

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 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21689020

研究課題名（和文） 心臓突然死における収縮帯壊死の診断価値の再評価

研究課題名（英文） Revaluation of contraction band necrosis as a marker for cardiac sudden death

研究代表者

新谷 香（石田香）(SHINTANI KAORI (ISHIDA KAORI))

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50345047

研究成果の概要（和文）：心筋梗塞のごく早期に心筋に観察される収縮帯は、心筋梗塞に進展すると考えられている。この急性心筋梗塞をラット虚血再灌流モデルで再現し、収縮帯形成と心筋梗塞進展の因果関係を検討した。収縮帯形成は、筋小胞体カルシウム調節タンパク質であるフォスフォランバン(PLN)の脱リン酸化が原因であった。一方、抗PLN抗体を用いてその働きをブロックすると、収縮帯壊死は抑制されたが、心筋梗塞サイズはむしろ拡大した。これは、ミトコンドリアのカルシウム過負荷によるmPTPの開口が原因であった。このことから、心筋梗塞進展には心筋過収縮（収縮帯）よりもmPTP開口が重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Contraction bands (CBs) are formed in early phase of myocardial infarction and have been believed to cause myocardial infarction. In rat model of coronary occlusion, the causality of CB for myocardial infarction was investigated. In ischemia-reperfusion, phospholamban (PLN), a regulatory protein of SR calcium uptake, was dephosphorylated, thereby causing formation of CBs. In vivo injection of anti-PLN antibody enhanced SR calcium uptake and inhibited the CB formation. On the other hand, the antibody induced mPTP opening through mitochondrial calcium overload and enlarged the region of myocardial infarction. These results indicate that mPTP opening, but not CB formation, is pivotal for the development of myocardial infarction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2010年度	4,785,055	1,440,000	6,225,055
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	17,385,055	5,220,000	22,605,055

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：心臓突然死、収縮帯壊死、小胞体、ミトコンドリア、カルシウム、フォスフォランバン、心筋梗塞

1. 研究開始当初の背景

疫学調査上、心臓突然死の主たる原因疾患は急性心筋梗塞を含む虚血性心疾患である。心筋細胞の不可逆的細胞死を意味する心筋梗塞の初期には、凝固壊死と収縮帯壊死が出現する。凝固壊死の出現には数時間以上の血流遮断を要する。一方、収縮帯壊死は血流再開（再灌流）後数分以内に生起されることが動物モデルで確認される。再灌流の際に収縮阻害剤（BDM）を投与すると、収縮帯壊死及び早期の心筋梗塞進展が抑制される。これは、収縮帯壊死が過収縮によって生起される不可逆的細胞死であることを示す。しかし最近、過収縮は細胞死の直接原因ではなく、細胞死へ至る1つの過程を示すに過ぎないとする分子生物学的な知見が報告された。一方、収縮帯壊死の生成にはカテコラミンの関与も示唆されているが、実験上のエビデンスは乏しい。

収縮帯壊死は心臓突然死の証拠とされ多くの突然死症例に認められるが、外因死事例や救急事例にも認められることが多い。そして、微視的な虚血やカテコラミンが外因死における収縮帯壊死生成に寄与している可能性がある。従って、収縮帯壊死生起の分子機構を解明し、収縮帯壊死が不可逆的細胞死の証拠か否かを明らかにすることが重要である。その上で、心臓突然死における収縮帯壊死の組織診断的価値を再評価する必要がある。

Gap junction (GJ) は隣接する心筋細胞をつなぐ存在板に存在し、イオンやセカンドメッセンジャーなどの低分子物質を細胞間で授受することで細胞間情報伝達 (GJ intercellular communication, GJIC) を担うチャンネルである。私は、前回の科研費研究によって、心筋 GJ が虚血再灌流時の収縮帯壊死の拡大に関与していることを明らかにした。ラットの冠状動脈を結紮し、心臓を短時間虚血 (30 分) に曝露すると、心筋 GJ の主要構成タンパク質である connexin43 (Cx43) が存在板に移行し、GJ の GJIC が活性化される結果、再灌流時に収縮帯壊死が細胞間に伝播することを見出した。また、最近 Cx43 がミトコンドリアにも存在し、ミトコンドリアで産生された ROS の細胞質への放出を制御していることが明らかになったが、私は予備的実験で、虚血でミトコンドリア Cx43 が減少することを見出した。さらに、カルパインは虚血再灌流時に活性化され、細胞骨格を破綻し細胞死を引き起こすタンパク分解酵素であるが、私は GJ 阻害剤が再灌流時のカルパインの活性化を抑制することも見出している。これらの結果は Cx43 が収縮帯壊

死から心筋梗塞へ至る病態に深く関わっていることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Cx43 と GJIC が収縮帯壊死及び心筋梗塞（不可逆的心筋細胞死）の生成に寄与する分子機構を解明することであり、以下について明らかにしようと考えた。

