

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25年5月22日現在

機関番号：	15501
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22590635
研究課題名（和文）	アルコール性心臓死におけるギャップ結合機能障害とペースメーカー細胞の役割
研究課題名（英文）	Cardiac gap junction and pacemaker cells in alcoholic sudden cardiac death
研究代表者	
劉 金耀 (LIU JINYAO)	
山口大学・大学院医学系研究科・講師	
研究者番号：	60379956

研究成果の概要（和文）：

アルコール性突然死ラットモデルを用いて、心筋線維形成・ギャップ結合リモデリングと心臓性突然死との関連を検討した。アルコール急性離脱期に心筋線維形成の増加およびギャップ結合のリモデリングを認め、交感神経遮断薬である carvedilol 前投与によって是正された。交感神経活性化を介する心筋線維形成とギャップ結合のリモデリングがアルコール性致死的不整脈の発生・維持に関与する重要な要因と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The influences of myocardial fibrosis and gap junction remodeling on the alcoholic life-threatening ventricular arrhythmias were evaluated in rats, particularly in acute ethanol withdrawal rats. Acute ethanol withdrawal followed 49-day continuous ethanol treatment induced a high risk of myocardial fibrosis formation; down-regulation of gap junction protein connexin (Cx) 43 protein and mRNA expressions; down-regulation of phosphorylated Cx43 protein expression; however, all of them were normalized by carvedilol (can block the sympathetic nervous system completely via β_1 , β_2 , and α adrenergic receptors) pretreatment. Acute ethanol withdrawal followed 49-day continuous ethanol treatment is sufficient to increase the risk of myocardial fibrosis formation and gap junction remodeling via the shift of cardiac sympathovagal balance toward sympathetic predominance, and then leads to the onset of the life-threatening ventricular arrhythmias in alcoholic subjects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：アルコール医学、致死的不整脈、心筋線維形成、心筋ギャップ結合

1. 研究開始当初の背景

独自開発したアルコール突然死ラットモ

デルを用いて、交感神経活性化を介するアルコール性突然死の研究成果を報告した（基盤

C・18590635、発表論文 1-2)。心筋線維形成を介し興奮伝播の不均一性および再分極過程の遅延を引き起こし、不整脈の発生・維持と関与することが考えられる。

一方、ギャップ結合は、隣接する細胞を直接連結して細胞間のイオン、シグナル伝達物質、分子交換を行い興奮伝播や電気的結合を調節する。不整脈の発生・維持には、心筋細胞の機能的・器質的リモデリングが関与し、それらには心筋細胞間結合構成蛋白、ギャップ結合の変化が想定されている。ギャップ結合は connexin (Cx) 蛋白により構成され、半減期は 1～2 時間で、短時間のうちに様々な負荷の影響を受ける。

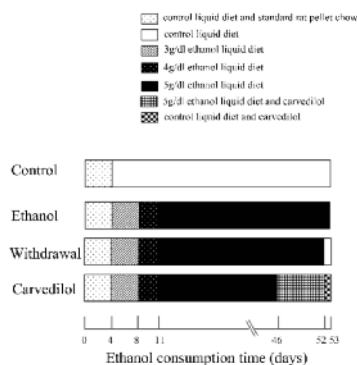
2. 研究の目的

アルコール関連死における心筋線維形成・ギャップ結合機能障害および交感神経活性化との関連について不明である。これらの不明点を明らかにし、これまでの研究成果を進展させる。特に、ギャップ結合機能に焦点をあて、細胞質内で行う Cx43 の合成および膜における Cx43 のリン酸化の変化；ギャップ結合リモデリングと交感神経活性化との関連；ギャップ結合リモデリングを制御する upstream 治療として、交感神経活性化遮断薬 carvedilol を位置づける可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作成

7 週令の Wistar 系雄ラット 77 匹を用いて、Lieber らの方法に準じ Pair-feeding を行い、49 日間コントロール液体食投与群 (Control, n = 23)、49 日間アルコール液体食継続投与群 (Ethanol, n = 20)、48 日間アルコール継続投与 + 1 日間コントロール液体食投与群 (Withdrawal, n = 18)、42 日間アルコール継続投与 + 6 日間 (アルコール液体食 + Carvedilol) 継続投与 + 1 日間 (コントロール液体食 + Carvedilol) 投与群 (Carvedilol, n = 16) の 4 群にわけた (図 1)。



