時間は、十分に覚醒して自発呼吸が安定して再開する 1 時間とした。手術時間は 20 分程度、開胸時間は 10 分前後であった。

心筋梗塞を作製したマウスを虚血性心不全 (MI) 群、sham 手術を施行したマウスを sham 群とした。

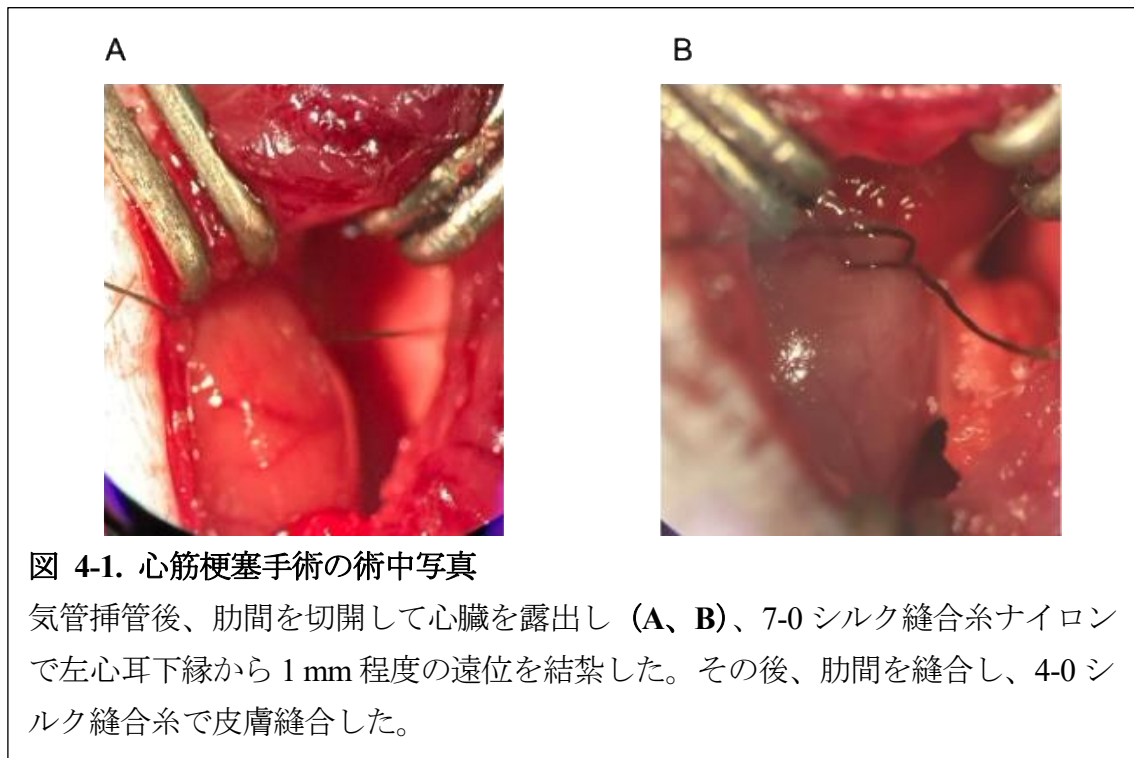


図 4-1. 心筋梗塞手術の術中写真

気管挿管後、肋間を切開して心臓を露出し (A、B)、7-0 シルク縫合糸ナイロンで左心耳下縁から 1 mm 程度の遠位を結紮した。その後、肋間を縫合し、4-0 シルク縫合糸で皮膚縫合した。

4.2 心エコー

心エコー法は非侵襲的な検査であるが実験動物においては安静を保つことが極めて難しいため、麻酔薬を用いることがあるが、麻酔薬によって心抑制が生じて正しく心機能を評価できないことが報告されており、手技に習熟していれば非麻酔下での心エコー法が推奨されている (Pachon *et al*, 2015)。そのため、本研究では非麻酔下で心エコー法を行った。検査台に臥位で四肢と尾をテープで固定し、除毛クリームでマウスの前胸壁を除毛した。超音波診断装置および 12 MHz リニアプローブを用いて、2D 胸骨傍短軸像乳頭筋レベルで最適な像を描出した。M モード法に切り替え、記録紙スピード 40 mm/sec で記録の上、心拍数、左室拡張末期径、左室

収縮末期径、左室前壁壁厚、左室後壁壁厚、左室内径短縮率を計測した（図 4-2）。



図 4-2. 心エコー検査時の写真

マウスを検査台の上に設置し、心エコー検査を実施した。

4.3 免疫組織化学染色

4.3.1 マウス検体

マウスの屠殺後、直ちに心臓及び左星状神経節を摘出して速やかに周囲組織をトリミングし、中性緩衝ホルマリン液に浸潤後パラフィン包埋して保存した。スライディングミクロトームを用いて $4\ \mu\text{m}$ の厚さで連続横断切片を作成した。脱パラフィン処理および親水化処理を行った後、 $400\ \mu\text{g/ml}$ のプロテインキナーゼ K を添加し室温で 15 分間静置した後に、PBS に浸して 5 分 $\times$ 2 回洗浄した。内因性ペルオキシダーゼの不活化処理のため、3%過酸化水素に室温で 5 分浸した後に、PBS で 5 分 $\times$ 3 回洗浄した。一次抗体反応として抗 NPY 抗体（Cell Signaling, Massachusetts, USA; 希釈度 1:1000）と抗 tyrosine hydroxylase（TH）抗体（MERCK, Darmstadt, German; dilution 1:1000）を添加し、 37°C に設定した恒温器で 90 分間インキュベートした。スライドは乾燥防止のためにカバーした。インキュベート終了後、PBS で洗浄（5 分 $\times$ 3 回）した。 $70\ \mu\text{l}$ の抗-FITC HRP 複合体を添加し 37°C 30 分間インキュベートした後に、PBS で洗浄（5 分 $\times$ 3 回）した。DAB 発色させるため 1 タブレットの DAB と 10 ml 蒸留水に 30%過酸化水素 $20\ \mu\text{l}$ を加えた溶液に室温で 15 分間浸した後に蒸留水で洗浄した。対比染色としてヘマトキシリンに数秒スライドを浸

し、各 10 秒ずつ 70%、90%、100%エタノールとキシレンに浸し脱水、透徹処置を行った後に封入し検鏡した。すべての画像は、蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて得た。各領域において、代表的な画像を 3 枚取得し、その平均値をその個体の値とした。MI 群における神経伝達物質の発現は、梗塞領域、境界領域、遠隔領域の 3 つの領域で評価した。これらの評価は sham 群の対応する心筋領域でも行った。

4.3.2 ヒト検体

対象患者

本研究では、2019 年 1 月 1 日から 2024 年 5 月 31 日の間に当院で死後病理解剖を施行された者で、①死後病理解剖時において年齢が 20 歳以上の者、②心筋検体が保管されている者、③研究対象者の遺族（研究対象者の配偶者、子、父母及びこれに準ずる者）から本研究の参加について拒否の申し出がない者を対象とした。心筋梗塞の既往のある 2 症例を prior MI 群、心疾患の既往がない 2 症例を非心臓疾患群として評価を行った。

組織学的評価

4.3.1 の方法と同様に NPY 発現について免疫組織化学染色を行った。ヒト検体においては、すべて心室中隔から採取された検体を用いており、評価領域として心筋間質、血管周囲、心筋外膜の 3 領域に分けて評価を行った。

4.4 免疫組織蛍光染色

マウスの屠殺後、直ちに心臓を摘出して速やかに周囲組織をトリミングし、中性緩衝ホルマリン液に浸潤後パラフィン包埋して保存した。スライディングミクロトームを用いて 4 μm の厚さで連続横断切片を作成した。切片を、抗体希釈液

(DAKO, Glostrup, Denmark) で希釈した NPY 抗体 (Cell Signaling, Massachusetts, USA; 希釈度 1:1000)、NE 抗体 (ISM, Bordeaux, France; 希釈度 1:1000) と共に 4°C で一晩インキュベートした。NE では、STAINperfect Immunostaining Kit (ISM, Bordeaux, France) を用い、指示書に従い免疫染色を行った。一次抗体インキュベーション後、切片を PBS-0.05%および FITC 標識ヤギ抗ウサギ (H+L) (希釈度 1:100) で 2 回洗浄し、30 分間インキュベートした。最後に、サンプルを DAPI (Invitrogen, Massachusetts, USA) で対比染色し、細胞核を可視化した。すべての画

像は、蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて得た。各領域において、代表的な画像を 3 枚取得し、その平均値をその個体の値とした。MI 群における神経伝達物質の発現は、梗塞領域、境界領域、遠隔領域の 3 つの領域で評価した。これらの評価は sham 群の対応する心筋領域でも行われた。

4.5 免疫ブロット法

頸椎脱臼後に、心筋を迅速に摘出し液体窒素で凍結し -80°C で保存した。心筋からのタンパク質抽出、電気泳動、および免疫ブロットを以下の手順で行った。

タンパク質抽出

- 1) 凍結保存したサンプルを氷上で解凍した。氷冷した 10× Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) を蒸留水で 10 倍希釈し、99.5%エタノール (Wako, Osaka, Japan) で希釈した 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) およびセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼを阻害するプロテアーゼインヒビターカクテル錠である complete Mini (Roche, Indiana, USA) を 1 錠添加した。組織サンプルを入れ、ダウンズ型ホモジナイザー (BioMasher II, nippi, Tokyo, Japan) でホモジナイズした。
- 2) ホモジナイズしたサンプルを遠心分離し (15000 g, 10 分, 4°C)、ペレットを吸引しないように上清を新しいエッペンドルフチューブに移した。長期保存のため、-80°C で冷凍保存した。

タンパク質濃度測定

抽出したサンプルタンパク質の濃度測定は、以下の手順の通り、ビシンコニン酸法で測定を行った。

- 1) CELLSTAR 96 穴マイクロプレート (Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria) に BCATM Protein Assay Reagent A と BCATM Protein Assay Reagent B (Thermo Scientific, Rockford, USA) を 50 対 1 の割合で混合した working reagent を作成し、各ウェルに 200 µl ずつ分注した。
- 2) ブランクとして 1 ウェル空白を置き、2 mg/ml のアルブミンスタンダードを 1、2、4、8、12、16 µl ずつウェルに混合した。

- 3) 測定するサンプルは各 2 μ l ずつウェルに注入した。
- 4) 37°Cで 30 分間インキュベートした。
- 5) タンパク濃度測定装置本体 (Immuno Mini Model NJ-2300, Biotec Tokyo, Japan) およびソフト (immuno mini, Biotec, Tokyo, Japan) で、540 nm 波長の吸光度を計測した。
- 6) スタンダードタンパク質の平均値の一次直線を算出し、スタンダードタンパク質濃度から得た検量線を基にサンプルタンパク質濃度を算出した。上記のタンパク質濃度測定は、スタンダード、サンプルとも同一サンプルを二重で各ウェルに置き、2 つの平均値で算出した。

サンプルの調製

- 1) 2-メルカプトノールを添加した Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 用サンプル緩衝液で、2.5 μ g/ μ l のサンプル溶液を作成した。ボルテックスミキサーで溶液を攪拌した。
- 2) MULTI HEATER TYPE MH-36 (WAKAMORI CO., LTD. Tokyo, Japan) にて 100 °C で 5 分間加温した。
- 3) 短時間遠心してエッペンドルフチューブの蓋に付着した水滴を落とし、ボルテックスミキサーで攪拌した。

電気泳動

- 1) 電気泳動槽 (Criterion セル, Bio-Rad Laboratories, California, USA) に SDS-PAGE 泳動緩衝液*1 を注入し、電気泳動用のタンパク質ゲルをセットした。電気泳動用のタンパク質ゲルは Criterion TGX プレキャストゲル (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA) を使用した。使用するゲルは、AnyKD の濃度ゲルを使用した。
- *1 SDS-PAGE 泳動緩衝液の組成: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS
- 2) 5 μ l のサンプルをピペットマンで各ウェルに注入し、サンプルレーンの端に分子量マーカーである、カラーマーカー (Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range, Bio-Rad Laboratories) を注入した。
- 3) POWER PAC 300 (Bio-Rad Laboratories) にて、60 V の定電圧で 30 分間、引き

続いて 120 V の定電圧でおよそ 1 時間 30 分泳動し、サンプルがゲルの先端まで移動するのを確認して泳動を終了した。

ウェスタンブロッティング

セミドライ式ブロッティングで転写した。

- 1) タンパク質ゲルを PVDF 膜である Trans-Blot Turbo™ (Bio-Rad Laboratories) の上に乗せた。
- 2) 1.0 A、25 V で 30 分間転写した。

ブロッキング～一次抗体反応～二次抗体反応

1 次抗体には、ウサギ抗体 NPY 抗体 (Cell Signaling: 希釈度 1:1000)、ヒツジ抗体 TH (MERCK: 希釈度 1:1000) を用い、2 次抗体には、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ標識免疫グロブリン G 二次抗体 (Abcam: 希釈度 1:5000) を用いた。

- 1) メンブレンをブロッキング溶液に移して、室温で 1 時間振蕩した。ブロッキング溶液として 3% スキムミルクおよび 3% BSA を用いた。
- 2) 1×TBST^{*1} で振蕩しながら洗浄 (10 分間×3 回) した。
- 3) 1 次抗体希釈液 (ブロッキング溶液と同じ溶液で希釈) に浸し、4℃で 1 晩抗体反応を行った。
- 4) 1×TBST で振蕩しながら洗浄 (10 分間×3 回) した。
- 5) 2 次抗体希釈液 (ブロッキング溶液と同じ溶液で希釈) に浸し、室温で 1 時間抗体反応を行った。
- 6) 1×TBST で振蕩しながら洗浄 (10 分間×3 回) した。

