

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860215

研究課題名(和文) 不全心における胎生期遺伝子再発現が心筋ギャップ結合の発現・分布・機能に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of fetal gene reprogramming on expression, distribution and expression of gap junction in failing hearts

研究代表者

高成 広起 (Takanari, Hiroki)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70723253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞間の物質や電氣的興奮のやりとりはギャップ結合を介して行われる。心室でギャップ結合を構成するコネキシン43蛋白(Cx43)の発現・分布異常は、心筋組織の電氣的興奮の伝導性に影響を及ぼし、重大な不整脈の原因となる。本研究ではCx43の発現・分布を制御する因子について詳細に検討を加えた。胎生期遺伝子についてはCx43に影響するものを抽出するに至らなかった。細胞内カルシウム制御蛋白・キナーゼはCx43の分布制御を介して心筋組織の興奮伝導性に影響を及ぼした。脂質(コレステロール)は心室のCx43に影響しなかったが、心房のコネキシン40蛋白発現を減少させ、脂質代謝異常と心房細動との関連を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Gap junction in the heart tissue contributes to the intercellular communication between adjacent cardiomyocytes. Gap junction channel consists of connexin43 protein (Cx43) in ventricle. We examined the molecular mechanisms which control the expression and the subcellular distribution of Cx43 in the heart. Unfortunately, we could not find any apparent molecules from fetal gene program which could influence the expression of Cx43 expression. Calcium handling protein and protein kinase depends to it modified the distribution of Cx43 in the heart, which resulted in alteration of electrical conductance of the heart tissue. Cholesterol did not affect the expression of Cx43, while mRNA level of connexin40 protein was significantly decreased by cholesterol application. The result suggested the relation between lipid metabolism disorder and cardiac arrhythmias such as atrial fibrillation.

研究分野：心臓電気生理学

キーワード：心筋ギャップ結合 Connexin43 Connexin40 カルモデュリン CaMK-II 脂質負荷

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞などの虚血性心疾患や、高血圧に伴う心肥大など、器質的心疾患に伴う致死性不整脈は生活習慣病などの基礎疾患の発症と共に増加傾向にある。これら病態心において、心筋ギャップ結合を構成するコネクシン 43 (Cx43) 蛋白の発現が低下するとともに、本来存在するべき心筋介在板ではなく心筋細胞側面に発現する分布異常を生じることが知られている。心筋ギャップ結合は心筋細胞間の物質交換や電氣的興奮の伝達を担っている。このため、不全心における Cx43 の発現・分布異常は心臓全体の興奮伝播異常や催不整脈性を惹起する。Cx43 の発現・分布を制御するメカニズムには未だに不明な点が多く存在する。

2. 研究の目的

本研究では不全心における Cx43 の発現・分布異常に影響する因子およびそのメカニズムを明確にすることを目的として研究を行った。特に、胎生期に発現して成長とともに消失し、不全心で再発現すると考えられる胎生期遺伝子プログラム、細胞内 Ca^{2+} とその制御に関連するカルモデュリン (CaM) あるいは 2 型 CaM 関連蛋白キナーゼ (CaMK-II) 細胞の脂質二重膜を構成し、その増減によって細胞膜の特性を変化させうる脂質 (特にコレステロール) 以上 3 つの因子が Cx43 発現・分布に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

1. 新生仔ラット心室筋培養を免疫染色法で観察し、ギャップ結合蛋白 Cx43 と細胞接着蛋白であるカドヘリンの細胞内局在を確認した。
2. 新生仔ラット心室筋培養において CaM 阻害剤 W7 の投与による Cx43 の分布変化を細胞膜分画の Western blot 法で定量評価した。また、Cx43 チャンネルを透過する色素 Lucifer Yellow を心筋細胞シートに投与し、W7 による Cx43 チャンネルの透過性を定量評価した。
3. CaMK-II を阻害する AC3-1 ペプチドを強制発現させたマウス (AC3-1 マウス) および正常野生型マウスに大動脈縮索術 (TAC) による心負荷モデルを作成し、Cx43 の分布を細胞膜分画の Western blot 法で定量評価した。また、これらマウスの摘出心臓をランゲンドルフ灌流して、心臓表面に多電極アレイを密着させて心表面の興奮伝導速度を記録し、期外刺激による不整脈誘発試験を行った。
4. 正常野生型マウス (WT) および慢性炎症モデルである IL-10 ノックアウト・マウス (IL10-KO) に対して正常食あるいは 60% ラードを含む高脂肪食を 4 週間与え、心電図変化や不整脈誘発率の変化を検証した。また心臓組織における繊維化マ

ーカー (SMA, Col-1)、Cx43 (心室型 Connexin) および Cx40 (心房型 Connexin) の mRNA 発現を qPCR 法で定量評価した。

