

論文の内容の要旨

論文題目 A study on the Alternation of Connexin43 in the Rat Ischemic Heart

ラット虚血心筋におけるコネキシン 43 の動態に関する研究

指導教官 吉田謙一教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月 1 日入学

医学博士課程

社会医学専攻

氏名 畑中一仁

【緒言】細胞間を結合する形態の一つにギャップ結合があり、心筋細胞では隣接する細胞間の介在板に存在する。ギャップ結合を介して種々のイオンや分子が細胞間を伝達されることから、ギャップ結合は細胞間の電氣的、代謝的な共役に関与するとされる。ギャップ結合は膜貫通型タンパクの六量体で構成されたコネクソンからなり、その膜貫通型タンパクはコネキシンと称される。心筋細胞の大部分では分子量 43-kDa のコネキシン 43 が発現している。コネキシン 43 は、半減期が約 1.3 時間という非常に代謝速度の速いタンパクであり、粗面小包体およびゴルジ装置で生合成され、リン酸化を受けた後、プロテアソームまたはライソゾームで分解される。

近年、ギャップ結合の生理的機能から、その構成要素であるコネキシン 43 の

障害と催不整脈性との関連が注目されており、コネキシン 43 のノックアウトマウスを用いた研究では、その発現が抑制された場合には不整脈が生じやすいとされている。また、動物モデルやヒトの虚血心の介在板における免疫染色性低下が認められており、その原因としてエピトープマスキング、つまり脱リン酸化等による抗原構造の内包化による機序が提唱されているが、コネキシン 43 の分解に関しては不明である。また灌流心での虚血モデルにおいてコネキシン 43 の脱リン酸化現象が報告されており、非虚血下では介在板でリン酸化型優位であったものが、虚血下では脱リン酸化型が経時的に増加する現象が確認されている。しかし、比較的早期の虚血心筋でのコネキシン 43 の動態に関しては不明な点が多い。また短時間虚血の先行による梗塞心筋保護作用および不整脈抑制効果は Ischemic preconditioning (IP) として知られているが、IP の効果が梗塞心筋のコネキシン 43 にもたらす影響に関しては不明である。

本研究では、ラット心筋梗塞モデルを用いて、梗塞早期のコネキシン 43 の脱リン酸化および分解の分子機構を明らかにするとともに、IP が梗塞心筋のコネキシン 43 に及ぼす影響について調べることを目的とした。

【材料・方法】8 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットの左冠動脈結紮により心筋梗塞を作成し、以下の各実験モデルを作成した。1) 梗塞モデル：1、2、3 時間梗塞モデル（経時変化）、2) 阻害剤投与モデル：カルシニューリン阻害剤（サイクロスポリン A）、ライソゾーム阻害剤（E64c）、およびプロテアソーム阻害剤（PSI）を前投与した 1 時間梗塞モデル、3) IP モデル：冠動脈結紮 3 分開放 5 分を 3 回反復後の 1 時間および 3 時間梗塞モデル。また IP との関連性が報告されている protein kinase C (PKC) の影響を調べるために、PKC 阻害剤（ケレレ

スリン) を前投与した IP モデル (梗塞 1 時間) を作製した。摘出心は虚血部と非虚血部に分けてホモジナイズ後、核・筋原線維分画 (P1)、膜分画 (P2)、細胞質分画 (S) に分離し、SDS (sodium dodecyl sulfate) -PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) 後、抗コネキシン 43 抗体 (ポリクロナールおよびモノクロナール抗体) および抗 PKC 抗体によるウェスタンブロッティングにより分析を行った。なおプロテアソームによるコネキシン 43 の分解を検証するために、プロテアソームの特異的基質である I κ B- α について同様に分析を行った。コネキシン 43 mRNA はノーザンブロッティングにより分析を行い、また蛍光抗体法による免疫組織学的検討も併せて行った。なお、使用した抗コネキシン 43 ポリクロナール抗体はリン酸化型コネキシン 43 および脱リン酸化型コネキシン 43 の両方を認識し、同モノクロナール抗体は脱リン酸化型コネキシン 43 のみを認識するという特性を持つ。

【結果】 対照群 (非虚血) におけるコネキシン 43 は大部分が膜分画にリン酸化型として存在し、免疫蛍光染色法による組織像では心筋細胞の介在板に存在することが確認された。梗塞 1 時間ではリン酸化型コネキシン 43 の減少と脱リン酸化型コネキシン 43 の増加が認められた。全コネキシンの減少は全量の約 15% であり、梗塞 1 時間では大部分が脱リン酸化されると考えられる。その後、両者は梗塞の進行に従って経時的に減少した。組織像では梗塞 1 時間で脱リン酸化型を示すモノクロナール抗体陽性像が介在板で強く認められたが、梗塞 3 時間ではその染色性は低下し、また心筋全体が弱くびまん性に染色された所見が認められた。これはコネキシン 43 分解産物の存在を示していると考えられる。なお S 分画のウェスタンブロッティングでは明らかなコネキシン 43 のバンドは

確認できなかったが、同分画のドットプロットでは経時的なドットシグナルの増強が認められたことから、コネキシン 43 分解産物が細胞質において増加していると考えられる。

サイクロスポリン A によりコネキシン 43 の梗塞 1 時間における脱リン酸化が抑制された。また、E64c および PSI により梗塞 1 時間におけるリン酸化コネキシン 43 の減少が有意に阻害され、両者の部分的な協調作用も認められたが、脱リン酸化型への影響はいずれも認められなかった。S 分画のドットプロットでは対象群で E64c および PSI 投与群でのドットシグナル増強を認め、梗塞 1 時間ではこれらの阻害剤投与によりドットシグナル増強が抑制された。またプロテアソームの基質である I κ B- α は梗塞 1 時間で有意に減少したが、PSI によりその減少は抑制された。コネキシン 43 の mRNA は梗塞 1 時間では対照とほぼ同レベルであったが、3 時間後には著減した。なお IP はコネキシン 43 mRNA レベルには影響を及ぼさなかった。

IP により梗塞 1 時間でのリン酸化型コネキシン 43 および I κ B- α の減少が有意に抑制されたが、3 時間ではその減少抑制は認められなかった。また IP によるリン酸化型コネキシン 43 の減少抑制がケレレスリンにより阻害されたことから、IP によるリン酸化型コネキシン 43 の減少抑制効果には PKC が関与すると考えられる。なお、ウェスタンブロッティングによる分析では IP モデルにおける PKC の膜分画への転移等を示す明らかな所見は認められなかった。

【考察】本研究により、早期心筋梗塞モデルにおけるカルシニューリンによるコネキシン 43 脱リン酸化、プロテアソーム及びライソゾームによるコネキシン 43 分解、さらに虚血 3 時間でのコネキシン 43 遺伝子発現減少が示された。すな

わち、梗塞初期にはコネキシン 43 の脱リン酸化と蛋白分解が起こり、その後、転写活性低下および mRNA の不安定化が起こると考えられる。また IP によりコネキシン 43 の減少が抑制されることが示され、その機序として PKC の関与が示唆された。一般的な組織学的検索では心筋の変化が殆ど認められない段階での早期梗塞において、コネキシン 43 が脱リン酸化・分解されていること、また IP が虚血によるコネキシン 43 の変化を抑制することから、心筋梗塞早期の不整脈による突然死の機構及び狭心症発作反復による梗塞時不整脈発生の抑制機構が虚血によるコネキシン 43 の変化と関連することが示唆される。

以上の結果より、コネキシン 43 を維持するような薬物療法による心機能保護および不整脈抑制の治療の可能性が示唆され、例えばプロテアソーム阻害剤や PKC 活性化剤などの応用が考えられる。また突然死例は臨床診断のみならず剖検診断および病理組織的診断においても診断が困難であり、特に法医学実務上では、事故、喧嘩、過労などによるストレス負荷が虚血性心疾患の誘因であった事例も多く、その診断が困難である場合が多い。早期虚血性心疾患の組織診断にはミオグロビンの逸脱等が用いられてきたが、これは細胞膜破壊の結果の指標であり特異的な診断方法とは言い難い。本研究で示されたように、コネキシン 43 の変化は梗塞の初期より出現し、特にその変化は不整脈と密接に関連することが示唆されることから、コネキシン 43 の免疫染色性の変化が心臓性突然死を示唆する指標として、また不整脈の指標として有用であると考えられる。