- (1) 収縮帯壊死による細胞死は可逆的なのか、不可逆的なのか

収縮帯壊死の領域がその後梗塞巣となるのか否かを、そしてこれを GJ 阻害剤が抑制するか否かを、ラットの冠状動脈結紮開放（虚血再灌流）による心筋梗塞モデルを用いて検証する。

- (2) 収縮帯壊死生起のメカニズム

前回の科研費研究で明らかにした GJ を介した収縮帯壊死の細胞間伝播には、再灌流時に多量に細胞内流入したカルシウムが関与している可能性が高い。また、カルパインはカルシウム依存性のタンパク分解酵素である。そこで、再灌流時に GJ が細胞内カルシウム過負荷を介してカルパインを活性化し、収縮帯壊死を生起する可能性を検証する。

- (3) Cx43 の細胞膜移送のメカニズム

前回の科研費研究の過程で、虚血によって Cx43 はミトコンドリアから細胞膜に移行していることを見出した。ミトコンドリアは虚血による細胞死に密接に関与していることから、ミトコンドリア Cx43 の細胞死への関与と、細胞膜移行の分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 心筋梗塞モデルの作製

ラットの左冠状動脈を 30 分結紮後開放して、虚血再灌流モデルを作製した。心臓摘出前に、エバンスブルーを心臓内に注入して虚血領域と非虚血領域を識別した。

- (2) 収縮帯占有面積の測定

乳頭筋レベルの短軸断で薄切切片を作製し、リンタングステン酸ヘマトキシリン染色を行った。収縮帯が確認された心筋領域の大きさを、画像解析ソフトを用いて計測した。

- (3) タンパク質の発現量、リン酸化レベルの測定

虚血領域、非虚血領域の心筋をホモジネートし、各特異抗体を用いてウェスタン

- ブロッティング法により定量した。
- (4) カルパイン活性化の確認
活性化型カルパイン特異的抗体を用いて、心筋ホモジネートのウェスタンブロッティングを行った。
 - (5) 心筋梗塞サイズの測定
エバンスブルー注入後の心臓を摘出し、心室を短軸断で3分割し、TTC染色を行った。左心室、エバンスブルー陰性の虚血領域、およびTTC染色陰性の心筋梗塞領域の大きさを、画像解析ソフトを用いて計測した。
 - (6) 抗PLN抗体の心筋導入
抗PLN抗体を封入したセンダイウィルスベクター (GenomONE-CAb、石原産業株式会社) を、注射器を用いて左心室に注入し、導入した。
 - (7) mPTP開口の確認
虚血再灌流後の心臓からミトコンドリアを単離し、Calcium-induced mitochondria swelling法を用いて評価した。

4. 研究成果

- (1) 虚血によるPLN脱リン酸化の分子機序と心筋収縮帯形成との因果関係について

ラット左冠状動脈結紮による虚血30分再灌流5分後において、虚血領域の広範にわたり収縮帯が形成され、カルパインが活性化された。これらはGJ阻害剤によって阻害され、収縮帯形成や心筋傷害の伝播にGJが関与することを確認した。

フォスフォランバン(PLN)は筋小胞体(SR)へのカルシウム取り込みに関与する、カルシウムポンプ構成タンパク質SERCA2aの活性を調節し、脱リン酸化すると、SERCA2aに結合してSRカルシウムの取り込みを阻害する。上述の実験において、PLNが虚血の間に脱リン酸化していることを偶然見出した。脱リン酸化したPLNは、SRへのカルシウム取り込み能低下から細胞内カルシウム過負荷を引き起こし、再灌流5分後の収縮帯形成を促進させていた。この結果は、収縮帯形成の機序を知る上で重要な新規知見であるため、申請時の計画を一部変更して、この虚血時のPLN脱リン酸化の分子機序とその生理学的意義について詳細に検討することにした。その結果、以下の知見を得た。

- ① PLNの脱リン酸化にはカルシウム依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンが関与している。
- ② 虚血30分により活性化したカルシニュー

リンは、プロテインキナーゼC(PKC)- α を活性化する。

- ③ 活性化したPKC- α はプロテインフォスファターゼ1(PP-1)の内因性インヒビターであるインヒビター1(I-1)のSer67をリン酸化することにより、I-1を不活性化する。
- ④ I-1の不活性化によって、PP-1が活性化し、PLNを脱リン酸化する。
- ⑤ 抗PLN抗体を導入してSERCA2aとの複合体形成を阻害すると、SRへのカルシウム取り込みを促進させ、再灌流時の細胞質カルシウム過負荷を軽減する。その結果、収縮帯形成およびカルシウム依存性プロテアーゼであり、虚血再灌流傷害に深く関わっていると考えられているカルパインの活性化を抑制する。

