

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390115

研究課題名（和文）心筋細胞-非心筋細胞間ギャップ結合の致死性不整脈発生における役割

研究課題名（英文）Role of heterocellular gap-junctional communication between cardiomyocytes and myofibroblasts in genesis of ventricular tachy arrhythmias

研究代表者

高松 哲郎 (Takamatsu Tetsuro)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：40154900

研究成果の概要（和文）：

心筋梗塞の修復期に増加する筋線維芽細胞(MF)が、心筋細胞(CM)との間にギャップ結合蛋白質コネキシン43(Cx43)を介して細胞間結合し、心臓に異常な興奮伝導を惹起するか否かを検証した。ラット心筋梗塞モデルでは、MF・CM間にCx43が発現し、CMからMFへ色素移行した。CMとMFの各単層組織をフィルター膜を挟み各々表裏に培養すると、CM層の伝導が遅延し巡回性の不整脈が生じ易くなった。また両細胞を人為的に電気的結合すると、細胞間抵抗の低下に伴いCMの脱分極や自発性興奮が発生した。以上、MFは心筋梗塞の重要な不整脈原性基質となることが判った。

研究成果の概要（英文）：

This study addressed the possibility that myofibroblasts (MF), produced during healing phase of myocardial infarct, play important role(s) in fatal ventricular tachyarrhythmias. In scrape loading of the left ventricular wall, neurobiotin loaded into the cardiomyocytes (CM) propagated to the surrounding MF via Cx43. CM culture of neonate revealed slower conduction of the CM tissue co-cultured with MF in the opposite side of the filter membrane cup. Arrhythmogenic depolarizations were observed in CM layer when MFs were cultured in filter-membrane on the opposite side. Taken together, MF plays important role in arrhythmias during MI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：不整脈、心筋梗塞、非心筋細胞、ギャップ結合

## 1. 研究開始当初の背景

心臓性突然死の多くは、心室の電氣的興奮伝導の異常に起因する頻脈性不整脈によって生じるが、その詳細なpathogenesisは未だ充分には明らかになってない。このうち突然死の主な原因である急性心筋梗塞では、梗塞領域の残存生存心筋や刺激伝導系に電氣的不安定性が高まり、興奮の旋回（リエントリー）、撃発活動等の致死性不整脈機序が生じやすくなると考えられてきたが、これらの機序を実際の組織構造の変化や機能障害として細胞レベルで説明できるものはなかった。これは、小さな領域の細胞群で生成された異常がどのようにして心臓全体の異常になるのかを捉える方法がなかったことによる。申請者は、虚血による心筋細胞傷害によって生じた細胞内のカルシウムイオン ( $Ca^{2+}$ ) 動態の異常が興奮生成の異常を来し不整脈を生じるとの仮説を立て、独自に開発した*in situ*イメージング法を用いて検討した結果、リエントリーや撃発活動が生じている局所を可視化することに成功した。

ところが、Wistar ラットを用いた急性心筋梗塞モデルでは、梗塞発症直後の0日目だけでなく、発症後4-6 日にも高い頻度で心室性不整脈が出現していることが分かった。4-6日は梗塞巣の壊死過程は既に終わっており、肉芽組織による修復が始まった時期である。つまり、強い $Ca^{2+}$ 動態の異常を示した細胞は既に消失しており、この時期の不整脈は梗塞発症直後と考えられた虚血による心筋細胞の傷害だけで説明できない。

申請者は、梗塞巣の周辺部に多数出現し、残存心筋細胞と接している筋線維芽細胞や内皮細胞などの非心筋細胞に注目し、急性心筋梗塞における致死性不整脈の発生機序に、肉芽組織として出現する非心筋細胞（特に筋線維芽細胞）が大きく関与している可能性を考えた。心筋梗塞後の肉芽組織内の非興奮性の非心筋細胞と残存心筋細胞との間にギャップ結合が発現し機能すれば、両細胞が電氣的に結合し、心筋細胞の興奮伝播は異常をきたし致死的心室性不整脈発生の解剖学的基質を形成する可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、肉芽組織として出現する非心筋細胞、とくに筋線維芽細胞が、心筋梗塞直後急性期（4-6 日後）に認められる不整脈の発生機序として重大な関与をしている可能性を、以下の3種の実験により検証することを目的とした。