4. 研究成果

1. 新生仔ラットから採取した幼若心筋では Cx43 が細胞膜全体に分布するが、そもそも Cx43 が存在するべき心筋介在板の構造自体が未成熟であった。カドヘリン蛋白など本来介在板に存在するはずの膜蛋白が細胞膜全体に満遍なく発現していた。カドヘリンはカテニンや ZO-1 といった介在蛋白と共に心筋介在板に存在し、Cx43 の発現を介在板に誘導する因子であることが既に知られている。今回の研究結果から、幼若心筋ではカドヘリン蛋白など介在板を構成する蛋白の分布異常が根底にあり、介在板の構造的な未成熟さが新生仔ラット心筋における Cx43 分布異常の原因であることが示唆された。
2. 新生仔ラット心室筋培養においては、W7 によって Cx43 の全体発現量は変化しなかったが、細胞膜分画 (介在板成分) の Cx43 が約 20% 増加し、代わりに細胞質分画の Cx43 が減少した。Lucifer Yellow を用いた色素拡散実験では、30 分の W7 曝露によって Lucifer Yellow の透過性が約 15% 増加し、W7 による CaM 阻害によってギャップ結合チャンネルの透過性が亢進していることが示された。以前の研究で W7 は心筋の興奮伝導性、あるいは Cx43 を介したギャップ結合の電氣的コンダクタンスを増大させることが示されている。これらの結果を合わせると、W7 による Ca^{2+} -CaM 阻害は Cx43 の介在板への集積を増やすことで電氣的コンダクタンスを増大させることが示唆された。
3. 正常野生型マウスに TAC 術を施すと、慢性期 (術後 16 週) に Cx43 の発現低下や分布異常を示して興奮伝導遅延が生じ、期外刺激により容易に心室性不整脈が誘発された。AC3-1 産生マウスはベースラインでの興奮伝導速度が野生型よりも 30% 程増大していた。さらに、TAC 術後も Cx43 の発現・分布は介在板において維持され、興奮伝導速度も維持されていた。しかし、不整脈の誘発試験では野生型マウスに TAC を施した場合と比べて大きな差異は認めなかった。これらの結果から、CaMK-II 阻害もまた Cx43 の介在板への集積を増やすことで電氣的コンダクタンスを増大させ、興奮伝導を亢進することが示されたが、残念ながらそれだけでは不整脈を完全に抑制できないこともまた示された。
4. WT マウスに高脂肪食を与えると、心室筋の Cx43 発現は変化しなかったが、心房筋において Cx40 の発現が減少した。一

方、IL10-K0 マウスでは通常食でも心臓組織に線維化を生じ、Cx43 の発現が減少したが、Cx40 の発現には変化は生じなかった。さらに IL10-K0 マウスに高脂肪食を与えると通常食と比べて心筋組織の線維化マーカーが増大し、心房においてはCx40 の発現が有意に減少した。WT マウスでは高脂肪食の投与によってわずかに P 波（心房波）の長さが延長し、IL10-K0 マウスに高脂肪食を与えた場合には P 波の波長が優位に延長した。すなわち、高脂肪食が心房筋の興奮電動遅延を生じることが示された。一方、心室の興奮伝導を示す QRS 波の波長は、高脂肪食投与の有無にかかわらず変化がなかった。これらの結果から、Cx43 の発現には主に炎症・線維化の過程が関与し、Cx40 の発現には脂質（コレステロール）による細胞膜の特性が関与する可能性が示唆された。臨床では脂質代謝異常（高コレステロール血症など）において心房の興奮伝導遅延や不整脈（心房細動）を生じることが以前より示唆されており、本研究によってそのメカニズムを解明する研究の一端となりうる成果を上げることができた。

研究成果 1. については研究仮説と異なる結果であり、ネガティブ・データであったため、論文作成は断念した。また、後に引き続く研究理論・仮説の構築が困難であったため、本成果から派生する新たな研究計画は現時点では持っていない。

2016 年 5 月現在、研究成果 2. 3. をまとめて論文を作成し、Cardiovascular Research に投稿して Revision を行っている。

研究成果 4. については論文作成中であり、近日中に投稿予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Morishima M, Iwata E, Nakada C, Tsukamoto Y, **Takanari H**, Miyamoto S, Moriyama M, Ono K: Atrial fibrillation-mediated up-regulation of miR-30d regulates myocardial electrical remodeling of G-protein-gated K^+ channel, $I_{K,ACH}$. *Circ J* **2016;80:1346-55.** (査読あり)
2. **Takanari H (corresponding)**, Miwa K, Fu X, Nakai J, Ito A, Ino K, Honda H, Tonomura W, Konishi S, Ophhof T, van der Heyden MAG, Kodama I, Lee JK: A new in vitro co-culture model using magnetic force-based nanotechnology. *J Cell Physiol* **2016. in press.** (査読あり)
3. Ma F, **Takanari H**, Masuda K, Morishima M, Ono K: Short- and long-term inhibition of cardiac inward-rectifier potassium channel current by an antiarrhythmic drug bepridil. *Heart Vessels* **2015. in press.** (査読あり)

