

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591081

研究課題名(和文) 致死性不整脈発生基質としての介在板リモデリングの検討

研究課題名(英文) Alterations in Intercalated Disk Proteins Contribute to the Development of Lethal Arrhythmias

研究代表者

大草 知子(Ohkusa, Tomoko)

九州大学・大学病院・研究員

研究者番号：00294629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：不整脈の発生原因には心筋細胞間を構成する介在板異常が関与する。介在板構成蛋白にはadhesion junction (AJ)とgap junction (GJ)があり、両者間は分子間結合や情報伝達を介して調節がおこなわれている。今回の研究では、心不全発現過程、および頻脈負荷により、GJコネクシン43に質的・量的変化が生じること、GJの変化に先行してADの変化が生じ、この変化によりコネクシン43発現が制御されていることが判明した。レニン・アンジオテンシン系は介在板構成蛋白質を制御することにより、介在板の質的・量的変化は抑えられること、その結果、不整脈の発生を抑制することができることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The intercalated disc (ID) contains adhesion junctions (AJs) and connexin (Cx) gap junctions (GJs). We investigated ID remodeling during development of heart failure in UM-X7.1 cardiomyopathic hamsters (UMX). We investigated the effect of angiotensin II blockade (ARB) on ID remodeling. At 10w, ~20% of UMX died suddenly, and VT/VF was inducible in ~30%. At 10w, the dispersion of action potential duration (APD) was increased. At 20w showed significant reduction of cardiac space constant, a decrease in conduction velocity, and an increase in APD dispersion. The expression of Cx43 was reduced and Ser255-phosphorylated Cx43 was increased at 20w. Qualitative and quantitative Cx43 alterations create serious arrhythmogenic substrate. The changes in beta-catenin preceded Cx43 alterations. At 10w, the nuclear expression of beta-catenin was remarkably decreased. ARB improved these alterations in ID proteins and physiological properties. ARB was an effective treatment of ID remodeling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：不整脈 介在板 ギャップ結合 心不全 レニン・アンジオテンシン系

## 1. 研究開始当初の背景

心筋細胞では隣接する細胞間は介在板により結合され、**介在板はギャップ結合と adhesion junction で構成**されている。細胞間の電氣的結合はギャップ結合で、機械的結合は adhesion junction で維持され、心筋細胞の同期的な収縮・弛緩が正常に保たれるように働いている。**ギャップ結合**は細胞間を直接連結するチャンネルにより構成され、興奮伝播や電氣的結合を調節する。ギャップ結合は connexin (Cx) 蛋白で構成され、心筋では少なくとも4つの異なった Cx 蛋白 (Cx43、40、45、37) が発現し、半減期が1~2時間と非常に短いために短時間のうちに様々な負荷の影響を受ける。Cx の合成、崩壊には Wnt/ カテニン系、RAA 系が関与していることが知られている。これまで申請者は、後述の業績 (Am J Cardiol 2003, JACC 2004, AJP 2008, Circ J 2009, cardiovasc) にもあるように、ヒト心筋細胞やモデル動物を用いてギャップ結合、Cx の量的変化に加え、異常リン酸化や分布変化が不整脈の発生・維持に関する直接的な基質となることを解明し、同時にギャップ結合リモデリングを制御する情報伝達系のひとつに RAA 系が関与することを報告した。国外の研究室からの同様の報告を統合すれば、**ギャップ結合リモデリングは重要な不整脈発生基盤である**ことは明らかである。

一方、**adhesion junction** は adherens junction (fascia adherens) とデスモゾームで構成され、細胞間の機械的結合を保持する役割を担っている。その構造は、細胞膜貫通蛋白質 (transmembrane protein) が linker protein を介して cytoskeletal protein と結合し、細胞の収縮・弛緩の同期性を維持している。adhesion junction 異常がなぜ不整脈発生のメカニズムに関与するかの詳細については不明な点が多い。近年、**adhesion junction がギャップ結合を直接的に制御**することが分子生物学的実験により報告された。デスモゾーム構成蛋白の desmin や adherence junction 構成蛋白の N-cadherin の発現量を遺伝子操作により減少させることにより、ギャップ結合リモデリングが生じ、

