

ミニ・レビュー —小西賞受賞者—

新生仔ラット培養心筋細胞への高頻度電気刺激負荷による ギャップ結合蛋白発現修飾の検討 MAPキナーゼとアンギオテンシンⅡ 受容体拮抗薬との関連について

井上宣子, 大草知子, 名尾朋子, 李 鍾国¹⁾, 松本 奉, 久松裕二,
佐藤孝志, 矢野雅文, 安井健二¹⁾, 児玉逸雄¹⁾, 松崎益徳

山口大学医学部応用医工学系・内科学第二講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)
名古屋大学環境医学研究所循環器分野¹⁾ 名古屋市千種区不老町 (〒464-8601)

Key words : 高頻度刺激, コネキシン43, 伝導速度, MAPキナーゼ, アンギオテンシンⅡ

和文抄録

心筋細胞間のギャップ結合の発現・分布はコネキシン蛋白の半減期が短いことにより様々な病態において直ちに变化しうる。高頻度電気刺激 (RES) によるギャップ結合リモデリングへの効果はいまだ明らかにされていない。

培養5日目のラット心室筋細胞に120分間3 HzのRESを負荷した。RESによりCx43蛋白質および遺伝子発現量は60分後には有意に増加した。免疫染色においても同様の結果であった。心筋細胞中のangiotensin II (AngII) は15分後に約2倍に上昇した。MAPK系のリン酸化型ERKは2峰性に5分と60分で、またリン酸化型JNKも15分と60分で著明に活性化された。リン酸化型p38 MAPKは5分後に1峰性に活性化された。細胞外電位記録法により心筋細胞の興奮伝播特性の変化を解析したところ、RESにより伝導速度は有意に増加した。これらの変化はlosartanにより抑制された。RESによるCx43の発現増加はまたERK, p38の特異的阻害剤にも抑制された。

RESは、早期より心筋細胞内のAngII産生を増加

し、MAPK系を活性化することによりCx43発現量を増加させた。その結果、細胞間の刺激伝播異常を引き起こし、不整脈基質の一つとなる可能性が示された。

目 的

我々は、高頻度電気刺激=rapid electrical stimulation (以下RES) のラット新生仔培養心筋細胞に負荷し、Cx43発現への影響と付随する電気生理学的変化を検討した。また、機械的伸展により心筋細胞からアンギオテンシンⅡが分泌され、mitogen-activated protein kinase family (以下MAPKs) を含む様々なキナーゼが活性化され、肥大を招くとの報告もあり、シグナル伝達経路として、我々はアンギオテンシンⅡとMAPKsに注目した¹⁻³⁾。

方 法

心筋細胞培養

1-2日令のラット新生仔心筋細胞を単離し、培養を行った⁴⁾。細胞は様々な方向に成長し単層培養され、5日目に規則的な同期自発収縮がみられるようになる。

平成17年7月11日受理

高頻度電気刺激法 (RES)

5日目に培養心筋細胞の培地を無血清培地に変更し, 3.0Hzで120分間までRESを負荷した。

細胞外電位記録法

培養心筋細胞の興奮伝導能を multielectrode array system (MED-P545AとMED64, Panasonic) による細胞外電位マッピングを用いて評価した^{5,6)}。伝導速度は刺激部位左から右へ横切る距離と活動電位時間をplotし, 計算して求めた (図8)。

蛋白質発現量の検討

回収した細胞にLysis bufferを加え, ホモジナイズし, 2000g, 4°Cで15分間遠心し, 上清を回収した。Western blot法にて蛋白発現量を検討した。

遺伝子発現量の検討

回収した培養心筋細胞から, acid guanidinium thiocyanate/phenol/chloroform 抽出法⁷⁾を用いて, total mRNAを抽出し, RT-PCR法にて遺伝子発現量の検討を行った。

蛍光免疫染色法によるCx蛋白質の分布の検討

culture slide上で培養された心筋細胞を4%ホルマリンで固定した。蛍光免疫染色を行い, 共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510 Laser-Scanning Microscope System; Carl Zeiss) を用いて観察した。

