

## 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11日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890049

研究課題名（和文） 情動ストレスによる突然死の分子病態研究

研究課題名（英文） Restraint stress induces connexin-43 translocation in rat heart

研究代表者

鵜沼 香奈 (UNUMA KANA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30586425

研究成果の概要（和文）：激しい情動ストレスが、交感神経の過緊張を介して心臓性突然死の発症率・死亡率を増す事が知られている。本研究では、代表的な情動ストレスモデルであるラット身体拘束を行った。情動ストレス負荷ラットでは $\beta$ -アドレナリン受容体依存性の交感神経系の過緊張とカテコラミン分泌亢進、心室性期外収縮の発生頻度上昇を認めたが死亡個体はなかった。一方、gap junction(GJ)の阻害剤を投与して情動ストレスを負荷すると、約21%で致死性不整脈が惹起された。これらの群では、 $\alpha$ -アドレナリン受容体依存性にGJ構成タンパクの量や分布形式に著しい変化を認めた。

**研究成果の概要(英文)**: Immobilization (IMO) confers emotional stress in animals and humans. It was recently reported that IMO in rats induced translocation of connexin-43 (Cx43) to gap junctions (GJs) and attenuated arrhythmogenesis with GJ inhibition. Few reports show the contribution of adrenoceptors to Cx43 upregulation in cardiomyocytes, but the involvement of adrenoceptors and ischemia in Cx43 translocation in IMO remains elusive. Male Sprague-Dawley rats underwent IMO and the ventricular distribution of Cx43 was examined by western blotting. IMO induced translocation of Cx43 to the GJ-enriched membrane fraction, with a peak at 60min. The IMO-induced Cx43 translocation was inhibited by pretreatment with the  $\alpha$ -adrenoceptor. The  $\beta$ -blockers inhibited the premature ventricular contractions (PVCs) induced by IMO. Translocation of Cx43 to the GJ-enriched fraction occurs via the  $\alpha$ -adrenoceptor pathway, independently of ischemia. The  $\beta$ -adrenoceptor pathway contributes to the inducing of PVCs in IMO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1260000	378000	1638000
2011年度	1160000	348000	1508000
年度			
年度			
年度			
総計	2420000	726000	3146000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：法医学

キーワード：心臓性突然死、コネキシン、ギャップジャンクション、情動ストレス

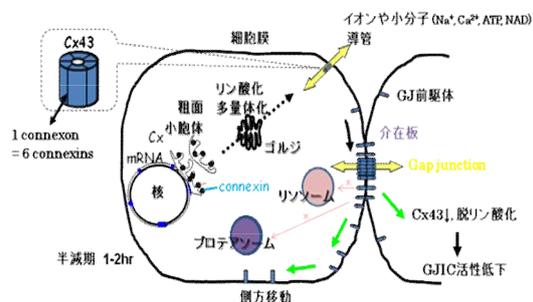
1. 研究開始当初の背景  
地震などの自然災害による情動ストレスが、交感神経の過緊張を介して心臓性突然死の

発症率・死亡率を高める事が知られている。また、突然死の解剖における病理組織学的検査から、心疾患を基盤としてストレスによっ

て突然死が惹起されるという報告もある。法医学実務上は、心疾患を基盤に事故・暴行・心理ストレスなどの外因が突然死の誘因になる事があるが、内因・外因の鑑別に有効な方法はない。

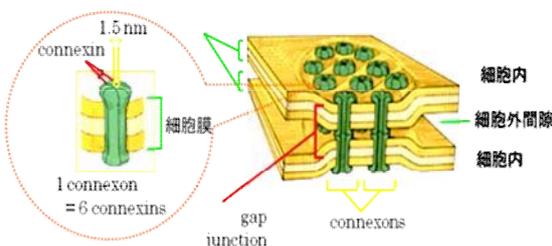
情動ストレスの代表的モデルである、ラット身体拘束でカテコラミン過剰分泌から、 $\beta$ -アドレナリン受容体刺激を介して「たこつぼ型心筋症」様変化を再現出来るという報告がある。このたこつぼ型心筋症は、地震などの際に被災生活によるストレスから多くの発症者が出たと報じられた。さらに、 $\beta$ -アドレナリン受容体アゴニストは、ラット心筋収縮帯や細胞死を伴う心筋障害（カテコラミン心筋症）を引き起こす事が知られている。また、 $\beta$ -アドレナリン受容体には SNP が存在し、この遺伝子間で心臓性突然死のリスクに差がある事が知られている。このように、心臓性突然死は心交感神経活性と密接な関係があることが示唆されるが、分子機構は不明な点が多い。

