

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790443

研究課題名（和文） カテコールアミン心筋障害におけるコネクシン 43 の関与

研究課題名（英文） Involvement of connexin 43 in catecholamine -induced cardiomyopathy

研究代表者

新谷 香（石田香）[SHINTANI KAORI (ISHIDA KAORI)]

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50345047

研究成果の概要：心交感神経活性の亢進は、心筋収縮不全や心筋傷害といったカテコールアミン心筋障害を引き起こす。本研究では、カテコールアミンの過剰分泌や虚血によって引き起こされると考えられている収縮帯壊死がギャップ結合を介して伝播する機序を解明した。ギャップ結合を構成するコネクシン 43 が虚血により介在板で増加し、ギャップ結合を介した細胞間情報伝達を活性化することにより、収縮帯壊死がこの活性化したギャップ結合を介して伝播していた。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,800,000 | 0 | 1,800,000 |
| 2008 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,800,000 | 300,000 | 3,100,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：コネクシン、心臓突然死、ギャップジャンクション

1. 研究開始当初の背景

心交感神経活性の亢進は、心筋収縮不全や心筋傷害といったカテコールアミン心筋障害を引き起こす。カテコールアミンの過剰分泌や虚血によって引き起こされると考えられている収縮帯壊死は心臓突然死の重要な指標である。

心筋コネクシン 43 (Cx43) は細胞膜上で hemi-channel (HC) を形成し、介在板に移動・集合して斑を形成する。この斑は隣接する細胞の斑と結合して gap junctions (GJs) という細胞を繋ぐチャンネルとなる。隣接する細胞間では、GJ を通じた無機イオンや低分子物質の授受により情報を伝達して、心拍動を同調させ、心筋組織の恒常性を保っている。交感神経過緊張や細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇により惹起される心筋の収縮帯壊死は隣接する細胞群に連続して観察されることから、GJs の関与が示唆される。この GJs を介した収縮帯壊死の伝播の可能性は、これまでに培養細胞の収縮を評価するという方法で検証されてはいるが、in vivo で実際に収縮帯壊死の生起のメカニズムを解明した報告はなかった。そこで、ラットを用い

てカテコールアミン投与あるいは虚血再灌流により生じられる収縮帯壊死の伝播とGJsの関係明らかにすることは、心臓性突然死の病態の理解や診断方法の確立に貢献できると考えた。

2. 研究の目的

収縮帯壊死がGJsを介して伝播する機序を明らかにするために、カテコールアミン投与あるいは虚血再灌流時のCx43の発現量やGJsを介した細胞間情報伝達(GJ intercellular communication, GJIC)活性の変化を調べ、これらの変化が収縮帯壊死の伝播にどのように関わっているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作製

SDラットを麻酔下で開胸し、左冠状動脈前下行枝をシルク糸で結紮することにより虚血モデルを作製した。ウェスタンブロッティング及びGJIC活性測定では30分の虚血後心臓を採取した。収縮帯壊死エリア及び心筋梗塞サイズの測定には30分の虚血後、結紮糸をはずしてそれぞれ5分間、6時間再灌流した後、心臓を採取した。なお、このプロトコルは東京大学動物実験専門委員会の承認を得ている。

(2) Cx43タンパクの定量

心臓のホモジネートを遠心分離によりP1(核及び筋原線維)、P2(細胞膜)、S(細胞質)画分に分画した。各画分をウェスタンブロッティング法によりCx43タンパクを検出し定量した。Cx43量は α -アクチン量で補正した。

(3) GJIC活性測定

心臓を心室の高さで厚く輪切りにし、さらに虚血領域と非虚血領域がまたがる様に前壁の中間層で縦に切り、ルシファーイエロー(LY, GJICの指標)とデキストランローダミン(DR, 細胞膜破綻の指標)を含む溶液に浸漬し、切り口からのLYとDRの拡散距離を測定した。

