

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

中島 唯光

山口大学大学院医学系研究科 応用医工学系専攻
器官制御医科学領域 器官病態内科学分野

平成 26 年 7 月

目次

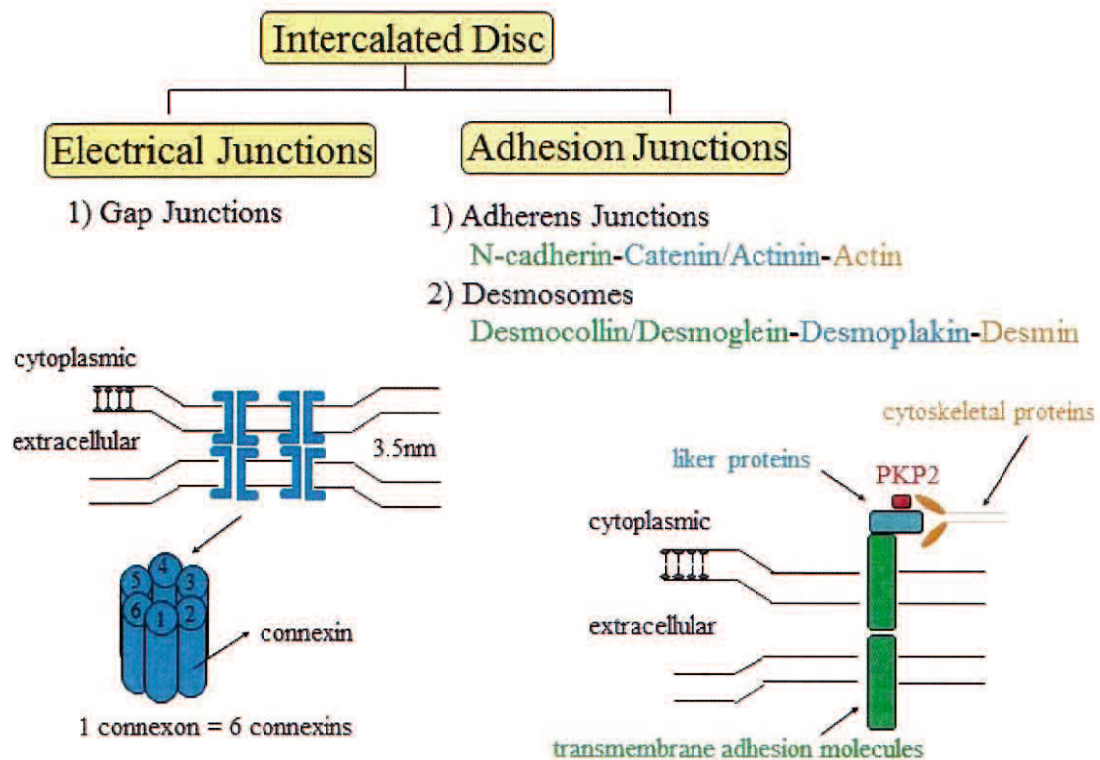
1. 要旨3
2. 緒言4
3. 方法6
3.1 細胞培養6
3.2 高頻度電気刺激負荷 (RES)7
3.3 免疫組織化学的検査及び免疫プロット法7
3.4 リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いた Cx43 mRNA の解析8
3.5 興奮伝播の細胞外電位マッピング9
3.6 統計解析9
4. 結果10
4.1 Cx43 の発現に対する RES の影響10
4.2 β カテニンの発現に対する RES の影響12
4.3 核内 β カテニン発現量に対する RES の影響14
4.4 興奮の伝播に対する RES の影響15
4.5 グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 β (GSK3 β) に対する RES の影響17
4.6 オルメサルタン、MAPK 阻害剤添加時の RES による β カテニン/Cx43 の上方調節と p-GSK-3 β 発現量増加の阻害18
5. 考察19
5.1 介在板リモデリングと催不整脈性19
5.2 RES 負荷による β カテニン発現量と Cx43 ギャップ結合 (GJ) リモデリングの変化21
5.3 アンジオテンシン II 受容体拮抗薬のオルメサルタンが β カテニン発現に及ぼす影響23
5.4 本研究の限界23
6. 結語24
7. 謝辞・開示24
8. 参考文献25

1. 要旨

心筋細胞間結合部には adhesion junction (AJ) と connexin (Cx) ギャップ結合 (GJ) の2つの複合体が含まれている。GJは細胞間の電流の経路である。AJは細胞間の正常な機械的結合を仲介し、さらにGJの安定性に重要な役割を果たしている。我々は心筋細胞間結合、特に β カテニンとCx43の変化に対する高頻度電気刺激 (RES) の影響を調べた。また、アンジオテンシンII受容体の阻害が細胞間結合リモデリングに与える影響についても検討した。新生仔ラットを断頭して安楽死させ、心筋細胞を培養し、RESを負荷した。リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、免疫組織化学的検査及び免疫ブロット法を用いた。培養心筋細胞の興奮伝播特性は細胞外電位マッピングシステムを用いて検討した。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 β カテニン発現量は30分後に有意に増加した。核内 β 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 β (GSK3 β) 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 β 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、 β カテニンの分解を阻害するが、我々は、リン酸化GSK3 β 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。 β カテニンの変化はCx43GJ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、 β 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。

2. 緒言

心筋細胞は細胞間結合、いわゆる介在板 (ID) を介して互いに接続している。ID には異なる結合複合体、すなわち adhesion junction (AJ) (adherens junction とデスモゾーム) 及びギャップ結合 (GJ) が含まれている。心臓の GJ は細胞間の電流の経路となり、活動電位の伝播と収縮の協調を可能にしている。ギャップ結合チャンネルは connexin (Cxs) から構成されている。AJ (adherens junction とデスモゾーム) は細胞骨格のアクチンとデスミンフィラメントそれぞれに結合することで、ID での細胞間の機械的カップリングの調節に重要な役割を果たしている。adherens junction では、N-カドヘリンとその細胞質結合蛋白 (カテニン又はプラコグロビン) が認められる。デスモゾームはデスモグレインとデスモコリンから構成され、これらはリンカー蛋白であるプラコグロビンとブラコフィリン (PKP) と相互作用している。adherens junction は ID での機械的結合の維持に重大な役割を果たしているだけでなく、ラット培養心筋細胞では GJ の形成とアセンブリにも重要な役割を果たしている (12,18,33)。最近我々は、AJ 蛋白の変化が Cx43 GJ の変化に先行し、また心不全の発生中は、ID リモデリングが不整脈源性に寄与している可能性があることを報告した (31)。さらに、心筋デスモゾームの蛋白の突然変異により、心突然死を伴う遺伝性疾患である不整脈源性右室心筋症 (ARVC) に至ることが報告されている (27)。また、家族性 ARVC に関連する突然変異は、デスモゾーム蛋白 PKP2 をコードする遺伝子内で生じていることも報告されている (30)。しかし、病的状態下での心筋細胞の GJ と AJ の関係、特に心筋細胞の高頻度刺激、いわゆる頻脈状態での関係は完全には理解されていない。



図に介在板の構造を示した。心筋細胞は介在板により隣接する細胞と結合しており、電気的な結合で細胞間電流の経路となり、活動電位の伝播および心筋細胞の収縮を可能にする **Electrical junction** と機械的結合を担う **Adhesion junction** から構成される。前者は **connexin** からなるギャップ結合がその役目を果たしており、**Adhesion junction** は **Adherens junction** と **Desmosomes** の2つの構造からなるが、両者とも **transmembrane adhesion molecule** に **linker protein** が結合し、それが細胞骨格に結合するという共通構造をとっている。

本研究は、「心拍数の急激な増加により生じる時間単位あたりの単収縮の増加が、細胞間結合蛋白に影響すると予測される」という仮説を検証するようデザインされた。我々は、新生仔ラットの培養心筋細胞を用い、高頻度電気刺激 (RES) により生じる細胞間結合リモデリング (特に AJ の構成蛋白の1つである β カテニン) と Cx43 の変化を調べた。さらに、アンジオテンシン II タイプ 1 受容体阻害剤であるオルメサルタンが細胞間結合リモデリングに与える影響を検討した。これは、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の調節による致死性不整脈に対するアップストリーム治療薬であることが知られている。我々は、