その結果、電気生理学的特性の変化により不整脈が生じることが報告された (Kostetskii I, Circ Res.2005, Gard JJ, Cardiovasc Res. 2005)。また、ARVC の原因蛋白質の PKP2 発現量を減少させることにより、ギャップ結合の Cx43 発現量が低下すること、PKP2 と Cx43 は共通の macromolecular complex として存在することも報告された (Oxford EM, Circ Res.2007)。本研究では、介在板リモデリングの心疾患病態形成への直接的な関与と Wnt/ カテニン系、RAA 系を中心とした情報伝達系を解明し、不整脈発生基盤となる介在板リモデリングをターゲットとした新しい治療法(薬)を探る。

## 2. 研究の目的

本研究では、**不整脈発生基盤となる心筋細胞介在板**を構成するギャップ結合および adhesion junction リモデリングに焦点をあて、以下の目的で研究を行う。**1) 病的心房・心室筋細胞での介在板リモデリングの把握**: 種々の心疾患では、介在板にどのような質的・量的変化 (介在板リモデリング) が生じ、不整脈の発生・維持につながっているのか? **2) 介在板リモデリングを制御する情報伝達系の解明と病態形成への関与の検討**: 介在板リモデリングに関与する情報伝達系のうち、本研究では特に Wnt/ カテニン系およびレニン・アンジオテンシン・アルドステロン (RAA) 系に着目し、病態形成への関与を検討する。**3) 介在板を制御する新しい不整脈治療の検討**: 介在板リモデリング制御に関わる新しい不整脈の治療薬として、RAA 系阻害薬を含めたどのような薬剤が可能性を有するのかを検討する。

## 3. 研究の方法

### A. 動物モデルを用いた研究 (心筋症ハムスターの心不全発現過程において Adhesion Junction の変化はギャップ結合リモデリングに先行する)

心筋症モデルとして UM-X7.1 を用いた。コントロールとしてゴールデンハムスターを用いた。0.01% オルメサルタンを飲水中に加えて6週齢から投与した。

**心エコー図、組織学、および電子顕微鏡を用いた観察**

心エコー図は 15MHz セクタープローベ付きの HDI-5000 (Philips 社) を用いた。電子顕微鏡観察用標本として左室心筋を 1mm<sup>3</sup> に切断し、2.5% グルタルアルデヒドを使用し一晩 4 で固定し、エタノールで脱水した後にエポキシレジンに包埋した。90nm の超薄切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色し、電子顕微鏡 (H-800; Hitachi, Tokyo, Japan) で観察した。

### **Western blotting と免疫組織染色による介在板構成蛋白の発現解析**

Lysis buffer を用いて、ハムスター左室心筋から total cellular fraction の蛋白サンプルを作成し SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。また、核蛋白分画を Lizzote らの報告に従い精製した。各種の一次抗体、二次抗体を使用した。蛋白質発現量は ECL<sub>TM</sub> immunoblotting detection system (GE Healthcare) を用いて X 線フィルムに感光させ定量化した。

免疫組織染色には一次抗体、二次抗体を使用し、共焦点顕微鏡 (LSM510; Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて観察した。

### **RT-PCR 法を用いた Cx43 mRNA 発現量の解析**

RNeasy Fibrous Tissue Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、凍結したハムスターの左室心筋から total RNA を単離し、Omniscrypt Reverse Transcriptase (Qiagen) と oligo-(dT)15 primer (Takara Biotechnology, Shiga, Japan) を用いて逆転写反応を行った。RT-PCR 産物は QuantiTect SYBR Green Kit (Qiagen) を用いて測定した。