(4) 収縮帯壊死エリアの測定

心室の高さで輪切りにした心臓セクションをパラフィン包埋後、リンタングステン酸ヘマトキシリン染色を行った。顕微鏡写真をデジタルカメラで撮り、収縮帯壊死所見が観察される心筋のエリアの大きさを画像解析ソフトで測定した。

(5) 心筋梗塞サイズの測定

心臓を約2-3 mmの厚さに輪切りし、これらのブロックを1%

2,3,5-tetraphenyltetrazolium chloride (TTC)溶液に浸漬し、37°Cで10分間インキュベートした。各ブロックの両面をデジタルカメラで撮り、梗塞領域(TTC陰性部)と非梗塞領域(TTC陽性部)の大きさを画像解析ソフトで測定した。

4. 研究成果

(1) 虚血におけるCx43タンパク量とGJIC活性の経時的変化

Cx43は虚血30分をピークに一過性にP1画分からP2画分に移行することが明らかになった。また、移行するCx43は介在板の局在やGJIC活性に必須であると考えられているリン酸化されたものであった(図1)。また、虚血30分でのCx43の免疫染色を行ったところ、Cx43は介在板で増加していた。

この虚血30分の時点でのGJIC活性を測定したところ、リスク(虚血)領域のGJICはsham群と比較して約3倍高かった(図2)。一方、非リスク領域のGJICはshamのそれと同程度であった。

以上の結果から、虚血30分をピークにCx43はリスク領域で一過性に介在板に移行し、GJIC活性を上昇させると考えられた。

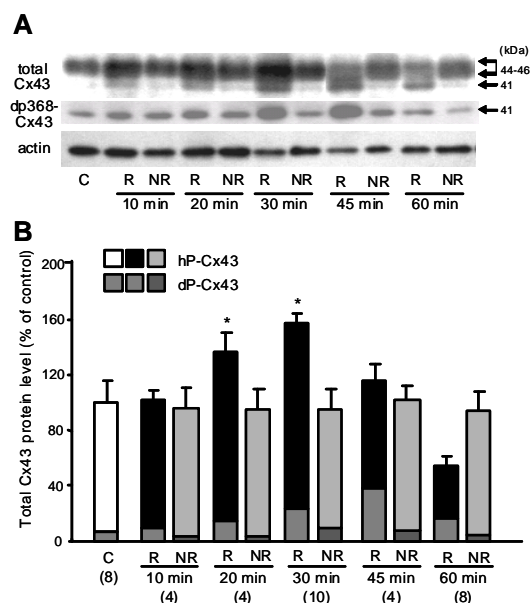


図1 P2画分のCx43タンパク量の経時的変化。パネルAはCx43のウェスタンブロット。total Cx43; 全てのCx43を認識する抗体を用いて検出されたCx43のバンド(リン酸化されたCx43は44-46 kDaの位置に、脱リン酸化されたCx43は41 kDaの位置に検出される), dp368-Cx43; Ser368が脱リン酸化されたCx43のみを認識する抗体を用いて検出, C; コントロール(開胸のみ), R; リスク領域, NR; 非リスク領域, hP-Cx43; リン酸化型Cx43, dP-Cx43; 脱リン酸化型Cx43, *; $P < 0.05$ (対コントロール)。

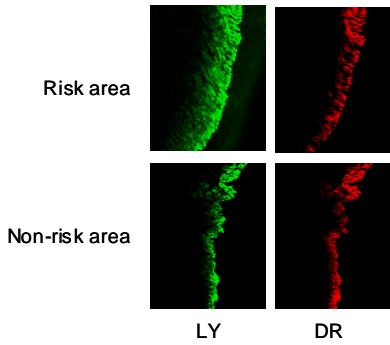


図2 虚血30分後の心臓におけるGJIC活性測定. GJICの指標であるルシファーイエロー(LY)の拡散は非リスク領域と比較してリスク領域で約3倍に増えているが、細胞膜破綻の指標であるデキストランローダミン(DR)は両領域間で差がない。