その特性から RES が負荷された in vitro の心筋細胞モデルを使用した。以前我々は、この in vitro 高頻度ペーシングモデルを用いて、Cx43 の顕著な上方調節が、主にアンジオテンシン II のオートクリン作用の上方調節を介して、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) を活性化することを明らかにした (14)。本研究で我々は、心筋細胞の細胞間結合蛋白発現量の時期依存性変化に対する RES の影響を調べた。この結果から、AJ 蛋白である β 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 の形成に重要な役割を果たしている可能性が明らかにされた。オルメサルタンは、 β カテニンシグナル伝達経路を介して AJ と GJ の両方のリモデリングを調節することで、不整脈のアップストリーム治療薬になり得る可能性が示された。

3. 方法

動物はいずれも山口大学動物実験委員会のガイドラインに準じて扱った。本研究は国立衛生研究所が発表した「実験動物の管理と使用に関する指針」(NIH Publication No.85-23, 1996 改訂) に従った。

3.1 細胞培養

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 (14)。酵素的に解離した筋細胞を培養皿に 3×10^5 cells/cm² の濃度で播種し、5%胎児ウシ血清を添加した Leibovitz L-15 培地 (Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ) 中で 37°C で培養した。細胞はランダムな配向 (isotropic growth) で増殖して集密的な層を形成し、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。

3.2 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、その極間距離は 6.5 cm (ID 蛋白発現量の解析実験の場合) 又は 0.5 cm (興奮伝播の細胞外電位マッピングの実験の場合) とした (14)。刺激強度は同時収縮閾値の 1.3 倍に調節した。酸素種を除去するアスコルビン酸 (250 $\mu\text{mol/L}$) を培地に添加した (14)。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) および MAPK の特異的阻害剤 [SB203580 (10 $\mu\text{mol/L}$) および PD98059 (50 $\mu\text{mol/L}$)] (Promega, Madison, WI) を使用した。上記薬剤を RES 開始 30 分前に培地に添加した。

3.3 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染色のため、ウサギ抗 Cx43 抗体 (1 : 100) (Sigma, St. Louis, MO) とマウス抗 β カテニン抗体 (1 : 100) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いた。核の検出のため、DAPI 二塩酸塩 (1 : 100) (Calbiochem, San Diego, CA) を用いた。透過処理 (0.1% トライトン X-100) し、クエンチングとブロッキング (10% ヤギ血清) の後、サンプルと抗体を一晩室温で安置した。一次抗体結合したこれらの抗体を、FITC 結合抗ウサギ IgG (1 : 200) (Millipore, Billerica, MA) と FITC 結合抗マウス IgG (1 : 500) (Millipore, Billerica, MA) により可視化し、共焦点顕微鏡 (LSM510, Zeiss, Germany) を用いて検討した。一次抗体で処理しなかったサンプルを陰性対照とした。これらの免疫応答シグナルの比率は、高シグナル強度 (最高値の >90%) のピクセル数を、心筋細胞が占める全体のピクセル数で除したものと定義した (32)。様々なフィールドの 10 回の測定値を平均化し、各培養スラ

イドについて1つの数値を算出した。

既報の通り収集した細胞を溶解し、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した(14)。核分画を NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) を用いて既報の通りに調製した(20)。以下の一次抗体を使用した。ウサギ抗 Cx43 抗体 (1 : 50,000) (SIGMA, St. Louis, MO)、マウス抗 β カテニン抗体 (1 : 50,000) (Invitrogen, Carlsbad, CA)、マウス抗 GAPDH 抗体 (1 : 1000) (SIGMA, St. Louis, MO)、マウス抗ヒストン H1 抗体 (1 : 1000) (Leinco Technologies Inc., St. Louis, MO)、ウサギ抗 GSK3 β 抗体 (1 : 1000)、及び phospho-GSK3 β (Ser9) 抗体 (1 : 1000) (Cell Signaling, Beverly, MA)。また二次抗体には以下のものを使用した。抗ウサギ IgG HRP 結合抗体 (1 : 1000) (Promega, Madison, WI)、抗マウス IgG HRP 結合抗体 (1 : 1000) (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)。抗体により認識された蛋白量を ECLTM Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Buckingham, UK) 及び SuperSignalTM West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, Rockford, Ill) により定量化した。Cx43 量は内因性グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の数値で補正した。1つの対照ディッシュで培養された心筋の数値を 1 とし、すべてのデータはこれに対して補正した。

3.4 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)₁₅ 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。Cx43 と GAPDH の増幅には以下のプライマーを用いた。Cx43

のセンスプライマー：5'-CTG GTG ACA GAA ACA ATTC C-3'、Cx43 のアンチセンスプライマー：5'-GTC GTC GGG GAA ATC GAA CG-3'。GAPDH のセンスプライマー：5'-TGA TGG GTG TGA ACC ACG AG-3'、GAPDH のアンチセンスプライマー：5'-GCC CTT CCA CGA TGC CAA AG-3'。この相対定量値は comparative Ct ($2^{-\Delta C_t - C_c}$) 法で表し、Cx43 の定量値を外因性 GAPDH の数値に対して補正した。

3.5 興奮伝播の細胞外電位マッピング

培養心室筋細胞の興奮伝播特性を、多点平面電極システム (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 (14)。これは、64 個の平面微小電極 (電極サイズ 50 μm x 50 μm) が電極間距離 450 μm で 8x8 にパターンニングされたもので、培養心筋細胞の下におかれ、3150 x 3150 μm のエリアをカバーした。4つの離れた電極を共通のリファレンス電極として、全 64 個の単極信号を同時に記録し、高ゲイン (60 dB) と低周波 (1.0~100 Hz) フィルター設定で増幅した。RES 負荷の前後に記録アレイの 2 本の側面電極から 3.0 Hz で一定刺激を加え、観察エリア内の興奮の一方向伝播を誘発した。刺激は 0.2 ms 間隔の二相パルスを採用し、その強度は 100~200 μA (拡張期閾値の 1.3 倍) とした。各記録部位の興奮時間は、鋭い陰性波により特定した。中心線に沿った左から右への伝導速度を、刺激部位からの距離に対して興奮時間をプロットして測定した (図 6)。

3.6 統計解析

データはいずれも平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表示した。予め規定した実験群間の連続分布変数の差を、SPSSソフトウェア (SPSS Inc., Chicago, Ill) を用いて一元配置分散分析とその

後のDunnettの多重比較検定により分析した。実験デザインは反復測定としてモデル化しなかった。P<0.05のとき差を有意とみなした。

4. 結果

4.1 Cx43 の発現に対する RES の影響

培養心筋細胞の HE 染色像と Cx43/ラミニン免疫標識の共焦点画像を示した (図 1A)。
Cx43 を含むギャップ結合は、隣接細胞の接合部で細胞周囲に沿った明るい点状の蛍光領域の集合体として視覚化された。60 分間の RES 負荷後、Cx43 の免疫応答シグナルが均一に増強したが、その分布パターンに影響はなかった。定量分析から、RES によって Cx43 陽性面積が有意に拡大したことが明らかになった(60 分後に $1.4 \pm 0.2\%$, $n=9$, 0 分に対して $p<0.01$) (図 1B)。