(1) ラット心筋梗塞モデルにおいて、心筋細胞-非心筋細胞間に機能するギャップ結合が出現することを、*in vivo* scrape-loading 法を用いて証明する。

(2) 心筋細胞と非心筋細胞の各2層の培養細胞組織を作成し、心筋細胞-筋線維芽細胞間に形勢されるギャップ結合の興奮伝播へ及ぼす影響を明らかにする。

(3)心筋細胞と筋線維芽細胞を人為的に電氣的結合させ、心筋細胞の膜電位に及ぼす影響を明らかにする。

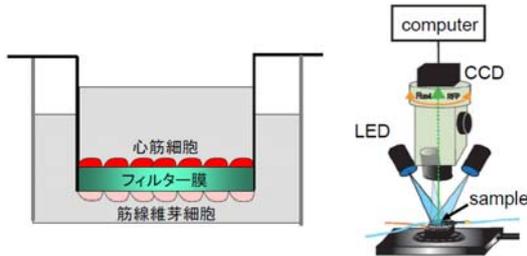
## 3. 研究の方法

**(1) *in vivo* scrape-loading 法によるラット心筋梗塞モデルにおける心筋細胞-非心筋細胞間のギャップ結合機能の解析** 9週齢のWistar ラットを全身麻酔下に開胸することにより、左冠動脈を結紮し心筋梗塞を作成、5日目に心臓を摘出し、経冠動脈的にTyrode液を灌流した。梗塞境界部より充分離れた健常組織を切開し、同部に4% neurobiotinを滴下し15分間静置した後固定し、neurobiotinのscrape loadingによる細胞間移行をAlexa488 streptavidinと反応させた蛍光強度から測定した。さらに非心筋細胞の同定、心筋細胞・非心筋細胞間のギャップ結合蛋白質コネクシン43（以下Cx43）の発現を、免疫組織化学的手法を用いて共焦点レーザー走査顕微鏡(FV-1000)で解析した。

**(2) 心筋細胞・筋線維芽細胞組織の興奮伝導様式の解析** 新生仔ラットの心筋細胞層組織と筋線維芽細胞が混在することなく各面で接する培養細胞組織を作成し、心筋細胞組織における興奮伝導様式を $Ca^{2+}$ 蛍光指示薬fluo4の蛍光強度変化の高速(450コマ/秒)画像から得た。これにより、心筋細胞-筋線維芽細胞間ギャップ結合コミュニケーションによる興奮伝播への影響を解析した。心筋細胞と筋線維芽細胞

の各組織は、多数の孔 ( $8\mu\text{m}$ ) を有するフィルター膜の裏表に各々生後2日のラットより得た心筋細胞または筋線維芽細胞を培養することにより作成した (図1)。培養5日後に心筋組織の興奮伝導様式をマクロズーム蛍光顕微鏡を用いて $\text{Ca}^{2+}$  蛍光強度変化から解析した。細胞間コミュニケーションは、calcein色素の細胞間移行により解析した。

図1



### (3) 筋線維芽細胞・心筋細胞間の電氣的結合による心筋活動電位の解析

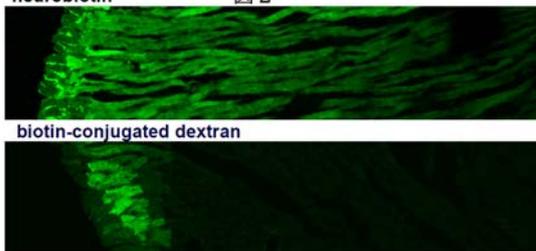
成獣ラットと新生仔ラットの心臓から各々コラゲナーゼ処理により単離した心筋細胞と筋線維芽細胞を各々パッチ電極により電流固定し膜電位を導出し、両細胞間に種々の抵抗 ( $\Omega$ ) で繋ぐことにより、各々の電位変化を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) *in vivo* scrape-loading 法によるラット心筋梗塞モデルにおける心筋細胞-非心筋細胞間のギャップ結合機能の解析

neurobiotin は、健全心筋組織の切開部から隣接する心筋細胞に取り込まれ、色素の移行は切開部より  $500\mu\text{m}$  に及んだ。これに対し、ギャップ結合を通さない高分子量の dextran-conjugated biotin は心筋細胞間の移行は見られなかった (図2)。

