

機関番号：20101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590870

研究課題名 (和文) 心筋細胞保護シグナルにおけるコネキシン 43 の役割

研究課題名 (英文) Role of connexin-43 in protective signaling in cardiomyocytes

研究代表者

三浦 哲嗣 (MIURA TETSUJI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：90199951

研究成果の概要 (和文)：

心筋細胞において細胞膜上のコネキシン 43 (Cx43) は G 蛋白連関受容体の β サブユニットと相互作用することによってクラス IB PI3 キナーゼ (PI3K) の活性化に寄与しており、PI3K-Akt-グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 β 経路の活性化、その結果としての細胞死抑制に必須な役割を果たしていることが明らかとなった。一方、ミトコンドリア ATP 感受性 K⁺ チャンネルの制御に寄与しているミトコンドリア Cx43 は G 蛋白連関受容体による PI3K-Akt 活性化には関与していないことが示された。

研究成果の概要 (英文)：

This study aimed to clarify role of connexin-43 (Cx43) in a major cytoprotective signaling, PI3K-Akt-GSK-3 β signaling in cardiomyocytes. We found that Cx43 in the sarcolemma contributes to activation of class I_B PI3K as a co-factor of β subunit of G proteins. This role of Cx43 is specific to regulation of class I_B PI3K and is not required for activation of class I_A PI3K. Cx43 in mitochondria, being necessary for redox signaling by activated mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel, was found to be dispensable in PI3K-Akt-GSK-3 β signaling by G-protein coupled receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：コネキシン、細胞シグナル、心筋細胞、細胞死

1. 研究開始当初の背景

コネキシン 43 (connexin-43, Cx43) は細胞膜に存在し、ギャップ結合の構成蛋白として細胞間の電氣的、化学的結合に寄与している。しかし、ギャップ結合以外の細胞膜領域、細胞質、小胞体、ミトコンドリアにも Cx43 は存在し、それぞれの領域における機能についてはほとんど明らかにされていない。我々は、

ギャップ結合蛋白としての Cx43 が心筋虚血再灌流障害の進展に果たす役割、また Cx43 が心筋細胞の G 蛋白連関受容体刺激による PI3K-Akt-GSK-3 β シグナル活性化に寄与していることを明らかにした。しかし、非ギャップ結合蛋白としての Cx43 が PI3K-Akt-GSK-3 β シグナルをはじめとする心筋細胞の生死を制御する細胞内情報伝達系にどのよ

うに寄与しているかについては不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリアならびに細胞膜上にヘミチャンネルとして存在する Cx43 が心筋細胞の生存に寄与する細胞情報伝達系に重要な役割を担っていることを仮説として設定し、特に GSK-3 β への細胞内シグナル伝達経路との関連に注目してその検証を目指す。

3. 研究の方法

培養心筋細胞(H9c2細胞)を用いて、G蛋白連関受容体刺激ならびに IGF-1 受容体刺激による PI3K-Akt-GSK-3 β シグナルを活性化し、この細胞保護シグナルに関与している Cx43 が細胞膜上のものかミトコンドリア内膜のものであるかを解析するために、PI3K と Cx43 との蛋白質相互作用の有無、HSP90 阻害によるミトコンドリア Cx43 発現抑制、Cx43 蛋白質の発現抑制によるミトコンドリア ATP 感受性 K⁺チャンネル (mK_{ATP} チャンネル) の機能の変化、の影響を解析した。蛋白質の発現抑制は siRNA、蛋白質相互作用は免疫沈降、蛋白質リン酸化は特異抗体を用いた Western blotting、HSP90 阻害には geldanamycin、microRNA199a(miR199a)の抑制には miR199a antagomir を用いた。mK_{ATP} チャンネル活性化によるミトコンドリアからの活性酸素(ROS)の定量は MitoTracker Red を指標に行った。細胞壊死、アポトーシスは antimycin A を用いた酸化ストレスにより誘導し、propidium iodide 染色、Hoechst 33342 染色あるいは flow-cytometry で定量した。

