

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390193

研究課題名（和文）薬物・虚血・心理ストレスによる心臓性突然死の分子機構に関する研究

研究課題名（英文） Research on the molecular mechanism underlying sudden cardiac deaths due to toxic substances, ischemia and emotional stress

研究代表者

吉田 謙一（YOSHIDA KEN-ICHI）

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40166947

研究成果の概要（和文）：ラットモデルで、Connexin 43 (Cx43) が虚血時に Gap Junction (GJ) に移行し、Phospholamban 脱リン酸化による小胞体  $Ca^{2+}$  取込み低下から、再灌流時、収縮帯が拡大される、小胞体から mitochondria に  $Ca^{2+}$  が移行し、mPTP が開口する結果、心筋梗が進展することを見出した。ラット身体拘束で、Cx43 が GJ に移行する結果、致死性不整脈が抑制されることを見出した。

研究成果の概要（英文）：In rats, we found that ischemia induces Connexin-43 (Cx43) translocation to gap junction (GJ) and Phospholamban (PLB) dephosphorylation, and reperfusion promotes spreading of Contraction Bands (CBs). We also found that anti-PLB antibody injection enlarges myocardial infarction through mPTP opening. In restrain of rats, Cx43 was translocated to the GJs, thereby reducing premature ventricular contractions and promoting GJ communication. As a result, lethal arrhythmias were suppressed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	13,000,000	3,900,000	16,900,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：コネクシン 43, ギャップ結合, 不整脈, 心臓突然死, 心筋虚血, 心理ストレス, 身体拘束, 心筋梗塞

## 1. 研究開始当初の背景

法医学実務上、心臓突然死の診断、事故、暴行、身体拘束等との因果関係の判断は、裁判や保険の判断のため、極めて重要であるが、科学的根拠がない。組織診断上、心臓突然死に、心筋の収縮帯が、心筋梗塞に凝固壊死をよく認めるが、その発生に関する分子機構は不明である。当教室では、虚血再灌流によって心筋の細胞死が誘導される分子機構を研究してきた。

## 2. 研究の目的

ラットの虚血再灌流による心筋収縮帯と心筋梗塞の分子機構を明らかにし、新しい診断法を開発する。加えて、身体拘束による突然死をラットで再現できる条件を検討し、特に、不整脈発生との関連から検討する。

いずれにおいても、Gap Junctions (GJs)の主要構成蛋白 Connexin 43 (Cx43)の変化と病変や不整脈の発生について検討する。

## 3. 研究の方法

ラットの冠動脈結紮による虚血の後、開放して再灌流し、心筋梗塞をTTC法により評価し、収縮帯を組織学的に評価する。Cx43・Phospholamban (PLB)の量・局在・リン酸化状態の変化を生化学的及び免疫組織学的な分析により明らかにし、これらの変化に寄与する分子の変化を観察し、さらに、阻害剤の効果を検討する。

## 4. 研究成果

Cx43が、心筋梗塞・心不全等で減少し、側方の細胞膜に転移する結果、不整脈や突然死が惹起されると考えられてきた。

Contraction Band (CB)は、心臓突然死に頻発し、虚血再灌流モデルで再現できる。しかし、私達は短時間虚血後、Cx43がGJに転移し細胞間伝導を促進する結果、早期再灌流時、CBを拡大することを見出した。

小胞体のCa<sup>2+</sup>-ATPaseの阻害蛋白であるPhospholamban (PLB)は心筋梗塞等で脱リン酸化し、心不全の発症に寄与する。私達は短時間虚血後、PLBが脱リン酸化し、再灌流時、Ca<sup>2+</sup>過剰による細胞骨格蛋白分解及び心筋過収縮から心筋障害に寄与すること、抗PLB抗体をHVJ virus vectorによる心臓への導入、またはPLB脱リン酸化の抑制によって、再灌流時、Ca<sup>2+</sup>過剰による心筋障害(Ca<sup>2+</sup>依存性proteaseによる細胞骨格蛋白 fodrin 分解、CB)が抑制されることを見出した。また、PLB脱リン酸化が、calcineurin-PKC・・活性化、I1抑制によるPP1不活化解除によって起こる経路を明らかにした。さらに、再灌流時、抗PLB抗体注射によって、筋小胞体内(SR)のCa<sup>2+</sup>取込みを改善させると、予想に反して、SR内過剰となったCa<sup>2+</sup>がmitochondriaに移行して、Pore Transition Pore (mPTP)を開口し、calpain活性化により、Apoptosis Inducing Factor (AIF)を遊離する結果、心筋梗塞が拡大することを見出した。従来から信じられてきた、心筋過収縮(収縮帯)による心筋梗塞進展というパラダイムを否定し、最近、注目されている、SR-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transferが*in vivo*において病変進展に寄与していることを初めて示し、心筋梗塞の発生機序に関する極めて重要な知見を得た。