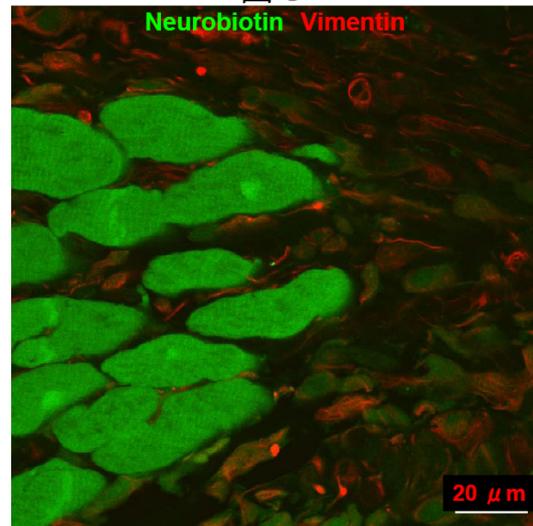
neurobiotin 図2



また、neurobiotin は、(心筋細胞マーカーである sarcomeric  $\alpha$ -actin (SAA)陽性の細胞) を介して梗塞部の非心筋細胞 (vimentin 陽性・SAA

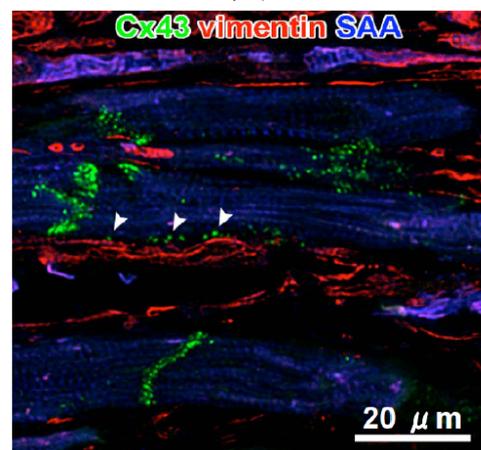
陰性の細胞) に取り込まれた (図3)。このことから心筋・非心筋間のコミュニケーションが示唆された。

図3



さらに neurobiotin 陽性の非心筋細胞の 80% 以上が  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) と smooth muscle heavy chain, embryonic form (S-memb) に陽性であり、筋線維芽細胞であることが示唆された。またこれらの細胞と心筋細胞の間に Cx43 が同定された (図4)。