4. 研究成果

Cx43 蛋白質発現抑制によって G 蛋白連関受容体 (δ -オピオイド受容体、エンドセリン受容体) 刺激による PI3K-Akt-GSK-3 β 経路活性化が阻害される一方、IGF-1 受容体刺激によるこの経路の活性化には影響が見られないことから、Cx43 は class IB の PI3K 活性化に関与している可能性が高いと考えられた。class IB の PI3K 活性化を制御する蛋白質と Cx43 との相互作用の解析から、G 蛋白質の β サブユニット ($G\beta$) と Cx43 が結合すること、Cx43 のノックダウンの PI3K-Akt-GSK-3 β シグナルへの効果は $G\beta$ のノックダウンにより再現されることなどから、細胞膜 Cx43 が $G\beta$ による PI3K 活性化に重要な役割を果たしていることが示された。

ミトコンドリアにおける Cx43 と PI3K-Akt-GSK-3 β シグナルとの関連については、geldanamycin によるミトコンドリア Cx43 の発現抑制が成功しなかったため、ミトコンドリア Cx43 を必須とする mK_{ATP} チャンネル活性化による ROS を surrogate marker として用いた。G 蛋白連関受容体 (δ -オピオイド受容体、

エンドセリン受容体) 刺激による mK_{ATP} チャンネル活性化は Cx43 のノックダウンに影響を受けず、IGF-1 受容体刺激は mK_{ATP} チャンネル活性化をもたらさなかった。これらの成績から G 蛋白連関受容体活性化に特徴的なミトコンドリア Cx43 を介した mK_{ATP} チャンネル活性化が PI3K-Akt-GSK-3 β に寄与していないことが明らかとなった。

ミトコンドリアにおける Cx43 の機能制御に関与する可能性のある分子として miR199a についても注目して解析を行ったが、両者の間に密接な関連を示唆する成績は得られなかった。

G 蛋白連関受容体活性化による PI3K-Akt-GSK-3 β シグナルは酸化ストレスによる心筋細胞の壊死ならびにアポトーシスを抑制することを確認するとともに、その機序には GSK-3 β -Ser-9 リン酸化によって細胞障害性の ROS 産生が抑制されることが関与していることを明らかにした。

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 17 件)

- 1) Yano T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Itoh T, Takada A, Sato T, Kouzu H, Shimamoto K, Miura T. Hypertensive hypertrophied myocardium is vulnerable to infarction and refractory to erythropoietin-induced protection. Hypertension 査読有 57; 2011: 110-5.
- 2) Miura T. Cytoskeletal proteins: hidden targets of cytoprotective signaling? Circ J 査読有 74; 2010: 2295-6.
- 3) Sato T, Tanno M, Miki T, Yano T, Sato T, Shimamoto K, Miura T. Erythropoietin (EPO) affords more potent cardioprotection by activation of distinct signaling to mitochondrial kinases compared with carbamylated EPO. Cardiovasc Drugs Ther 査読有 24; 2010: 401-8.
- 4) Terashima Y, Sato T, Yano T, Maas O, Itoh T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Shimamoto K, Miura T. Roles of phospho-GSK-3 β in myocardial protection afforded by activation of the mitochondrial K ATP channel. J Mol Cell Cardiol 査読有 49; 2010: 762-70.
- 5) Miura T, Tanno M. Mitochondria and GSK-3beta in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. Cardiovasc Drugs Ther 査読有 24; 2010: 255-63.
- 6) Miura T, Miki T, Yano T. Role of the gap junction in ischemic preconditioning in the heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol 査読有 298; 2010: H1115-25.
- 7) Miura T. Epicardium and pericardium: a joint force for infarct repair? J Mol Cell Cardiol 査読

有 48; 2010: 579-81.

8) Hotta H, Miura T, Miki T, Togashi N, Maeda T, Kim SJ, Tanno M, Yano T, Kuno A, Itoh T, Satoh T, Terashima Y, Ishikawa S, Shimamoto K. Angiotensin II type 1 receptor-mediated upregulation of calcineurin activity underlies impairment of cardioprotective signaling in diabetic hearts. *Circ Res* 査読有 106; 2010: 129-32.