### **Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)**

Light Shift Chemiluminescent EMSA kit (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いて行った。過去の報告に基づき、TCF/LEF プローベとして二本鎖ヌクレオチドオリゴマー (CCC TTT GAT CTT ACC) を使用した。スーパーシフトアッセイには anti- $\beta$ -catenin antibody (BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いた。電気泳動後にナイロン膜にトランスファーし、バンドを Chemiluminescent Nucleic Acid Detection module (Pierce) を用いて検出した。

### **心室頻拍・心室細動誘発試験**

Langendorff 灌流心を用いて心室頻拍 (VT) と心室細動 (VF) の誘発試験を行った。以前の報告と同様に、ハムスターの心臓を取り出し modified Krebs-Ringer 液を 95%酸素と 5%二酸化炭素を用いて 37、pH7.4 に平衡化し、Langendorff 装置で灌流させた。VT/VF 誘発には期外刺激法を用いた。150ms で S1-S1 刺激を加えた後に、左室自由壁中央から単発期外刺激 (S2) を加え、徐々に S1-S2 間隔を短縮させた。心室の電気興奮を観察するために左室心尖部と右室高側壁の間の双極誘導を用いた。

### **B, 心筋細胞を用いた研究 (高頻度電気刺激負荷は心筋細胞間結合蛋白の変化を惹起する)**

新生仔ラット (生後 1~2 日齢) を断頭して安楽死させ、新生仔の心筋細胞を既報の通りに調製し培養した。酵素的に解離した筋細胞を培養皿に 3x10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> の濃度で播種し、5%胎児ウシ血清を添加した Leibovitz L-15 培地中で 37 で培養した。細胞はランダムな配向 (isotropic growth) で増殖してコンフルエントな層を形成し、5 日後までには一定速度の同期した自発的拍動が認められた。

### **高頻度電気刺激負荷 (RES)**

培養 5 日目の心筋細胞を 0.5%血清培地に移し、RES (3.0 Hz) を最高 60 分間負荷した。RES は既報の通り、白金線刺激電極 (0.5 mm 径) を介したフィールド刺激により負荷した。刺激強度は同時収縮閾値の 1.3 倍に調節した。ID リモデリングに対する影響を解明するため、アンジオテンシン II タイプ 1 受容体の特異的アンタゴニストであるオルメサルタン 100 nmol/L (第一三共株式会社より贈与) を用い、この化合物を RES 開始 30 分前に培地に添加した。

### **ランゲンドルフ灌流心実験法**

#### **免疫組織化学的検査及び免疫プロット法**

細胞間結合蛋白の免疫組織化学的検査のため、先の方法で行った。

**リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いた Cx43 mRNA の解析**

RNA 全体を RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて新生仔ラット培養細胞から単離し、Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany) 及びオリゴ- (dT)<sub>15</sub> プライマー (タカラバイオ株式会社) を用いて逆転写させた。リアルタイム PCR 産物量を QuantiTect SYBR Green Kit (Qiagen, Hilden, Germany) により Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて測定した。

#### **興奮伝播の細胞外電位マッピング**

培養心室筋細胞の伝導特性を、多電極アレイシステム (MED-P545A 及び MED64、アルファメッドサイエンティフィック株式会社) を用いた細胞外電位マッピングにより既報のとおり検討した。

#### **4. 研究成果**

##### **A. 動物モデルを用いた研究成果**

今回我々は介在板リモデリングの心室性不整脈の発生における役割について検討した。また UM-X7.1 心筋症ハムスターモデル (以下 UM-X7.1) の心不全発現過程での介在板リモデリングに対するアンギオテンシン II 受容体拮抗薬のオルメサルタン の効果について検討した。UM-X7.1 は 10-15 週齢では心肥大、20 週齢では中等度の収縮性低下を伴った代償性心不全、24 週齢以上では非代償性心不全を呈する。本研究では、6-20 週齢の UM-X7.1 の介在板構成蛋白質の変化について検討した。致死性不整脈の発生率の変化についても検討した。その結果、adhesion junction 構成蛋白質の変化はギャップ結合リモデリングに先行することが分かり、介在板リモデリングは心不全発現過程における心室性不整脈の発生に寄与する可能性が示唆された。アンギオテンシン II 受容体拮抗薬のオルメサルタンは介在板の変化を修飾することにより、心室性不整脈に対する新しいアップストリーム治療となることが示された。