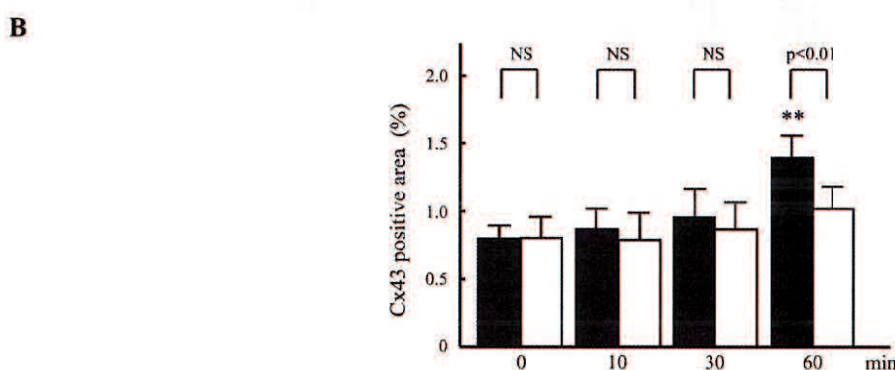
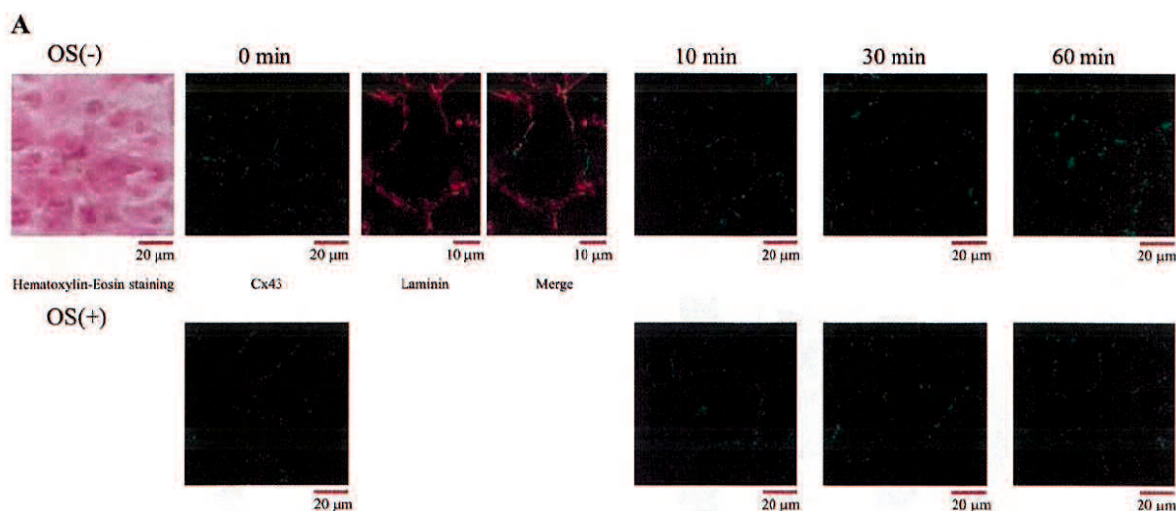


図 1：培養心筋細胞の Cx43 免疫標識の共焦点画像。A：代表的な培養心筋細胞の HE 染色像と Cx43 の代表的な免疫蛍光像。それぞれ Cx43 の免疫蛍光像（緑）を示し、0 min に関しては、抗ラミニン抗体を用いた基底膜の免疫蛍光像（赤）および Cx43 と重ね合わせた像を提示した。B：細胞総面積に対して Cx43 免疫応答シグナルが占有する割合（平均値±SD、n=9）。黒棒：オルメサルタン (OS) なし、白棒：オルメサルタン (OS) あり、**0 分（ベースライン）に対して p<0.01。

Cx43 mRNA の発現量も、60 分間以下の RES によって有意に増加した (1.2±0.1 倍、n=9、0 分に対して p<0.01) (図 2A)。免疫ブロット (図 2B) では、Cx43 抗体は 40~43 kDa の間に存在する特異的な 3 つのバンドを認識した。Cx43 蛋白量は RES により徐々に増加し、60 分でその変化は統計的有意に達した (1.5±0.3 倍、n=9、0 分に対して p<0.01)。

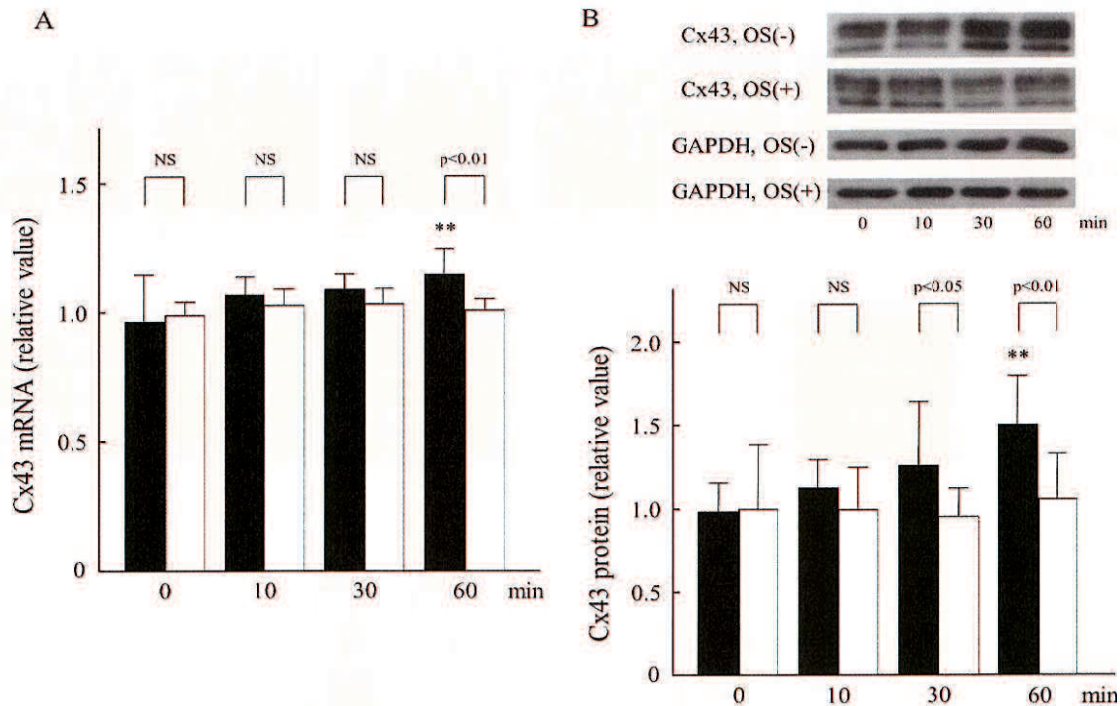


図 2 : RES 負荷をかけた心筋細胞の Cx43 mRNA 及び蛋白レベルの定量分析。A : リアルタイム PCR により推定した Cx43 mRNA レベル。Cx43 mRNA 量は GAPDH に対して補正した (平均値 \pm SD、n=9)。黒棒 : オルメサルタン (OS) なし、白棒 : オルメサルタン (OS) あり、**0 分 (ベースライン) に対して p<0.01。B : ウェスタン解析で推定した Cx43 蛋白レベル。上図は代表的なデータ。Cx43 量は GAPDH に対して補正した (平均値 \pm SD、n=9)。黒棒 : オルメサルタン (OS) なし、白棒 : オルメサルタン (OS) あり、**0 分 (ベースライン) に対して p<0.01。

4.2 β カテニンの発現に対する RES の影響

β カテニン免疫標識の共焦点画像を示した (図 3A、3B、3C)。60 分間の RES 負荷後に β カテニンの免疫応答シグナルが細胞表面上で均一に増強した。興味深いことに、核内 β カテニン発現量は RES 負荷により 10 分後までに増加がみられた。定量分析から、RES によって細胞表面の β カテニン陽性面積の有意な増加が明らかにされた。(30 分後に $2.7\pm 0.6\%$ 、60 分で $2.9\pm 0.9\%$ 。n=9、0 分に対して p<0.01) (図 3D)。