- (2) 収縮帯と心筋梗塞進展の因果関係について

上述のように、抗PLN抗体を導入すると再灌流時に形成される収縮帯を抑制することができる。そこで、収縮帯が不可逆的細胞死の証拠であり、心筋梗塞進展に関与しているのか否かについて、抗PLN抗体を導入したラットで検証した。その結果、以下の知見を得た。

- ① 抗PLN抗体の心筋への導入は再灌流5分後の収縮帯壊死形成を抑制するが、その後の心筋梗塞進展は抑制せず、むしろ亢進させる。
- ② 抗PLN抗体によって改善したSRのカルシウム取り込みは、ミトコンドリアユニポーターを介して、SRからミトコンドリアへのトランスポートにより、ミトコンドリアのカルシウム過負荷を引き起こす。
- ③ ミトコンドリアカルシウム過負荷は、mitochondria permeability transition pore (mPTP)を開口させ、心筋梗塞進展を亢進させる。
- ④ 心筋梗塞進展には、細胞質内よりもむしろ、ミトコンドリア内カルシウム過負荷によるミトコンドリア機能不全が重要な役割を担っている。

これまで、心筋梗塞は収縮帯壊死の延長線上にあると考えられており、心筋収縮帯は心臓突然死の一所見とみなされてきた。しかし、上述のように、収縮帯形成を抑制しても、心筋梗塞が進展する条件が存在することが明らかとなった。

- (3) 収縮帯壊死の診断価値の再評価

以上、急性心筋梗塞における収縮帯壊死

の診断価値を再評価した結果、収縮帯を指標として用いるのは正しくないことを立証した。抗 PLN 抗体導入や PLN 遺伝子改変等による PLN のノックダウンは心不全を改善するという報告が多くある。しかし、急性心筋梗塞においては、抗 PLN 抗体導入は細胞質のカルシウム過負荷を軽減させ、収縮帯形成やカルパイン活性化を抑制するが、驚くべきことに、心筋梗塞の進展はむしろ亢進させた。この新知見は、臨床治療においても重要な情報である。

抗 PLN 抗体導入は、SR へのカルシウム取り込みを促進し、SR からミトコンドリアへのトランスポートを介して、ミトコンドリアのカルシウム過負荷を引き起こす。その結果、mPTP が開口することが、心筋梗塞の進展に重要であることが示された。よって、急性心筋梗塞の診断には収縮帯よりも、ミトコンドリア機能不全を指標とするのが適当であると考えられた。

今後の展望として、ミトコンドリア機能不全に至る分子機序と心筋梗塞進展との因果関係を詳細に解明すれば、正確な指標を見出すことができると期待される。

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 11 件)

1. Shintani-Ishida K, Inui M, Yoshida K. Ischemia-reperfusion induces myocardial infarction through mitochondrial Ca^{2+} overload. *J Mol Cell Cardiol*. 2012, 掲載確定 (印刷中). 査読有
2. Shintani-Ishida K, Yoshida K. Ischemia induces phospholamban dephosphorylation via activation of calcineurin, PKC- α , and protein phosphatase 1, thereby inducing calcium overload in reperfusion. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011, 1812: 743-751. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.03.014. 査読有
3. Unuma K, Shintani-Ishida K et al. Restraint stress induces connexin-43 translocation via α -adrenoceptors in rat heart. *Circ J*. 2011, 74: 2693-2701. DOI: 10.1253/circj.CJ-10-0529. 査読有
4. Unuma K, Shintani-Ishida K et al. Connexin-43 redistribution and gap

junction activation during forced restraint protects against sudden arrhythmic death in rats. *Circ J*. 2011, 74: 1087-1095. DOI: 10.1253/circj.CJ-09-1019. 査読有

5. 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: 449-454. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.017. 査読有
6. 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: 1661-1668. DOI: <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-09-0079>. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. 新谷香, 乾誠, 吉田謙一. Anti-phospholamban antibody introduction enhances opening of mPTP and development of myocardial infarction through uniporter-dependent mitochondrial Ca^{2+} overloading in ischemia-reperfusion. 第 76 回日本循環器学会学術集会. 2012 年 3 月 16 日. 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
2. 新谷香, 黒田亮平, 廣瀬泉, 吉田謙一. 心筋収縮帯と心筋梗塞の関連性. 第 95 次日本法医学会学術全国集会. 2011 年 6 月 17 日. コラッセふくしま (福島県福島市)
3. 新谷香, 永井恒志, 石井康博, 坂幹樹, 高橋麻衣子, 原田一樹, 吉田謙一. Phospholamban は心筋虚血再灌流時の contraction bands 形成に関与する. 第 94 次日本法医学会学術全国集会. 2010 年 6 月 2 4 日. タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 香 (石田香) (SHINTANI KAORI (ISHIDA KAORI))

東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：50345047

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし