

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：平成 21 年度～平成 23 年度

課題番号：21590420

研究課題名（和文）

間質が関与する心臓の興奮伝導異常におけるギャップ結合コミュニケーションの役割

研究課題名（英文）

Role of gap-junctional coupling between cardiomyocytes and stromal cells in genesis of cardiac arrhythmias

研究代表者

田中 秀央 (Tanaka Hideo)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60236619

研究成果の概要（和文）：

心筋梗塞の修復期には血管内皮細胞や線維芽細胞の増生による肉芽組織が形成される。これらの間質細胞が心筋細胞との間にギャップ結合 connexin43 (以下 Cx43) を介して電氣的結合すると、心筋は興奮伝導は異常をきたし致死的不整脈につながる可能性がある。この可能性を検証するために血管内皮細胞や線維芽細胞の Cx43 を特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (以下 Cx43 欠損マウス) を作成し、間質細胞の Cx43 欠損が心筋梗塞後の興奮伝導異常や致死性不整脈の発生を抑制するか否かを検討、併せて新生児ラットから単離した心筋細胞と筋線維芽細胞を用いて興奮伝導異常の解析を行い、以下の結果を得た。

1. Cx43 欠損マウスの冠動脈を結紮し心筋梗塞を作成、修復期にあたる梗塞 5 日後まで連続心電図記録し不整脈解析を行った。対照に野生型マウスを用いた。左心室の概ね 45% の領域に心筋梗塞が形成されたが、両群マウス間に梗塞サイズに有意差はなかった。また梗塞作成後 4 - 5 日に不整脈の発生頻度は増大したが、有意な致死的不整脈はなく、不整脈の頻度も全心拍数の 0.06% 程度と低く、両群間でも不整脈発生に有意な差はなかった。
 2. 一方、冠動脈結紮 5 日後の梗塞巣中の凝固壊死巣と肉芽組織巣の比率を求めると、Cx43 欠損マウスでは野生型マウスに比して有意に凝固壊死巣が大きく、肉芽組織の形成が不十分であることが示唆された。このことから血管内皮細胞・線維芽細胞の Cx43 の欠損が梗塞の修復を遅らせる可能性が示唆された。
 3. ラット新生仔の心筋細胞を 35mm 培養皿で単層培養し、これをさらに線維芽細胞の単層培養組織との間に多数の小孔を有する培養膜を置き培養したところ、両細胞間に Cx43 のギャップ結合が形成され、心筋・線維芽細胞の間の両細胞間の色素移行、心筋の興奮伝導速度の低下が確認された。2 種の細胞を各々片面に培養した組織では両側に心筋細胞を培養した組織比しリエントリー性不整脈が発生し易いこと、さらに心筋・線維芽細胞間のギャップ結合の空間的不均一性がリエントリー性の異常の素地になるという結果を確認した。
- 以上、本研究では間質細胞の Cx43 のノックアウトマウスが心筋梗塞に伴う不整脈を抑止するとの仮説は実証できなかったが、梗塞巣の修復が遅延する傾向が明らかになった。この結果は梗塞後の組織修復における間質細胞の動員に Cx43 が何らかの役割を演じている可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：

During the healing phase of myocardial infarct, proliferation of endothelial cells and fibroblasts constitute granulation tissue to replace the infarct resion. Recent reports have confirmed that stromal cells, especially fibroblasts, coupled electrically with cardiomyocytes via gap junction proteins connexins, provide an important basis for cardiac arrhythmias.

However, it is unresolved whether or not stromal cells at the border zone of myocardial infarct really contribute to the arrhythmogenesis. To address this, this project was conducted by using an infarct model of conditional knockout mice specific for Cx43 in the Fsp-1 proteins.