##### **B. 心筋細胞を用いた研究成果**

心筋細胞中の Cx43 蛋白の発現量は、60 分後に有意に増加した。細胞分画全体の カテニン発現量は 30 分後に有意に増加した。核内 カテニンは、Cx43 の T 細胞因子 / リンパ球エンハンサー結合因

子 (TCF/LEF) 転写活性化因子として働き、その分解はグリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 (GSK3 ) により調節されているが、この発現量は 10 分後に劇的に増加した。伝導速度は 60 分間の RES 負荷により有意に上昇した。オルメサルタンはこのような RES の作用を阻害した。GSK3 は活性化されたマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) によりリン酸化され、カテニンの分解を阻害するが、我々は、リン酸化 GSK3 の増加はオルメサルタンによって減弱することを明らかにした。

カテニンの変化は Cx43 GJ のリモデリングに先行しており、これが GJ の形成と安定性に重要な役割を果たしている可能性がある。オルメサルタンは、カテニンシグナル伝達経路を介して細胞間結合リモデリングを調節することにより、新たな不整脈のアップストリーム治療薬になると考えられる。

#### **5. 主な発表論文等**

Alterations in adhesion junction precede gap junction remodeling during development of heart failure in cardiomyopathic hamsters  
Yoshida M, Ohkusa T, Nakashima T, Takanari H, Yano M, Takemura G, Honjo H, Kodama I, Mizukami Y, Matsuzaki M, Cardiovasc Res, 査読有、92:95-105, 2011

TNakashima T, Ohkusa T, Okamoto Y, Yoshida M, Lee JK, Mizukami Y, Yano M, Rapid electrical stimulation causes alterations in cardiac intercellular junction proteins of cardiomyocytes. AJP, 査読有、in press, 2014

〔雑誌論文〕(計 2 件)

大草知子, 松崎益徳, 「Chapter 5 併用療法 1 Ca 拮抗薬」ファーマナビゲーター 遮断薬編 改訂版 :150-155, 2011

班長 松崎益徳, 班員 20 名, 協力員 池田安宏, 大草知子, 矢野雅文他 6 名 「慢性心不全治療ガイドライン(2010 年改訂版)」Circ J 日本循環器学会 : 1-35, 2011.6

〔学会発表〕(計 2 1 件)

(国際学会)

European Society of Cardiology Congress  
2013, Amsterdam, 2013.8.31  
Tadamitsu Nakashima, Tomoko Ohkusa, Masaaki  
Yoshida, J.K.Lee, Masafumi Yano  
「Alterations in cardiac beta-catenin  
precede connexin gap junction remodeling in  
cardiomyocytes exposed to rapid electrical  
stimulation」

(国内学会)

The 75th Annual Scientific Meeting of the  
Japanese Circulation Society, Yokohama,  
2011.8.3, Masaaki Yoshida, Tomoko Ohkusa,  
Takashi Satoh, Shinsuke Suzuki, Genzo Takemura,  
Hiroki Takanari, Haruo Honjo, Itsuo Kodama,  
Masunori Matsuzaki「Olmesartan Modulates Disc  
Remodeling during the Development of Heart  
Failure」Circ J 75[Suppl ] : 2746