私達は、心理ストレスのモデルであるラット身体拘束によって、期外収縮(PVC)発生頻度が増加し、QRS間隔増加を伴う心臓内伝導障害が相まって致死性不整脈である心

室性頻拍や心室細動が惹起されることを明らかにした。さらに、身体拘束によって、Cx43のGJ転移の結果、不整脈の発生と突然死を抑制すること、しかし、心筋梗塞等で見られるCx43の減少によるGJ伝導の抑制を薬剤により再現すると、その後の身体拘束による致死性不整脈の発生頻度が増すことを見出した。これは、興奮した精神病患者等が身体拘束されたとき、心臓危険因子の存在下に突然死する現象を説明する。

#### 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21件)

1. Ueyama T, Yamamoto Y, Ueda K, Kawabe T, Hano T, Ito T, Tsuruo Y, Ichinose M, Yoshida K. Cardiac and vascular gene profiles in an animal model of takotsubo cardiomyopathy.

Heart Vessels. 2011;26(3):321-337. (査読有)

2. Shintani-Ishida K, Yoshida K. Ischemia induces phospholamban dephosphorylation via activation of calcineurin, PKC- $\alpha$ , and protein phosphatase 1, thereby inducing calcium overload in reperfusion.

Biochim Biophys Acta.

2011;1812(7):743-751 (査読有)

3. Unuma K, Harada K, Furutani M, Furutani Y, Nakajima M, Nakanishi T, Matsuoka R, Yoshida K. Multiple stenotic arteriopathy in a 72-year-old female with Williams syndrome. J Clin Pathol.

2011;64(4):368-370. (査読有)

4. Unuma K, Shintani-Ishida K, Yahagi N, Tsushima K, Shimosawa T, Ueyama T, Yoshida K.

Restraint stress induces connexin-43 translocation via  $\alpha$ -adrenoceptors in rat heart.

Circ J. 2010;74(12):2693-2701 (査読有)

5. Unuma K, Harada K, Nakajima M, Ito T, Okutsu K, Yoshida K.

Unexpected death of a patient with rheumatoid arthritis complicated by a cervical deformity.

Leg Med (Tokyo). 2010;12(5):242-245. (査読有)

6. Unuma K, Harada K, Nakajima M, Eguchi H, Tsushima K, Ito T, Shintani-Ishida K, Kojima H, Yoshida K.

Autopsy report on central pontine myelinolysis triggered by vomiting associated with digoxin intoxication.

Forensic Sci Int. 2010;194(1-3):e5-8 (査読有)

7. Unuma K, Shintani-Ishida K, Yahagi N, Tsushima K, Shimosawa T, Ueyama T, Yoshida

K,

Restraint Stress Induces Connexin-43

Translocation via  $\alpha$ -Adrenoceptors in Rat

Heart. Circ J, 2010;74(6):1087-1095. (査読有)

8. Unuma K, Harada K, Nakajima M, Ito T, Okutsu K, Yoshida K.

Unexpected death of a patient with rheumatoid arthritis complicated by a cervical deformity.

Leg Med; 2010;12(5):242-245. (査読有)

9. Tojo A, Unuma K, Harada K, Yoshida K, Fujita T.

Localization and mechanism of nephrocalcinosis in pseudo-Bartter's syndrome.

Kidney Int. 2010;77(9):831 (査読有)

10. Kondo-Nakamura M, Shintani-Ishida K, Uemura K, Yoshida K.

Brief exposure to carbon monoxide preconditions cardiomyogenic cells against apoptosis in ischemia-reperfusion.

Biochem Biophys Res Commun.

2010;393(3):4494-54. (査読有)

11. Shintani-Ishida K, Harada K, Nakajima M, Yoshida K.

Usefulness of blood vessels as a DNA source for PCR-based genotyping based on two cases of corpse dismemberment.

Leg Med . 2010;12(1):8-12. (査読有)

12. Unuma K, Shintani-Ishida K, Tsushima K, Shimosawa T, Ueyama T, Kuwahara M, Yoshida K.

Connexin-43 redistribution and gap junction activation during forced restraint protects against sudden arrhythmic death in rats.

Circ J. 2010;74(6):1087-1095. (査読有)

13. Nakajima M, Kojima H, Takazawa Y, Yahagi N, Harada K, Takahashi K, Unuma K, Yoshida K.

An autopsy report on multiple system atrophy diagnosed immunohistochemically despite severe ischaemic damage: a new approach for investigation of medical practice associated deaths in Japan.