培養液中アンギオテンシンII濃度の測定

培養液中のアンギオテンシンIIの濃度はRIA法を用いて行った⁸⁾。

統計処理

群間比較はDunnett多重比較検定で行った。データは平均±標準偏差で示した。p値が0.05以下を統計学的な有意差とした。

結 果

Cx43発現量

コントロール蛋白により補正したCx43蛋白量はRESにより徐々に増加し, baselineと比較し60分後より有意差に増加していた。Cx43 mRNA発現量も

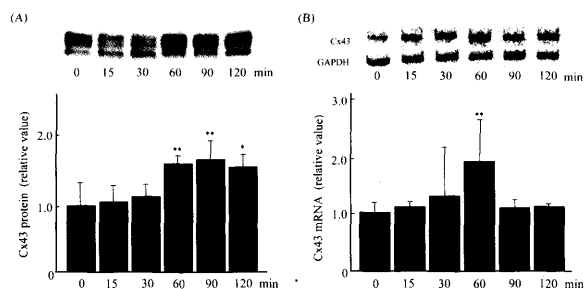


図1

培養心筋細胞におけるRES負荷後のCx43蛋白質 (A) およびmRNA (B) 発現量の比較。A,Cx43蛋白質はウェスタンブロット法により評価し, control蛋白により補正した (平均±標準偏差, n=8)。*p<0.05, **p<0.01 vs. baseline B,Cx43 mRNAはRT-PCR法により評価し, GAPDHにより補正した (平均±標準偏差, n=8)。**p<0.01 vs. baseline

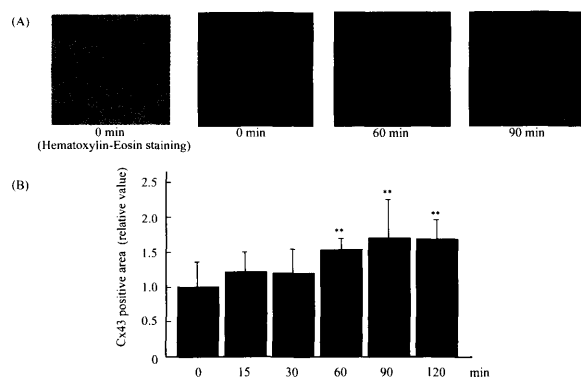


図2

培養心筋細胞におけるCx43の蛍光免疫染色法による解析。A.培養心筋細胞の光顕写真とRES前, RES負荷60分, 90分後の代表例を示す。B.全細胞面積に対するCx43蛍光免疫染色陽性シグナルの比率 (平均±標準偏差, n=8)。**p<0.01 vs. baseline

また, RES 60分後に有意に増加していた (図1B)。

60から90分間のRESの後, 分布パターンに影響を与えず一様にCx43に免疫反応したシグナルが増加していた。定量分析ではCx43-positive areaはRESにより有意に増加していた (図2B)

アンギオテンシンIIの生成・分泌

アンギオテンシンIIはCx43を増加させることが知られているため, 我々はRESによる培養液中及び心筋細胞中のアンギオテンシンII含有量の変化を検討した^{9,10)}。培養液中のアンギオテンシンIIの濃度はRES15分後には有意に増加し, その増加はその後も持続している (図3A)。図3Bでイムノブロット法により評価した心筋細胞中のアンギオテンシンII発現量を示す。アンギオテンシンIIはRES15-60分

後で有意に増加していた。これらよりRESを負荷した場合、心筋細胞はアンギオテンシンIIを急速に生成・分泌することが示された。

MAPKsの発現

次に我々はシグナル伝達系においてアンギオテンシンIIの下流にあるMAPKsを検討した。リン酸化ERK (p-ERK) はRES 5分と60分後と2峰性のピークをもって大幅に増加していた(図4A)。リン酸化JNK (p-JNK) もまた15分と60分後と2峰性のピークをもって劇的に増加していた(図4B)。リン酸化p38 MAPKs (p-p38) はRES 5分と非常に早期に1峰性の上昇がみられた(図4C)。これらの結果よりMAPK系はRESにより活性化されることが示された。

