

審査の結果の要旨

氏名 鶴沼 香奈

本研究は、心筋の協調拍動やホメオスターシスを司る gap junction (GJ)における興奮伝導の変化が、興奮者の身体拘束下における不整脈発生や突然死に関与しているのではないかという仮説を証明するため、ラット身体拘束下での心筋 GJ 主要構成タンパクである connexin43(Cx43)の発現量やリン酸化状態、GJ分布を明らかにすることを試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. GJ 阻害剤投与下で身体拘束されたラットの一部で致死的不整脈が発生する

身体拘束のみでは心室性期外収縮(PVC)が増加したが、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分から95分の間で約21%のラットに、致死性不整脈(VT/VF)が誘発された。

2. 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×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分画(P2分画)に分け、GJを豊富に含むP2分画におけるCx43のタンパク量とリン酸化状態をWestern blottingで検討した。その結果、身体拘束60分をピークに一過性にCx43タンパク量が非拘束群の約2倍上昇し、120分でベースラインに戻ることが明らかになった。

同様にして、細胞分画前のホモジェネートおよび1,000×g沈殿物のCx43タンパク量の経時変化を検討したところ、ホモジェネート液においては群間に有意な変化を認めなかったが、1,000×g沈殿物では身体拘束群で60分においてCx43タンパク量が低下していることが分かった。一方、Cx43 mRNAレベルに変化は認めなかった。また、刺激伝導系に多く発現しているCx40やCx45のタンパク量やリン酸化状態は身体拘束中変化しなかった。

3. 身体拘束60分でCx43発現が介在板上で増加し細胞間情報伝達 (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、身体拘束により介在板で増加した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、身体拘束60分の心筋におけるGJIC活性をdye transfer assayにより検討した結果、約2.5倍上昇していたことから、身体拘束という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。

4. 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

1. で述べたように、身体拘束に加えて GJ 阻害剤である carbenoxolone (CBX)を投与すると、約 21%のラットで致死性不整脈が惹起された。またこのとき GJIC 活性を調べると、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することが示された。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。

以上、本論文は、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ー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を得ている。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を明らかにした。また、身体拘束時に不整脈による心臓性突然死が惹起され得るという 1つの可能性を示した。本研究は、これまで未知に等しかった興奮者の身体拘束時の突然死の機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。