心筋コネクシン 43 (Cx43) は粗面小胞体で合成され、ゴルジ装置において 6 量体を成し中心に孔をもつ connexon が形成され、細胞膜へ移動後介在板に移動・集合して斑を形成する。この斑は隣接する細胞の斑と結合して gap junction (GJ) となる。隣接する細胞間ではこの GJ を通じた無機イオンや低分子の挿受により情報を伝達して心拍動を同調さ



せ心筋の恒常性を保っている。

心肥大、心筋梗塞、心不全などの病態では、Cx43 のタンパク合成や分解、細胞膜への輸送の過程が就職され、心筋細胞における GJ-Cx43 タンパク量や分布様式が著しく変化する。例えば、肥大型心筋症患者や心筋梗塞巣周囲の残存心筋において、GJ-Cx43 が介在板部分で減少し、側方細胞膜に分布するように発現が変化すること (lateralization) が知



られている。Guerrero らは CX43 ノックアウトマウスのヘテロ個体において、心室伝導速度が 30% 程にまで低下する事を報告した。さらにこのような Cx43 ノックアウトマウスのヘテロ個体に虚血傷害を加えると、心室性不整脈が高い頻度で出現する事が報告された。これらの知見から、Cx43 の側方細胞膜への分布や介在板での発現減少は、心筋細胞間の電氣的結合コンダクタンスや興奮伝導速度の低下を来し、興奮伝播の不均一促進、異方向性伝播助長により、微小な領域におけるリエントリーの発生を促し、催不整脈性を引き起こすと考えられている。

一方、Cx43 の代謝回転速度は、1-2 時間と早いから、かかる環境変化に対して極めて速やかに適応すべく制御されていると考えられる。最近では、培養心筋細胞にアドレナリン受容体刺激を加えた直後から、介在板の Cx43 発現が増加し GJ 情報伝達の活性が上昇すると報告された。これらの知見から、カテコラミン増加によるアドレナリン受容体刺激が、Cx43 の発現やリン酸化を介して GJ 機能を修飾する事で、不整脈発生、心機能に寄与すると考えられたが、その分子学的機序は明らかでない。

## 2. 研究の目的

本研究では、情動ストレスはアドレナリン受容体刺激を介して心筋介在板 GJ における Cx43 の量的変化を引き起こすのではないかと、そして特に GJ 情報伝達活性が低下している状況において、不整脈や突然死を引き起こすのではないかとという仮説をたてた。

これらの仮説を検証するため、本研究では代表的な情動ストレスモデルであるラット身体拘束モデルを用いて、GJ 阻害剤投与下での情動ストレス負荷時の生理学的・分子学的変化、及びアドレナリン刺激と GJ 情報伝達の関係、不整脈発生の関係性を検討する事を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 代表的な情動ストレスモデルである、ラット身体拘束モデルを用いて、情動ストレスは心筋介在板 GJ における Cx43 の量的変化にどのような影響を与えるかを検討する。また、GJ 阻害剤投与下での、生理学的データやその分子学的メカニズムの検討を行う。

① 情動ストレス負荷のために、5 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットを無麻酔のまま背臥位で四肢を粘着テープで固定した群を身体拘束 (IMO; immobilization) とする。