^{*1}1×TBST の組成: 20×トリス緩衝生理食塩水 (0.4 M Tris/HCl (pH 7.6)、3 M NaCl) を純水で 20 倍に希釈し、0.1% となるように polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween20®, Wako, Osaka, Japan) を加えた。

検出

- 1) PVDF 膜の全面を覆うように検出試薬をかけ、3 分間室温で静置した。検出試薬には ECL Prime (RPN2232, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を使用した。

- 2) ウェスタンブロッティング撮影用イメージングシステムで可視化されたバンドを検出した。

画像解析ソフト Image J (U.S. National Institutes of Health) を用いて集積光濃度を定量して解析した。

4.6 カルシウムイメージング

4.6.1 心筋細胞単離

麻酔下で心筋を迅速に摘出し、以下の手順で心筋細胞を単離した。

- 1) 抗凝固目的に塩酸ヘパリン (400 IU ; AY Pharma, Tokyo, Japan) を腹腔内投与した。
- 2) 5 分後、マウスを屠殺して心臓を摘出し、氷冷した Perfusion buffer 液^{※1}に漬けた。

※1 Perfusion buffer 液 (pH 7.4) の組成 : 135 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.33 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 1 mM MgCl₂, 10 mM 2, 3-Butanedione-monoxime, 5 mM Taurine

- 3) Perfusion buffer 内で胸腺組織を除き、上行大動脈を露出した。
- 4) 上行大動脈に 23 ゲージ針を挿入し、4-0 絹糸で固定した。
- 5) ランゲンドルフ装置 (図 4-5) に接続した。37°C に保温し、酸素でバブリングした Perfusion buffer 液で逆行性灌流を 3ml/時間で開始した。
- 6) 1 分後に酵素液に変更した。酵素液は、Perfusion buffer 液にコラゲナーゼ (0.5 mg/ml, WAKO, Tokyo, Japan) とプロテアーゼ (0.1 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を溶解したものを使用した。
- 7) 10 分後、BufferA に漬けた。BufferA は Perfusion buffer 液に BSA (5mg/ml, NACALAI TESQUE, Kyoto, JAPAN) を溶解したものを使用した。
- 8) BufferA 内で両心房を取り除いて残った心室筋を小切片に切除し、100 μm セルストレーナー (Falcon, Tewksbury, MA, USA) で濾過した。
- 9) 10 分後、沈殿したペレットを 1.2mM カルシウム Tyrode 液^{※2}に移した。単離心筋細胞は単離後 4 時間以内に使用した。

※2 1.2mM カルシウム Tyrode 液 (pH = 7.4) の組成 : 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂·2H₂O, 10 mM HEPES, 5 mM glucose

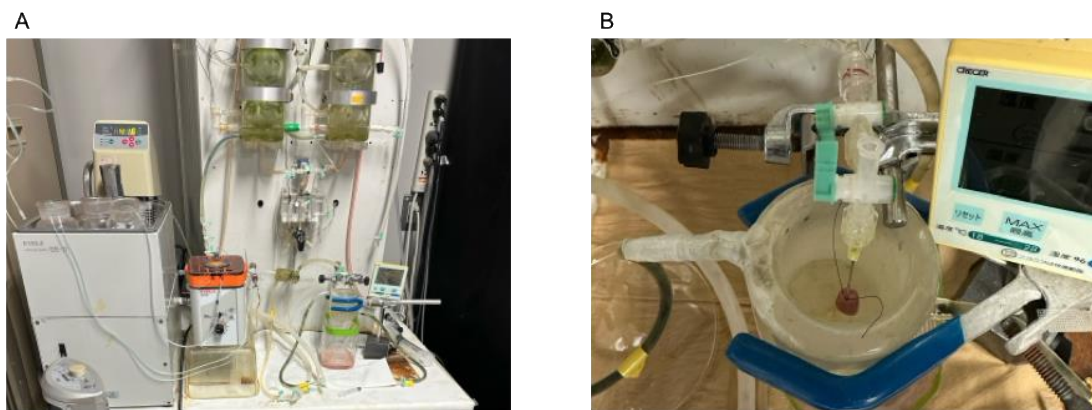


図 4-5. ラングENDORF装置の写真

(A) 左に恒温槽、真ん中にペリスタティックポンプがあり、右手に摘出した心臓を設置する。摘出した心臓の周囲には、風を防ぎ、温度を一定に保つためのチャンバーを設置し、チャンバー内は温水が灌流している。(B) 設置した心臓とその周りのチャンバーを示す。

4.6.2 心筋細胞のカルシウム色素染色

ガラスボトムディッシュ (Matsunami, Osaka, Japan) に、40 $\mu\text{g/ml}$ に希釈したラミニン (Wako, Osaka, Japan) を添加し、常温で1時間インキュベートした。残った器質を吸引し、穏やかにリンスした。ガラスボトムディッシュに5 μM の Fluo-4 AM、0.04% (w/v) pluronic F-127、1.25 mM Probenecid (Dojindo, Kumamoto, Japan) を含む1.2 mM カルシウム Tyrode を添加し、心筋細胞を滴下した。遮光下、室温で30分間インキュベートした。溶液を取り除き、1.2 mM カルシウム Tyrode 液を添加した。

4.6.3 共焦点レーザー顕微鏡

カルシウムウェーブの測定は、アルゴンイオンレーザーと倒立顕微鏡 (Axio Observer Z.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を組み合わせた共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-710, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を使用した。対物レンズは、油浸18Plan-Neofluor 対物レンズ (40倍、開口数1.3) を使用し、励起波長を488 nm、蛍光波長を493-630 nm とした。ガラスボトムディッシュに装着した電極による field stimulation により心筋細胞の電気刺激 (矩形波、7-10 V、0.75 msec) を0.5 Hzで行った。撮影はラインスキャンモードで行った。ラインスキャンモードは設定し

た線上を繰り返しスキャンすることで、1次元の空間情報と2次元の時間情報を含む2次元画像を作製する。単離心筋細胞の縦軸に平行な線上を繰り返しスキャンした (327.9 Hz)。

4.6.3-1 カルシウムトランジェント

0.5 Hz で field stimulation をおこない定常状態に達した後、ラインスキャンモードで撮像した。撮影した画像は Image J で解析し、心筋細胞の縦軸に平行に、拡張期の基線となっている蛍光強度 (F_0) に対する蛍光強度 (F) の比率 (F/F_0) を測定した。

4.6.3-2 カルシウムウェーブ

0.5 Hz で field stimulation を行い、安定してカルシウムトランジェントを認める細胞のみを解析対象とした。カルシウムトランジェントが定常状態に達した後にペーシングを停止し、約1分間のカルシウムウェーブの回数を比較した。

4.7 電気生理学的記録

4.7.1 心筋細胞単離

4.6.1 の方法と同様に行った。

4.7.2 ホールセルパッチクランプ法

パッチクランプ法による膜電位固定を行い、全細胞電流を測定した。パッチクランプ法は、単离心筋細胞にガラス電極を接近させ陰圧をかけることで細胞と一体化させ、細胞全体の電位や電流を測定する手法である。パッチ電極はガラス管キャピラリー (Borosilicate Glass Capillaries. World Precision Instruments, Inc, Sarasota, Florida, USA) を牽引器 (Model P-97, Stutter Instrument Company, California, USA) で引いて作製し、熱線に近づけて先端の形状を整えるヒートポリッシュを行った後、Pipette solution 液*1 で満たした。ガラス電極は抵抗値が 2~5 M Ω のものを使用した。細胞内電位の測定は EPC10 パッチクランプ増幅器

(HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz, Germany) を用いて記録し、増幅器に内蔵されたアナログ-デジタル変換回路から細胞内電位のデータを出力して、コンピューターに記録した。膜電流の記録およびパルスプロトコル制御には、Patchmaster ソフトウェア (HEKA Elektronik) を使用した。

単離心筋細胞をプレート上に滴下し、固着のため 5 分間待った。その後 Bath solution 液を滴下し、顕微鏡による目視及び電極の抵抗の変化を指標に単離細胞と電極を接触させ、シリンジにて陰圧をかけギガオームシールを形成した。さらに陰圧をかけることで細胞膜を破り、ホールセルを形成した。パッチクランプ法は室温にて行った (24~25°C)。以下の 2 つのプロトコールで実験的に DAD の観察を行った。静止膜電位が -60 mV 以下の細胞を解析の対象とした。

プロトコール : 1 nA、3 msec、0.5 Hz の電流を 5 回与えたのち、30 秒間で起きる活動電位を解析した。

0.5 msec 以内に 1 mV 以上電位が上昇したものを DAD、膜電位が脱分極しオーバーシュートしたものを自発的活動電位 (spontaneous action potential) と定義した。

※1 Pipette solution 液 (pH 7.25) の組成: 30 mM KCl, 110 mM K-aspartate, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0.1 mM EGTA.

※2 Bath solution 液 (pH 7.4) の組成: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glucose.

4.8 不整脈誘発性の検討

4.8.1 ランゲンドルフ灌流心

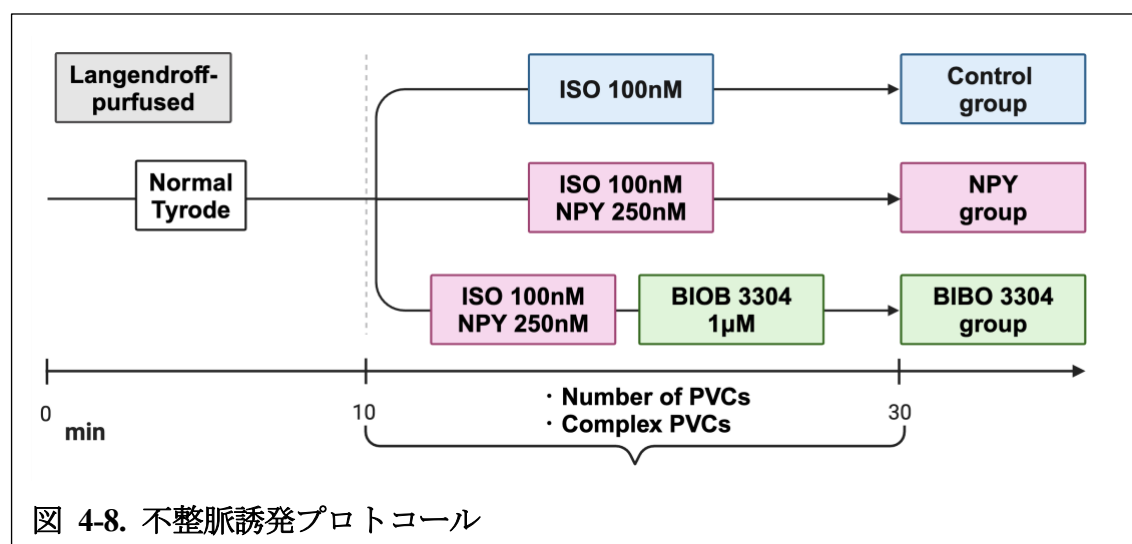
- 1) 抗凝固を目的として塩酸ヘパリン (400 IU ; AY Pharma, Tokyo, Japan) を腹腔内投与した。
- 2) 5 分後、マウスを頸椎脱臼により屠殺して心臓を摘出し、氷冷したカルシウム Tyrode 液※1に漬けた。

※1 カルシウム Tyrode の組成 (pH 7.4) : 143 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.33 mM NaH₂PO₄, 5 mM HEPES, 5.5 mM glucose, 0.5 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂

- 3) カルシウム Tyrode 液内で胸腺組織を除き、上行大動脈を露出させた。
- 4) 上行大動脈に 23 ゲージ針を挿入し、4-0 絹糸で固定した。
- 5) ランゲンドルフ装置に接続した。37 °C に保温し、酸素でバブリングしたカルシウム Tyrode 液で逆行性灌流を 3 ml / 時間で開始した。
- 6) 灌流心は 37 °C に保温されたチャンバー内で固定し、数分間拍動が安定していることを確認した後、実験に使用した。

4.8.2 不整脈誘発性の評価

摘出灌流心の後壁に単極ペーシング電極、右室、左室にそれぞれ心電図記録用の単極電極を装着した。ランゲンドルフ装置後 10 分間は、通常の Tyrode 液で灌流を行った。次に、①100 μ M のイソプロテレノール (ISO) を含む群、② ①に加えて NPY 250 nM を含む群、③ ②に加えて NPY Y1 受容体拮抗薬である BIBO3304 を 1 μ M 含む群、の 3 群に分けて 20 分間の間、心室期外収縮 (PVC) と心室性二段脈及び非持続性心室頻拍 (NSVT) を含む Complex PVC の発生率を観察した (図 4-8)。心室性期外収縮は以前の QRS 波形と異なり頻拍周期が変化したものと定義し、PVC 波形が 3 連発以上のものを心室頻拍と定義した。



4.9 統計学的検討

得られた数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。2 群間の平均値の差の検定は、Student's *t*-test を用いて行なった。3 群間以上の平均値の差の検定に関しては、必要に応じて one-way analysis of variance (ANOVA) を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法を用いた。2 群間の頻度検定に関しては Fisher の正確検定を用いて行った。解析ソフトは Prism 10 (GraphPad Software、CA、USA) を使用した。 $P < 0.05$ を有意と定義した。