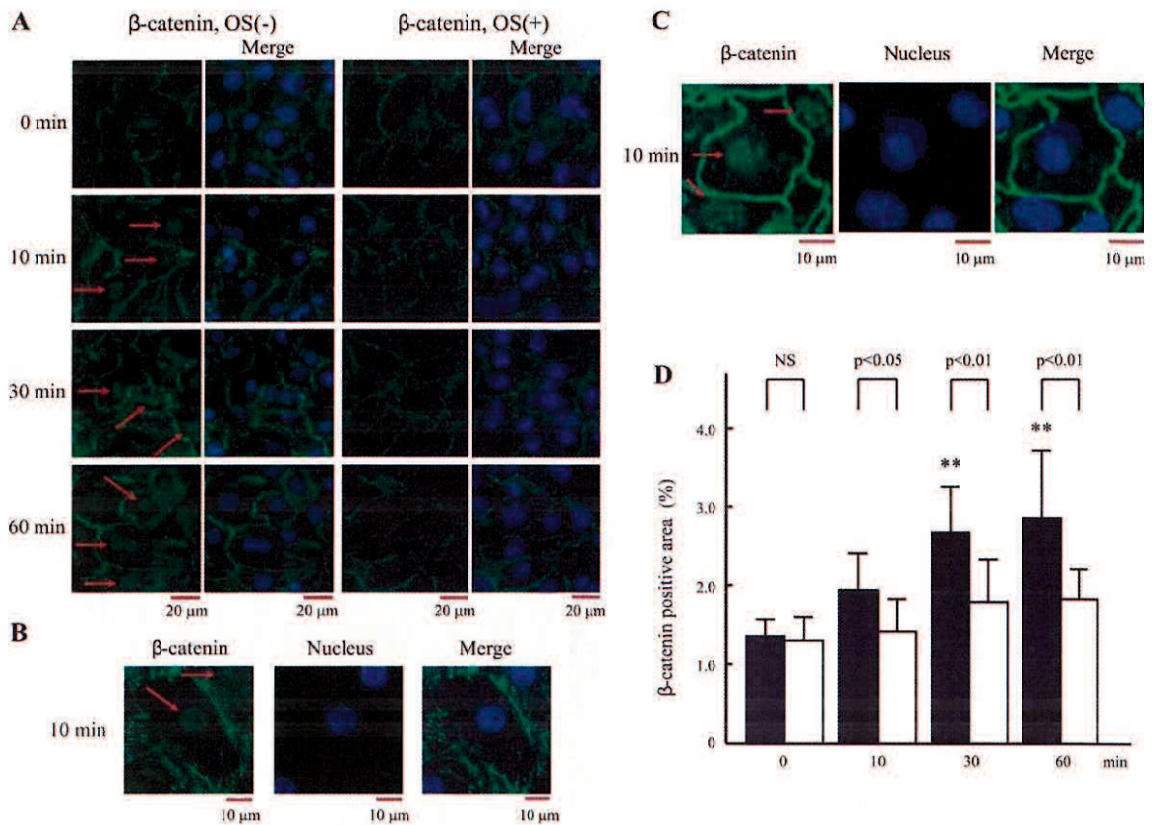


図3：培養心筋細胞の β カテニン免疫標識の共焦点画像 A：RES 負荷前（0分）と負荷後の、オルメサルタン（OS）添加時と非添加時の β カテニンの代表的な免疫蛍光像。赤い矢印は核を示す。 β カテニンの免疫蛍光像（緑）を核の免疫蛍光像（青）と重ね合わせた像も提示した。B：RES 負荷 10 min 後の β カテニンの免疫蛍光像（緑）と核の免疫蛍光像（青）およびそれらを重ね合わせた像をそれぞれ拡大したものを示す。C：3D イメージングを用いた代表的な核の体積画像。D：細胞総面積に対して β カテニン免疫応答シグナルが占有する割合（平均値 \pm SD、n=9）。黒棒：オルメサルタン（OS）なし、白棒：オルメサルタン（OS）あり、**0分（ベースライン）に対して p<0.01。

細胞分画全体の β カテニン蛋白量は30分のRES負荷後とその後に有意に増加した（30分で 1.5 ± 0.3 倍、60分で 1.5 ± 0.3 倍。n=9、0分に対して p<0.05）（図4）。

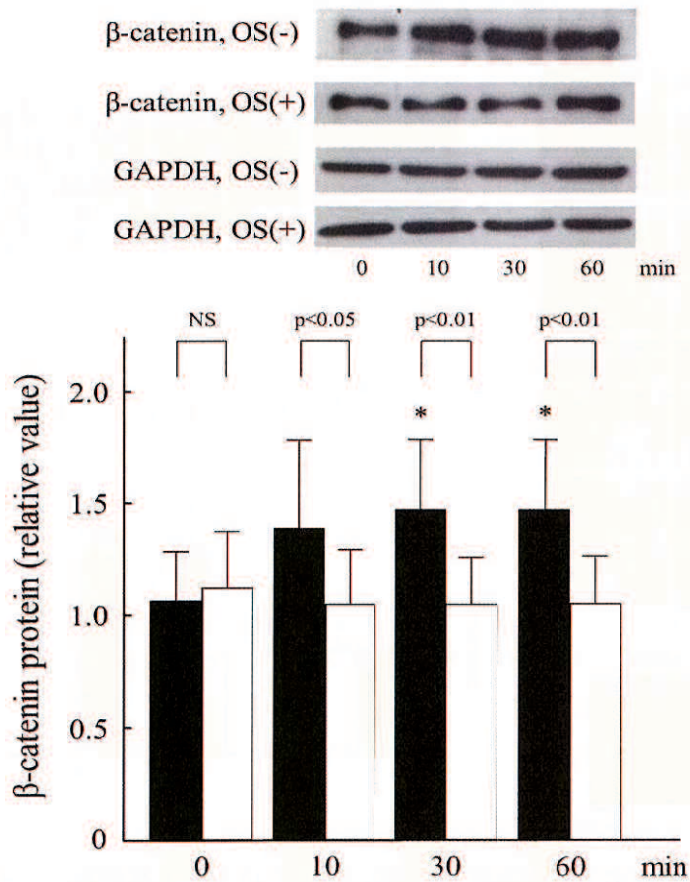


図 4 : RES に曝された心筋細胞の細胞分画全体に対する β カテニン蛋白レベルの定量分析。上図は代表的なデータ。 β カテニン量は GAPDH に対して補正した (平均値 \pm SD、 $n=9$)。黒棒 : オルメサルタン (OS) なし、白棒 : オルメサルタン (OS) あり、*0 分 (ベースライン) に対して $p<0.05$ 。

4.3 核内 β カテニン発現量に対する RES の影響

心筋細胞における β カテニン発現量の上方調節を明らかにするため、核分画の β カテニン発現量を調べた。核内の β カテニンは TCF/LEF 転写活性化因子として働き、また Cx43 は TCF/LEF 標的遺伝子の 1 つとして知られている。興味深いことに、核内 β カテニン発現量は 10 分間の RES とそれ以降にベースラインに比べ著しく増加した (10 分後に 1.4 ± 0.2 倍、 $n=9$ 、0 分に対して $p<0.05$) (図 5B)。