4. Okuda T, **Takanari H**, Shiotani S. Letter to the editor: A systematic review and pooled analysis of CPR-associated cardiovascular and thoracic injuries. *Resuscitation* **2015;97:e3.** (査読あり)
5. Okuda T, **Takanari H**, Shiotani S, Hayakawa H, Ohno Y, Fowler DR: Pericardial tear as a consequence of cardiopulmonary resuscitation (CPR) involving chest compression: A report of two postmortem cases of acute type A aortic dissection with hemopericardium. *Legal Med* **2015;17:201-4.** (査読あり)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. **Takanari H**, van der Heyden M, Stary-Weinzinger A: Structure-based analysis of the function of Kir2.1 channel using a novel I_{K1} blocker PA-6: Interplay between PA-6 and intracellular spermine. 第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 24 日、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)シンポジウム
2. Yabusaki M, Morishima M, **Takanari H**, Ono K: A novel pathway for up-regulation of microRNA expression in cardiomyocytes exposed to angiotensin II. 第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 23 日、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)
3. 増田季美子、**高成広起**、森島真幸、王岩、馬芳芳、小野克重: テストステロンの長期作用による緩徐活性化遅延整流カリウムチャネル I_{Ks} の心筋発現の増加. 第 66 回西日本生理学会、2015 年 10 月 9 日、久留米大学筑水会館(福岡県、久留米市)
4. Takahashi M, **Takanari H**, Morishima M, Ono K: Influence of high-cholesterol on arrhythmogenicity in mouse atrium. 第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 21 日、神戸コンベンションセンター(兵庫県、神戸市)
5. Haruyama T, Morishima M, **Takanari H**, Ono K: Role of apelin in human atrial tissue with persistent atrial fibrillation. 第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 21 日、神戸コンベンションセンター(兵庫県、神戸市)
6. **高成広起**、高橋正起、馬芳芳、増田季美子、近藤秀和、森島真幸、高橋尚彦、小野克重: 炎症と脂質負荷が心房細動発症に及ぼす影響. 第 24 回日本循環薬理学会、2014 年 12 月 5 日、山形テルサ(山形県、山形市)
7. 森島真幸、岩田英理子、中田知里、塚本善之、**高成広起**、宮本伸二、守山正胤、小野克重: 心房細動におけるイオンチャネルリモデリング. 第 65 回西日本生理学会、2014 年 10 月 24 日、琉球大学研究者交流施設 50 周年記念館(沖縄県、中頭郡)
8. 馬芳芳、増田季美子、森島真幸、**高成広起**、小野克重: 新生獣ラット心室筋の内向き

整流カリウムチャネルに対するペプリジルの長期作用. 第 24 回日本病態生理学会大会、2014 年 8 月 9 日、北九州国際会議場 (福岡県、北九州市)

9. Morishima M, Iwata E, Nakada C, Tsukamoto Y, **Takanari H**, Miyamoto S, Moriyama M, Ono K: MicroRNA-dependent regulation of K⁺ channel remodeling in human cardiomyocytes with persistent atrial fibrillation. 第 29 回日本不整脈学会学術大会・第 31 回日本心電学会学術集会・合同大会、2014 年 7 月 22 日、東京プリンスホテル (東京都、港区)
10. **高成広起**, Bourgonje VJA, van der Heyden MAG, van Veen T, van Rijen H, Anderson M, 本荘晴朗, 児玉逸雄, 小野克重, Vos MA: カルモデュリン関連蛋白キナーゼ阻害が心筋興奮伝播に及ぼす影響: Connexin43 発現分布の制御を介した作用. 第 13 回九州脳・高血圧・循環制御研究会、2014 年 7 月 19 日、ホテル日航福岡 (福岡県、福岡市) 優秀賞
11. 森島真幸, 岩田英理子, 中田知里, 塚本善之, **高成広起**, 宮本伸二, 守山正胤, 小野克重: 心房細動ヒト心筋で異常発現する microRNA の機能解析. 第 13 回九州脳・高血圧・循環制御研究会、2014 年 7 月 19 日、ホテル日航福岡 (福岡県、福岡市) 優秀賞

〔図書〕(計 2 件)

1. **Takanari H**: Digitalis: How to use this traditional drug in modern medicine (日本語総説). **循環器内科** 2016. **accepted**.
2. Hiraki Y, **Takanari H**: A new type of ATP-sensitive potassium channelopathy: Cantú Syndrome (日本語総説). **脳と発達** 2016. **accepted**.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

講座のホームページ (下記リンク) に上記業績については逐一記載している
<http://www.med.oita-u.ac.jp/pathophysiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高成 広起 (タカナリ ヒロキ)
大分大学医学部 病態生理学講座 助教
研究者番号: 70723253

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

・ Marcel van der Heyden
Associate Professor
Department of Medical Physiology,
Division of heart and Lungs,
University Medical Center Utrecht
研究者番号: なし

・ Toon van Veen
Associate Professor
Department of Medical Physiology,
Division of heart and Lungs,
University Medical Center Utrecht
研究者番号: なし

・ Marc Vos
Professor
Department of Medical Physiology,
Division of heart and Lungs,
University Medical Center Utrecht
研究者番号: なし