5. 実験結果

5.1 動物特性、心エコーデータ

表 5-1-1 に術後 28 日の体重、臓器重量の結果を示す。体重で標準化した左室重量や肺重量は MI 群で sham 群と比較し、有意に増加した。表 5-1-2 に術後 28 日の心エコー指標の結果を示す。心エコーで評価した左室内径や左室後壁厚は MI 群で sham 群と比較し、有意に増加し、左室短縮率は有意に低下した。心拍数は各群に差はなかった。図 5-1 に MI 群の代表的な心エコー画像を示す。左室内径は MI 群で sham 群と比較し、有意に増加し、左室短縮率は有意に低下した。

表 5-1-1. 術後 28 日の体重及び臓器重量評価

データは平均値±標準誤差。* $P < 0.05$ vs. sham 群。Unpaired t test を用いて検定を行った。

	Sham 群 (n = 6)	MI 群 (n = 6)
体重、g	26.0 ± 0.30	$24.7 \pm 0.27^*$
左室重量/体重、mg/g	3.10 ± 0.11	$4.07 \pm 0.09^*$
肺重量/体重、mg/g	4.40 ± 0.04	$5.08 \pm 0.14^*$

表 5-1-2. 術後 28 日の心エコー評価

データは平均値±標準誤差。* $P < 0.05$ vs. sham 群。Unpaired t test を用いて検定を行った。

	Sham 群 (n = 10)	MI 群 (n = 10)
左室拡張末期径、(mm)	3.22 ± 0.05	$5.47 \pm 0.15^*$
左室収縮末期径、(mm)	1.58 ± 0.03	$4.72 \pm 0.16^*$
左室内径短縮率、(%)	50.9 ± 0.39	$13.9 \pm 0.72^*$
左室前壁厚、(mm)	0.91 ± 0.02	$0.45 \pm 0.02^*$
左室後壁厚、(mm)	0.88 ± 0.03	0.81 ± 0.03
心拍数、(bpm)	676.8 ± 8.8	674.1 ± 12.45

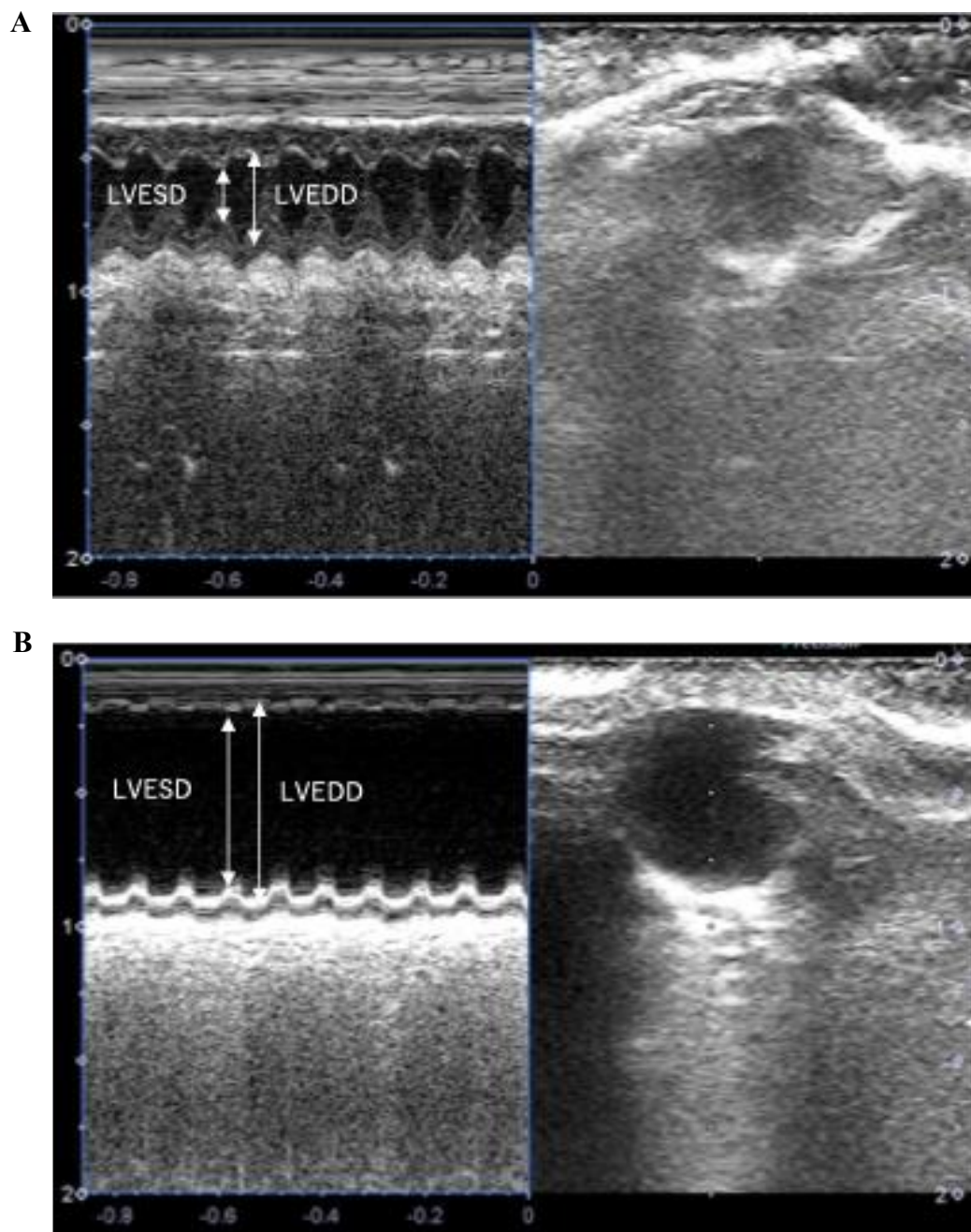


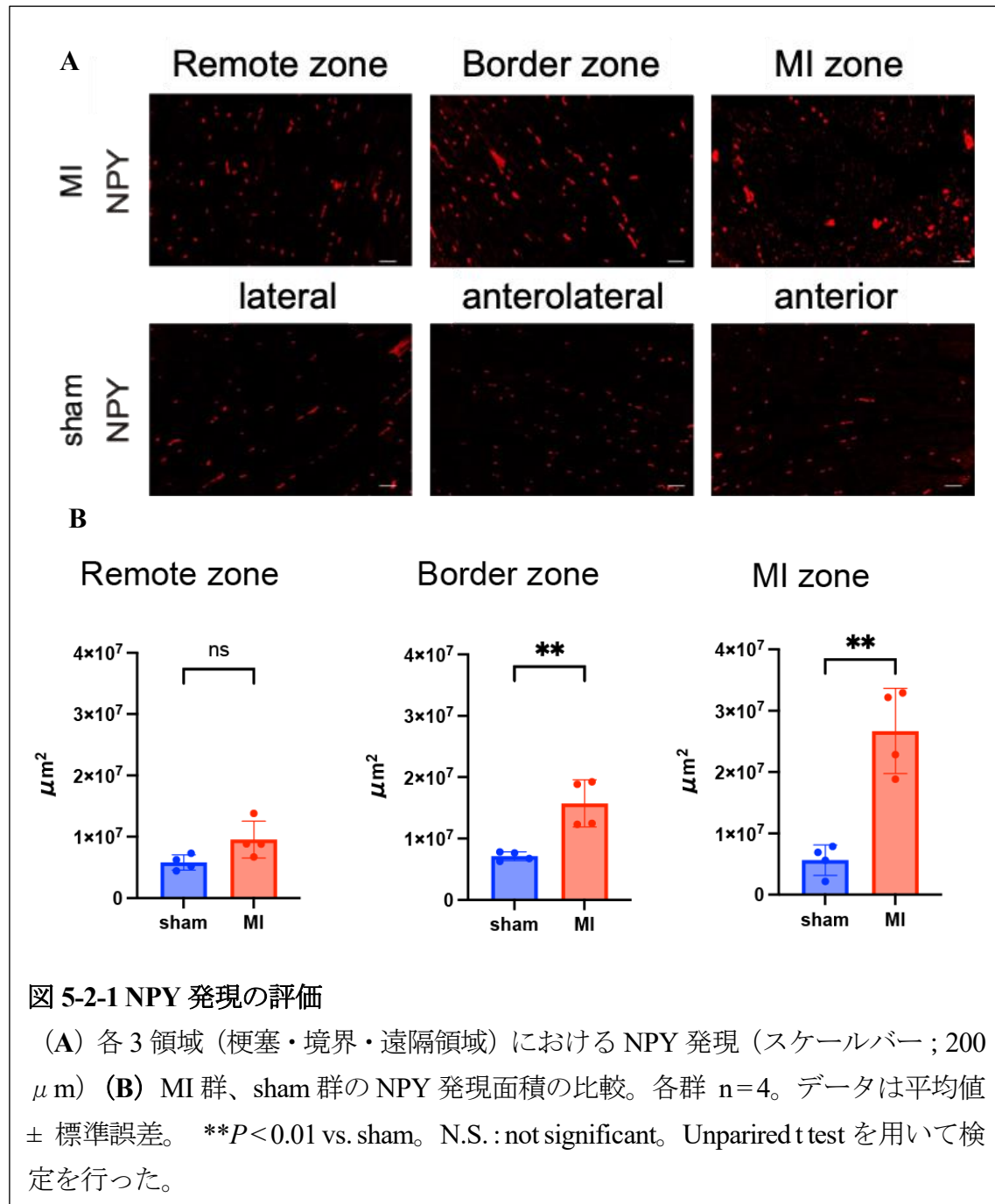
図 5-1 sham 群 (A) および MI 群 (B) の代表的な心エコー画像

胸骨傍短軸像乳頭筋レベル、M モード方で記録した。横軸が時間 (sec)、縦軸は長さ (mm) を表す。MI 群で左室内径の拡大、左室内径短縮率の低下を認めている。

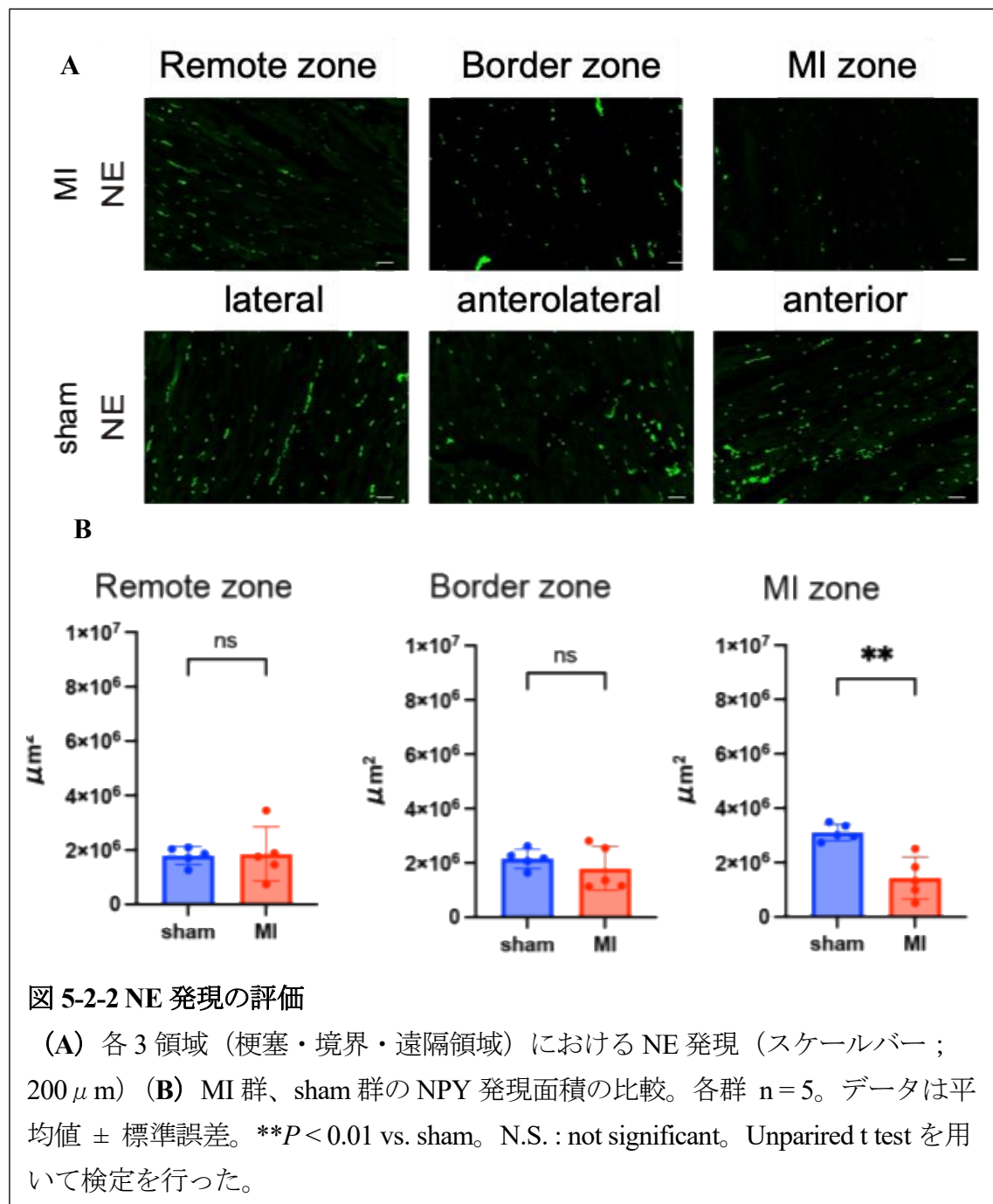
LVEDD : left ventricular end-diastolic diameter (左室拡張末期径)、LVESD : left ventricular end-systolic diameter (左室収縮末期径)