ロサルタン・MAPK阻害剤添加後の変化

RESによるCx43 upregulationがアンギオテンシンIIのautocrine作用によるMAPKs系の活性化の結果と仮定した場合、Cx43発現の増加や活性型のMAPKsはAngII type 1 (AT1) receptorの薬理的ブロッカーにより阻害されるはずである。図5でロサルタン添加後のRESのCx43発現への影響を示す。ロサルタン100nmol/Lで処理した心筋細胞ではbaselineのCx43蛋白質、mRNAレベルは影響を受けなかった。ロサルタン存在下では、RES60または90分後のCx43蛋白質(図5A)とmRNAの有意な増加は起こさなかった(図5B)。免疫組織化学染色においても、ロサルタン存在下ではRES30-90分後、Cx43 positive areaの有意な変化はみられなかった(図5C)。

図6にRESの活性型MAPK系への影響を示す。ロサルタン存在下ではp-ERK、p-JNKはRES60-90分後で有意な増加は認められなかった。一方p-p38はロサルタン存在下でもRES 5分後で有意に増加していたが、その増加の程度はロサルタン無添加のものと比較し、大幅に少なかった。RES15分後のp-p38の応答はロサルタンにより完全に消失していた。これらよりAT1受容体拮抗薬はRESによるCx43のupregulationとMAPKの活性化の予防に有効であることが示された。

各々のMAPKの寄与の程度を評価するため、心筋細胞にそれぞれの経路の特異的阻害剤で処理した

(A)Table. Angiotensin II Content of Culture Media

	Angiotensin II (pg/ml)
baseline	< 3
15 min	16.8 ± 3.6 **
30 min	20.0 ± 2.6 **
60 min	19.0 ± 2.8 **
90 min	19.4 ± 2.8 **

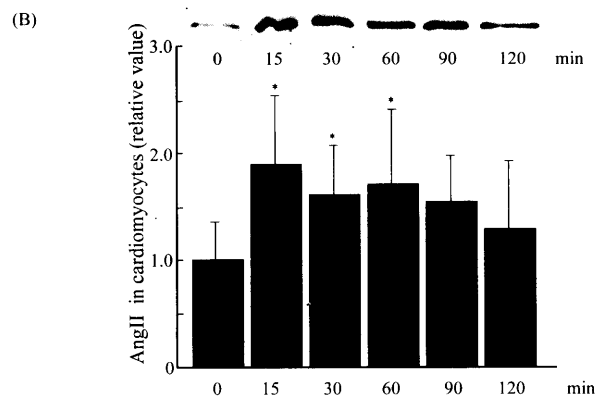


図3

培養心筋細胞によるアンギオテンシンIIの分泌・産生の比較。A,培養液中のアンギオテンシンII濃度(平均±標準偏差, n=8)。**p<0.01 vs. 0min baseline B,培養細胞中のアンギオテンシンII発現量をウェスタンブロット法にて評価し, baselineの値により補正した(平均±標準偏差, n=8)。*p<0.05, **p<0.01 vs. baseline

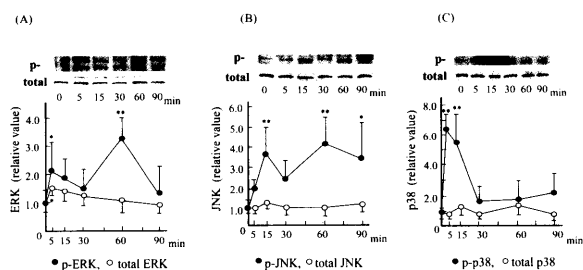


図4

RES負荷による3種類のMAPKsの変化を示す。A, total ERKとリン酸化ERK (p-ERK) B, total JNKとリン酸化JNK C, total p-38 MAPKsとリン酸化p-38 MAPKs (p-p38)。各々baselineの値で補正している(平均±標準偏差, n=8)。*p<0.05, **p<0.01 vs. baseline