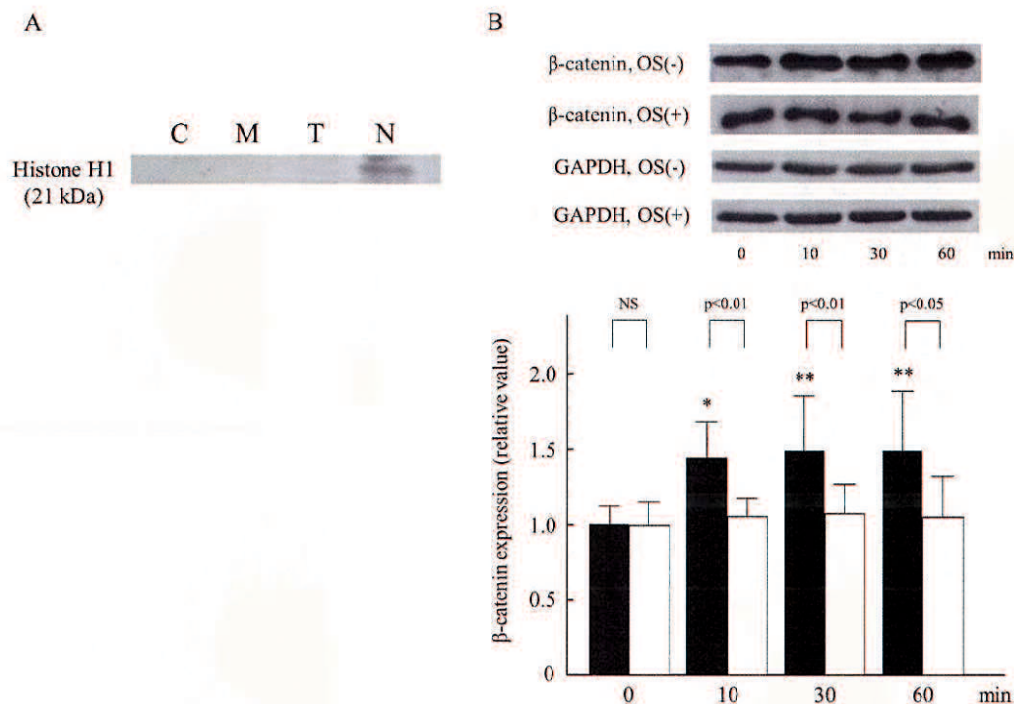


図 5 : RES に曝された心筋細胞の核内 β カテニン蛋白レベルの定量分析。A : 心筋細胞の様々な蛋白分画における抗ヒスタミン H1 抗体(核分画の特異的のマーカとして使用される)の局在化。様々な蛋白分画 (30 $\mu\text{g}/\text{lane}$) を免疫ブロット法に供した。核分画で強いシグナルを観察した。C : 細胞質、M : 全膜分画、T : 全分画、N : 核分画。B : 核内 β カテニン蛋白レベルの定量分析。上図は代表的なデータ。 β カテニン量は GAPDH に対して補正した (平均値 \pm SD、 $n=9$)。黒棒 : オルメサルタン (OS) なし、白棒 : オルメサルタン (OS) あり、*0 分 (ベースライン) に対して $p<0.05$ 、**0 分 (ベースライン) に対して $p<0.01$ 。

4.4 興奮の伝播に対する RES の影響

多電極細胞外電位マッピングを用いて RES により誘発される Cx43 上方調節の機能的変化の検討を行った。64 個の電極の大半 (>90%) で、陽性波に続く陰性波を認める明らかな局所電位図が記録された (図 6A)。興奮時間の等時線図から、左から右へのほぼ均一な興奮の伝播が RES 前 (コントロール、図 6B) と 60 分間の RES 後 (図 6C) に示された。各記録部位での RES 後の興奮時間は、コントロールに比べてはるかに短くなっており、RES が伝導の加速を誘発したことが示唆された。

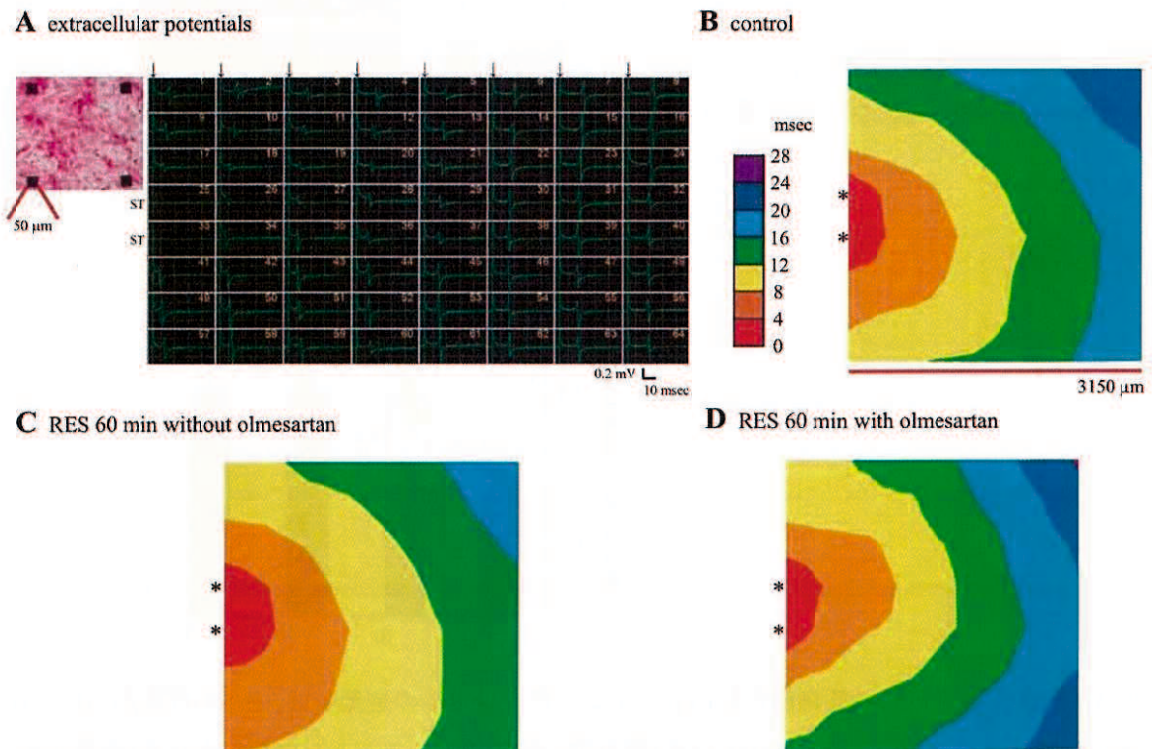


図 6: 興奮伝播中の多電極細胞外電位マッピング。A: 64 個の端子から記録された代表的電位図。矢印: 刺激アーチファクト、ST: 刺激点。B,C: オルメサルタン非存在下での、60 分間の RES 負荷前 (コントロール) と負荷後の培養皿内の興奮時間の等時線図。D: オルメサルタン (OS) 100 nmol/L 存在下での、60 分間の RES 負荷後の別の培養皿内の興奮時間の等時線図。
*: 刺激点。

次に伝導速度の測定結果を示す (図 7)。オルメサルタン非添加時には、RES 負荷後 60 分での伝導速度の数値 (25.7 ± 4.0 cm/sec, $n=6$) はコントロールに比べ有意に高値であった (19.1 ± 4.0 cm/sec, $n=6$, $p < 0.05$)。オルメサルタン添加時には、RES 負荷は伝導速度に影響せず、RES 負荷後 60 分での数値 (19.0 ± 1.7 cm/sec, $n=5$) はコントロールと同程度であった (18.5 ± 2.4 cm/sec, $n=5$)。

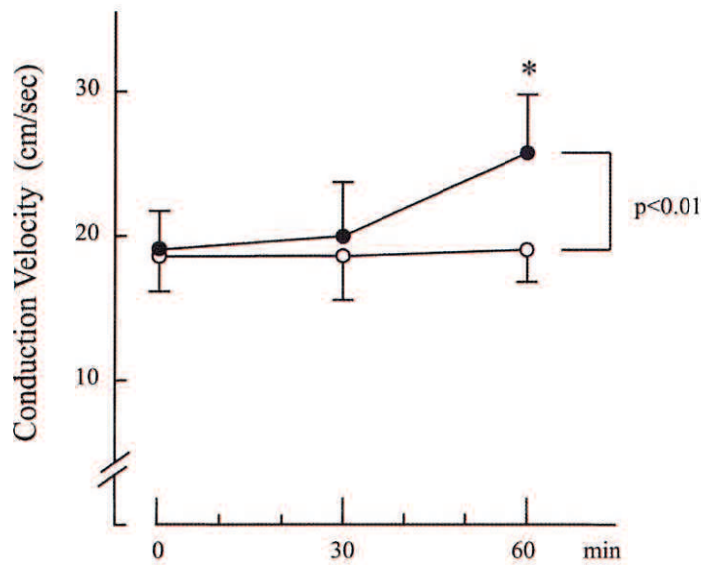


図 7：伝導速度に対する RES の影響。RES の 0 分後、30 分後、及び 60 分後に、観察領域の中心線に沿って左から右への伝導速度を測定した。オルメサルタン (OS) 100 nmol/L の非存在下 (●、n=6) と存在下 (○、n=5) で得られた数値を、RES 開始後の時間に対してプロットした。
*0 分 (ベースライン) に対して $p<0.05$ 。