Continuous ECG recording in combination with histological analysis was conducted in the Fsp-Cre/Cx43 loxP mice. It was found that the heart devoid of Cx43 in the fibroblasts and endothelial cells failed to attenuate ventricular arrhythmias after infarction. However, formation of granulation tissue showed a significant retardation in the Cx43-KO mice after infarction as compared with wild type mice. The results indicate that Cx43 contributes to formation of granulation tissue in the infarct heart.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	2,200,000	660,000	2,860,000
平成22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成23年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：線維芽細胞、心筋梗塞、ギャップ結合、不整脈、肉芽組織

1. 研究開始当初の背景

心筋ギャップ結合タンパクであるコネクシン43 (Cx43) は、心筋細胞間の電氣的結合を司る重要な細胞間結合蛋白である。近年、Cx43が心筋細胞間のみならず、心筋細胞・間質細胞間にも発現することが免疫組織化学的に明らかにされ、両細胞間にギャップ結合コミュニケーションが形成される可能性が示唆されている。しかしながらその機能については、培養細胞の系で心筋細胞・線維芽細胞間のギャップ結合コミュニケーションが形成され心筋の電氣的特性が変化すると報告に留まっており、実際の心臓内でこのような異種細胞間のギャップ結合が機能するか否かは明らかにされていない。本研究では、梗塞心の梗塞境界組織に着目し、壊死に陥った心筋に代わって線維芽細胞や血管内皮細胞の増生により形成される肉芽組織（間質）が心筋とギャップ結合を形成すれば、心筋の興奮伝導異常、すなわち不整脈を惹起しやすくなる可能性があるという仮説を立て、以下の実験を行った。

2. 研究の目的

線維芽細胞や血管内皮細胞のCx43の発現を特異的にノックアウトし心筋とのギャップ結合を阻害すれば、不整脈の発生が抑止できるとの仮説をたて、これを検証するために線維芽細胞と血管内皮細胞に特異的に発現するFsp-1蛋白をターゲットとしたCx43コンディショナルノックアウトマウスを作成、同マウスの心筋梗塞修復期の不整脈ならびに心

臓の組織形態学的解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) コンディショナルノックアウトマウス (FspCre・Cx43)の作製
線維芽細胞特異的蛋白プロモーター(FSP-1)下にCreリコンビナーゼを発現させるトランスジェニックマウス (FSP1Cre マウス)とCx43をloxP配列で挟んだターゲティングマウス (Cx43-Flox マウス)を交配させることにより、線維芽細胞や血管内皮細胞のCx43を特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (CKO マウス)を作製し繁殖させた (図1)。

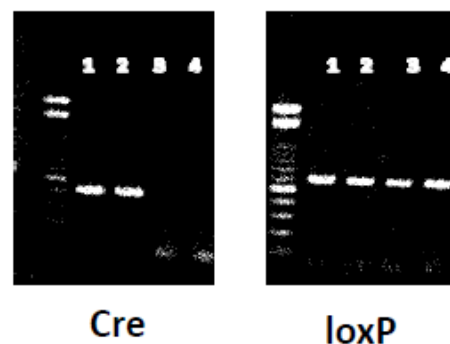


図1 1, 2 ; CKO 3, 4: Cx43fl/-

併せて両マウスの尾から線維芽細胞を単離・培養し、Cx43 の免疫細胞化学を行った (図2)。

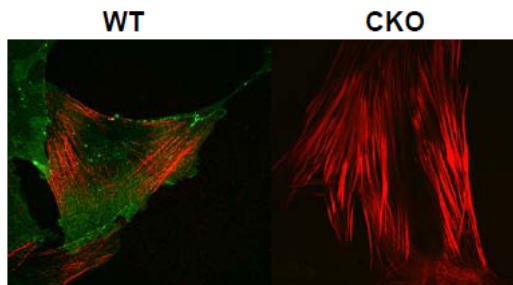


図2 赤：アクチン、 緑：Cx43

(2) 心筋梗塞モデルマウス作製

12 週齢の CKO マウスと対照の野生型マウス (C57B6、以下 WT) の雄を、全身麻酔下に開胸、左冠動脈起始部を結紮するにより心筋梗塞を作成した。冠動脈結紮後 5 日目に心臓を摘出し、心筋梗塞の組織形態学的解析に供した。

(3) テレメトリー法による連続心電図記録

心筋梗塞作製の際、双極電極を心臓を挟み込む形で右上前胸部の鎖骨下と左下側胸部の 2 点に留置し、腹腔内にテレメータ (送信機) を留置した。閉胸後より心臓摘出の 5 日目まで心電図の連続記録を行なった。

(4) 組織形態学的解析

心筋梗塞作成後 5 日目に全身麻酔下心臓を摘出、直ちに 2% パラホルムアルデヒドで浸漬固定し、パラフィン包埋の上組織切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン染色及びマッソン・トリクロム染色で行なった。なお心臓摘出の際、心臓の重量を計量した。