後にRESを負荷した(図7)。Cx43蛋白質のbaseline levelはPD98059 (50uM), SP600125 (50uM), SB203580 (10uM)で影響されなかった。MAPK/ERK阻害剤であるPD98059はRESによるCx43発現の増加をほとんど抑制した。それに対し、JNK阻害剤であるSP600125はRESによるCx43のupregulationに影響を与えなかった。p38 MAPKとJNK2経路の阻害剤であるSB203580は部分

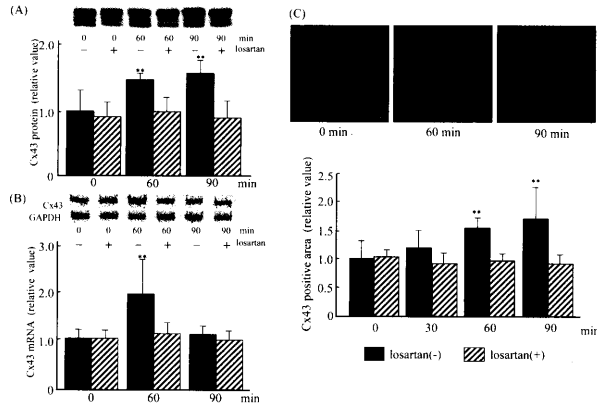


図 5
ロサルタン添加によるRES負荷後のCx43 upregulationの抑制。RES前(0分)とRES後60分・90分で、ロサルタン添加無し(黒カラム)と添加有り(斜線カラム)で示す。A, Cx43蛋白質発現量の変化 B, Cx43 mRNA発現量の変化 C, Cx43蛍光免疫染色陽性シグナルの比率(平均±標準偏差, n=8)。**p<0.01 vs. baseline

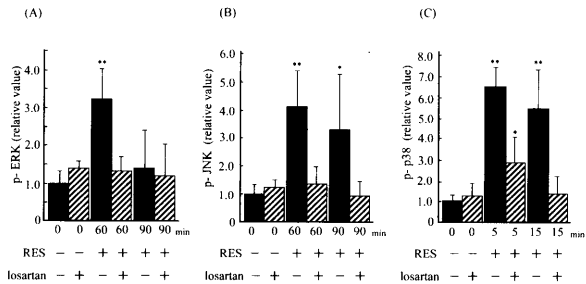


図 6
ロサルタン添加によるRES負荷後のMAPKs活性化の抑制。A, リン酸化ERK (p-ERK) の発現レベル。B, リン酸化JNK (p-JNK) の発現レベル。RES前(0分)とRES後60分・90分で、ロサルタン添加無し(黒カラム)と添加有り(斜線カラム)で示す。C, リン酸化p38 MAPKs (p-p38) の発現レベル。RES前(0分)とRES後5分・15分で、ロサルタン添加無し(黒カラム)と添加有り(斜線カラム)で示す。(平均±標準偏差, n=8)。*p<0.05, **p<0.01 vs. baseline

的にCx43のupregulationを抑制した。これらよりRESによるCx43のupregulationはおもにERKとp38 MAPKの経路を介することが示唆された。

興奮伝導能

我々は多電極細胞外電位マッピング法を用いて機能的変化を検討した。activation timeの等電位マップはRES前(control, 図8B)とRES90分後(図8C)ではほぼ様な左から右への興奮伝播を示している。RES後のactivation timeはcontrolのそれと比較大幅に短縮しており、RESによる伝導の促進がみられた。RES後のこのような伝導の変化はロサルタンの前処置(100 nmol/L)により阻害された(図8D)。