4.5 グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3β (GSK3β) に対する RES の影響

次に我々は、Wnt/β カテニンシグナル伝達経路を介して Cx43 発現を調節している GSK3β を検討した。GSK3β は活性化 MAPK によりリン酸化され、β カテニンの分解を阻害することが知られている (13)。また我々は、MAPK の ERK と p38 MAPK が RES により活性化されることも報告している (14)。RES に応答して GSK3β 全体の変化はなかったが、GSK3β のリン酸化型 (p-GSK3β) は 10 分という速さで有意な増加を示した (2.0 ± 0.4 倍、n=9、0 分に対して $p<0.01$) (図 8A)。これらの結果は、RES 負荷により p-GSK3β が MAPK 活性化を介して増加する可能性を示唆している。

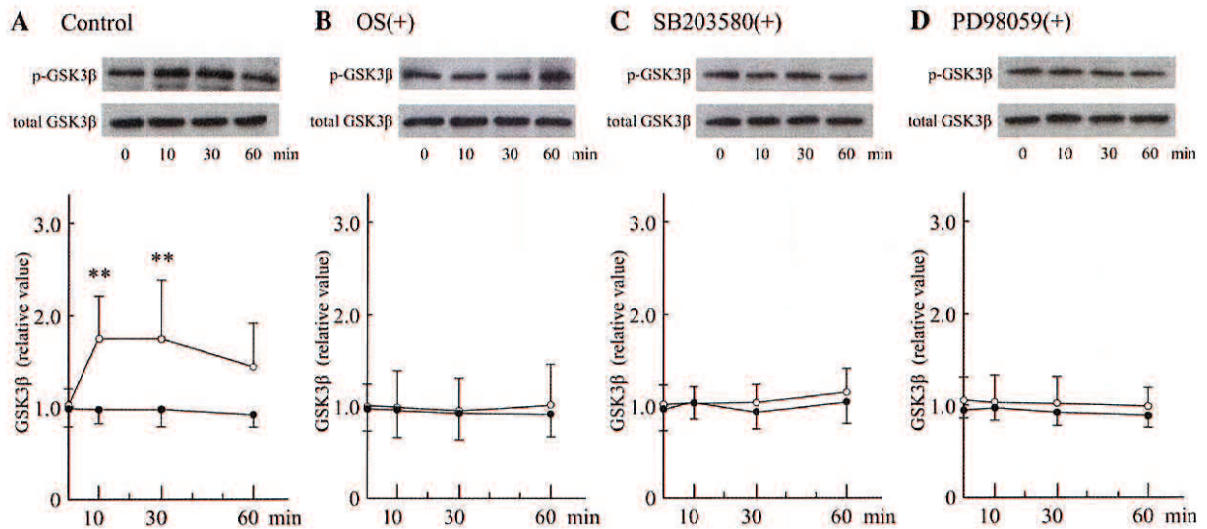


図 8: A: RES に対する GSK3 β 全体とリン酸化 GSK3 β (p-GSK3 β) の変化。B: RES 誘発性 p-GSK3 β 活性化のオルメサルタン (OS) による抑制。数値は GAPDH に対して補正した (平均値 \pm SD、n=9)。○ : p-GSK3 β 、● : GSK3 β 全体、**0 分 (ベースライン) に対して p<0.01。

4.6 オルメサルタン、MAPK 阻害剤添加時の RES による β カテニン/Cx43 の上方調節と p-GSK-3 β 発現量増加の阻害

β カテニンの上方調節が、RES 誘発性に MAPK が活性化されることでリン酸化 GSK3 β により分解が阻害される結果であるとしたら、RES 誘発性の GSK3 β リン酸化と β カテニン/Cx43 の上方調節は、アンジオテンシン II タイプ 1 受容体の薬理的阻害によって阻止されるはずである。図 1~5 に示す通り、ベースラインの Cx43 と β カテニンレベルは、心筋細胞のオルメサルタン処理により影響を受けなかった (100 nmol/L)。免疫組織化学染色では、オルメサルタン存在下で 60 分間 RES 負荷したとき、Cx43 及び β カテニン陽性面積に有意な変化は生じなかった (図 1、図 3)。オルメサルタン存在下での 60 分間の RES 負荷は、細胞分画全体及び核分画の両方における Cx43 mRNA (図 2A)、Cx43 蛋白 (図 2B) 及び β カテニン発現量を有意に増加させた (図 4、図 5B)。さらに RES を 60 分間負荷した心筋細胞では、伝導速度の上昇がオルメサルタンにより減弱した (図 6D、図 7)。興味深いことに、

10 分間の RES 負荷に対する p-GSK3 β の応答は、オルメサルタンによって消失した (図 8B)。以上の結果は、RES 誘発性の β カテニン/Cx43 の上方調節と p-GSK3 β 増加は、アンジオテンシン II タイプ 1 受容体阻害剤であるオルメサルタンにより効果的に阻害されることを示唆している。

5. 考察

本研究の新たな知見は、RES が心筋細胞間蛋白の変化を惹起すること、ならびに心筋細胞の β カテニンの変化がギャップ結合 (GJ) のリモデリングに先行することである。アンジオテンシン II タイプ 1 受容体の阻害は、Wnt/ β カテニンシグナル伝達経路の一部を介した細胞間結合リモデリングの調節に重要な役割を果たしていると考えられる。核内 β カテニンの増加は Cx43 GJ リモデリングに先行し、催不整脈性を増強する可能性がある。アンジオテンシン II タイプ 1 受容体阻害剤のオルメサルタンは細胞間結合蛋白リモデリングに影響し、RES 負荷を受けた心筋細胞の電気生理学的特性を変化させている可能性がある。

5.1 介在板リモデリングと催不整脈性

心筋細胞介在板を介した電氣的結合の変化は、病的心の催不整脈性に重大な役割を果たしている (2)。幾つかの病的心筋では adhesion junction (AJ; adherens junction とデスモゾーム) を介した機械的結合の異常が生じ (10,15,25,29)、AJ リモデリングは不整脈基質の重要な因子のひとつである。培養心筋細胞における GJ と AJ に関する幾つかの研究から、介在板においては細胞の AJ の形成に GJ が必ずしも必要でないことが報告されている (3,7,18)。さらに Gutstein らは、AJ と心筋細胞介在板の関連蛋白の構築に GJ が必要でないことも報告している (9)。その一方で、培養心筋細胞における GJ の形成と集合に AJ が重要な役割を

果たすことはよく知られている (12,18,33)。しかし、心筋細胞の GJ と AJ の関係、特に病的状態下での関係は完全には理解されていない。

AJ と GJ との間に分子間クロストークがあることを示唆する報告が数本ある。一部の研究者は、細胞結合の完全性を維持することの重要性を報告している。McKoy らは、プラコグロビン遺伝子の変異によって不整脈原性右室心筋症 (ARVC) に至ることを明らかにしている (22)。Oxford らは PKP2 発現量の低下により Cx43 が減少し、心筋細胞間の dye-coupling が減少すると報告している (24)。さらに、心臓疾患においてカドヘリン-カテニン複合体が不安定化することにより、ギャップ結合が不安定化し不整脈基質の形成の原因となりうるという報告もある (17,19)。これらの報告に基づくと、AJ は GJ の調節に重要な役割を果たしている。