9) Miki T, Miura T, Hotta H, Tanno M, Yano T, Sato T, Terashima Y, Takada A, Ishikawa S, Shimamoto K. Endoplasmic reticulum stress in diabetic hearts abolishes erythropoietin-induced myocardial protection by impairment of phospho-glycogen synthase kinase-3 β -mediated suppression of mitochondrial permeability transition. *Diabetes* 査読有 58; 2009: 2863-72.

10) Miura T, Miki T. GSK-3 β , a therapeutic target for cardiomyocyte protection. *Circ J* 査読有 73; 2009: 1184-92.

11) Miura T, Nishihara M, Miki T. Drug development targeting the glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)-mediated signal transduction pathway: role of GSK-3 β in myocardial protection against ischemia/reperfusion injury. *J Pharmacol Sci* 査読有 109; 2009: 162-7.

12) Naitoh K, Yano T, Miura T, Itoh T, Miki T, Tanno M, Sato T, Hotta H, Terashima Y, Shimamoto K. Roles of Cx43-associated protein kinases in suppression of gap junction-mediated chemical coupling by ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 査読有 296; 2009: H396-403.

13) Ohori K, Miura T, Tanno M, Miki T, Sato T, Ishikawa S, Horio Y, Shimamoto K. Ser9 phosphorylation of mitochondrial GSK-3 β is a primary mechanism of cardiomyocyte protection by erythropoietin against oxidant-induced apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 査読有 295; 2008: H2079-86.

14) Miura T, Miki T. Limitation of myocardial infarct size in the clinical setting: current status and challenges in translating animal experiments into clinical therapy. *Basic Res Cardiol* 査読有 103; 2008: 501-13.

15) Tanno M, Miura T. Adenine nucleotide translocator, a mitochondrial carrier protein, and fate of cardiomyocytes after ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* 査読有 80; 2008: 1-2.

16) Nishino Y, Webb IG, Davidson SM, Ahmed AI, Clark JE, Jacquet S, Shah AM, Miura T, Yellon DM, Avkiran M, Marber MS. Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in

the mouse. *Circ Res* 査読有 103; 2008: 307-14.

17) Kobayashi H, Miura T, Ishida H, Miki T, Tanno M, Yano T, Sato T, Hotta H, Shimamoto K. Limitation of infarct size by erythropoietin is associated with translocation of Akt to the mitochondria after reperfusion. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 査読有 35; 2008: 812-9.

[学会発表] (計 17 件)

1) Kuno A, Tanno M, Ishikawa S, Horio Y, Miura T. Activation of Sirt1 suppresses hypertrophic response of cardiomyocytes by inhibition of H3K9 acetylation via proteasome-mediated p300 degradation. 83rd Scientific Sessions of American Heart Association. (Nov 13-17, 2010). Chicago, USA

2) Ishikawa S, Kuno A, Miki T, Tanno T, Yano T, Kouzu H, Sato T, Sunaga D, Miura T. Connexin-43 contributes to transmission of MitoK_{ATP} channel-derived redox signal to Akt-GSK-3 β pathway in cardiomyocyte protection afforded by G protein-coupled receptors. 83rd Scientific Sessions of American Heart Association. (Nov 13-17, 2010). Chicago, USA

3) Takada A, Miki T, Tanno M, Suzuki H, Yano T, Kuno A, Itoh T, Sato T, Miura T. Ventricular dysfunction and blunted response to adrenergic stimulation in obese type 2 diabetes predispose to fatal heart failure after infarction: Possible involvement of microRNA-1 down-regulation. 83rd Scientific Sessions of American Heart Association. (Nov 13-17, 2010). Chicago, USA

4) Kouzu H, Itoh T, Miki T, Tanno M, Yano Y, Sato T, Takada A, Sunaga D, Miura T. Increased ER stress is a fundamental mechanism for impairment of cardioprotective signaling in type 2 diabetes. 83rd Scientific Sessions of American Heart Association. (Nov 13-17, 2010). Chicago, USA

5) Ishikawa S, Miki T, Tanno M, Miura T. Connexin43-dependent mitochondrial GSK-3 β phosphorylation in protection of cardiomyocyte against necrosis. 20th World Congress of the International Society for Heart Research. (May 13-16, 2010). Kyoto, Japan.