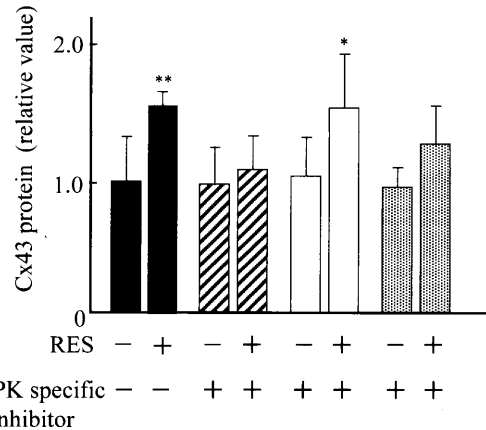


図 7
MAPK阻害剤添加によるRES負荷後のCx43 upregulationの抑制。RES前(0分)とRES後60分、添加なしと50 μmol/L PD98059 (MAPK/ERK kinase 阻害剤), 50 μmol/L SP600125 (JNK阻害剤), 10 μmol/L SB203580 (p38とJNK2 阻害剤) 添加有りです。(平均±標準偏差, n=8)。*p<0.05, **p<0.01 vs. baseline

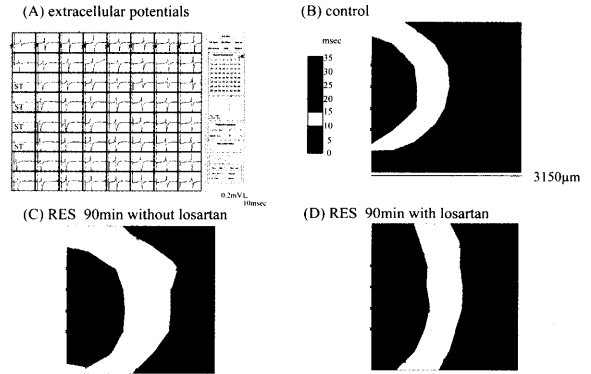


図 8
興奮伝導時の多電極細胞外電位マッピング。A, 64電極から記録された代表的電位図。矢印は刺激によるアーティファクト, STは刺激点を示す。B, C, ロサルタン添加無しでRES前(control)とRES90分後の培養皿内のactivation timeの等電位マップ。D, 別の培養皿でロサルタン添加有りてRES90分後のactivation timeの等電位マップ。*, 刺激点。

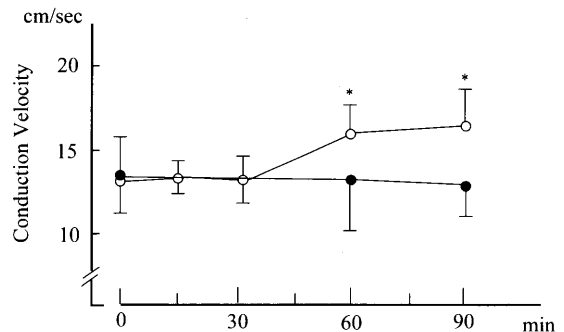


図 9
RESの伝導時間への影響。RES15-90分後の左から右への伝導時間を測定した。ロサルタン添加無し(○, n=7-9)と、有り(●, n=7-9)の伝導速度をRES開始からの時間に対しプロットした。*p<0.01 vs. control

図9にて伝導速度の蓄積したデータを示す。ロサルタン無添加の場合、RESにより伝導速度は増加し、controlと比較しRES60分後と90分後で有意に上昇する。ロサルタン存在下ではRESは伝導速度に影響を与えず、RES60分後、90分後はcontrolと同様の値であった。