(2) 虚血再灌流時の収縮帯壊死の伝播におけるGJICの関係

虚血30分後、再灌流すると数分でリスク領域と非リスク領域の境界からリスク領域に向かって、心筋の中間層を中心に広がって分布していた。再灌流の直前にGJsのブロッカーであるcarbenoxolone (CBX)を1分間静脈投与したところ、この収縮帯壊死のエリアが約1/3に狭小化した(図3)。この結果は虚血再灌流時に形成される収縮帯壊死はGJsを介して伝播することを示唆している。

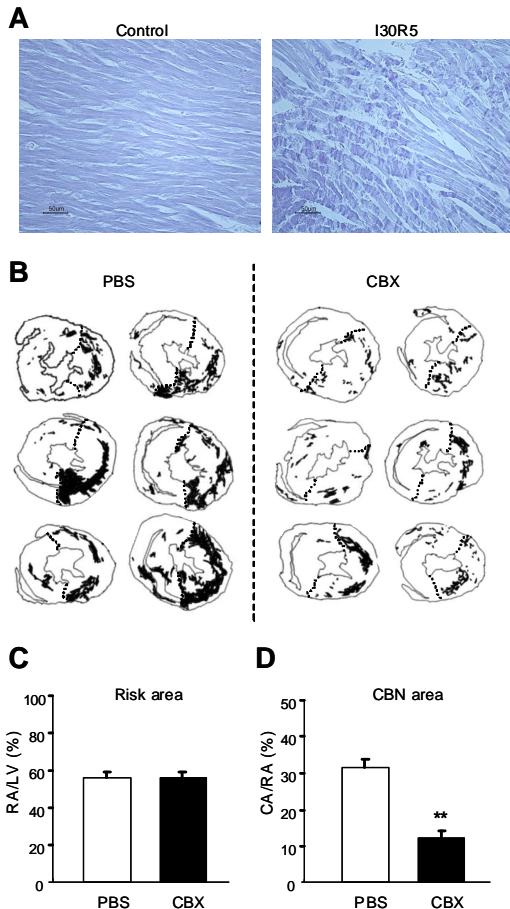


図3 再灌流後収縮帯壊死形成に対するGJブロッカーCBX投与の影響. パネルAはコントロールと虚血30分再灌流5分後の心臓のリンタングステン酸ヘマトキシリン染色像. パネルBは各6個体の輪切りされた心臓での収縮帯壊死の分布を黒色で示した. パネルCとDはPBS投与群とCBX投与群のリスク領域の大きさ収縮帯壊死エリアの大きさをそれぞれ定量化したもの. **: P<0.01 (対PBS投与群).

(3) GJブロッカーの心筋梗塞サイズへの影響

収縮帯壊死におちいった領域が将来心筋梗塞になると考えられている。そこで、CBX投与による収縮帯壊死エリアの狭小化が心筋梗塞サイズに影響を及ぼすのかかについて検討した。再灌流6時間後の心筋梗塞サイズはCBXの投与によって約2/3に減少した(図4)。

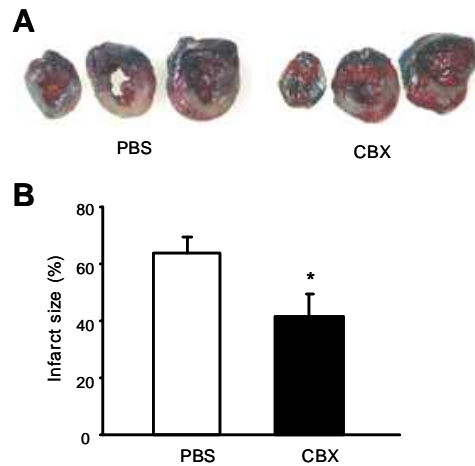


図4 心筋梗塞発展に対するCBX投与の影響. パネルAはTTC染色後の心臓スライス写真. 白色部が心筋梗塞エリア、赤色部はリスク領域で非梗塞エリア、青色は非リスク領域. パネルBは心筋梗塞エリアを定量化したもの. *: P<0.05 (対PBS投与群).