The 28th Annual Scientific Meeting of the  
Japanese Society of Electrocardiology & The  
26th Annual Meeting of the Japanese Heart  
Rhythm Society & The 4th Asia Pacific Heart  
Rhythm Society (APHRs) Scientific Session,  
Fukuoka, 2011.9.18, Tadamitsu Nakashima,  
Tomoko Ohkusa, Masaaki Yoshida, Jutarō Yamada,  
Takayuki Okamura, Takeshi Ueyama, Toshiro  
Miura, Akihiko Shimizu, Minoru Horie, Masunori  
Matsuzaki, 「New Diagnostic Test for  
Arrhythmogenic Right Ventricular  
Cardiomyopathy」Jpn J Electrocardiol 31[Suppl  
4] : 209

第 59 回日本心臓病学会学術集会, 神戸,  
2011.9.23 中島唯光, 大草知子, 吉田雅昭, 山田  
寿太郎, 岡村誉之, 上山 剛, 三浦俊郎, 清水昭  
彦, 堀江 稔, 松崎益徳「不整脈原性右室心筋症  
の診断と免疫組織染色法」J Cardiol 6[Suppl ] :  
442

第 16 回アミオダロン研究会, 東京, 2011.10.1  
大草知子「心不全における心房細動の発症機序 -  
電氣的、病態的リモデリングの役割 - 」Prog Med

32[Suppl 1] : 104-108

第 21 回山口大学医学部第二内科飛翔会循環器  
研究会, 宇部, 2011.10.8 立石裕樹, 矢野雅文,  
末富 建, 大野 誠, 徐 曉娟, 内海仁志, 奥田  
真一, 小田哲郎, 小林茂樹, 山本 健, 池田安宏,  
大草知子, 松崎益徳, 池本憲章「Defective  
domain-domain interactions within ryanodine  
receptor as a critical cause of diastolic Ca<sup>2+</sup>  
leak in failing hearts」

The 15th Annual Scientific Meeting of the  
Japanese Heart Failure Society, Kagoshima,  
2011.10.13 Yasuhiro Ikeda, Tomoko Ohkusa,  
Masafumi Yano, Masunori Matsuzaki 「Revision  
Points and Remaining Issues to be Solved in the  
Updated Guidelines for Treatment of Chronic  
Heart Failure」J Card Fail 17(9)[Suppl 1] : S131

The 15th Annual Scientific Meeting of the  
Japanese Heart Failure Society, Kagoshima,  
2011.10.13 Tadamitsu Nakashima, Tomoko Ohkusa,  
Masaaki Yoshida, Jutarō Yamada, Takayuki  
Okamura, Takeshi Ueyama, Toshiro Miura,  
Akihiko Shimizu, Minoru Horie, Masunori  
Matsuzaki 「New Diagnostic Test for  
Arrhythmogenic Right Ventricular  
Cardiomyopathy」J Card Fail 17(9)[Suppl 1] :  
S172

第 99 回日本循環器学会中国地方会, 下関,  
2011.11.26 福井 剛, 大草知子, 上山 剛, 原田  
希, 三浦俊郎, 松崎益徳「動悸の精査で見つかった  
原発性心臓腫瘍の一例」

The 76th Annual Scientific Meeting of the  
Japanese Circulation Society, Fukuoka,  
2012.3.16 Tomoko Ohkusa, Masunori Matsuzaki  
「Intercalated Disk Remodeling and  
Arrhythmogenesis during the Development of  
Heart Failure -Its Mechanism and New Upstream  
Therapy-」Circ J 76[Suppl ] : 131

第 60 回日本心臓病学会学術集会, 金沢,  
2012.9.14 中島唯光, 大草知子, 吉田雅昭, 松崎  
益徳「Adhesion Junction の変化は高頻度電気刺