Liu, et al. ACER 2010;34:223-230

図 1 実験モデルの作成

(2) Carvedilol の前投与

Carvedilol は、交感神経の α_1 受容体と β 受容体を遮断する作用を持ち、今回、浸透圧ポンプを使用し、carvedilol の投与量は 10mg/kg BW/day として、pair-feeding 43 日目に 1-2% イソフルランと酸素混合ガスの吸入麻酔下において腹腔内に埋め込んだ。

(3) 左心室心筋組織の採取

Pair-feeding 終了時に、生理食塩水で全身脱血、心臓を摘出した。分離された左心室は液体窒素処理後に -80°C 保存、あるいは 4% パラホルマリン液と 15% スクロース液処理後 4°C 保存した。

(4) 心筋線維形成の評価

8 μ m の組織切片を作成 (Reichert-Jung Cryocut 1800) し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5 Pascal microscope) を用いて心筋組織の蛍光免疫染色画像を撮った。共焦点レーザー顕微鏡で撮られた写真を 30 枚用いて、 α -SMA 陽性細胞が心筋細胞全体に占める割合を計算した。

同じ動物の心筋組織を用いて、鍍銀染色・Azan 染色し、心筋組織における線維組織の変化を専用ソフト (Keyence BZ-9000) により定量評価した。

同じ動物の心筋組織を用いて、RT-PCR を用いて、 α -SMA・Collagen 1a1 の mRNA 発現量を評価した。

(5) 左心室ギャップ結合構成蛋白 Cx43 の評価

専用 kit (ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction Kit) を用いて、左心室心筋細胞の細胞質および膜貫通蛋白を精製した。7.5% SDS ゲルを使用し、電気泳動、転写、ブロッキングした後に、Cx43 を反映する一次抗体 Cx43 (H150, rabbit polyclonal)・リン酸化を反映するセリン 368 (p-Cx43 ser 368, rabbit polyclonal) とセリン 279/282 (p-Cx43 ser 179/282, rabbit polyclonal) を用いて心筋ギャップ結合構成蛋白 CX43 の蛋白発現量を調べた。蛋白発現量は Quantity One (Bio-Rad Laboratories Inc., 2000, CA, USA) で定量評価し、各サンプルは β -actin (1:5000, A2228, mouse monoclonal) で補正した。

同じ動物の心筋組織を用いて、RT-PCR を行い、 $\Delta\Delta$ CT 法でギャップ結合蛋白 Cx43 遺伝子の発現量を測定し、GAPDH で補正した。

4. 研究成果

(1) アルコール消費量と左心室重量

アルコール投与した 3 群では心臓の重さが上昇傾向はあったが、統計学的に有意な差は見られなかった (図 2)。同じアルコールが消

費され、週間での総アルコール消費量は約150gであった。

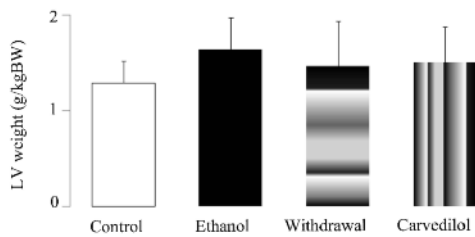


図2 左心室重量

(2) アルコール慢性投与、特に急性離脱による心筋線維形成リスクの増大
 鍍銀染色を用いた組織の定量評価では、Control群に比較して、Ethanol群とWithdrawal群で心筋細胞周囲に細網線維組織の増加が認められたが、Carvedilol群とControl群では有意な差はみられなかった(図3)。

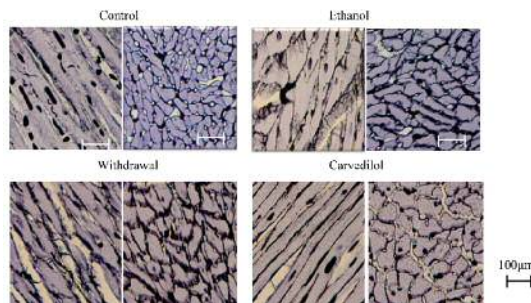


図3 心筋細網線維の変化
 Data represent mean ± SD

細網線維形成と関連する collagen 1a1 mRNAの結果を図4に示す。コントロール群に比べ、アルコール慢性投与群・急性離脱群では collagen 1a1 mRNA の up-regulation が見られた。しかし、carvedilol 前投与により、この up-regulation が是正された。