② GJ 阻害剤として、リン酸緩衝液で溶解した carbenoxolone (CBX) を経静脈的に投与する。

③ 心電図測定は、テレメトリを予め皮下に埋め込み、解析は ECG processor を用いて行う。

(2) 心筋細胞にアドレナリン受容体刺激薬を直接投与し、in vivo の系で報告されている

のと同じような介在板へのCx43の転移が起こるかどうかを確認する。

(3) このとき、Cx43タンパク発現や局在、GJの機能がどのように変化するかを検討する。

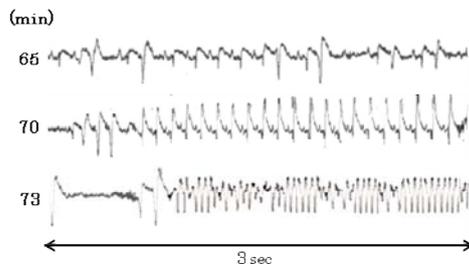
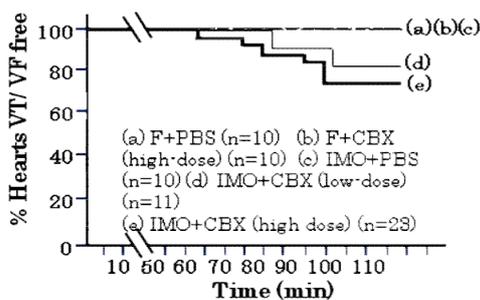
① *in vivo* で見られたような介在板への転移をまず免疫染色で確認する。その後、GFPを融合させたCx43(GFP-Cx43)を細胞にトランスフェクションさせ、細胞内でのCx43移動を詳細に検討する。

② 心筋初代培養細胞に各種アドレナリン受容体刺激薬を投与し、アドレナリン刺激によるCx43タンパクの変動の作用機構を観察する。また、GJ情報伝達を阻害した際に、Cx43や不整脈がどのように影響を受けるかを検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 情動ストレス負荷ラットにおける心電図変化

GJ阻害剤であるCBXを持続投与した状態で身体拘束をし、120分間心電図をモニターしたところ、心室頻拍VT/心室細動VFから突然死に至るラットを21%程認めた。



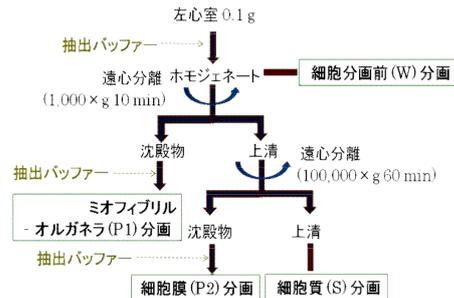
これらのラット心電図を詳細に検討すると、死亡した個体ではQS延長、心室性期外収縮PVCの発現頻度の著しい上昇を認めた。 $\beta$ -アドレナリン受容体遮断薬を投与すると、PVCが抑制され、致死的不整脈の発生率を有意に抑制した。 $\alpha$ -アドレナリン受容体刺激薬やNOなどの血管拡張薬では、死亡率の減少を認めなかった。なお、身体拘束単独ないし

CBX単独投与でこのような変化を起こした個体はなかった。

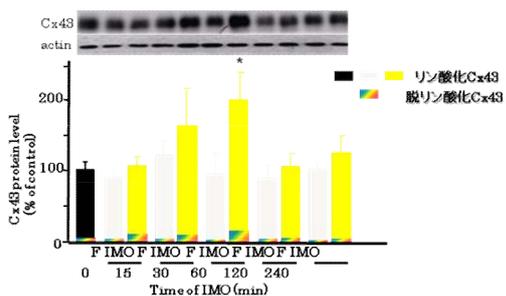
##### (2) 情動ストレスによるCx43の量的変化

Cx43はいくつかのリン酸化部位を持つ。正常状態では44-46 kDaのリン酸化Cx43がメインで41 kDaの脱リン酸化Cx43は殆ど検出されないが、心筋虚血、心肥大など病的状態では、脱リン酸化される事が知られている。

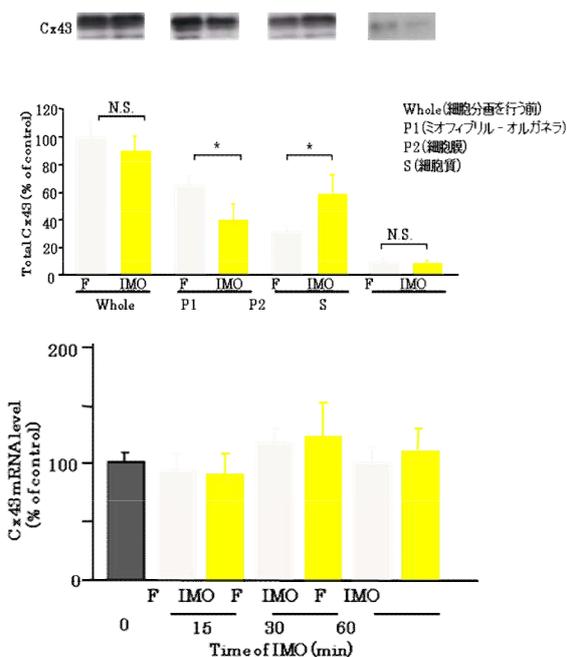
下記の様な方法で細胞分画を行い、GJの豊富な細胞膜分画(P2分画)における、情動ストレス負荷心筋Cx43の発現量について経時的に検討した。