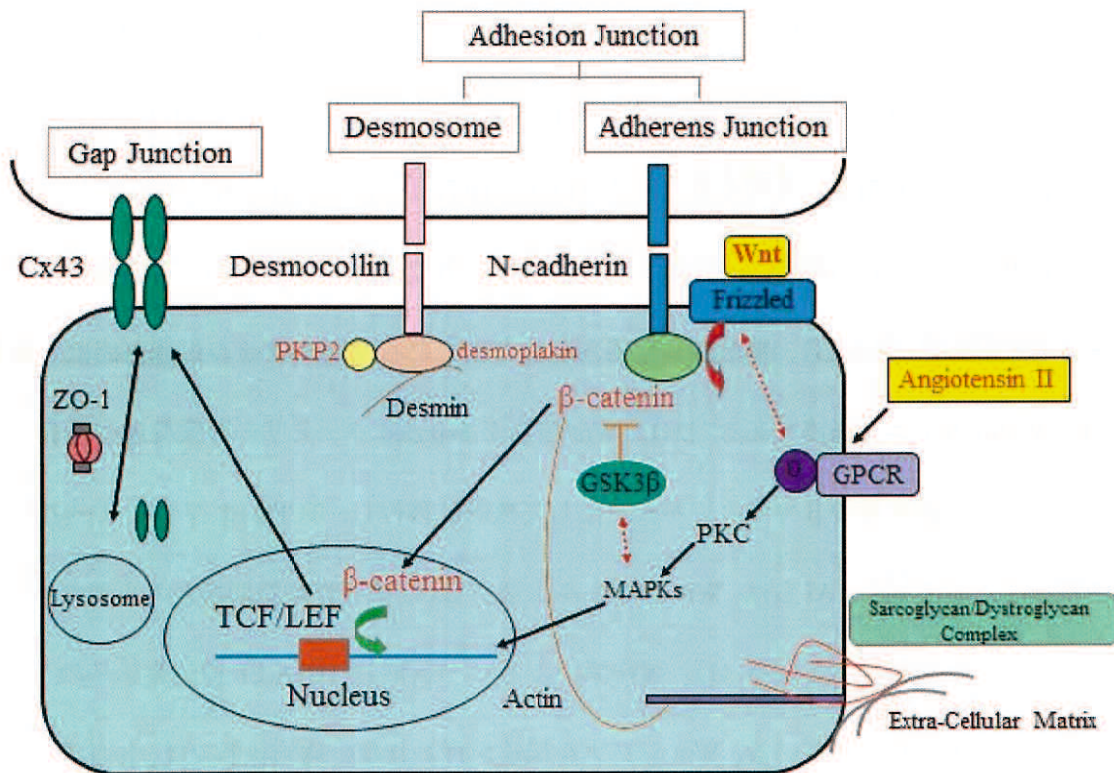
我々はこれまで、心筋細胞介在板の変化による致死性心室性不整脈のメカニズムを明らかにしている (31)。UM-X7.1 心筋症ハムスターモデルを用いた我々の研究から、 β カテニン AJ 蛋白の変化が Cx43 GJ の変化に先行すること、心不全の発生時には介在板リモデリングが心室性不整脈発生に寄与するらしいこと、またアンジオテンシン II タイプ 1 受容体阻害剤が介在板リモデリングを調節することで致死性不整脈に対する新たなアップストリーム治療薬となり得ることを明らかにしている (31)。さらに我々は、培養心筋細胞を用いた *in vitro* の実験で、短時間の RES により主にアンジオテンシン II の自己分泌作用が ERK と p38 MAPKs を活性化させることにより、心筋細胞内の Cx43 アップレギュレーションが惹起されることも報告している (14)。我々のこれまでの報告に基づき、本研究で我々は、RES に曝された心筋細胞中で β カテニンと Cx43 蛋白の発現量が経時的に変化するかを中心に検討した。興味深いことに、 β カテニン発現量は Cx43 発現量の増加に先行して有意に増加していた。これらの結果は、 β カテニンの増加が Cx43 GJ リモデリングに先行し、それにより

短時間 RES に曝された心筋細胞では不整脈基質が形成される可能性を示唆している。このような β カテニンの先行は、UM-X7.1 心筋症ハムスターモデルにおける介在板リモデリングを報告した我々の過去の研究とも一致している。我々の研究結果、並びに従来報告に基づき (22,24,27,30,31)、 β カテニンは GJ の形成と維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

5.2 RES 負荷による β カテニン発現量と Cx43 ギャップ結合 (GJ) リモデリングの変化

カドヘリン/カテニン複合体は機械的調節のみならず、細胞外シグナルに応答するシグナル伝達経路でも重要な役割を果たすことはよく知られている (4)。特に β カテニンは、カドヘリンとの結合の接着のプロセスに貢献する一方で、Wnt/Wingless シグナル伝達カスケードにも関わる (5,6,23)。特徴が最も明らかにされている Wnt シグナル伝達経路は、標準的な Wnt/ β カテニン経路である (21)。Wnt 蛋白が Frizzled ファミリーの膜貫通型受容体に結合すると、細胞質の β カテニンが安定化して核内に移行し、TCF/LEF ファミリーの転写活性因子として働く。Ai らは、Wnt シグナル伝達が Cx43 依存性細胞間結合の重要な修飾因子であることを報告している (1)。興味深いことに、Cx43 は TCF/LEF 標的遺伝子の 1 つであることがよく知られている。Wnt シグナル伝達が行われない病的状態では、 β カテニンがユビキチン化され、プロテオーム内で GSK-3 β により分解される (13,16)。GSK-3 β は蛋白合成の負の調節因子であり、Wnt/ β カテニン経路のダウンレギュレーションを起こす (11)。興味深いことに、我々の実験では、Cx43 の TCF/LEF 転写活性因子として働く核内 β カテニンの発現量が 10 分間の RES により劇的に増加し、それにより心筋細胞内の Cx43 のアップレギュレーションが惹起された。これまでに我々は、心不全発現過程では TCF/LEF DNA- β カテニン複合体が減少し、その結果、Cx43 mRNA・蛋白が減少し、致死性不整脈が発生し

維持されることを報告している (26,31)。さらに、TCF/LEF 転写因子を介する β カテニン依存性転写の低下が、デスモプラキンの欠損により生じる ARVC の分子機構であることが示唆されている (8)。 β カテニン依存性の転写促進に Cx43 プロモーターが反応することから、心筋細胞の核内 β カテニン発現の減少が Cx43 遺伝子発現に影響を与える可能性が示唆される。これらの結果は、AJ 及び GJ リモデリングが少なくとも一部においては、重要な不整脈基質であることを意味している。



図に細胞間結合構成蛋白の模式図を示す。 β カテニンは Adherens Junction の構成蛋白であるだけでなく、Wnt signal にて安定化し、GSK3 β の調節を受けながら核内で TCF/LEF 転写因子と結合し、活性化するという Wnt/ β カテニン経路を介して Wnt 標的分子の合成を担う。興味深いことに Cx43 は TCF/LEF 転写因子の標的遺伝子であることが知られている。その一方で、高頻度電気刺激等で増加したアンジオテンシン II が G protein 受容体に作用し、MAPK 系を介して標的分子の合成を行う経路も存在し、この MAPK 系と GSK3 β とでクロストークが存在するという報告もある。

5.3 アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬であるオルメサルタンがβカテニン発現量に及ぼす影響

本研究ではオルメサルタンが培養心筋細胞において細胞間結合リモデリングを改善し、RES 負荷によるβカテニンとCx43のアップレギュレーションを減弱し、GSK3βのリン酸化を阻害し、伝導速度を低下させた。今回、オルメサルタンによる核内βカテニン発現量を制御するメカニズムを確立することはできなかったが、予想されるRES負荷によるβカテニンのアップレギュレーションを減弱するメカニズムについて考察する。

これまでに我々は、短時間のRESにより主にアンジオテンシンⅡの自己分泌作用がERKとp38 MAPKsを活性化させることにより、心筋細胞内のCx43アップレギュレーションが惹起されることを報告している(14)。さらに、βカテニンの分解は活性化されたGSK3βにより負の方向に調節される(13,16)。興味深いことに、GSK3βはp38 MAPKによりリン酸化され、このリン酸化によりGSK3βが不活化し(28)、結果的に蛋白分解が阻害され蛋白合成/発現が増大すること(肥大など)が報告されている(11)。活性化されたp38 MAPKがGSK-3βをリン酸化しβカテニンの分解を阻害した場合、TCF/LEF転写因子が活性化されてCx43のmRNAと蛋白発現量を増加させる。その際、アンジオテンシンⅡ受容体阻害剤であるオルメサルタンは、MAPKによるGSK-3βのリン酸化を減少させ、βカテニンの分解を亢進し、結果的にCx43のアップレギュレーションを減弱すると考えられる。数種の病態におけるアンジオテンシンⅡ-MAPKs-GSK3β-βカテニンのシグナル伝達相互作用については、今後の研究を待つところである。