(5) ラット新生仔心筋細胞・線維芽細胞培養組織の興奮伝導異常

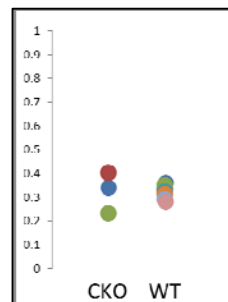
ラット新生仔の心筋細胞を 35mm 培養皿で単層培養し、これをさらに線維芽細胞の単層培養組織との間に多数の小孔を有する培養膜を置き培養したところ、両細胞間に Cx43 のギャップ結合が形成され、両細胞間の色素移行、心筋の興奮伝導速度の低下が確認された。両側に心筋細胞を培養した組織では、心筋・線維芽細胞間の混合培養に比しリエントリー性不整脈が発生し易いこと、さらに心筋・線維芽細胞間のギャップ結合の空間的不均一性がリエントリー性の異常の素地になるという結果を確認した。

4. 研究成果

(1) 梗塞心重量の比較

CKO マウス (n=3) と WT マウス (n=9) との間で梗塞心の重量に有意差はなかった (図3)。

図3



(2) 心室性不整脈の検討

CKO マウス、WT マウスともに心室性不整脈は梗塞後 4-5 日に発生が増大した (図4)。しかしその頻度は総心拍数の 0.06% 程度と少なく、CKO マウスでむしろ頻度がやや増大を示したものの両群間で不整脈頻度に有意な差は認めなかった。不整脈は単発ないし 2-3 連発の心室期外収縮で、心室

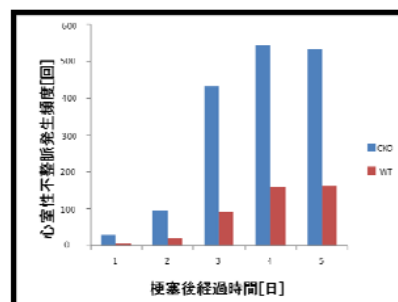
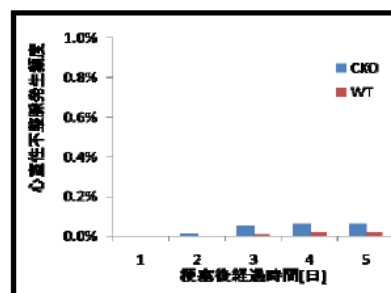
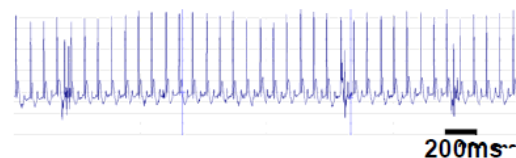


図4 マウス梗塞心の不整脈の記録例 (上段)、心室性不整脈の日別発生率 (中段)、心室性不整脈の日別発生回数 (下段)

細動や心室頻拍などの致死的な不整脈の発生は認めなかった。

(3) 心室性不整脈の検討

冠動脈結紮 5 日後の梗塞巣を組織学的に比較すると、左室に占める梗塞巣の割合には両群間に差はなかった (図 5, 6)。これに対し、凝固壊死巣と肉芽組織巣の比率を求めると、CKO マウスでは WT マウスに比して有意に凝固壊死巣が大きく、肉芽組織の形成が不十分であることが示唆された (図 7、図 8)。

図 5

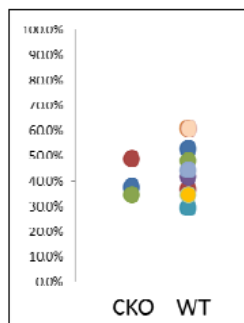
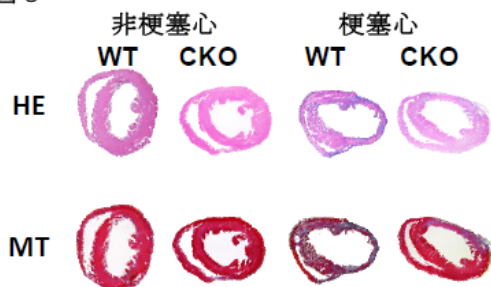