その結果、情動ストレス負荷後60分をピークに一過性にCx43タンパク量がコントロール群の約2倍上昇し、120分でベースラインに戻る事が明らかになった。

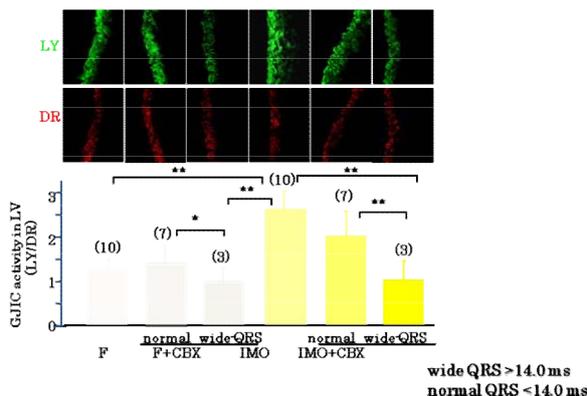


次に、同様にして細胞分画を行う前のホモジネート液(W)およびミオフィブリル・オルガネラ分画(P1)のCx43タンパク量低下していることが分かった。そこで、拘束4匹のラットのW液の総Cx43タンパク量平均を100%とした時の、各群間の%を比較検討した。コントロール群ではCx43の配分は、P1に65%、P2に30%、細胞質(S)に5%程度であった。一方、情動ストレス負荷群では、P1で約40%に減少し、P2分画は約55%に増加していた。一方、W分画は殆ど変化しなかった。また、Cx43のmRNAレベルには変化は認めなかった。



### (3) 情動ストレスおよび GJ 阻害剤投与ラットにおける GJIC 活性

情動ストレス負荷 60 分における介在板上のリン酸化 Cx43 の増加は、GJ チャンネルの増加と GJ 開口を示唆している。そこで、dye transfer assay 法を用いて、左室における GJIC 活性を測定した。その結果、情動ストレス負荷ラットの GJ 細胞間情報伝達活性は、コントロール群の約 2.5 倍増加していた。一方、CBX 投与によってこの GJ 細胞間情報伝達活性の上昇が約 30% のラットで有意に抑制されていた。CBX 投与群については、さらに QRS 幅が延長したもの (>14.0 ms) とそうでないもの (<14.0 ms) に分けて検討を加えたところ、CBX 投与による QRS 延長は GJ 細胞間情報伝達活性阻害と相関する事が分かった。



### (4) 心筋細胞へのアドレナリン刺激の直接的効果の検討

心筋初代培養細胞に、 $\alpha$ -アドレナリン受容体刺激薬を加えたところ、投与 15 分という

ごく早期に介在板の Cx43 発現が上昇し、GJ による細胞間情報伝達の活性が上昇する事が確認された。一方、 $\beta$ -アドレナリン刺激では有意差を認めなかった。よって、in vivo の系-ラットに情動ストレスを負荷すると、心筋 Cx43 が介在板に転移し、GJ 細胞情報伝達の活性が上昇-で確認された変化が、カテコラミン増加によるアドレナリン受容体刺激によって起こっているのではないかという傍証を得た。

以上から、本研究の意義を下記のように考える。情動ストレスと不整脈についてはその関係性は疫学的な関連はあるが、そのメカニズムについては殆ど報告がない。本研究は、げっ歯目の情動ストレス負荷モデルにおいてのみならず、培養細胞においても、GJ 情報伝達が亢進する事、この GJ 情報伝達活性をキャンセルさせると、致死性不整脈が誘発され得る事を明らかにした。また、不整脈については  $\beta$ -アドレナリンを介して起こる事、Cx43 の介在板への転移などは  $\alpha$ -アドレナリンを介する事を明らかにした点で意義があると考ええる。

### 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 2 件)

1. 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.
2. 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.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者 ( )

研究者番号：

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：