考 察

RESによるCx43 upregulationのシグナル伝達経路

新生仔ラット培養心筋細胞において、いくつかのMAPK family memberはpulsatile stretchに应答して活性化することが示されている³⁾。ERK, JNK, p38はアンジオテンシンIIやエンドセリン-1といったG-protein-coupled receptor (GPCR) アゴニストにより活性化される¹¹⁾。またERK, JNK, p38は高浸透圧ショック、蛋白合成阻害剤、低酸素・再還流や活性酸素など様々な細胞ストレスにより活性化される¹¹⁾。我々の結果においてもRESはリン酸化ERK, JNK, p38を急激かつ劇的に増加させることが明らかになった。加えて、RESによるこれらMAPK系の活性化の多くはロサルタンにより抑制された。また、RESによるCx43のupregulationはJNK阻害剤で影響されず、ERKやp38阻害剤で抑制された。これらの所見はERKとp38MAPKがRESによるCx43発現においてアンジオテンシンIIのシグナル伝達経路の重要な役割を担っている可能性があることを示唆する。これは外因性のアンジオテンシンIIをラット培養心筋細胞に添加し、24時間のうちにERK1/2とp38の活性化を含むシグナル伝達経路を介してCx43のupregulationを起こすことを示したPolontchoukらの報告と一致している¹⁰⁾。しかし、今回p38のRESによる早期の活性化はロサルタンにより完全に抑制されておらず(図6C)、AngII以外のmediatorの存在を除外できてはいない¹²⁻¹⁴⁾。

Cx43 upregulationによる機能的変化

今回RES60-90分後で伝導速度は有意に増加することが示された。また、この作用はロサルタン存在下では完全に抑制され、AngII type 1 receptorとCx43の発現が機能的に相関していることがわかった。今回みられた23-27%の伝導速度の増加の多くはCx43発現が増加していることに関連している。

しかしながら、その他の可能性として新しく合成されたCx43ギャップ結合は元来の状態とは異なる伝導能を持つ可能性がある。Yaoらは近年梗塞治療部の境界域のギャップ結合はリモデリングされ、コンダクタンスが低く、電位依存性が変化していることを報告した¹⁴⁾。リン酸化はギャップ結合を形成するコネクシンの安定性に関連する。病態心におけるギャップ結合のリモデリング過程に注目した研究はますます増えている^{15, 16)}。最近ではBeardsleeらは急性虚血モデルにおいて心筋組織のuncouplingはCx43の脱リン酸化とギャップ結合プラークのCx43の非リン酸化Cx43の蓄積と関連していることを示した¹⁷⁾。RESがCx43リン酸化の修飾により伝導能に影響を与えている可能性があり、今後の研究課題である。Rohrらは培養細胞において急激な幾何学的拡張部位において刺激伝導の逆説的な改善を引き起こすことを示した¹⁸⁾。RESによる電氣的細胞間カップリングの増加は突然の幾何学的拡大部位で伝導の不連続性を促進し、一方向性ブロックの形成に寄与する可能性がある。AT1やMAPK系は急激に心拍数増加を伴う病的状態下で致死性不整脈を抑制する重要な標的分子である可能性が示唆された。

結 語

本研究は初めて短時間のRESにより主にAngII-MAPK系を介してCx43の発現の増加が起こり、伝導特性の変化を伴うことを明らかにした。

引用文献

- 1) Malhotra R, Sadoshima J, Brosius F, Izumo S. Mechanical stretch and angiotensinII differentially upregulate the renin-angiotensin system in cardiac myocytes in vitro. *Circ Res* 1999; **85**: 137-146.
- 2) Sadoshima J, Izumo S. Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathway in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO J* 1993; **12**: 1681-1692.
- 3) Seko Y, Takahashi N, Tobe K, Kadowaki T, Yazaki Y. Pulsatile stretch activates mitogen-