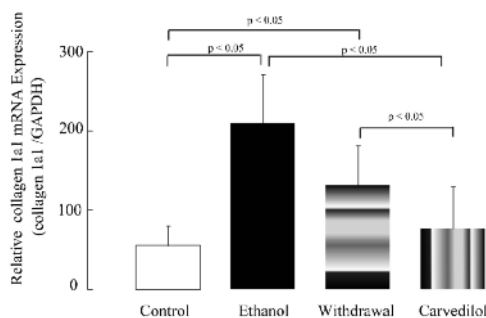


図4 細網線維形成と関連する collagen 1a1 mRNA 発現量の変化
 (Data represent mean ± SD, n = 4)

蛍光免疫染色定量評価では、Control群と比較して、Ethanol群では α-SMA 陽性細胞が有

意に増加した。この α-SMA 陽性細胞の増加は急性離脱により増悪したが、carvedilol 前投与により改善された(図5)。

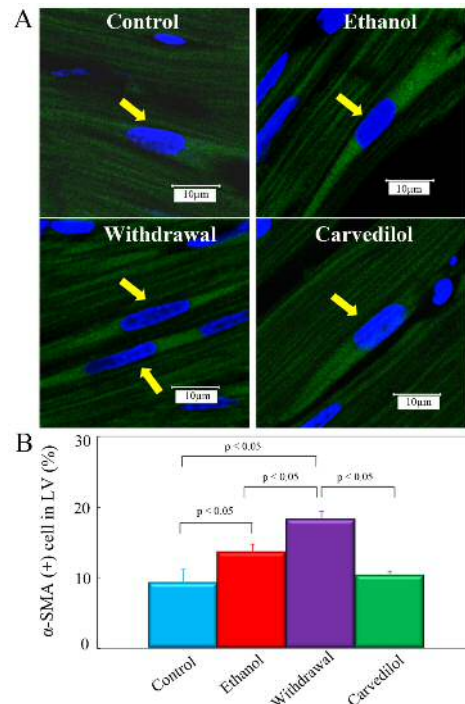


図5 慢性アルコール投与による心筋線維芽細胞(α-SMA)の増加
 A: 典型例, B: 統計結果
 (Data represent mean ± SD, n = 5)

コントロール群に比べ、アルコール慢性投与群・急性離脱群では α-SMA mRNA の up-regulation が見られた。しかし、carvedilol 前投与により、この up-regulation が是正された(図6)。

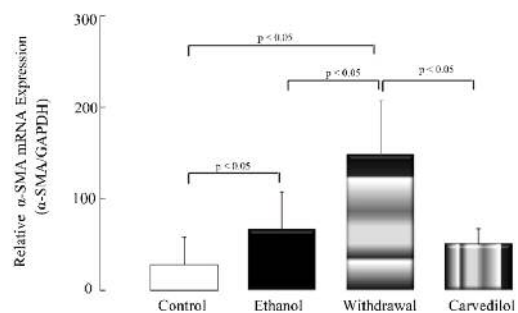


図6 慢性アルコール投与による心筋線維芽細胞(α-SMA) mRNA 発現量の増加
 (Data represent mean ± SD, n = 4)

(3) アルコール慢性投与、特に急性離脱による左心室心筋ギャップ結合構成蛋白質Cx43のリモデリング
 慢性アルコール持続投与中に細胞質のト

一タール CX43 の mRNA 発現量 (図 7) および蛋白質発現量 (図 8) が低下傾向を示したが、統計学的な有意差はみられなかった。しかし、急性離脱時には mRNA 及び蛋白質発現量は有意に低下し、Cx43 の合成の低下が示唆された。この低下は carvedilol 前投与によって是正された (図 7-8)。

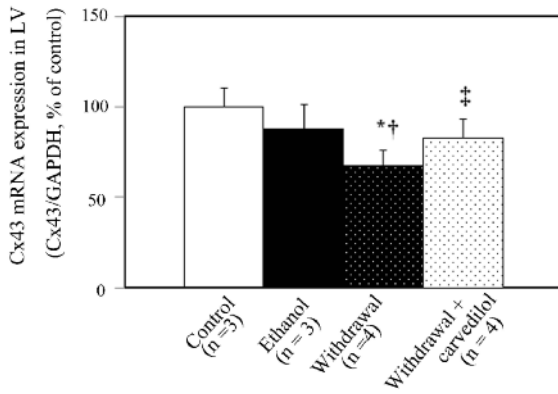


図 7 慢性アルコール投与による Cx43 mRNA 発現量の変化

Data represent mean \pm SD, * p < 0.05 vs. Control, † p < 0.05 vs. Ethanol, ‡ p < 0.05 vs. Withdrawal