(4) 考察

以上の結果から、1) 虚血でCx43が一過性に介在板に移行する。2) GJsを介した細胞間情報伝達を促進させるが、この時、再灌流が起こると、収縮帯壊死がこの活性化したGJsを介して伝播していくと考えられた。

収縮帯壊死はリスク領域と非リスク領域の境界に多く観察される。収縮帯壊死のGJsを介した伝播はこれまでも細胞培養を用いた実験で示唆されていた。しかし、これまでの知見だけでは、なぜ収縮帯壊死がリスク領域に限られ、非リスク領域には伝播しないのかという疑問を解き明かすことは出来なかった。本研究で得られた結果からこの謎を図5のように説明することができる。

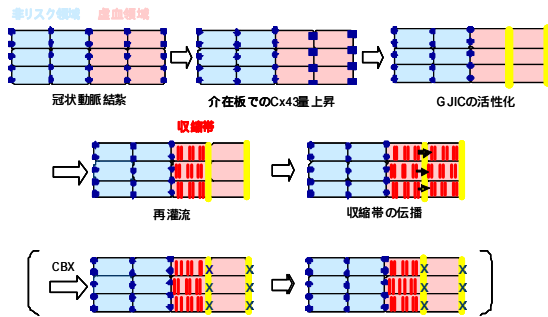


図5 収縮帯壊死がリスク領域にのみ広がるメカニズム。Cx43の介在板への移行に伴うGJICの活性化はリスク領域でのみ起こり、非リスク領域ではGJsは不活性なままである。そのため、再灌流直後に生じた収縮帯壊死はリスク領域にのみ広がっていく。

(5) まとめ

本研究は国内外で初めて、収縮帯壊死がGJsを介して伝播することをin vivoで立証した。心臓突然死症例で観察される、収縮帯壊死のリスク領域での限局性の疑問を解明した。また、再灌流時にGJsプロセッサーを投与すれば、収縮帯壊死の拡大抑制を通じて、心筋梗塞進展を遅らせるという知見は臨床的意義が大きい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Shintani -Ishida K, Unuma K, Yoshida K. Ischemia enhances translocation of connexin43 and gap junction intercellular communication. thereby propagating contraction band necrosis after reperfusion. *Cir J* (in press), 2009 (査読有)

Shintani -Ishida K, Uemura K, Yoshida K. Hemichannels in cardiomyocytes open transiently during ischemia and contribute to reperfusion injury following brief ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, 1714 -1720, 2007 (査読有)

Ohno H, Uemura K, Shintani -Ishida K, Nakamura M, Inomata M, Yoshida K. Ischemia promotes calpain mediated degradation of p120-catenin in SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 547 -552, 2007 (査読有)

Uji M, Yoshida K, Shintani -Ishida K,

Morimoto K. Sex difference in norepinephrine surge in response to psychological stress through nitric oxide in rats. *Life Sci* 80, 860 -866, 2007 (査読有)

[学会発表](計4件)

Shintani -Ishida K, Yoshida K. Why is contraction band necrosis clustered exclusively within the ischemic area? The 7th International Symposium Advances in Legal Medicine 2008年9月3日 大阪市 中央公会堂
新谷 香, 吉田謙一 他 Gap junctionsは心筋虚血再灌流時におけるcontraction bandの細胞間伝播に關与する. 第92次日本法医学会総会 2008年4月25日 長崎市 ブリックホール
新谷香, 吉田謙一 他 Brief Ischemia Enhances Gap Junction Intracellular Communication, Thereby Promoting Cell-to-Cell Spread of Cell Death in Rat Heart. 第72回日本循環器学会総会・学術集会 2008年3月28日 福岡市 福岡国際会議場
新谷香, 吉田謙一 他 Hemichannelsのカルシウム濃度依存的開閉と虚血再灌流傷害への關与. 第91次日本法医学会総会 2007年5月17日 秋田市 秋田ビューホテル

[その他]

ホームページ

<http://plaza.umin.ac.jp/~forensic/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 香 (石田 香)

(SHINTANI KAORI (ISHIDA KAORI))

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 50345047

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし