

論文内容の要旨

論文題目 **Inhibition of gap junctional intercellular communication causes lethal
arrhythmia in forced restrained rat**

ラット拘束ストレスによる心臓性突然死における

ギャップジャンクションの役割

指導教員 吉田 謙一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

社会医学専攻

鶴沼 香奈

【背景・目的】

精神病院・拘置所内で興奮している人の身体を拘束した際、突然死することがある。このような事例の法医解剖では、特異的な所見を認めないため診断に苦慮する。心肥大、肥満など心血管リスクを認める人々が多いことから、心臓性突然死、とくに不整脈の関与による死亡が疑われるが確証を得られない場合が多い。

身体拘束と死の因果関係の判断が拘束者の責任の有無を決めることがあるが、判断の根拠は得難い。ハンス・セリエは、ラットの身体拘束による情動ストレスが、心血管系に“**fight or fright**”反応を誘発することを提唱した。実際、地震などの自然災害による情動ストレスが、交感神経系の過緊張を介して心臓性突然死の発症率・死亡率を増すことが知られている。

心拍動の協調には細胞間結合の一つである **gap junction (GJ)**が重要な役割を担っており、GJ をイオンや分子量 1 kDa 以下の小分子が受動的に伝達することで、心筋の協調拍動や恒

常性が保たれている。このような GJ を介した細胞間情報伝達は GJ intercellular communication (GJIC) と呼ばれる。

GJ を構成する半チャネルをコネクソンといい、コネクソンはコネキシン(Cx)タンパクによって構成され、心臓では Cx43 が主体である。正常状態の心筋では GJ-Cx43 は介在板に多く発現し、興奮伝導の等方性を司っているが、心肥大、心不全などの病態では GJ-Cx43 量が減少し、細胞膜全体に渡って広く分布するように発現が変化することが報告されている。一方、Cx43 の代謝回転速度は 1-2 時間程度と速いため、かかる環境変化に対して速やかに適応すべく制御されていると考えられている。最近では、培養心筋細胞に周期的伸展刺激を加えた 1 時間後、あるいは β -アドレナリン受容体刺激剤投与 5 分後に、GJ-Cx43 量が増加し GJIC 活性が上昇することが報告された。我々も、ラット左冠状動脈結紮モデルにおいて、30 分という早期には介在板上の Cx43 タンパク量が一過性に増加し GJIC 活性が上昇する結果、再灌流時心筋収縮帯が急激に細胞間に伝播することを見出し報告した。

【仮説および目的】

本研究では、身体拘束というストレスは、心筋 GJ-Cx43 の量的変化を引き起こすのではないかと、そして特に GJIC 活性が低下している状況において、不整脈発生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に、ラット身体拘束モデルを用いて、GJ 阻害剤投与下での拘束中の心電図変化、および Cx43 発現量の変化を調べることにした。

【材料と方法】

拘束ストレス (IMO) を負荷するため、無麻酔下、6 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットの四肢を、背臥位で粘着テープにて固定した。同じ時間、ケージ内を水・餌なしで自由に活動させた“非拘束 (F)”を対照とした。GJ 阻害剤である carbenoxolone (CBX) (0.12 or 0.25 mg/kg/hr)を頸静脈から持続投与しながら、テレメトリ法により心電図をモニターした。ラットをランダムに 5 つの群、非拘束・リン酸緩衝液 (PBS) 投与群 (F+PBS)、非拘束・高濃度 CBX 投与群 [F+CBX (0.25 mg/kg/hr)]、拘束・PBS 投与群 (IMO+PBS)、拘束・高濃度 CBX 投与群 [IMO+CBX (0.25 mg/kg/hr)]、拘束・低濃度 CBX 投与群 [IMO+CBX (0.12 mg/kg/hr)] に振り分けて心電図を測定し、心室性期外収縮 (PVCs)、心室頻拍 (VT)と心室細動 (VF) をカウントした。さらに、F+PBS、F+CBX (0.25 mg/kg/hr)、IMO+PBS、IMO+CBX (0.25 mg/kg/hr) の 4 群を対象に、身体拘束 60 分の左室心筋を用いて、dye transfer assay による GJIC 活性の測定、血液生化学検査を行った。また、身体拘束 240 分まで経時的に採取した左室心筋を、細胞分画を行う前のホモジェネート液、1,000 \times g 沈殿物、細胞膜・マイクロオルガネラ・ミトコンドリアを含む P2 分画に分け、Cx43 タンパク量を Western blotting で検討した。さらに、拘束・非拘束の 2 群を対象に Cx43 の免疫組織染色、real-time RT-PCR による mRNA の定量を行った。