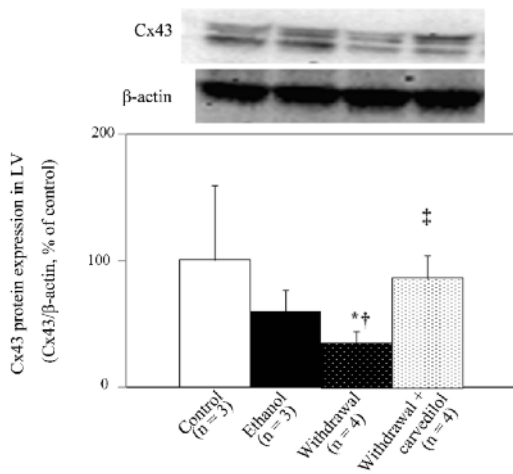


図 8 慢性アルコール投与による Cx43 蛋白質発現量の変化

Data represent mean \pm SD, * p < 0.05 vs. Control, † p < 0.05 vs. Ethanol, ‡ p < 0.05 vs. Withdrawal.

膜貫通蛋白質のセリン 368 (図 9) とセリン 279/282 (図 10) リン酸化 Cx43 については慢性アルコール投与により低下傾向が認められたが、統計学的に有意な差はみられなかった。しかし、急性離脱の際にこれらの指標は著明に低下した。一方、これらの Cx43 の変化は carvedilol 前投与によって是正された (図 9-10)。

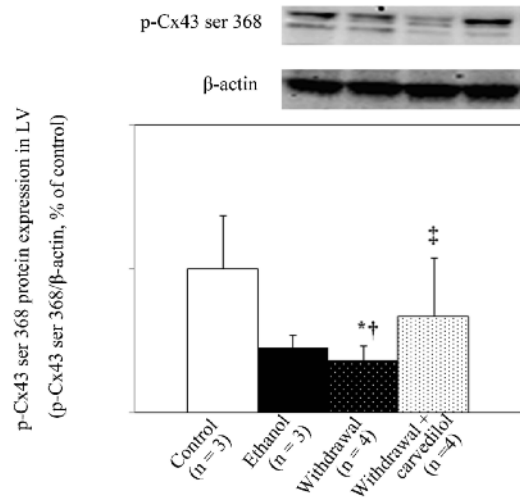


図 9 慢性アルコール投与による p-Cx43 ser 368 蛋白質発現量の変化

Data represent mean \pm SD, * p < 0.05 vs. Control, † p < 0.05 vs. Ethanol, ‡ p < 0.05 vs. Withdrawal.

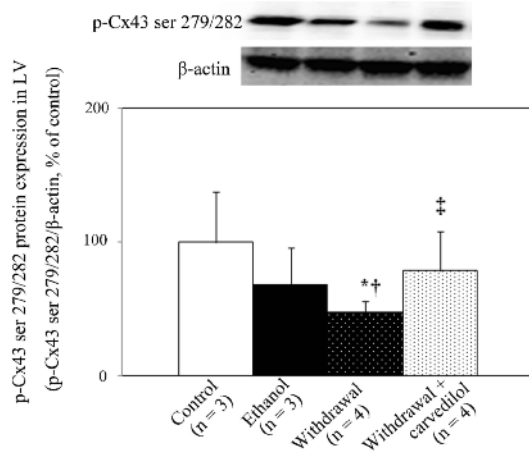


図 10 慢性アルコール投与による p-Cx43 ser 279/282 蛋白質発現量の変化

Data represent mean \pm SD, * p < 0.05 vs. Control, † p < 0.05 vs. Ethanol, ‡ p < 0.05 vs. Withdrawal.