5.2 虚血性心不全モデルマウスにおける NPY と NE の発現

まず、本研究で着目している交感神経系の神経伝達物質である NPY と NE について、術後 28 日の心筋における発現量や分布について、組織学的評価を行った。NPY 発現について、虚血性心不全モデルで梗塞領域及び境界領域で sham 群と比較して有意に NPY 発現が上昇していた（梗塞領域: $P < 0.0001$, 境界領域 $P < 0.001$ ）（図 5-2-1）。



次に NE 発現について、NPY と対照的に虚血性心不全モデルの梗塞領域で sham 群と比較して有意に NE 発現が低下していた（梗塞領域: $P < 0.001$ ）（図 5-2-2）。



5.3 NPY 及び TH のタンパク発現

組織学的所見では、NPY は MI 群で有意に発現が上昇し、NE は MI 群で有意に発現が低下している所見を認めた。他のモダリティでの評価を追加するため、梗塞領域を含む左室心筋でのタンパク発現の評価を行った。

NPY については、MI 群において有意にタンパク発現量が上昇し ($P < 0.05$)、NE 合成の調整因子であるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) は MI 群で有意にタンパク発現量が低下していた ($P < 0.0001$) (図 5-3)。以上の結果より、虚血性心不全モデルでは、梗塞・境界領域を中心に NPY の発現は亢進する一方、NE の発現は低下していた。

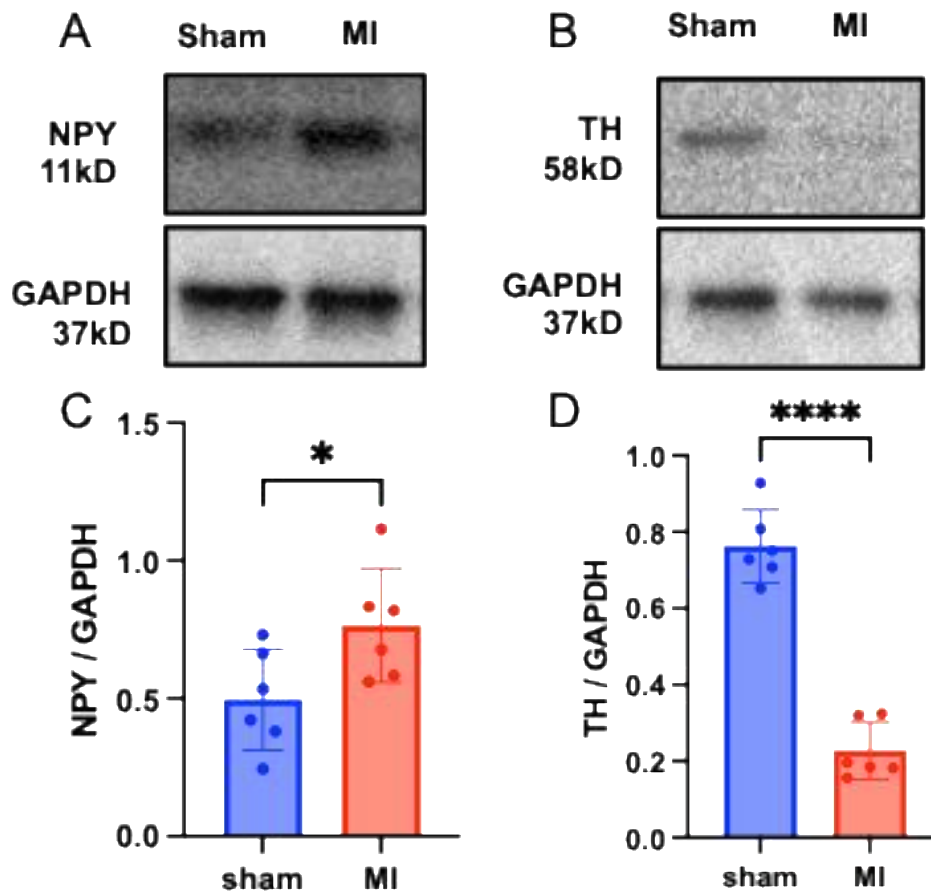


図 5-3 NPY, NE のタンパク質発現の評価

ウエスタンブロット解析で梗塞領域を含む左室心筋組織の NPY 及び TH タンパク質発現を定量評価した。(A、B) それぞれ NPY、TH の代表的なブロットを示す。(C、D) NPY 及び TH の sham 群と MI 群の比較。各群 $n=6$ 。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。* $P<0.05$ 、**** $P<0.0001$ vs. sham。N.S.: not significant。Unpaired t test を用いて検定を行った。

5.4 心筋層別の NPY 発現の組織学的評価

心臓交感神経は心外膜側に多く、心内膜側に少ない分布となっていることが報告されている。そのため、虚血性心不全モデルにおいて、交感神経伝達物質である NPY の心筋外・内膜側での発現の差異について、境界・遠隔領域において評価を行った。境界領域においては、外膜側・内膜側両方で NPY 発現は sham 群と比較して上昇していた (梗塞領域: $P<0.0001$, 境界領域 $P<0.001$)。遠隔領域において、外・内膜側では両群間で差を認めなかった (図 5-4)。

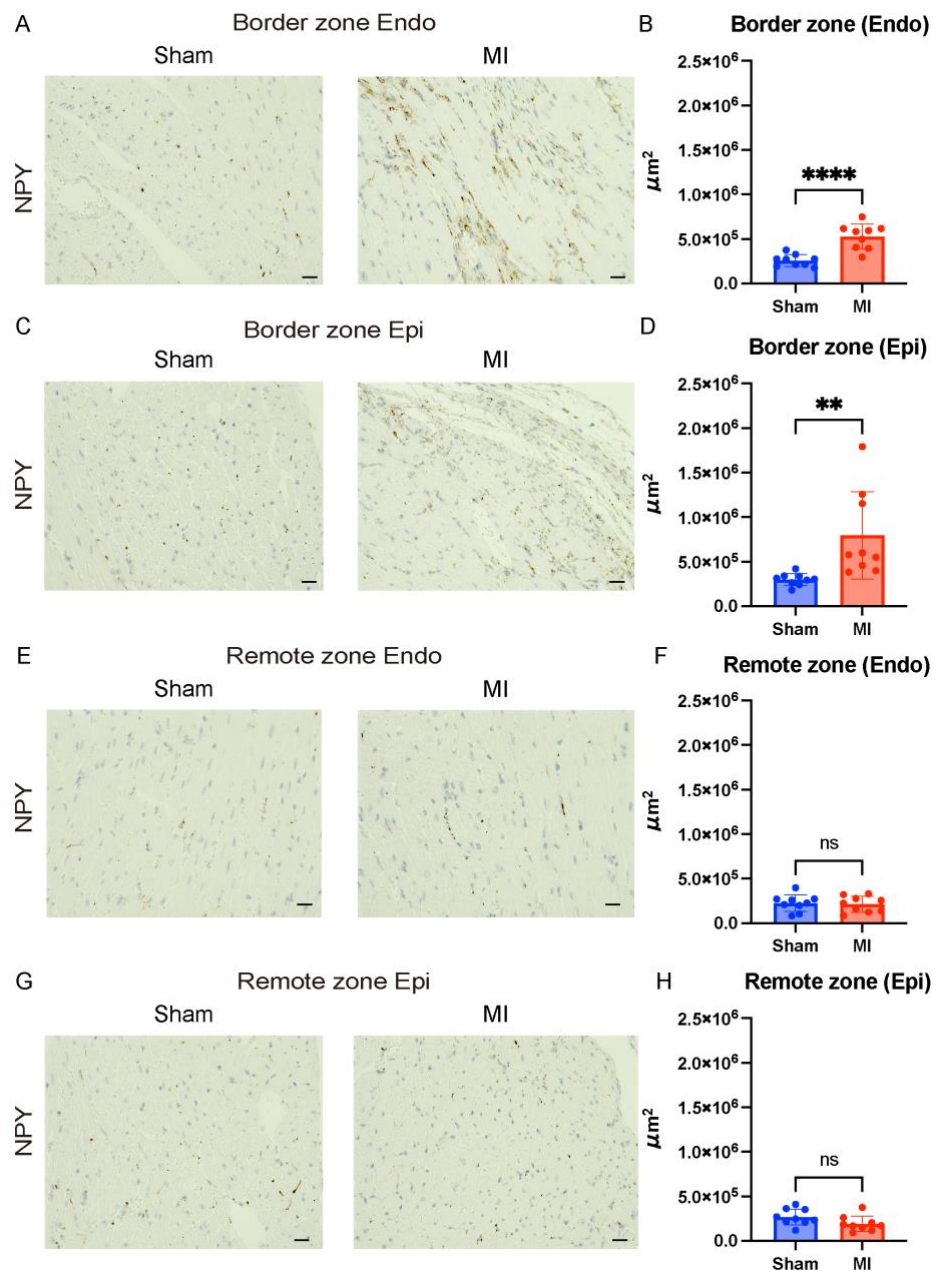


図 5-4 心筋層別の NPY 発現の組織学的評価

虚血性心不全 (MI) 群における心筋層別の NPY 発現の評価。(A、B) 境界領域、心筋内側の NPY 発現の代表絵と sham 群との比較。(C、D) 境界領域、心筋外側の NPY 発現の代表絵と sham 群との比較。(E、F) 遠隔領域、心筋内側の NPY 発現の代表絵と sham 群との比較。(G、H) 境界領域、心筋内側の NPY 発現の代表絵と sham 群との比較。スケールバー ; 200 μ m。各群 n = 9。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。** $P < 0.01$ 、**** $P < 0.0001$ vs. sham。N.S. : not significant。Unpaired t test を用いて検定を行った。Endo; 心筋内側; Epi; 心筋外側。

5.5 虚血性心不全モデルにおける心筋 NPY 発現の経時的変化

虚血性心不全モデルにおける、NPY 発現の時間経過についても検証を行った。NPY レベルは7日目で梗塞領域・境界領域に広く発現するようにピークに達して、その後減少傾向となるも、14-28日目では上昇したままであった（図 5.5）。

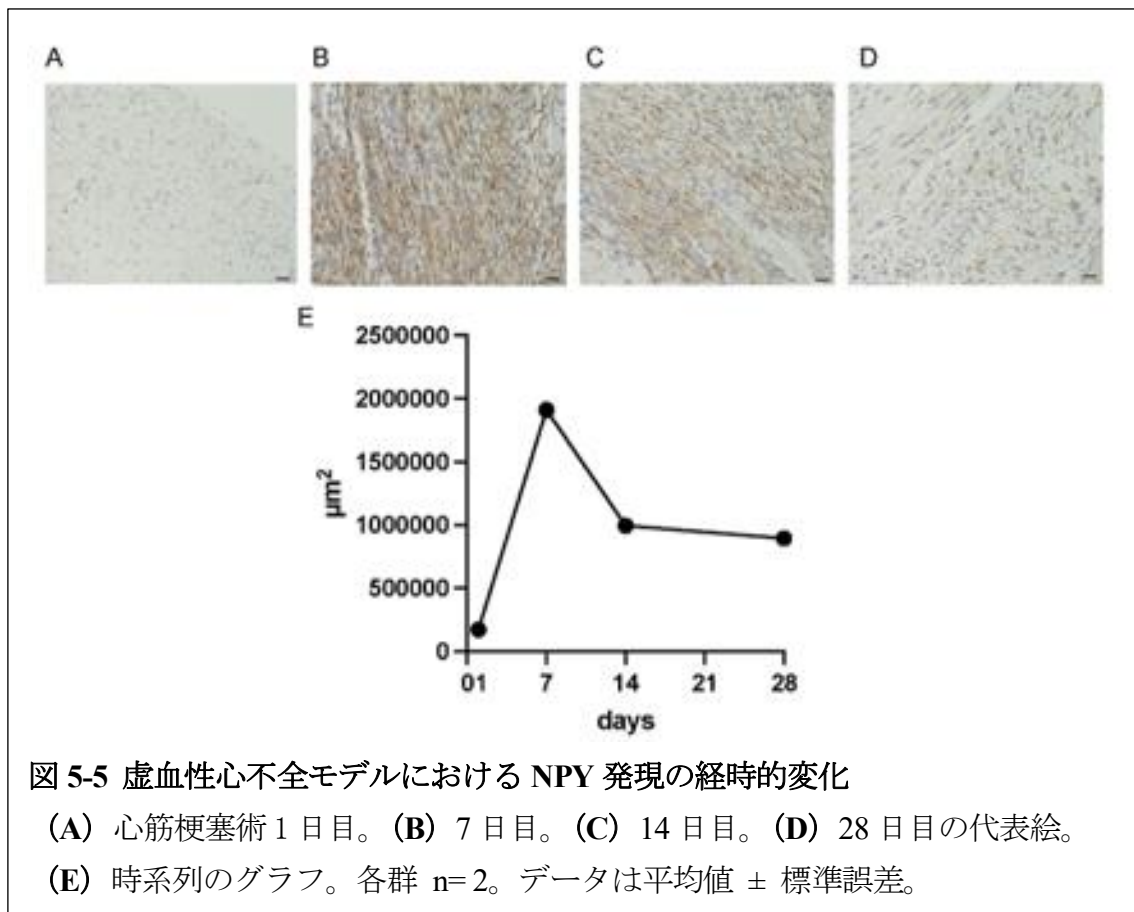


図 5-5 虚血性心不全モデルにおける NPY 発現の経時的変化

(A) 心筋梗塞術 1 日目。(B) 7 日目。(C) 14 日目。(D) 28 日目の代表絵。

(E) 時系列のグラフ。各群 n=2。データは平均値 ± 標準誤差。

5.6 ヒト心筋における NPY 発現の評価

今回我々は、当院で行われた剖検症例で、心筋梗塞の既往のある prior MI 群と非心臓疾患群の 2 群で左室心筋における NPY 発現の組織学的評価を行った。両群の患者特徴について表 5-6 に示す。Prior MI 群は、非心臓疾患群と比較して各領域において NPY 発現が多い所見が得られた（図 5-6）。以上より、陳旧性心筋梗塞患者において我々の虚血性不全心モデルと同様に NPY 発現が上昇していることが確認された。

