

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591091

研究課題名(和文)ギャップ結合による洞機能パリティ保証機構の解明

研究課題名(英文)Parity check by gap junctions maintains normal cardiac conduction in sinoatrial node

研究代表者

西井 明子(関明子)(Nishii, Akiko)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80408608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ギャップジャンクション(GJ)は、細胞間の通路であり、コネクシン(Cx)と呼ばれる単位蛋白により構成される。Cx45は胎児では心臓全体、成体では刺激伝導系に限局して存在し、活動電位の伝播に関わる。我々は、個々の心筋細胞の活動電位を協調させ、適切なリズムの出力を得るためには、Cx45によるエラーチェック機構(パリティ保証機構)が必要であると仮定した。その仮説を検証するため、胎生期及び成体における心筋Cx45ノックアウトマウスを作製したところ、胎児・成体の両方に於いて、心臓伝導障害が認められた。これらの結果から、Cx45は心臓刺激伝導系のパリティ保証機構に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gap junctions (GJ) are intercellular pathway consisted of protein called connexins (Cx). Cx45 is distributed in whole heart in early embryonic stage and it is restricted in cardiac conduction system in the adult heart. We proposed that parity check by Cx45 is important to maintain normal cardiac conduction. To verify this hypothesis, we built region and time specific Cx45 knockout mice. Both in embryonic and adult heart, Cx45 knockout showed abnormal cardiac conduction. The data are in agreement with the hypothesis.

研究分野：医師薬学

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：ギャップジャンクション コネクシン45 洞結節 パリティ保証機構 ノックアウトマウス 伝導障害

1. 研究開始当初の背景

ギャップジャンクション(GJ)は、細胞間の通路であり、コネキシン(Cx)と呼ばれる単位蛋白が12個集合することによって形成される。心筋にはCx43, 40, 45, 46, 30.2, 31の発現が報告されている。

Cx45は胎生初期心臓に発現する最初のCxであり、この時期には心臓全体に豊富に発現している。発達・成長と共にCx45の発現量は減少し、Cx43, 40が作業心筋に多く発現するようになる。出生後、Cx45の分布は心臓刺激伝導系に限局する。

洞結節は、100個ほどの小型で球形～楕円形の横紋に乏しい洞結節細胞で構成され、通常心筋細胞とは区別される細胞塊である。成体の心臓刺激伝導系にはCx40, 45, 30.2が発現しており、中でもCx45とCx30.2は洞結節の中心部に多く存在し、他のCxに比較してそのコンダクタンスは小さく、Cx45は特に電位依存性・pH依存性が強いという特徴を持つ。

洞リズム形成においては、洞結節中で最も速く活動電位を生成する細胞に同調して他の洞結節細胞も興奮し、洞結節全体として整流(=パリティチェック)を受けた出力が生成される。本研究に先立つ予備実験において、マウス成獣のCx45をタモキシフェンを用いて時期特異的・心臓特異的にノックアウトすると、生理的洞リズムに変化は見られないものの、洞結節回復時間が延長するという結果が得られた。この結果は、洞リズム発生メカニズムの基盤において、洞結節細胞塊内におけるパリティ保証機構が存在し、Cx45がその役割を担うと解釈できる。洞機能不全症候群などの病的状態においては、GJによるパリティチェックが障害されていると考えられ、GJをターゲットとした治療法が有効となる可能性がある。

2. 研究の目的

洞結節細胞内の活動電位の伝導及び協調におけるエラーチェック機構の役割をCx45が担っているという仮説を、分子生物学的、電気生理学的方法を用いて検証することが、この研究の目的である。

3. 研究の方法

胎生期及び成体における心筋Cx45ノックアウトマウスを作製し、その形態及び機能について検討した。胎生8.5日から10.5日の胎児心臓のビデオを撮影し、点追跡ソフト(Motion Analyzer, Keyence)を用いて、胎児心臓の画像上に13の点を設定し、各々の点の時間軸に対する位置をプロットした。成体心臓のCx45の時期特異的・心臓特異的ノックアウトについては、タモキシフェン誘発性ノックアウトシステムを用いた。タモキシフェンの投与前後において、体表面心電図と電気生理学的検査(食道ペースキングによる洞

結節及び房室結節の機能評価)を行った。

4. 研究成果

野生型及びCx45の胎生ノックアウトマウス(Cx45KO)の胎生8.5から10.5日の心臓をビデオ撮影し、点追跡ソフトを用いた解析を行った。形態異常としては、心内膜床欠損がみられた。点追跡によるラスタプロットでは、Cx45KOについて房室伝導ブロックと逆行性伝導がみられた(図1, 2)。心臓の収縮は心房から心室への秩序立ったものではなく、蠕動様で、胎児は胎生10.5日で死亡した。

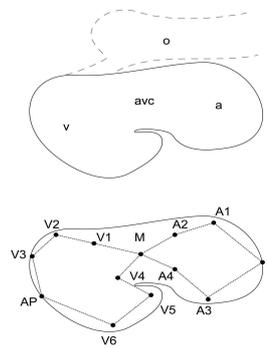


写真: 胎生8.5日の心臓(野生型マウス)。左図上: 同心臓のトレース像。a: atrium, v: ventricle, avc; atrioventricular canal. 左下図: 心臓上に設定した13個の点を示す。