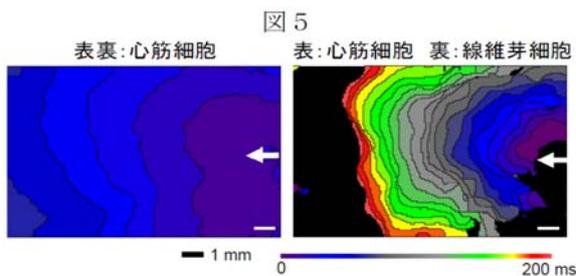
図4



以上より、修復期の心筋梗塞組織では、筋線維芽細胞が心筋細胞との間に Cx43 によるギャップ結合コミュニケーションを示すことが示唆された。

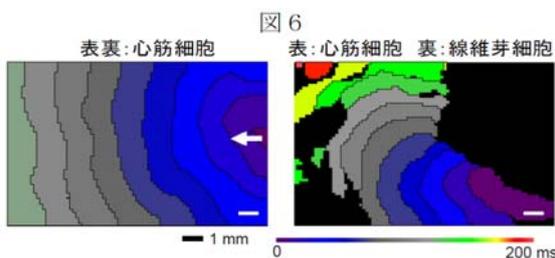
### (2) 心筋細胞・筋線維芽細胞組織の興奮伝導様式の解析

フィルター膜の表と裏に心筋細胞を培養した組織に、1-3Hz で定頻度刺激をすると、刺激部より均一に興奮が伝導し、

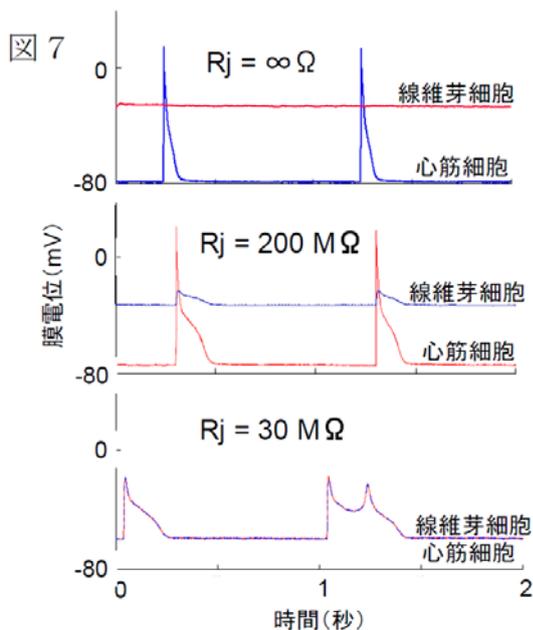


殆どリエントリー性の興奮は生じなかったのに対し、表裏に各々心筋細胞ならびに線維芽細胞を培養した組織では、伝導速度が有意に低下し(図5)、リエントリー性の不整脈が優位に発生し易かった(図6)。

また心筋細胞に負荷した calcein 色素は Cx43 を通して筋線維芽細胞に移行すること、



免疫組織化学的に心筋・筋線維芽細胞間に Cx43 が発現していることが確認された。これらより、心筋と筋線維芽細胞間にギャップ結合が形成されると心筋の伝導が抑制され、リエントリー性の不整脈が惹起され易くなることが証明された。



### (3) 筋線維芽細胞・心筋細胞間の電氣的結合による心筋活動電位の解析

成獣ラットの心筋細胞と新生仔ラットの筋線維芽細胞を各々パッチ電極による電流固定により膜電位を測定し、細胞間抵抗を $\infty$ から徐々に低下させると、 $500\text{M}\Omega$ 以下で心室筋の静止膜は脱分極を示し、筋線維芽細胞が過分極を占めした。さらに細胞間を低い抵抗で繋ぐと  $30\text{M}\Omega$ で両細胞の電位が一致し、活動電位持続時間の延長や早期後脱分極が生じた(図7)。これらの結果から、心筋が筋線維芽細胞との電氣的結合により脱分極し、興奮伝導に強い影響を示すことが示唆された。

#### 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 8 件)

1. Murayama Y, Harada Y, Imaizumi K, Dai P, Nakano K, Okamoto K, Otsuji E, Takamatsu T. Precise detection of lymph node metastases in mouse rectal cancer by using 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer*. 査読有, 125, 2256-2263.
2. Asazuma-Nakamura Y, Dai P, Harada Y, Jiang Y, Hamaoka K, Takamatsu T. Cx43 contributes to TGF- $\beta$  signaling to regulate differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Exp. Cell Res*. 査読有, 2009, 315, 1190-1199.
3. Taniguchi D, Dai P, Hojo T, Yamaoka Y, Kubo T, Takamatsu T Low-energy laser irradiation promotes synovial fibroblast proliferation by modulating p15 subcellular localization. *Lasers Surg. Med*. 査読有, 41, 2009, 232-239.
4. Ogawa M, Harada Y, Yamaoka Y, Fujita K, Yaku H, Takamatsu T Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed simultaneous Raman microscopy *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 2009, 382, 370-374.
5. Harada Y, Dai P, Yamaoka Y, Ogawa M, Tanaka H, Nosaka K, Akaji K, Takamatsu T. Intracellular Dynamics of topoisomerase I inhibitor, CPT-11, by slit-scanning confocal Raman microscopy. *Histochem Cell Biol*. 査読有 2009, 132, 39-46.