6) Yano T, Tanno M, Itoh T, Miura T. Enhancement of cyclophilin-D-ANT interaction upon reperfusion in hypertensive hypertrophied hearts: a target of cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. 20th World Congress of the International Society for Heart Research. (May 13-16, 2010). Kyoto, Japan.

7) Itoh T, Terashima Y, Miki T, Miura T, Shimamoto K. Role of GSK-3 β in negative regulation of the mPTPs by the mitochondrial K_{ATP} channel. 20th World Congress of the

International Society for Heart Research. (May 13-16, 2010). Kyoto, Japan.

8) Sato T, Miura T, Tanno M, Miki T, Takada A, Itoh T, Shimamoto K. Mitochondria is a critical compartment for phospho-GSK-3 β to afford cytoprotection against ischemia/reperfusion injury. 20th World Congress of the International Society for Heart Research. (May 13-16, 2010). Kyoto, Japan.

9) Miura T, Miki T, Shimamoto K. Glycogen synthase kinase-3 β as a therapeutic target for cardiomyocyte protection. 20th World Congress of the International Society for Heart Research. (May 13-16, 2010). Kyoto, Japan.

10) Miura T, Terashima Y, Maas O, Miki T, Tanno M, Ishikawa S, Shimamoto K. Role of GSK-3 β in negative regulation of mitochondrial permeability transition pore by the mitochondrial KATP channel. 31st Congress of the European Society of Cardiology. (Aug 29-Sep 2, 2009). Barcelona, Spain.

11) Miki T, Yano T, Miura T, Tanno M, Shimamoto K. Enhanced ANT-cyclophilin-D interaction underlies reduced anti-infarct tolerance and loss of protective response to erythropoietin in hypertensive hypertrophied hearts. 31st Congress of the European Society of Cardiology. (Aug 29- Sep 2, 2009). Barcelona, Spain.

12) Miura T, Hotta H, Miki T, Yano T, Ishikawa S, Shimamoto K. Jak2-mediated cardioprotective signaling is impaired in diabetic hearts by AT₁ receptor-mediated up-regulation of calcineurin. 31st Congress of the European Society of Cardiology. (Aug 29- Sep 2, 2009). Barcelona, Spain.

13) Kuno A, Tanno M, Miura T, Horio Y, Shimamoto K. Activation of histone/protein deacetylase SIRT1 by resveratrol induces MnSOD upregulation via FOXO3a and improves survival of heart failure animals. 31st Congress of the European Society of Cardiology. (Aug 29-Sep 2, 2009). Barcelona, Spain.

14) Miki T, Tanno M, Kuno A, Yano T, Sato T, Hotta H, Ichikawa S, Miura T. ER stress contributes to dysregulation of GSK-3 β -mediated suppression of mitochondrial permeability transition in diabetic hearts. 81st Scientific Sessions of American Heart Association. (Nov 8-12, 2008) New Orleans, USA.

15) Ishikawa S, Miura T, Tanno M, Kuno A, Sato T, Hotta H, Terashima Y, Miki T. Connexin43-dependent and -independent mechanisms of mitochondrial GSK-3 β phosphorylation in protection of cardiomyocyte against necrosis. 81st Scientific Sessions of American Heart Association. (Nov 8-12, 2008) New Orleans,

USA.

16) Tanno M, Kuno A, Miki T, Miura T, Horio Y, Shimamoto K. Activation of a protein deacetylase, SIRT1, by Resveratrol suppresses progression of heart failure and improves survival by up-regulation of Mn-SOD. 81st Scientific Sessions of American Heart Association. (Nov 8-12, 2008) New Orleans, USA.

17) Kuno A, Tanno M, Miura T, Horio Y, Shimamoto K. Resveratrol, an activator of protein deacetylase SIRT1, suppresses oxidative stress-induced cell death by upregulating MnSOD expression through transactivation of Foxo3a. 81st Scientific Sessions of American Heart Association. (Nov 8-12, 2008) New Orleans, USA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 哲嗣 (MIURA TETSUJI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90199951

(2) 研究分担者

三木 隆幸 (MIKI TAKAYUKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00336405

(3)研究分担者

丹野 雅也 (TANNO MASAYA)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：00398322