J Clin Pathol. 2009;62(11):1029-1033. (査読有)

14. Shintani-Ishida K, Unuma K, Yoshida K.

Ischemia enhances translocation of connexin43 and gap junction intercellular communication, thereby propagating contraction band necrosis after reperfusion. Circ J.

2009;73(9):1661-1668.

(査読有)

15 . Ueyama T, Kawabe T, Hano T, Tsuruo Y, Ueda K, Ichinose M, Kimura H, Yoshida K.

Upregulation of heme oxygenase-1 in an animal model of Takotsubo cardiomyopathy. Circ J. 2009;73(6):1141-1146. (査読有)

16. Unuma K, Tojo A; Harada K, Saka K; Nakajima M; Ishii T; Fujita T, Yoshida K. Autopsy report on pseudo-Bartter syndrome with renal calcification induced by diuretics and diet pills. BMJ Report. doi:10.1136/bcr.12.2008.1380 (on-line journal) (査読有)

17. Ueda K, Ueyama T, Yoshida K, Kimura H, Ito T, Shimizu Y, Oka M, Tsuruo Y, Ichinose M. Adaptive HNE-Nrf2-HO-1 pathway against oxidative stress is associated with acute gastric mucosal lesions.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008;295(3):G460-469. (査読有)

18. Morimoto K, Uji M, Ueyama T, Kimura H, Kohno T, Takamata A, Yano S, Yoshida K. Estrogen replacement suppresses pressor response and oxidative stress induced by cage-switch stress in ovariectomized rats.

Ann N Y Acad Sci. 2008;1148:213-218. (査読有)

19. Morimoto K, Morikawa M, Kimura H, Ishii N, Takamata A, Hara Y, Uji M, Yoshida K. Mental stress induces sustained elevation

of blood pressure and lipid peroxidation in postmenopausal women. Life Sci.

2008;82(1-2):99-107. (査読有)

20. Uemura K, Ueyama T, Shintani-Ishida K, Unuma K, Yoshida K.

An autopsy report on four sudden cardiac death cases by Immobilization.

International Medical Journal 2008; 15: 301-305. (査読有)

21. Kimura K, Mukaida M, Watanabe M, Hashino K, Nishioka T, Tomino Y, Yoshida K, and Matsumoto K.

Quantitative evaluation of time-resolved fluorescence microscopy using a new europium label: Application to immunofluorescence imaging of nitrotyrosine in kidneys.

Anal Chem 2008 ; 372, 119-121,. (査読有)

[学会発表] (計6件)

1. 鶴沼香奈、吉田謙一

「ダイエット薬乱用による偽性バスター症候群の剖検例における結石形成機序の考察」第41回臨床体液研究会 2009年10月24日、東京通信病院（東京都千代田区）

2. 坂幹樹、鶴沼香奈、小沼純貴、浅井重博、新谷香、中嶋信、笠原麻美、吉田謙一、

「タイから輸入された痩せ薬主成分分析」第77回日本法医学会関東地方会、2008年11月1日、東京大学鉄門記念講堂（東京都文京区）

3. 鶴沼香奈、原田一樹、坂幹樹、中嶋信、高橋香、高橋麻衣子、藤乗嗣泰、吉田謙一

「タイのダイエット薬を服用中であった女性の突然死の1剖検例」第77回日本法医学会関東地方会、2008年11月1日、東京大学鉄門記念講堂（東京都文京区）

4. UnumaK, Shintani-IshidaK, TsushimaK, Shimozawa T, Yoshida K

Effect of gap junction inhibitor on heart, in psychological stress-induced cardiac response in rat. The 7<sup>th</sup> International Symposium Advances in Legal Medicine. 2008

年9月3日、大阪市中央公会堂（大阪府大阪市）

5. 新谷香、鶴沼香奈、高橋香、坂幹樹、吉田謙一

「Gap Junctions は心筋虚血再灌流時における contraction band の細胞間伝播に関与する」第92次日本法医学会、2008年4月24日、長崎ブリックホール（長崎県長崎市）

6. 鶴沼香奈、新谷香、原田一樹、中嶋信、吉田謙一、Gap Junctions play a protective role in cardiac disfunction of immobilization stress model. 第92次日本法医学会、2008年4月24日、長崎ブリックホール（長崎県長崎市）

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
吉田 謙一 (YOSHIDA KEN-ICHI)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：40166947

(2)研究分担者

上山 敬司 (UEYAMA TAKASHI)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50264875

木村 博子 (KIMURA HIROKO)

順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：00053299

上村 公一 (UEMURA KOUICHI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：30244586

(3)連携研究者

(H20年度のみ)

原田 一樹 (HARADA KAZUKI)  
東京大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：00253146

新谷 香 (SHINTANI KAORI)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：50345047

坂 幹樹 (SAKA KANJU)

東京大学・大学院医学系研究科・技術職員  
研究者番号：30447388