表 5-5 各群の患者特徴

	年齢	性別	部位
非心臓疾患 1	73	男性	左室中隔
非心臓疾患 2	63	男性	左室中隔
陳旧性心筋梗塞 1	83	男性	左室中隔
陳旧性心筋梗塞 2	68	男性	左室中隔

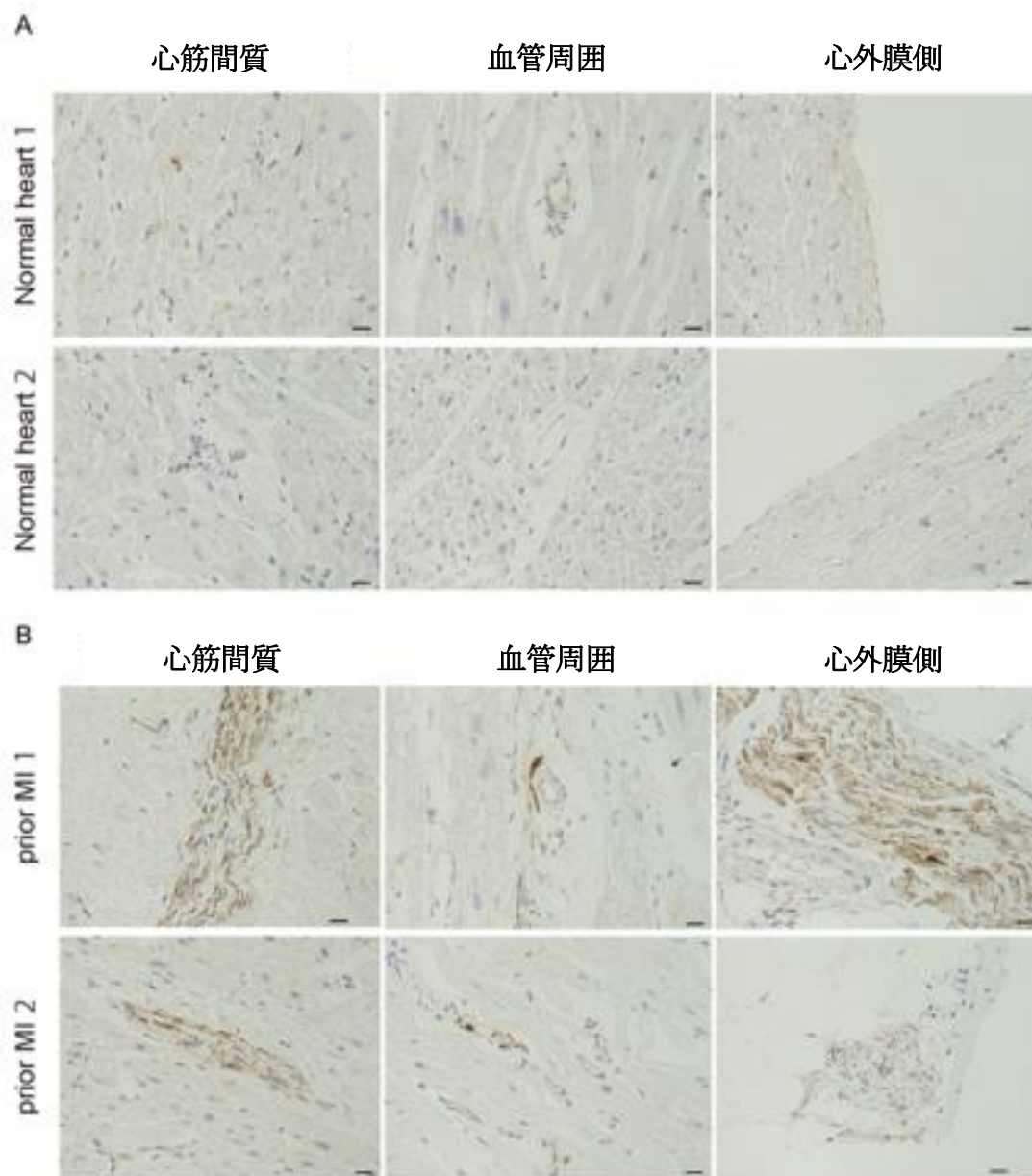


図 5-6 ヒト心筋における NPY 発現の評価

(A, B) 心筋梗塞の既往のある prior MI 群と、非心臓疾患群 (Normal heart) における各領域の NPY 発現の代表絵。スケールバー ; 200 μ m。

5.7 星状神経節における NPY 発現の組織学的評価

心臓交感神経系の上流にある星状神経節における NPY 発現の組織的な評価を行った。星状神経節は主に、①Type 1 ; 細胞質とゴルジ体が陽性、②Type 2 ; ゴルジ体のみが陽性、③Type 3 ; どちらも陰性、の 3 種類に大別された。それぞれ、

Type1、Type2、Type3、Type1+2 の陽性割合について検討を行ったが両群間に有意な差は認めなかった。また、TH の発現評価も行ったが、こちらも両群間に有意な差は認めなかった (図 5-7)。以上より、心臓交感神経系の上流である星状神経節においては、我々の虚血性心不全モデルでは NPY や TH の変化は生じていない可能性が示された。

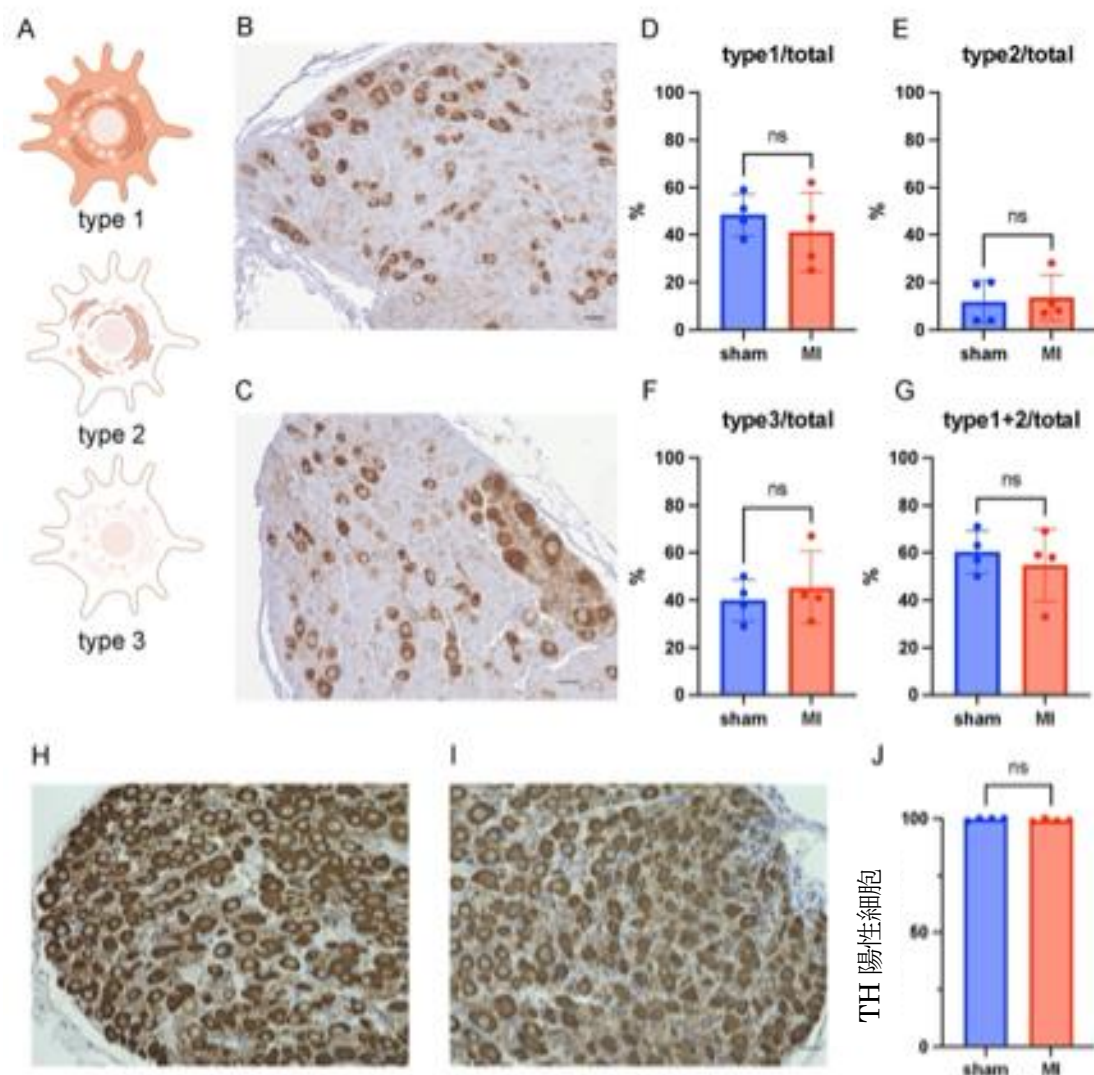


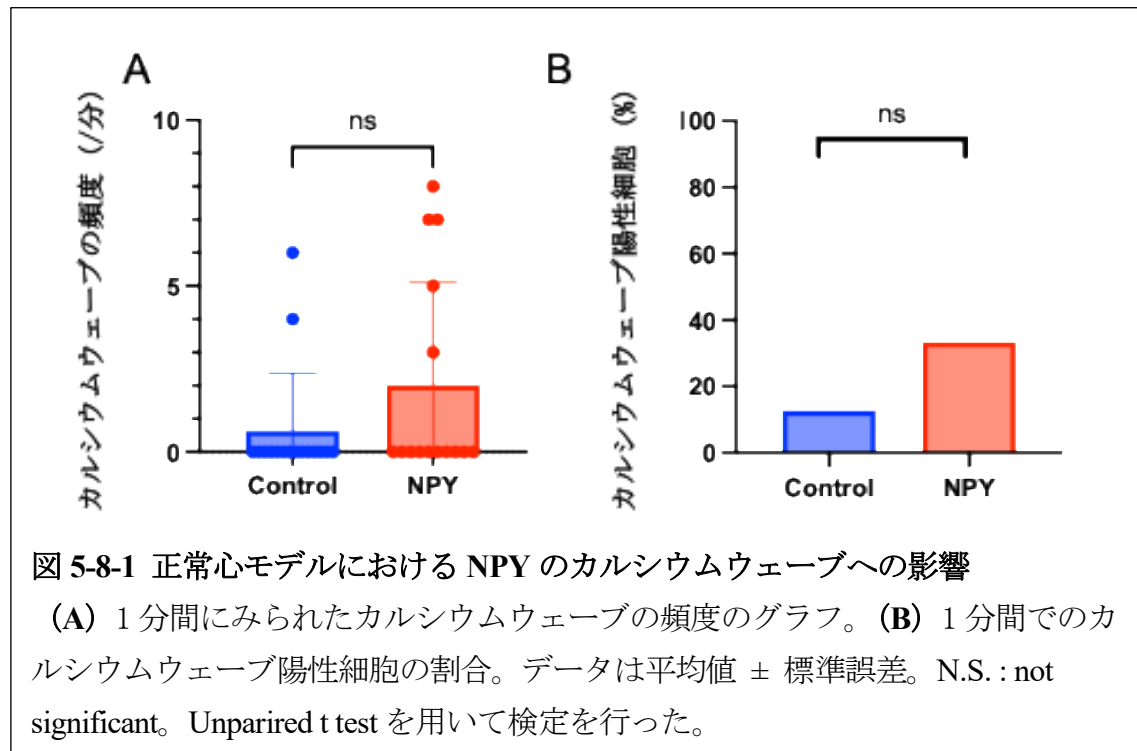
図 5-7 星状神経節における NPY、TH 発現の評価

(A) それぞれの type の代表絵。(B) sham 群の NPY 免疫組織染色の代表絵。(C) MI 群の NPY 免疫組織染色の代表絵。(D-G) type1、2、3、1+2 の全細胞に対する NPY 陽性細胞の割合。(H) sham 群の TH 免疫組織染色の代表絵。(I) MI 群の TH 免疫組織染色の代表絵。(J) 全細胞に対する TH 陽性細胞の比率。N.S.: not significant. 各群 n=4。フィッシャーの正確確率検定を用いて行った。

5.8 正常心モデルにおけるカルシウムウェーブの比較

まず我々は、正常心モデルにおける NPY のカルシウムウェーブへの影響を評価した。正常心モデルでは NPY 100 nM を投与した群ではカルシウムウェーブの頻度

やカルシウムウェーブを認めた細胞の割合はコントロール群と比較して有意な上昇は認めなかった [カルシウムウェーブの頻度: 0.63 ± 0.47 /min (control, N = 2, n = 16) vs. 2.00 ± 0.81 /min (NPY, N = 2, n = 15) , $P = 0.137$ 、カルシウムウェーブ陽性細胞の割合: 12.5% (Control, N = 2, n = 16) vs. 33.3% (NPY, N = 2, n = 16) , $P = 0.22$] (図 5-8-1)。