【結果】

GJ 阻害剤投与下で身体拘束されたラットの一部分で致死的不整脈が発生する

身体拘束のみでは PVCs は増加したが致死性不整脈は認められず、GJ 阻害剤投与のみでは約半数に QRS 幅の延長を認めるものの有意な不整脈を認めなかった。しかし、GJ 阻害剤投与下で身体拘束を行うと、55~95 分の間で約 21% のラットに致死性不整脈が誘発された。

身体拘束により、左室心筋の P2 分画において Cx43 タンパク量が一過性に上昇する

身体拘束 60 分をピークに一過性に P2 分画での Cx43 タンパク量が約 2 倍上昇した。分画前のホモジェネート液中の Cx43 タンパク量は拘束による変化を認めず、Cx43 mRNA レベルでも増加を認めなかったことから、細胞内全体の Cx43 発現量が増加したのではなく、P2 分画への分配率が高まったためであることが分かった。

身体拘束 60 分でリン酸化 Cx43 発現が介在板上で増加し、GJIC 活性が上昇する

拘束・非拘束にかかわらず P2 分画の Cx43 は殆どが 44-46 kDa のリン酸化型であったことから、介在板で増加した Cx43 はリン酸化 Cx43 であることが示唆された。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 開口率の上昇を引き起こすため、拘束 60 分の心筋における GJIC 活性を検討した結果、約 2.5 倍上昇しており、拘束ストレスに反応してリン酸化 Cx43 が介在板上に増加した結果、GJIC 活性が促進されたと考えられた。

CBX 投与によって身体拘束による GJIC 活性上昇がキャンセルされると致死性不整脈が惹起され得る

身体拘束に加えて GJ 阻害剤を投与すると、一部のラットで致死性不整脈が惹起された。またこのとき、身体拘束によってもたらされた GJIC 活性の上昇がキャンセルされる群が存在した。さらに、このキャンセルされた群において特に QRS 幅が有意に延長していた。

GJ 阻害剤の副作用の検討

CBX は GJ に特異性の高い阻害剤として広く用いられているが、高い濃度では電解質ホメオスターシスに影響を与えるという報告があるため、これらに影響を与えたか否かを検討した。その結果、本研究で使用した濃度ではいずれの群でも影響は認められなかった。また、CBX 投与による Cx43 タンパク量への影響も認めなかった。一方、心電図では CBX 投与により、拘束・非拘束群とも QRS 幅延長が見られ、これらは濃度依存性に变化する傾向があったことから、CBX 投与による心電図変化は GJIC 活性阻害作用によるものと考えられた。

【考察】

本研究では、身体拘束ラット心筋細胞の介在板において、心筋の協調拍動やホメオスタシスを司る細胞生物学的因子とされる GJ-Cx43 量が一過性に上昇し、かつ GJIC 活性も増加するという新しい知見が得られた。さらに、この GJIC 活性の増加を、特異的な GJ 阻害剤の一つである CBX によって抑制した時に、身体拘束によって致死性不整脈が惹起され得ることが明らかになった。身体拘束における GJ-Cx43 量の増加や GJIC 活性の上昇は、不整脈易発生な状態に対する代償反応として機能している可能性が考えられる。また、GJIC 活性上昇が抑制された状況で身体拘束を加えると致死性不整脈が発生しやすいことが示された。本研究結果は、身体拘束が心臓性突然死を起こし得るという 1 つの可能性を示したといえる。