5.4 本研究の限界

本研究では培養心筋細胞を用いるにあたって、我々は成熟ラットではなく、新生ラット

心筋細胞を使用した。その理由としては、蛋白精製およびウェスタンブロットを用いて、純粋な心筋細胞の介在板構成蛋白の質的・量的変化を検討するために、十分な蛋白量を得る必要があったこと。さらに multi-electrode array system を用いて、細胞間における伝達と興奮伝播特性を調べるために、monolayer に培養された心筋細胞が必要となったことが挙げられる。また、Whole heart での実験を行った場合、幾つかの他の構造的・分子的な素因が細胞間結合リモデリングの調節因子として作用する可能性がある。これらの理由から、実験をシンプルにするために、我々は新生ラット培養心筋細胞を用いた。

6. 結語

本研究の結論として、我々は GJ リモデリング発生において、AJ 蛋白である β カテニンの変化が先行することを明らかにした。AJ 蛋白の変化は、RES に曝された心筋細胞における GJ の形成と安定化に重要な役割を果たしていると考えられる。さらに我々は、 β カテニン発現量に対するアンジオテンシン II タイプ 1 受容体阻害剤の影響について、その根底にある機構の 1 つを調べた。アンジオテンシン II 受容体阻害剤は介在板リモデリングを調節することにより、致死性不整脈に対する新たなアップストリーム治療薬となり得る可能性が示された。

7. 謝辞・開示

オルメサルタンは第一三共株式会社様のご好意により提供いただいた。

著者らは金銭等の利益相反がないことを宣言する。

本論文を作成するにあたり、ご指導いただいた大草知子先生、矢野雅文教授に深い感謝の意を表す。

8. 参考文献

1. **Ai Z, Fisher A, Spry DC, Brown AM, Fishman GI.** Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 105: 161-171, 2000.
2. **Akar FG, Tomaselli GF.** Conduction abnormalities in nonischemic dilated cardiomyopathy: basic mechanisms and arrhythmic consequences. *Trends Cardiovasc Med* 15: 259-264, 2005.
3. **Angst BD, Khan LU, Severs NJ, Whitely K, Rothery S, Thompson RP, Magee AI, Gourdie RG.** Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium. *Circ Res* 80: 88-94, 1997.
4. **Barth AIM, Nathke IS, Nelson WJ.** Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin in Cell Biol* 9: 683-690, 1997.
5. **Cadigan KM, Nusse R.** Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11: 3286-3305, 1997.
6. **Dale TC.** Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J* 329: 209-223, 1998.
7. **Fujimoto K, Nagafuchi A, Tsukita S, Kuraoka A, Ohokuma A, Shibata Y.** Dynamics of connexins, E-cadherin and α -catenin on cell membranes during gap junction formation. *J Cell Sci* 110: 311-322, 1997.
8. **Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, Willerson JT, Schneider MD, Khoury DS, Marian AJ.** Suppression of canonical Wnt/ β -catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest* 116: 2012-2021, 2006.
9. **Gutstein DE, Liu FY, Meyers MB, Choo A, Fishman GI.** The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. *J Cell Sci* 116: 875-885, 2003.
10. **Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman GI.** Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res* 88: 333-339, 2001.
11. **Hardt SE, Sadoshima J.** Glycogen synthase kinase-3 β : a novel regulator of

- cardiac hypertrophy and development. *Circ Res* 90: 1055-1063, 2002.
12. **Hertig C, Eppenberger-Eberhardt M, Koch S, Eppenberger H.** N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. I. Functional role of N-cadherin and impairment of cell-cell contact by a truncated N-cadherin mutant. *J Cell Sci* 109: 1-10, 1996.
 13. **Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A.** Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J* 17: 1371-1384, 1998.
 14. **Inoue N, Ohkusa T, Nao T, Lee JK, Matsumoto T, Hisamatsu Y, Satoh T, Yano M, Yasui K, Kodama I, Matsuzaki M.** Rapid electrical stimulation of contraction modulates gap junction protein in neonatal rat cultured cardiomyocytes: Involvement of mitogen-activated protein kinases and effects of angiotensin II-receptor antagonist. *J Am Coll Cardiol* 44: 914-922, 2004.
 15. **Kanno S, Saffitz JE.** The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Pathol* 10: 169-177, 2001.
 16. **Kikuchi A.** Regulation of β -catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 243-248, 2000.
 17. **Kostetskii I, Li J, Xiong Y, Zhou R, Ferrari VA, Patel VV, Molkentin JD, Radice GL.** Induced deletion of the N-Cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. *Circ Res* 96: 346-354, 2005.
 18. **Kostin S, Hein S, Bauer EP, Schaper J.** Spatiotemporal development and distribution of intercellular junctions in adult rat cardiomyocytes in culture. *Circ Res* 85: 154-167, 1999.
 19. **Li J, Patel VV, Kostetskii I, Xiong Y, Chu AF, Jacobson JT, Yu C, Morley GE, Molkentin JD, Radice GL.** Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. *Circ Res* 97: 474-481, 2005.
 20. **Lizotte E, Tremblay A, Allen BG, Fiset C.** Isolation and characterization of subcellular protein fractions from mouse heart. *Anal Biochem* 345: 47-54, 2005.
 21. **Logan CY, Nusse R.** The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810, 2004.
 22. **McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A,**

- Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S, McKenna WJ.** Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet* 355: 2119-2124, 2000.
23. **Miller JR, Moon RT.** Signal transduction through β -catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev* 10: 2527-2539, 1996.
24. **Oxford EM, Musa H, Maass K, Coombs W, Taffet SM, Delmar M.** Connexin43 remodeling caused by inhibition of plakophilin-2 expression in cardiac cells. *Circ Res* 101: 703-711, 2007.
25. **Peters NS, Wit AL.** Myocardial architecture and ventricular arrhythmogenesis. *Circulation* 97: 1746-1754, 1998.
26. **Sato T, Ohkusa T, Honjo H, Suzuki S, Yoshida MA, Ishiguro YS, Nakagawa H, Yamazaki M, Yano M, Kodama I, Matsuzaki M.** Altered expression of connexin43 contributes to the arrhythmogenic substrate during the development of heart failure in cardiomyopathic hamster. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1164-H1173, 2008.
27. **Sen-Chowdhry S, Syrris P, McKenna WJ.** Genetics of right ventricular cardiomyopathy. *J Cardiovasc Electrophysiol* 16: 927-935, 2005.
28. **Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, Rincon M.** Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3 β inactivation. *Science* 320: 667-670, 2008.
29. **van Rijen HV, Eckardt D, Degen J, Theis M, Ott T, Willecke K, Jongsma HJ, Opthof T, de Bakker JM.** Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation* 109: 1048-1055, 2004.
30. **van Tintelen JP, Entius MM, Bhuiyan ZA, Jongbloed R, Wiesfeld AC, Wilde AA, van der Smagt J, Boven LG, Mannens MM, van Langen IM, Hofstra RM, Otterspoor LC, Doevendans PA, Rodriguez LM, van Gelder IC, Hauer RN.** Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation* 113: 1650-1658, 2006.
31. **Yoshida M, Ohkusa T, Nakashima T, Takanari H, Yano M, Takemura G, Honjo H, Kodama I, Mizukami Y, Matsuzaki M.** Alterations in adhesion

junction precede gap junction remodelling during the development of heart failure in cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Res* 92: 95-105, 2011.

32. **Zhuang J, Yamada KA, Saffitz JE, Kleber AG.** Pulsatile stretch remodels cell-to-cell communication in cultured myocytes. *Circ Res* 87: 316-22, 2000.
33. **Zuppinger C, Schaub MC, Eppenberger HM.** Dynamics of early contact formation in cultured adult rat cardiomyocytes studied by N-cadherin fused to green fluorescent protein. *J Mol Cell Cardiol* 32: 539-555, 2000.