しかし、NPY 投与量を 200 nM とした際には、コントロールと比較して有意な上昇を認め、容量依存的な効果が確認された [カルシウムウェーブの頻度: 0.63 ± 0.47 /min (control, N = 2, n = 16) vs. 4.93 ± 1.28 /min (NPY 200 nM, N = 2, n = 14) , $P < 0.01$ 、カルシウムウェーブ陽性細胞の割合: 12.5% (control, N = 2, n = 16) vs. 71.4% (NPY 200 nM, N = 2, n = 14) , $P < 0.001$] (図 5-8-2)。

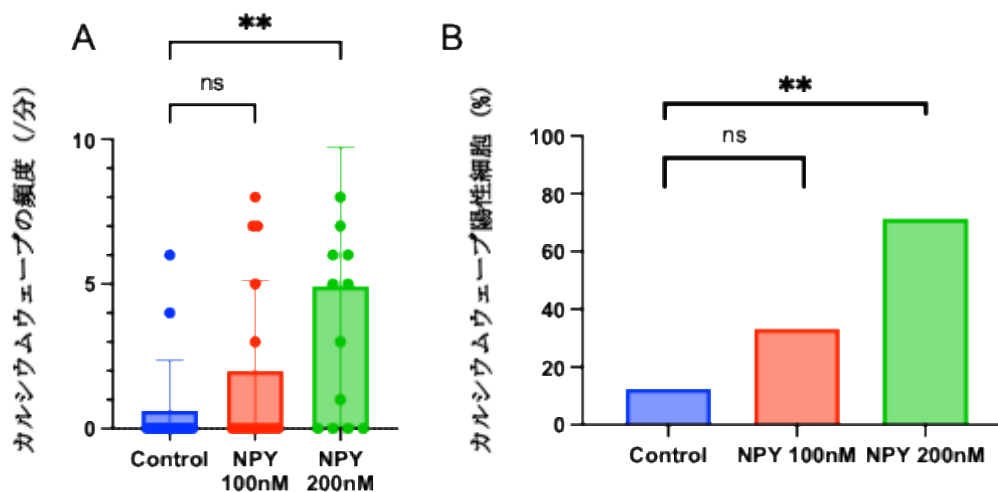
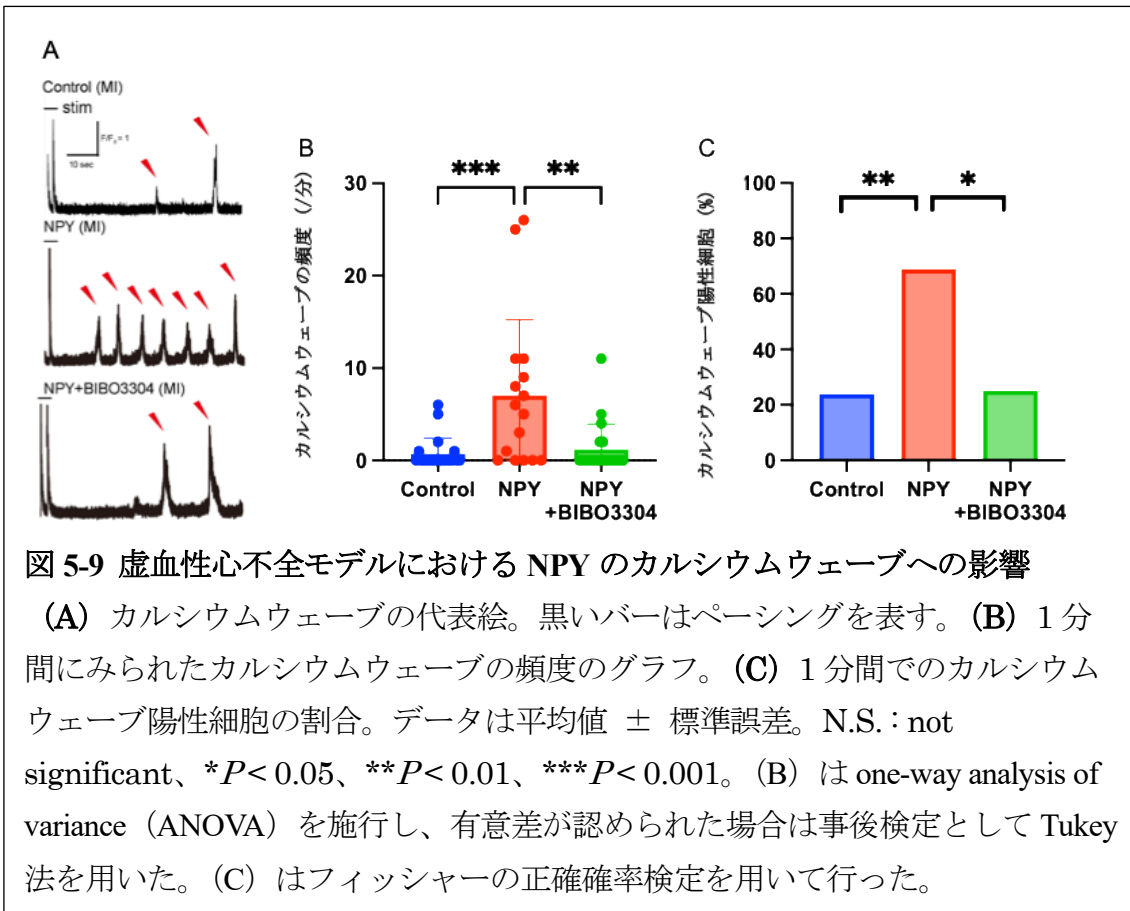


図 5-8-2 正常心モデルにおける NPY の容量依存効果

(A) 1 分間にみられたカルシウムウェーブの頻度のグラフ。(B) 1 分間でのカルシウムウェーブ陽性細胞の割合。データは平均値 ± 標準誤差。N.S. : not significant, ** $P < 0.01$ vs. control。(A) は one-way analysis of variance (ANOVA) を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法を用いた。(B) はフィッシャーの正確確率検定を用いて行った。

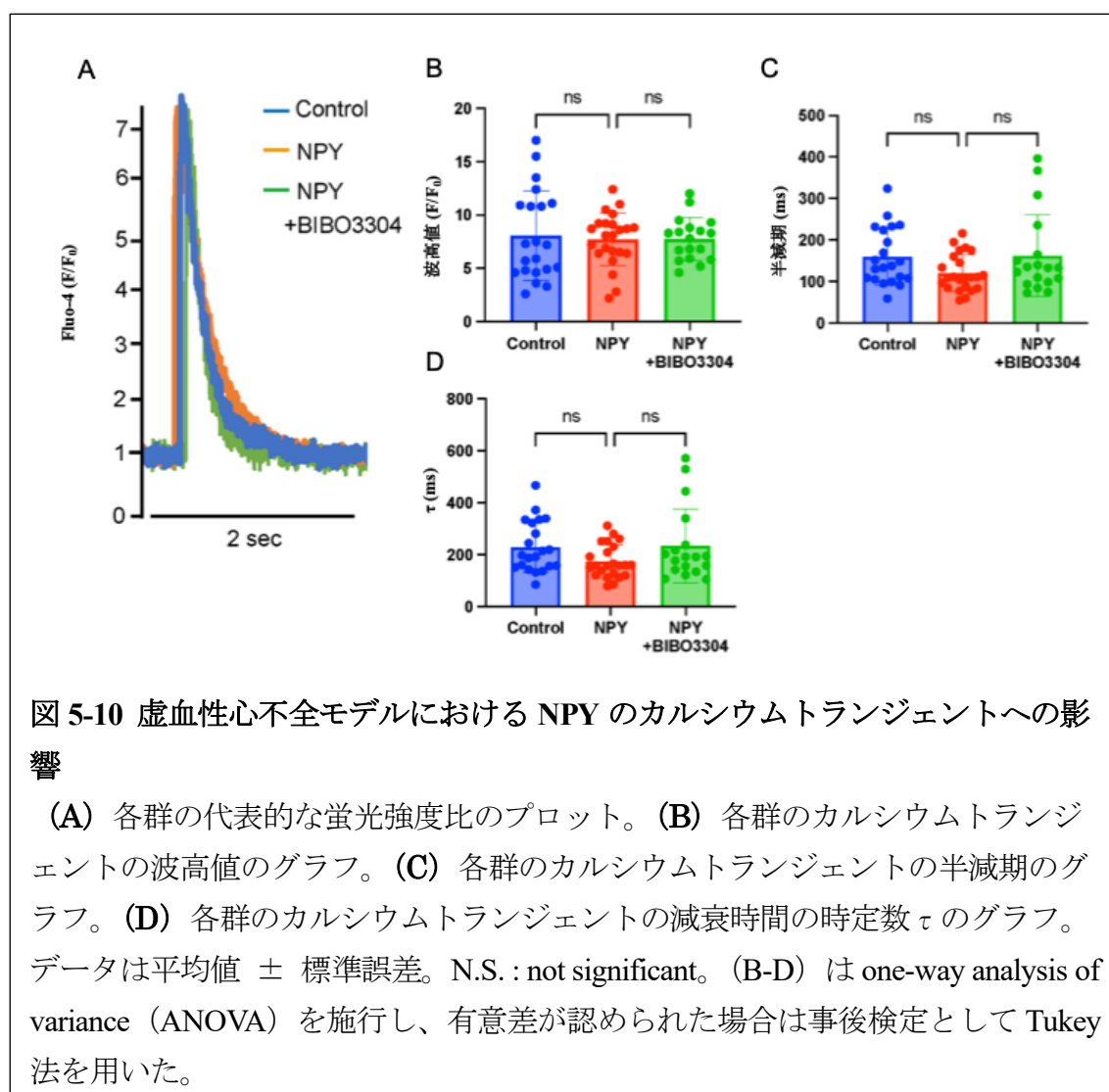
5.9 虚血性心不全モデルにおけるカルシウムウェーブの比較

続いて、虚血性心不全モデルにおいて同様の実験系で NPY のカルシウムウェーブへの影響について検討を行った。虚血性心不全モデルにおいて、正常心モデルではカルシウムウェーブの上昇に統計学的有意差を示さなかった NPY 100 nM を投与した群でカルシウムウェーブの頻度やカルシウムウェーブを認めた細胞の割合はコントロール群と比較して有意に上昇した。そしてこれらの上昇は、NPY Y1 受容体遮断薬である BIBO3304 の投与に有意に抑制された [カルシウムウェーブの頻度: 0.71 ± 0.37 /min (control, $N = 6, n = 21$), 7.00 ± 2.07 /min (NPY, $N = 6, n = 23$), 1.20 ± 0.61 /min (BIBO3304, $N = 2, n = 18$)、カルシウムウェーブ陽性細胞の割合: 23.8% (Control, $N = 6, n = 21$), 68.8% (NPY, $N = 6, n = 23$), 25.0% (BIBO3304, $N = 2, n = 18$)] (図 5-9)。以上より、正常心の単離心筋では生じなかった NPY 投与量で、虚血性心不全の単離心筋ではカルシウムウェーブが有意に上昇し、それは BIBO3304 によって抑制する効果がみられた。



5.10 電気刺激によるカルシウムトランジェントへの NPY の影響の評価

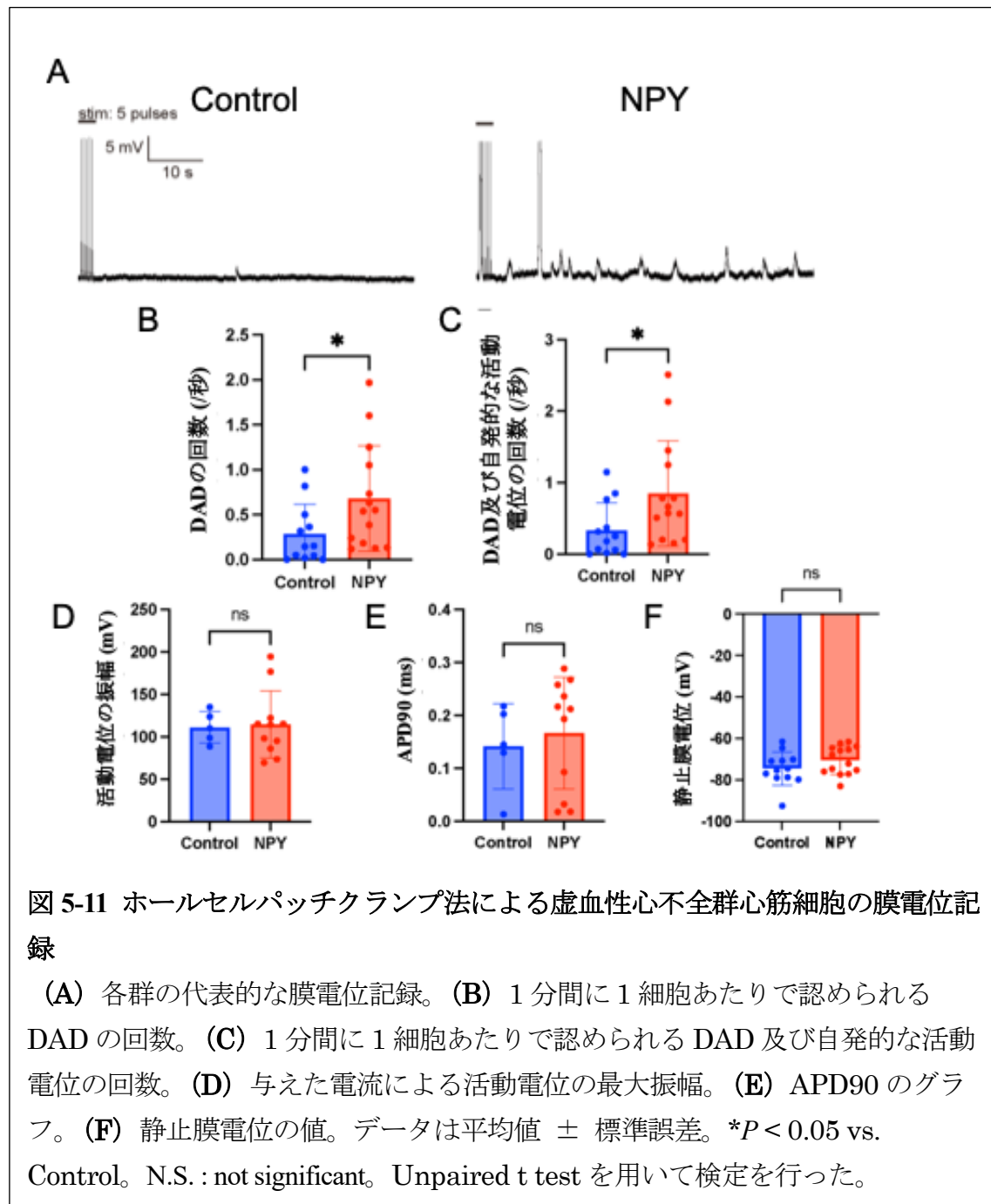
0.5 Hz で field stimulation をおこない定常状態に達した後、ラインスキャンモードで撮像し、カルシウムトランジェントの評価を行った。カルシウムトランジェントの波高値、半減期、 τ に 3 群間で有意差は認めなかった (図 5-10)。



5.11 ホールセルパッチクランプ法による膜電位記録

NPY はカルシウムウェーブの頻度を上昇させカルシウムハンドリング異常をもたらすことが明らかとなった。このカルシウムハンドリング異常が、膜電位に与える影響を評価するために、拡張期の自発的な活動電位の頻度をパッチクランプ法で評価した。1 分間に認める DAD の回数、及び DAD と自発的な活動電位の回数を合わせてものは Control と比べて NPY 投与によって有意に上昇した [DAD の回数: 0.284 ± 0.097 /sec (Control, N = 5, n = 12) vs. 0.679 ± 0.157 /sec (NPY, N = 6, n = 15), $P = 0.049$ 、DADs と自発的な活動電位の回数: 0.336 ± 0.111 /sec (Control, N = 5, n = 12) vs. 0.851 ± 0.197 /sec (NPY, N = 6, n = 15), $P = 0.030$]。また、活動電位波形の立ち上がり最大速度時点を局所の脱分極点とし、局所の脱分極点から活動電位の最大

振幅における 90%再分極点までの時間 (action potential duration at 90% repolarization ; APD90) や活動電位の振幅、静止膜電位の値は両群で有意な差を認めなかった (図 5-11)。



5.12 NPY 投与による心室性不整脈への影響

NPY 投与によりカルシウムハンドリング異常の出現、撃発活動の増加を認めたため、さらなる検討として、ランゲンドルフ灌流心での心室性不整脈の誘発性を評価した。まず正常心モデルでは、Control 群と NPY 投与群では PVC の頻度や複雑性 PVC の発生率に有意差は認めなかった (図 5-12-1)。

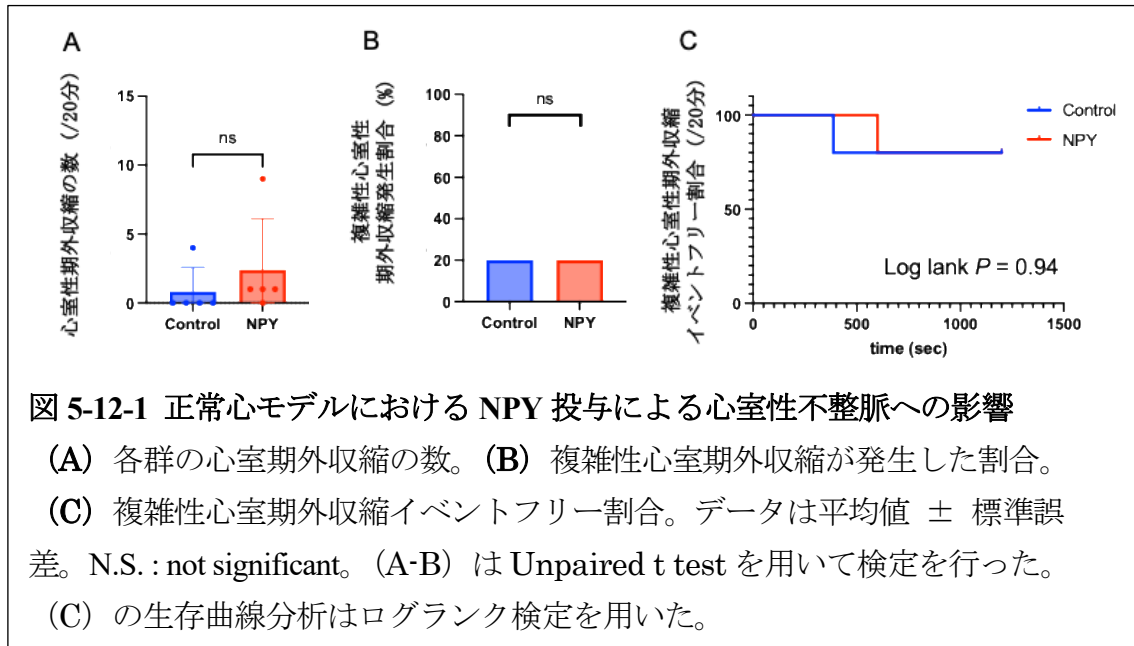


図 5-12-1 正常心モデルにおける NPY 投与による心室性不整脈への影響

(A) 各群の心室期外収縮の数。(B) 複雑性心室期外収縮が発生した割合。

(C) 複雑性心室期外収縮イベントフリー割合。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。N.S.: not significant。(A-B) は Unpaired t test を用いて検定を行った。

(C) の生存曲線分析はログランク検定を用いた。

しかし、虚血性心不全モデルでは同じ投与量の NPY で、PVC の頻度と複雑性 PVC の発生率は NPY 投与群で有意に上昇し、これは BIBO3304 の追加によって有意に抑制された [心室性期外収縮の数: 1.67 ± 0.803 /20min (control, n=6) vs 59.5 ± 22.25 /20min (NPY, n=6), $P=0.027$]。また、複雑性 PVC 発生に対するイベントフリー割合は、NPY 投与によって有意に減少を認めた ($P=0.039$) (図 5-12-2)。以上より不整脈誘発試験においても、正常心モデルでは誘発性が上昇しなかった NPY 投与量で、虚血性心不全モデルでは心室性不整脈の誘発性が上昇し、それは BIBO3304 によって抑制可能であることが確認された。

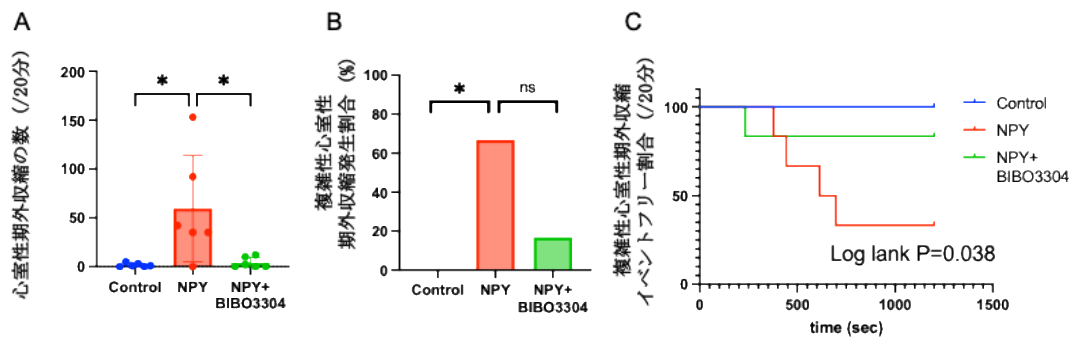


図 5-12-2 虚血性心不全モデルにおける NPY 投与による心室性不整脈への影響

(A) 各群の心室期外収縮の数。(B) 複雑性心室期外収縮が発生した割合。

(C) 複雑性心室期外収縮イベントフリー割合。データは平均値 ± 標準誤差。* $P < 0.05$ 。N.S. : not significant。(A) は one-way analysis of variance

(ANOVA) を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法を用いた。(B) はフィッシャーの正確確率検定を用いて行った。(C) の生存曲線分析はログランク検定を行い、Holm 法で P 値を調整した。

6. 考察

我々は本研究を通じて以下の知見を明らかにした。

- ①慢性期の虚血性心不全モデルにおいて、心筋組織中の梗塞領域・境界領域を中心に NPY 発現が上昇した。これは虚血性心不全患者でも心筋組織中の NPY 発現は上昇が認められた。
- ②同モデルにおいて、NPY の負荷によりカルシウムウェーブの形成が亢進したが、NPY Y1 受容体遮断薬である BIBO3304 がその亢進を抑制した。
- ③膜電位レベルにおいて、NPY の負荷により DAD の出現が亢進していた。
- ④ランゲンドルフ灌流心において、NPY 負荷により心室期外収縮の出現が亢進したが、BIBO3304 によってその亢進は抑制された。

6.1 虚血性心不全における NPY の構造的変化

今回の研究では、虚血性心不全モデルにおいて、NPY 発現の増加と NE 発現の減少を認めた。心筋梗塞後の交感神経活性化が生じることは明らかとなっており、交感神経の過剰活性化が心室性不整脈の重要な引き金となっている (Goldberger *et al*, 2019; Shen & Zipes, 2014)。この過剰活性化は、しばしば NE の枯渇と β 受容体の脱感作を引き起こす (Chidsey CA, 1964; Li *et al*, 2004)。このような過剰活性化で NE 濃度が低下する一方で、NPY 濃度は逆に上昇し、また交感神経刺激に反応した NPY 放出もまた亢進し、持続的な上昇をもたらすことも報告されている (Warner *et al*, 1991)。これは不整脈基質に大きな影響を及ぼし、余剰的に催不整脈作用に寄与している可能性がある。NPY は NE に比べて半減期が長いことから (Perow *et al*, 1986; Cuculi *et al*, 2013)、不整脈基質への影響はより大きい可能性があるが、これについてはさらなる検討が必要である。

また、NPY 発現の領域間の違いも観察され、虚血性心不全の遠隔領域に比べて境界領域では発現が亢進していた。このような NPY 分布の空間的不均一性は、先行研究で支持されているように、境界領域における DAD の発生増加に寄与している可能性がある (Hegyi *et al*, 2018)。さらに、星状神経節における NPY 産生を評価したところ、コントロール群と MI 群で発現に有意差は認められなかったが、これは心筋梗塞ブタモデルにおいて星状神経節での NPY 発現が上昇したという過去の報

告とは異なるものであった (Ajjola *et al*, 2015)。この結果の違いは、動物種特異的な違いを反映している可能性があり、動物モデルから得られた知見をヒトに応用する際には、慎重な解釈が必要である。

また、MI 群における NPY の発現増加と NE の発現低下は交感神経系の発現変化を表している可能性が示唆されるが、こちらについてもさらなる検討が必要である。

注目すべきは、我々のマウスモデルで観察された傾向と同じように、陳旧性心筋梗塞患者のヒト心筋標本で NPY 発現の上昇を初めて示したことである。これらの所見は、虚血性心不全の慢性期における NPY がヒトの治療標的となりうることを示唆している。

6.2 虚血性心不全における NPY によるカルシウム過負荷

これまでの報告より正常心では、NPY は PLC 経路を介して細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させ、細胞内カルシウム過負荷による催不整脈作用をもたらす (Heredia *et al*, 2005)。さらに、星状神経刺激時に NPY Y1 受容体拮抗薬と β 遮断薬を併用すると、カルシウムトランジェント振幅の増大とカルシウムトランジェントの持続時間の短縮が抑制されることが示されている (Ajjola *et al*, 2020)。今回の研究は、これらの知見が虚血性心不全モデルにも適用できることを初めて示したものである。注目すべきは、虚血性心不全モデルの単離心筋は正常心モデルにおける単離心筋と比較して、NPY に対してより感受性が高いということである。また、虚血性心不全モデルでは、正常心臓では不整脈を誘発しない NPY 濃度で、カルシウムウェーブの出現が亢進することも確認された。このような感受性の亢進は、NPY Y1 受容体の発現の変化に起因している可能性がある。NPY Y1 受容体は、急性心筋梗塞 7 日後時点で、心筋中における発現が亢進していることが報告されている (Qin *et al*, 2022)。さらに、PLC シグナル伝達の下流にあるイノシトール 1,4,5 三リン酸受容体 (IP₃R) の発現変化についても、心不全状態では心筋中 IP₃R の発現が上昇していることが報告されており (Go *et al*, 1995; Ai *et al*, 2005)、これらの受容体変化が関与している可能性がある。カルシウム過負荷が DAD や不整脈発生の主な原因であることを考えると、NPY は特に虚血性心不全において、細胞内カルシウムイオン濃度を是正することにより心室性不整脈を抑制する有効な治療

標的である可能性が考えられる。さらに、カルシウム過剰負荷は不整脈発生に寄与するだけでなく、心不全を悪化させ、心筋線維化とリモデリングを促進する

(Kobayashi *et al*, 2009; Choudhury *et al*, 2014)。したがって、今回の知見は、NPY が不整脈の治療と心不全の管理の両者において重要な役割を果たす可能性を示唆している。