6. akagami T, Tanaka H, Dai P, Lin SF, Tanabe T, Mani H, Fujiwara K, Matsubara H, Takamatsu T. Generation of reentrant arrhythmias by dominant-negative inhibition of connexin43 in rat cultured myocyte monolayers.

*Cardiovasc Res* 査読有 79, 2008, 70-79.

7. Takamatsu T. Arrhythmogenic substrates in myocardial infarct.

*Pathol Int* 査読有 58, 2008, 533-543

8. Fujiwara K, Tanaka H, Mani H, Nakagami T, Takamatsu T. Burst emergence of intracellular  $Ca^{2+}$  waves evokes arrhythmogenic oscillatory depolarization via the  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  exchanger: simultaneous confocal recording of membrane potential and intracellular  $Ca^{2+}$  in the heart. *Circ Res* 査読有 103, 2008, 509-518.

[学会発表] (計 13 件)

1.高松哲郎 In vivo イメージングと不整脈原性基質 平成 21 年度日本顕微鏡学会バイオメディカルニューマイクロスコープ分科会シンポジウム 2010.1.18, 東京

2.Takamatsu T. Imaging of arrhythmogenic substrates in myocardial infarct The 9th CJ-JSHC Plenary Lecture 2009.11.06, Nanning, China

3.田中秀央、小山田正人、藤原克次、谷口大吾、小川貢、原田義規、高松哲郎. 心筋梗塞境界組織における心筋細胞・筋線維芽細胞間ギャップ結合コミュニケーション. 第 50 回日本組織細胞化学会学術集会. 2009.9.27, 大津

4.高松哲郎 From Bench to Bedside ー光による生体分子イメージングの医療応用ー第 18 回日本バイオイメージング学会総会シンポジウム 「分子から vivo まで」 2009.9.3, 岡山

5.田中秀央、中上拓男、高松哲郎. 興奮伝導の高速イメージング. 第 18 回バイオイメージング学会学術集会. 2009.9.3, 岡山

6.Takamatsu T. In situ calcium imaging of arrhythmogenic substrates in the heart IUPS2009 Whole-day symposium (Irisawa Memorial Symposium) Arrhythmias and muscle contraction 2009.07.30, Kyoto

7.Tanaka H, Nakagami T, Takamatsu T.

Regional heterogeneity of connexin-43 coupling promotes susceptibility to reentrant arrhythmias in rat cultured myocyte monolayers. The 36th Congress of the International Union of Physiological sciences, 2009, 7.28, Kyoto

8.高松哲郎 これだけは知っておきたい -不整脈基質への解剖・病理学的アプローチ- 虚血心筋組織における不整脈源性基質の形成 第 24 回日本不整脈学会学術大会/第 26 回日本心電学会学術集会合同学術集会 パネルディスカッション 2009.7.3, 京都

9.田中秀央, 高松哲郎. 心筋カルシウム動態異常の不整脈源性、第 24 回日本不整脈学会学術大会/第 26 回日本心電学会学術集会 合同学術集会ワークショップ. 2009.7.3, 京都

10.高松哲郎 光を用いた無染色生体診断技術 第 98 回日本病理学会総会ワークショップ ライブセルイメージングの進歩と病理学 2009.5.2, 京都

11.中上拓男、田中秀央、戴 平、姜 艶、高松哲郎. 心筋組織のコネキシン 43 (Cx43) ドミナントネガティブ (DN) 抑制はリエントリー性異常興奮を惹起する. 第 98 回日本病理学会総会. 2009.5.2, 京都

12.Takamatsu T. Seeing More with Light Microscopy. Piet Van Duijn Lecture International Congress for Histochemistry and Cytochemistry 2008 Symposium “Recent advances in optical microscopy”. 2008.8.25, Gdansk, Poland

13.Tanaka H, Fujiwara K, Takamatsu T. Simultaneous imaging of intracellular calcium dynamics and membrane potentials in the heart by dual-view rapid scanning confocal microscopy. International Congress for Histochemistry and Cytochemistry, ICHC 2008. 2008.8.25, Gdansk, Poland

[その他]  
ホームページ  
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pcr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高松 哲郎 (Takamatsu Tetsuro)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：40154900

(2) 連携研究者

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