【総括】

慢性アルコール投与、特に急性離脱の際に致死的不整脈の発症リスクが上昇し、全身および心臓交感神経活性化、心筋脱分極の不均一性の増大が認められた (基盤 C・18590635)。今回のラットを用いた実験では、8 週間アルコール投与により、形態的な心筋細胞線維の増加と Collagen 1a1 mRNA 発現量の増加が見られた。線維形成のキー細胞である α -SMA 陽性細胞と α -SMA mRNA 発現量の増加が、特に急性離脱ラットで認められた。心筋細胞線維・免疫染色・mRNA 発現量の変化は、carvedilol 前投与により是正された。

一方、ギャップ結合リモデリングすなわち

細胞質における Cx43 合成の低下および膜貫通 Cx43 のセリン 368 およびセリン 279/282 リン酸化の低下を認めた。これらの変化も carvedilol 投与により是正された。

以上の結果により、慢性アルコール投与、特に急性離脱により、心筋での線維化リスクが上昇し、不整脈のリスクが高まる可能性が示唆された。ギャップ結合リモデリングは細胞間の興奮伝播の異常を生じさせ、頻脈性不整脈の発生・維持に関与する重要な要因と考えられた。また、ギャップ結合リモデリングについて、直接的な交感神経系の関与が証明され、交感神経系を制御することは頻脈性不整脈の upstream 治療となる可能性が示された。

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 4 件)

- ① Liu J, Takase I, Hakucyo A, Fujimiya T, Carvedilol Prevents the Ethanol-Induced Ventricular Arrhythmias by Modifying the Gap Junction Remodeling in Rats, Heart, 査読あり、8 巻、2012、E 109-E 109
DOI: 10.1136/heartjnl
- ② 劉金耀、高瀬泉、白鳥彩子、藤宮龍也、アルコール心臓性突然死における交感神経活性化と心筋細胞ギャップ結合リモデリングとの関連、アルコールと医学生物学、査読あり、31 巻、2012、54-56
ISBN978-4-86459-064-8
- ③ 劉金耀、高瀬泉、白鳥彩子、藤宮龍也、慢性アルコール投与ラットにおける心筋の線維化リスクと心筋交感神経活性化との関連、アルコールと医学生物学、査読あり、30 巻、2011、76-78
ISBN978-4-88595-983-7
- ④ Shirafuji S, Liu J, Okamura N, Hamada K, Fujimiya T, QT Interval Dispersion and Cardiac Sympathovagal Balance Shift in Rats with Acute Ethanol Withdrawal. Alcohol Clin Exp Res, 査読あり、34 巻 2010、223-230
DOI:10.1111/j.1530-0277

[学会発表] (計 7 件)

- ① Liu J, Takase I, Hakucyo A, Liu X, Fujimiya T, Carvedilol Prevents the Ethanol-Induced Ventricular Arrhythmias by Modifying the Gap Junction Remodeling in Rats, 23rd Great Wall International Congress of Cardiology, 2012 年 11 月 12 日, Beijing, China
- ② Liu J, Takase I, Hakucyo A, Fujimiya T,

Antiarrhythmic effects of carvedilol via modifying the gap junction remodeling in the alcohol rats, 2012 International Society for Biomedical Research on Alcoholism, 2012 年 9 月 10 日, Sapporo Convention Center, Japan

- ③ 劉金耀、高瀬泉、白鳥彩子、藤宮龍也、アルコール心臓性突然死と心筋細胞ギャップ結合機能、第 96 次日本法医学会学術全国集会、2012 年 6 月 8 日、アクトシティ浜松 (静岡)
- ④ 劉金耀、高瀬泉、白鳥彩子、藤宮龍也、アルコール心臓性突然死における交感神経活性化と心筋細胞ギャップ結合リモデリングとの関連、第 31 回アルコール医学生物学会学術集会、2012 年 1 月 27 日、ホテル日航金沢 (石川)
- ⑤ 劉金耀、高瀬泉、白鳥彩子、藤宮龍也、アルコール性心筋線維化と交感神経活性化との関連、第 46 回日本アルコール・薬物医学会、2011 年 10 月 15 日、愛知県労働センター (愛知)
- ⑥ 劉金耀、高瀬泉、白鳥彩子、藤宮龍也、慢性アルコール投与ラットにおける心筋線維化リスクと心筋交感神経活性化との関連、第 30 回アルコール医学生物学会学術集会、2010 年 10 月 7 日、久留米萃香園ホテル (福岡)
- ⑦ Liu J and Fujimiya T, Rats in Acute Withdrawal from Ethanol Exhibit the High Risk of Myocardial Fibrosis Formation and Cardiac Sympathetic Predominance, 2010 World Congress of International Society for Biomedical Research on Alcoholism, 2010 年 9 月 14 日, Paris, France

6. 研究組織

(1) 研究代表者

劉 金耀 (LIU JINYAO)

山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：60379956

(2) 研究分担者

藤宮 龍也 (FUJIMIYA TATSUYA)

山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50219044