6.3 治療標的としての NPY

我々は、虚血性心不全モデルにおいてランゲンドルフ灌流心で、NPY が心室性不整脈の誘発性を上昇させるが、この効果は NPYY1 受容体拮抗薬によって抑制されることを明らかにした。過去のブタ正常心モデルを用いた研究で、NPYY1 受容体拮抗薬と β 遮断薬の併用によって、星状神経節刺激時の心室細動閾値を低下させることが示された (Hoang *et al*, 2020)。さらに、ラットの虚血再灌流モデルにおいて、NPY による心室細動誘発と BIBO3304 によるその抑制効果が明らかとなり、NPY が心室細動を制御するターゲットであることが報告されている (Ajjola *et al*, 2020)。さらに、NPY レベルの上昇は、ST 上昇型心筋梗塞患者における心筋梗塞後の心室性不整脈の発生率上昇と関連し (Ajjola *et al*, 2020)、NPY レベルの高値は、心不全患者における死亡率の上昇と関連することが報告されている

(McDowell *et al*, 2024)。したがって、NPY は潜在的な心不全の治療標的と考えられる。しかしながら、急性虚血性心不全モデルでは、NPY は血管新生促進作用を通じて心筋保護的に働く可能性も報告されており、NPY は急性期には虚血に対して代償的な作用をもたらすものの、慢性期における虚血性心不全の病態においては、致死性不整脈の誘因となるという仮説が想起された。本研究の結果は、虚血性心不全における致死性不整脈の治療標的として NPY が重要である可能性を示唆している。

6.4 本研究の限界

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、正常心臓モデルマウスは 11~12 週齢であり、虚血性心不全モデルマウスとは約 4 週間程度の差があったことである。しかし既報においては、生後 30 日までのラットにおける NPY とその受容体の発現を追跡した研究では、発現レベルに変化はなかったと報告されている (Masliukov *et al*,

2016)。第二に、我々は陳旧性心筋梗塞既往のある剖検患者の心筋で NPY 発現の上昇を確認したが、NPY 受容体が心筋細胞のカルシウムハンドリングに及ぼす影響は、種によって異なる可能性があることには留意する必要がある (Millar *et al*, 1991; Bryant & Hart, 1996)。最後に、心筋細胞単離の段階で、境界領域の採取に努めたが、完全に遠隔領域を除外できていない可能性は否定できない。

7. 総括及び結論

①本研究の結果から明らかになった事項の要約を以下に述べる。

1. 虚血性心不全において、sham 群と比較して虚血性心不全群で心筋組織中の梗塞領域・境界領域を中心に NPY 発現は上昇し、NE 発現は低下していた。NPY 発現については、陳旧性心筋梗塞既往のあるヒト心筋検体においても同様の所見が確認された。
2. 虚血性心不全において、NPY 投与により DAD の原因となるカルシウムウェーブは有意に上昇し、NPY Y1 受容体遮断薬の使用で抑制可能であった。
3. 虚血性心不全において、NPY 投与により膜電位レベルでの DAD 発生が有意に上昇した。また、NPY 投与により心室性不整脈発生を有意に増加させたが、NPY Y1 受容体遮断薬により抑制された。

②本研究の意義

この研究は、虚血性心不全における NPY を標的とした新規治療戦略の可能性を見出したものである。その結果、虚血性心不全では、NPY レベルの上昇が心室性不整脈誘発性の亢進とカルシウムハンドリング異常に関連していることが明らかになった。 β 遮断薬は虚血性心不全に伴う心室性不整脈に対して有効な治療法であるにもかかわらず、それ単独では残存する心室性不整脈を完全に抑制することは不十分であり、別のアプローチの必要性が求められている。カルシウムハンドリングを通じて心室性不整脈を惹起する NPY の役割は、BIBO3304 のような NPY Y1 受容体拮抗薬が有望な治療薬となりうることを示唆している。これらの知見は、NPY をターゲットとした治療戦略の臨床応用の架け橋となるものである。

③今後の展望

本研究では解明できなかった詳細な分子機序について解明を行う必要がある。また、非虚血性心不全においても過度な交感神経活性化の病態が明らかとなっており、本研究の知見が肥大心モデルのような非虚血性心不全モデルにも応用されるのか、さらなる検討が望まれる。

④今後の課題

本研究結果を応用して、臨床応用可能な NPY Y1 受容体遮断薬の創薬開発などが期待される。そのために、生物種によって異なる可能性のある NPY が心筋細胞に及ぼす影響についてさらなる検証が必要である。

8. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、御指導頂いた北海道大学大学院医学研究院内科学講座循環病態内科学教室 安斉俊久教授に感謝申し上げます。

北海道大学大学院医学研究院内科学講座循環病態内科学教室 天満太郎診療講師には博士課程での研究全般・学位論文作成に、御多忙の中、多くの御指導をして頂き大変感謝申し上げます。重ねて、親身なご助言を頂きました社会医療法人 カレスサッポロ 北光記念病院 渡邊昌也先生、並びに北海道大学大学院医学研究院内科学講座循環病態内科学教室 中尾元基助教、甲谷太郎特任助教、門坂崇秀特任助教、社会福祉法人 北海道社会事業協会小樽病院 夏井宏征先生に深く感謝の意を表します。

本研究において、御協力をいただきました北海道大学大学院医学研究院内科学分野循環病態内科学教室 立田大志郎医員、西野広太郎医員、齋藤翔太医員、川上慧医員、川崎祐寛医員、島野金太郎医員、並びに循環病態内科学教室員の先生方に深く感謝申し上げます。

本研究において、共同研究者として組織学的実験に御助力頂きました北海道大学大学院医学研究院病理学講座腫瘍病理学教室 田中伸哉教授、種井善一助教に深く感謝申し上げます。

本研究において、共同研究者としてホールセルパッチクランプ法による細胞膜電位記録に御助力頂きました北海道大学医学研究院解剖学分野組織細胞学教室 藤山文乃教授、苅部冬紀助教に深く感謝申し上げます。

また本研究の実験遂行にあたり多大なご助力をいただきました実験助手の木村友紀様、また医局秘書室の皆様に厚く御礼を申し上げます。

本研究は多くの実験動物の尊い生命の犠牲の賜物であることをここに銘記いたします。

2025 年 3 月

甲谷 次郎

9. 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

10. 参考文献

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM and Pogwizd SM (2005) Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circ. Res.* **97**: 1314–1322

Ajjjola OA, Chatterjee NA, Gonzales MJ, Gornbein J, Liu K, Li D, Paterson DJ, Shivkumar K, Singh JP and Herring N (2020) Coronary Sinus Neuropeptide Y Levels and Adverse Outcomes in Patients With Stable Chronic Heart Failure. *JAMA Cardiol* **5**: 318–325

Ajjjola OA, Yagishita D, Reddy NK, Yamakawa K, Vaseghi M, Downs AM, Hoover DB, Ardell JL and Shivkumar K (2015) Remodeling of stellate ganglion neurons after spatially targeted myocardial infarction: Neuropeptide and morphologic changes. *Heart Rhythm* **12**: 1027–1035

Bryant SM and Hart G (1996) Effects of neuropeptide Y on L-type calcium current in guinea-pig ventricular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 1455–1460

Chatzidou S, Kontogiannis C, Tsilimigras DI, Georgiopoulos G, Kosmopoulos M, Papadopoulou E, Vasilopoulos G and Rokas S (2018) Propranolol Versus Metoprolol for Treatment of Electrical Storm in Patients With Implantable Cardioverter-Defibrillator. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**: 1897–1906

Chidsey CA E al (1964) Cardiac norepinephrine stores in experimental heart failure in the dog. *J. Clin. Invest.* **43**: 2386–2393

Choudhury S, Bae S, Ke Q, Lee JY, Singh SS, St-Arnaud R, Monte FD and Kang PM (2014) Abnormal calcium handling and exaggerated cardiac dysfunction in mice with defective vitamin d signaling. *PLoS One* **9**: e108382

Ciofalo FR and Thomas LJ Jr (1965) The effects of zinc on contractility, membrane potentials, and cation content of rat atria. *J. Gen. Physiol.* **48**: 825–839

Cuculi F, Herring N, De Caterina AR, Banning AP, Prendergast BD, Forfar JC, Choudhury RP, Channon KM and Kharbanda RK (2013) Relationship of plasma neuropeptide Y with angiographic, electrocardiographic and coronary physiology indices of reperfusion during ST elevation myocardial infarction. *Heart* **99**: 1198–1203

Curran J, Hinton MJ, Ríos E, Bers DM and Shannon TR (2007) Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ. Res.* **100**: 391–398

Go LO, Moschella MC, Watras J, Handa KK, Fyfe BS and Marks AR (1995) Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J. Clin. Invest.* **95**: 888–894

Goldberger JJ, Arora R, Buckley U and Shivkumar K (2019) Autonomic Nervous System Dysfunction: JACC Focus Seminar. *J. Am. Coll. Cardiol.* **73**: 1189–1206

Hegyi B, Bossuyt J, Griffiths LG, Shimkunas R, Coulibaly Z, Jian Z, Grimsrud KN, Sondergaard CS, Ginsburg KS, Chiamvimonvat N, Belardinelli L, et al (2018) Complex electrophysiological remodeling in postinfarction ischemic heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**: E3036–E3044

Heredia M del P, Delgado C, Pereira L, Perrier R, Richard S, Vassort G, Bénitah J-P and Gómez AM (2005) Neuropeptide Y rapidly enhances $[Ca^{2+}]_i$ transients and Ca^{2+} sparks in adult rat ventricular myocytes through Y1 receptor and PLC activation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **38**: 205–212

Hoang JD, Salavatian S, Yamaguchi N, Swid MA, David H and Vaseghi M (2020) Cardiac sympathetic activation circumvents high-dose beta blocker therapy in part through release of neuropeptide Y. *JCI Insight* **5**: Available at: <http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.135519>

Kawai S, Takagi Y, Kaneko S and Kurosawa T (2011) Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp. Anim.* **60**: 481–487

Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Mochizuki M, Xu X, Uchinoumi H, Okuda S, Yamamoto T, et al (2009) Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**: 1993–2005

Li W, Knowlton D, Van Winkle DM and Habecker BA (2004) Infarction alters both the distribution and noradrenergic properties of cardiac sympathetic neurons. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286**: H2229–36

- Masliukov PM, Moiseev K, Emanuilov AI, Anikina TA, Zverev AA and Nozdrachev AD (2016) Development of neuropeptide Y-mediated heart innervation in rats. *Neuropeptides* **55**: 47–54
- McDowell K, Adamson C, Jackson C, Campbell R, Welsh P, Petrie MC, McMurray JJV, Jhund PS and Herring N (2024) Neuropeptide Y is elevated in heart failure and is an independent predictor of outcomes. *Eur. J. Heart Fail.* **26**: 107–116
- McMurray J, Køber L, Robertson M, Dargie H, Colucci W, Lopez-Sendon J, Remme W, Sharpe DN and Ford I (2005) Antiarrhythmic effect of carvedilol after acute myocardial infarction: results of the Carvedilol Post-Infarct Survival Control in Left Ventricular Dysfunction (CAPRICORN) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **45**: 525–530
- Meredith IT, Broughton A, Jennings GL and Esler MD (1991) Evidence of a selective increase in cardiac sympathetic activity in patients with sustained ventricular arrhythmias. *N. Engl. J. Med.* **325**: 618–624
- Millar BC, Weis T, Piper HM, Weber M, Borchard U, McDermott BJ and Balasubramaniam A (1991) Positive and negative contractile effects of neuropeptide Y on ventricular cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* **261**: H1727-33
- Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Brown MW, Andrews ML and Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial II Investigators (2002) Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *N. Engl. J. Med.* **346**: 877–883
- Pachon RE, Scharf BA, Vatner DE and Vatner SF (2015) Best anesthetics for assessing left ventricular systolic function by echocardiography in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **308**: H1525-9
- Pernow J, Lundberg JM, Kaijser L, Hjemdahl P, Theodorsson-Norheim E, Martinsson A and Pernow B (1986) Plasma neuropeptide Y-like immunoreactivity and catecholamines during various degrees of sympathetic activation in man. *Clin. Physiol.* **6**: 561–578
- Qin Y-Y, Huang X-R, Zhang J, Wu W, Chen J, Wan S, Yu X-Y and Lan H-Y (2022) Neuropeptide Y attenuates cardiac remodeling and deterioration of function following myocardial infarction. *Mol. Ther.* **30**: 881–897

Shen MJ and Zipes DP (2014) Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias. *Circ. Res.* **114**: 1004–1021

Shiba N, Nochioka K, Miura M, Kohno H, Shimokawa H and CHART-2 Investigators (2011) Trend of westernization of etiology and clinical characteristics of heart failure patients in Japan--first report from the CHART-2 study. *Circ. J.* **75**: 823–833

Solomon SD, Zelenkofske S, McMurray JJV, Finn PV, Velazquez E, Ertl G, Harsanyi A, Rouleau JL, Maggioni A, Kober L, et al (2005) Sudden death in patients with myocardial infarction and left ventricular dysfunction, heart failure, or both. *N. Engl. J. Med.* **352**: 2581–2588

Steinbeck G, Andresen D, Seidl K, Brachmann J, Hoffmann E, Wojciechowski D, Kornacewicz-Jach Z, Sredniawa B, Lupkovics G, Hofgärtner F, et al (2009) Defibrillator implantation early after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **361**: 1427–1436

Tatemoto K (1982) Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**: 5485–5489

Warner MR, Senanayake PD, Ferrario CM and Levy MN (1991) Sympathetic stimulation-evoked overflow of norepinephrine and neuropeptide Y from the heart. *Circ. Res.* **69**: 455–465