激負荷により生じるギャップ結合リモデリングに先行する」

第 29 回日本心電学会学術集会, 千葉,  
2012.10.12Masaaki Yoshida, Tomoko Ohkusa,  
Tadaaki Nakashima, Hiroki Takanari, Masafumi  
Yano, Genzou Takemura, Haruo Honjo, Itsuo  
Kodama, Yoichi Mizukami Masunori Matsuzaki  
「Alterations in Adhesion Junction Precede Gap  
Junction Remodeling During the Development of  
Heart Failure in Cardiomyopathic Hamster」心  
電図 32[Suppl 5] : 94

第 29 回日本心電学会学術集会, 千葉,  
2012.10.12 中島唯光, 大草知子, 吉田雅昭, 松崎  
益徳「高頻度電気刺激負荷では Adhesion Junction  
の変化がギャップ結合リモデリングに先行する」  
心電図 32[Suppl 5] : 173

The 16th Annual Scientific Meeting of the  
Japanese Heart Failure Society, Sendai,  
2012.11.30Tadamitsu Nakashima, Tomoko Ohkusa,  
Masaaki Yoshida, Masunori Matsuzaki「Changes of  
-catenin Protein Precede Gap Junction  
Remodeling in Cardiomyocyte Caused by Rapid  
Electrical Stimulation」J Card Fail  
18(10)[Suppl 1] : 170

第 101 回日本循環器学会中国地方会, 出雲,  
2012.12.8 中島唯光, 大草知子, 吉田雅昭, 矢野  
雅文「高頻度電気刺激負荷の心筋細胞 -catenin  
へおよび影響についての検討」

The 77th Annual Scientific Meeting of the  
Japanese Circulation Society, Yokohama,  
2013.3.15 Tadamitsu Nakashima, Tomoko Ohkusa,  
Masaaki Yoshida, Masafumi Yano, Cardiac  
-catenin Alterations Precede Connexin Gap  
Junction Remodeling in Cardiomyocytes Exposed  
to Rapid Electrical Stimulation, Circ J  
77[Suppl ] : 1357

第 61 回日本心臓病学会学術集会, 熊本,  
2013.9.20 中島唯光, 大草知子, 吉田雅昭, 李 鐘  
國, 水上洋一, 矢野雅文「アンジオテンシン受容  
体拮抗薬は不整脈発生基盤となる介在板リモデリ

ングを抑制する」J Cardiol 8[Suppl ] : 282  
第 103 回日本循環器学会中国地方会, 米子,  
2013.10.26 中島唯光, 大草知子, 原田典子, 名尾  
朋子, 和田靖明, 上山 剛, 小林茂樹, 池田安宏,  
矢野雅文「心不全患者における睡眠呼吸障害の有  
病率に関するコホート研究(HYPNOS)の中間報告」  
The 17th Annual Scientific Meeting of the  
Japanese Heart Failure Society, Saitama,  
2013.11.28Tadamitsu Nakashima, Tomoko Ohkusa,  
Masaaki Yoshida, Jong-Kook Lee, Yoichi  
Mizukami, Masafumi Yano「Cardiac -catenin  
Alterations Play an Important Role in Gap  
Junction Remodeling of Cardiomyocytes Exposed  
to Rapid Electrical Stimulation」J Card Fail  
19(10)[Suppl 1] : 166

第 91 回日本生理学会大会, 鹿児島, 2014.3.16  
本荘晴朗, 大草知子, 児玉逸雄, 神谷香一郎「コ  
ネキシン発現異常と不整脈」

The 78th Annual scientific Meeting of the  
Japanese Circulation Society, Tokyo,  
2014.3.21Tadamitsu Nakashima, Tomoko Ohkusa,  
Jong-kook Lee, Masafumi Yano「Wnt/ -catenin  
Pathway Plays an Important Role in  
Cx43-dependent Arrhythmogenesis in  
Cardiomyocytes Exposed Rapid Electrical  
Stimulation」Circ J 78[Suppl ] : 1336

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

大草 知子 (OHKUSA, Tomoko )

九州大学 大学病院 学術研究員

研究者番号 : 00294629