- activated protein kinases (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125 (FAK)) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 ; **259** : 8-14.
- 4) Yonemochi H, Yasunaga S, Teshima Y, Takahashi N, Nakagawa M, Ito M, Saikawa T. Rapid electrical stimulation of contraction reduces the density of β -adrenergic receptors and responsiveness of cultured neonatal rat cardiomyocytes: possible involvement of microtubule disassembly secondary to mechanical stress. *Circulation* 2000 ; **101** : 2625-2630.
 - 5) Oka H, Shimono K, Ogawa R, Sugihara H, Taketani M. A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. *J Neurosci Methods* 1999 ; **93** : 61-67.
 - 6) Shimono K, Brucher F, Granger R, Lynch G, Taketani M. Origins and distribution of cholinergically induced beta rhythms in hippocampal slices. *J Neurosci* 2000 ; **20** (22) : 8462-8473.
 - 7) Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki RK, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro; the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986 ; **51** : 263-273.
 - 8) Kobayashi H, Shimamoto K, Moriguchi O, Miyahara M. A sensitive radioimmunoassay for the determination of plasma angiotensin II in human subjects. *Jap Circ J* 1979 ; **43** : 727-732.
 - 9) Dodge SM, Beardslee MA, Darrow BJ, Green KG, Beyer EC, Saffitz JE. Effects of angiotensin II expression on the gap junction channel protein connexin43 in neonatal rat ventricular myocytes. *J Am Coll Cardiol* 1998 ; **32** : 800-807.
 - 10) Polontchouk L, Ebel B, Jackels M, Dhein S. Chronic effects of endothelin 1 and angiotensin II on gap junctions and intercellular communication in cardiac cells. *FASEB J* 2002 ; **16** : 87-89.
 - 11) Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res* 1998 ; **83** : 345-352.
 - 12) Darrow BJ, Fast VG, Kleber AG, Beyer EC, Saffitz JE. Functional and structural assessment of intercellular communication; increased conduction velocity and enhanced connexin expression in dibutyryl cAMP-treated cultured cardiac myocytes. *Circ Res* 1996 ; **79** : 174-183.
 - 13) Pimental RC, Yamada KA, Kleber AG, Saffitz JE. Autocrine regulation of myocyte Cx43 expression by VEGF. *Circ Res* 2002 ; **90** : 671-677.
 - 14) Yao J-A, Hussain W, Patel P, Peters NS, Boyden PA, Wit AL. Remodeling of gap junctional channel function in epicardial border zone of healing canine infarcts. *Circ Res* 2003 ; **92** : 437-443.
 - 15) Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA. Connexin expression and turnover. Implications for cardiac excitability. *Circ Res* 2000 ; **86** : 723-728.
 - 16) van Veen TAB, van Rijen HVM, Opthof T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res* 2001 ; **51** : 217-229.
 - 17) Beardslee MA, Lermer DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, Kleber AG, Schuessler RB, Saffitz JE. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res* 2000 ; **87** : 656-662.
 - 18) Rohr S, Kucera JP, Fast VG, Kleber AG. Paradoxical improvement of impulse conduction in cardiac tissue by partial cellular uncoupling. *Science* 1997 ; **275** : 841-844.

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

Noriko INOUE, Tomoko OHKUSA, Tomoko NAO, Jong-Kook LEE¹⁾,
Tomo MATSUMOTO, Yuji HISAMATSU, Takashi SATOH, Masafumi YANO,
Kenji YASUI¹⁾, Itsuo KODAMA¹⁾ and Masunori MATSUZAKI

*Department of Internal Medicine II. and Digital Bio-information Medicine,
Yamaguchi University School of Medicine,*

1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

*1) Department of Circulation. Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University,
Furocho, Chikusa, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan*

SUMMARY

- BACKGROUND** The expression and distribution of gap junctions in cardiac muscle can be changed readily under a variety of pathological conditions because of dynamic turnover of connexins. The effects of rapid electrical stimulation (RES) of contraction on the gap junction remodeling are not well-understood.
- METHODS** Neonatal rat ventricular myocytes cultured for 5 days were subjected to RES at 3.0 Hz for up to 120 min.
- RESULTS** RES resulted in a significant upregulation of Cx43. Angiotensin II content was increased significantly by RES >15 min. Phosphorylated forms of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), c-Jun NH₂-terminal kinases (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinases (p38 MAPKs) were all increased dramatically by RES with peaks at 5~60 min. Propagation of excitation was visualized by extracellular potential mapping by using a multiple electrode array system. Conduction velocity was increased significantly by RES for 60 to 90 min. Treatment of myocytes with losartan prevented most of these effects of RES. RES-induced upregulation of Cx43 was also prevented by specific inhibitors for ERK and p38 MAPKs.
- CONCLUSIONS** A short-term RES causes upregulation of Cx43 in cardiomyocytes and a concomitant increase of conduction velocity mainly through an autocrine action of Angiotensin II to activate ERK and p38 MAPKs.