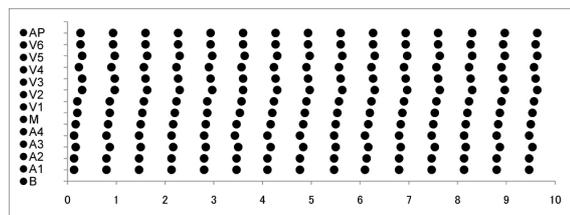


図1. 野生型マウスの胎児心臓における刺激伝導(点追跡ソフトによるラスタプロット)。心房から心室へ、順行性に1:1伝導がみられる。

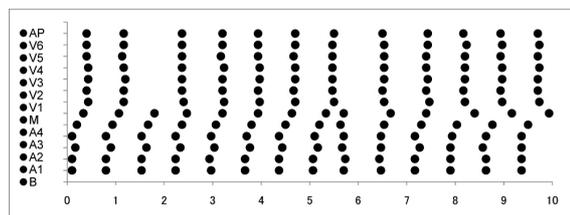


図2. Cx45KOマウスの胎児心臓における刺激伝導。伝導の中断(ブロック)、逆行性伝導がみられる。

収縮期及び拡張期の心室容積を、B から M、M から AP に引いた直線を軸として回転させた際に得られる円筒の容積と仮定して計算したところ、Cx45KO マウスでは成長、発達に必要な心拍出量が得られていないと推察された。

一方、タモキシフェンを用いた時期特異的・心臓特異的 Cx45 ノックアウトでは、成体心臓に於いては、安静時心拍数、体表面心電図の各パラメーターには有意な変化はみられなかった。食道ペースティングによる電気生理学的検査では、洞結節回復時間の延長がみられ、洞結節機能が潜在的に障害されていることが示唆された(表 1、2)。

| | HR | PR | QRS | QTc |
|------|--------------|------------|-----------|------------|
| Pre | 455.7 ± 19.6 | 33.7 ± 1.2 | 8.9 ± 0.4 | 37.1 ± 5.5 |
| Post | 451.6 ± 12.5 | 36.9 ± 2.4 | 9.3 ± 0.8 | 34.9 ± 4.4 |
| p | 0.87 | 0.30 | 0.65 | 0.77 |

表 1. タモキシフェン投与前 (Pre) と投与後 (Post) の体表面心電図パラメーター (N=7)。投与前後で有意差はみられなかった。

Cre(+)/Cx45(Flox/Flox)

| | SNRT | CSNRT | AV2:1 rate | Atrial ERP |
|------|--------------|--------------|-------------|------------|
| Pre | 178.7 ± 11.1 | 54.3 ± 10.9 | 58.6 ± 9.1 | 52.9 ± 4.2 |
| Post | 235.7 ± 13.1 | 102.4 ± 17.3 | 62.9 ± 10.9 | 56.4 ± 5.7 |
| p | 0.006 | 0.01 | 0.92 | 0.62 |

Cre(-)/Cx45(Flox/Flox)

| | SNRT | CSNRT | AV2:1 rate | Atrial ERP |
|------|-------------|-------------|------------|------------|
| Pre | 184.8 ± 5.2 | 59.03 ± 4.5 | 59.7 ± 1.5 | 57.5 ± 1.5 |
| Post | 193.9 ± 8.5 | 66.3 ± 8.2 | 57.7 ± 1.3 | 54.6 ± 1.4 |
| p | 0.42 | 0.49 | 0.38 | 0.24 |

表 2. 食道ペースティングによる洞結節機能、房室結節機能、心房不応期の評価 (N=7)。Cre(-)/Cx45(Flox/Flox)はコントロール群。

タモキシフェンによる Cx45KO 群では、洞結節機能の有意な低下を認めた(赤字)。コントロール群では投与前後で変化を認めなかった。

恒久的ペースメーカー植え込みを必要とするヒトにおける洞結節機能障害では、潜在的な洞結節機能低下に加え、洞結節部及び周囲の線維化がみられることが報告されている。

今回は生後 5 週から 20 週までの若年マウスを使用し、組織学的には洞結節部及び周囲の線維化の所見は認めなかったが、加齢による線維化が加わることにより洞結節機能の更なる低下がみられることが予想される。これらのことから、胎児心臓においては、刺激伝導及び心筋収縮の全般、また成体の心臓に於いては主に洞結節機能について、Cx45 によるパリティ保証機構が存在すると考えられた。

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

西井 清雅、関 明子、David L. Paul、萩原 誠久、小林 靖、網膜電気シナプスはカルシウム依存転写因子 NFAT の活性化に必要である。第 119 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 平成 26 年 3 月 2 9 日(土) (3/27-29) 自治医科大学(下野)

関 明子、西井 清雅、柴田 洋三郎、小林 靖、萩原 誠久、Cx knock-out と不整脈。Role of connexins on cardiac arrhythmia。(シンポジウム: 心筋ギャップ結合機能調節機構とその病態, 招待)。第 91 回 日本生理学会大会 平成 26 年 3 月 1 6 日(日) (3/16-18) 鹿児島大学(鹿児島)

西井 清雅、関 明子、熊井 まどか、森本 幸生、三輪 岳志、萩原 誠久、柴田 洋三郎、小林 靖。Connexin45 conducts essential myocardial functions during heart development。第 36 回 日本分子生物学会年会 平成 25 年 1 2 月 3 日(火) (12/3-6) 大阪大学(神戸)

[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

関 明子 (SEKI, Akiko)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80408608

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

西井 清雅 (NISHII Kiyomasa)

防衛医科大学校・医学部・助教

研究者番号：20264020