図 6 : 梗塞巣の左室に占める割合

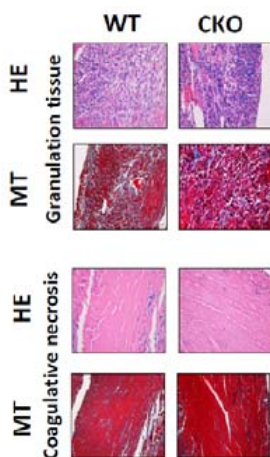


図 7 梗塞組織内の肉芽組織と凝固壊死巣

《 % granulation tissue 》

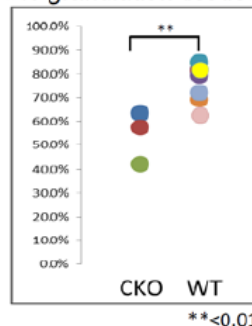


図 8 梗塞組織内の肉芽組織の比率

以上、心筋・線維芽細胞間の不均一なギャップ結合コミュニケーションは不整脈の発生に重要な素地を形成することが確認できた。間質細胞のCx43のノックアウトマウスが心筋梗塞に伴う不整脈を抑止するとの仮説は実証できなかったが、梗塞巣の修復が遅延する傾向が明らかになった。Cx43ノックアウトマウスから得られた結果は梗塞後の組織修復における間質細胞の動員にCx43が何らかの役割を演じている可能性を示唆する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Imaizumi K, Harada Y, Wakabayashi N, Yamaoka Y, Konishi H, Dai P, Tanaka H, Takamatsu T. Dual-wavelength excitation of mucosal autofluorescence for precise detection of diminutive colonic adenomas *Gastrointest Endosc*, 査読有、75巻、2012、110 – 117. 10.1016/j.gie.2011.08.012
- ② Nakamura H, Matoba S, Iwai-Kanai E, Kimata M, Hoshino A, Nakaoka M, Katamura M, Okawa Y, Mita Y, Ikeda K, Okigaki M, Adachi S, Tanaka H, Takamatsu T, Matsubara H. p53 promotes cardiac dysfunction in diabetic mellitus due to excessive mitochondrial respiration-mediated ROS generation and lipid accumulation *Circ- Heart Fail*, 査読有、5巻、2012、106 – 115. 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.111.961565
- ③ Tanaka H, Mani, H, Adachi T, Jiang Y, Takamatsu T. Dissipation of beta-dystroglycan with resultant hypercontracture of sarcomeres is culprit for formation of contraction bands in rat injured hearts. *Eur Heart J*. 査読有、32巻 (Suppl 1), 2011, 691 – 691. doi:10.1093/eurheartj/ehr324

〔学会発表〕（計5件）

- ① Tanaka H, Mani, H, Adachi T, Jiang Y, Takamatsu T. Dissipation of beta-dystroglycan with resultant hypercontracture of sarcomeres is culprit for formation of contraction bands in rat injured hearts. European Heart Congress 2011, August 30, 2011, フランス共和国パリ市
- ② 足達哲也、田中秀央、姜艶、橋本恵美、高松哲郎 心筋・線維芽細胞間ギャップ結合コミュニケーションは心筋の興奮伝導を障害する 日本組織細胞化学会学術集会、平成23年9月24日、金沢市
- ③ 田中秀央、足達哲也、姜艶、橋本恵美、高松哲郎 虚血・再灌流障害心の収縮帯形成は β ジストログリカンの脱落によって生じる 日本組織細胞化学会学術集会、平成23年9月24日、金沢市
- ④ 足達哲也、田中秀央、姜艶、橋本恵美、高松哲郎 心筋・線維芽細胞間ギャップ結合コミュニケーションは興奮伝導を障害する 日本病理学会総会、平成23年4月28日、横浜市
- ⑤ 田中秀央、万井広基、足達哲也、姜艶、高松哲郎 虚血・再灌流障害心の収縮帯形成におけるコスタメアの役割 日本病理学会総会、平成23年4月28日、横浜市

〔図書〕（計2件）

- ① 田中秀央、足達哲也 中山書店 疾患モデルマウス表現型解析指南 2011 心筋虚血 pp.151 - 157
- ② 田中秀央、高松哲郎 学際企画 組織細胞化学 2011 光による生体分子イメージング技術 pp. 167 - 173.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 秀央(Tanaka Hideo)
 京都府立医科大学・大学院医学研究科・
 准教授
 研究者番号:60236619