

# 致死性心室性不整脈の発生基盤の解明と新しい治療法（薬）の開発 —心筋細胞介在板の異常を中心として—

九州大学病院 きらめきプロジェクト キャリア支援センター  
特任准教授 大草 知子

(共同研究者)

山口大学大学院 医学系研究科器官病態内科学 臨床助教 中島 唯光

## はじめに

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は adhesion junction (AJ) (adherens junctionとデスモゾーム) 及びギャップ結合 (GJ) で構成されている。GJは細胞間の興奮刺激伝播の調節を行い、収縮の協調性を維持している。GJ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、細胞間の機械的結合の調節を行う。adherens junction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) により構成されている。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プラコフィリン (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はなく、GJの形成や崩壊に重要な役割を果たしている<sup>(1,2)</sup>。我々は、心不全発現過程では、AJ蛋白の変化がCx43 GJの変化に先行し、IDリモデリングが不整脈の発生に関与していることを報告した<sup>(3)</sup>。さらに、心筋デスモゾーム蛋白の遺伝子異常は、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) を引き起こすことが報告され<sup>(4)</sup>、家族性ARVCの関連遺伝子異常は、デスモゾーム蛋白PKP2をコードする遺伝子であることも知られている<sup>(5)</sup>。一方、心筋細胞の高頻度電気刺激 (RES)、いわゆる頻脈状態での心筋細胞GJとAJの変化についての報告は無い。

本研究では、心筋細胞へのRES負荷が介在板構成蛋白にどのような質的・量的変化を及ぼすかを検討した。新生仔ラットの培養心筋細胞を用い、RES負荷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 $\beta$ カテニン) とCx43の変化を解析した。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。以前我々は、RESモデルを用いて、Cx43発現量増加は、RESにより心筋細胞から産生されたアンジオテンシンIIがMAPKを活性化した結果であることを明らかにしている<sup>(6)</sup>。本研究では、心筋細胞の介在板構成蛋白発現量のRESに対する経時的変化を検討した。

## 結 果

### 1) Cx43発現に対するRESの影響

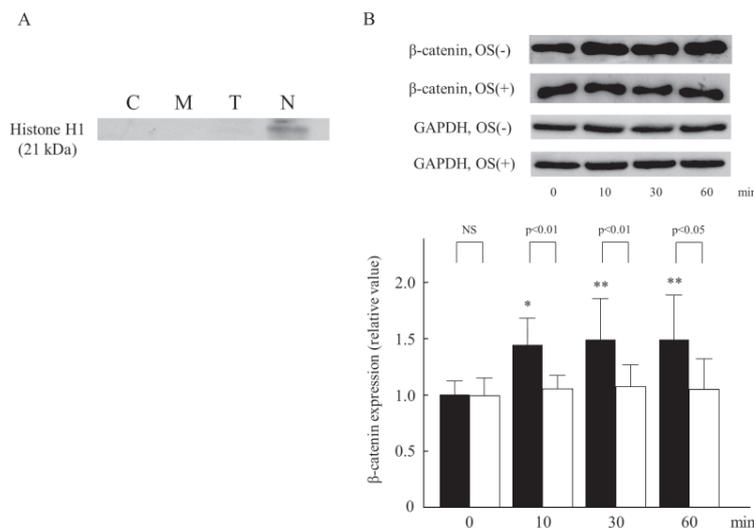
RES60分負荷後、Cx43の細胞膜上での発現量が均一に増強した。その分布パターンは不変であった。Cx43 mRNAの発現量も、RES60分負荷後より有意に増加した。Cx43蛋白量はRES負荷後、徐々に増加し、60分でその増加は有意であった。

### 2) $\beta$ カテニンの発現に対するRESの影響

RES60分負荷後に $\beta$ カテニンの細胞膜上での発現量が均一に増強した。興味深いことに、核内 $\beta$ カテニン発現量はRES負荷10分後より増加した。細胞分画全体の $\beta$ カテニン蛋白量はRES30分負荷後より増加した（30分で $1.5 \pm 0.3$ 倍、60分で $1.5 \pm 0.3$ 倍。0分と比較して $p < 0.05$ ）。

### 3) 核内 $\beta$ カテニン発現量に対するRESの影響

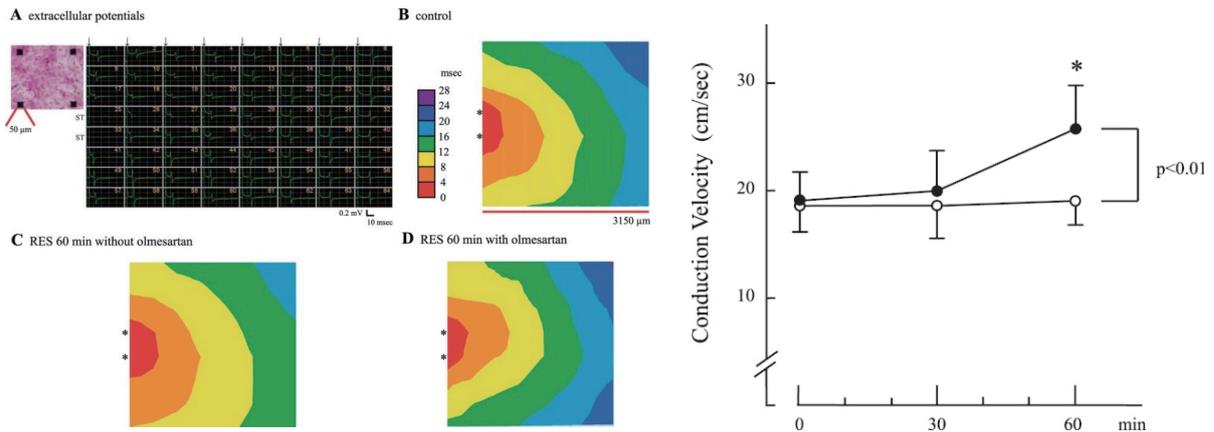
核内の $\beta$ カテニンはTCF/LEF転写活性化因子として働き、またCx43はTCF/LEF標的遺伝子の1つとして知られている。核分画 $\beta$ カテニン発現量を調べた。興味深いことに、核内 $\beta$ カテニン発現量はRES10分負荷後より著しく増加した（下図）（10分後に $1.4 \pm 0.2$ 倍。0分と比較して $p < 0.05$ ）。



### 4) 興奮伝播速度に及ぼす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の機能的変化の検討を行った。興奮時間の等時線図では、左から右へのほぼ均一な興奮の伝播がRES前とRES60分後に見られた。RES後の興奮時間は、コントロールに比べてはるかに短く、RESによる興奮伝播速度の増加が判明した。興奮伝播速度の測定結果を下図に示す。オルメサルタン非添加時には、RES60分負荷後の伝播速度 ( $25.7 \pm 4.0$  cm/sec) はコントロール ( $19.1 \pm 4.0$  cm/sec、 $p < 0.05$ ) に比べ有意に高値であった。オルメサルタン添加時には、RES60分負荷後の値 ( $19.0$

± 1.7 cm/sec)はコントロールと比較して変化はなかった(18.5 ± 2.4 cm/sec)。(下図)

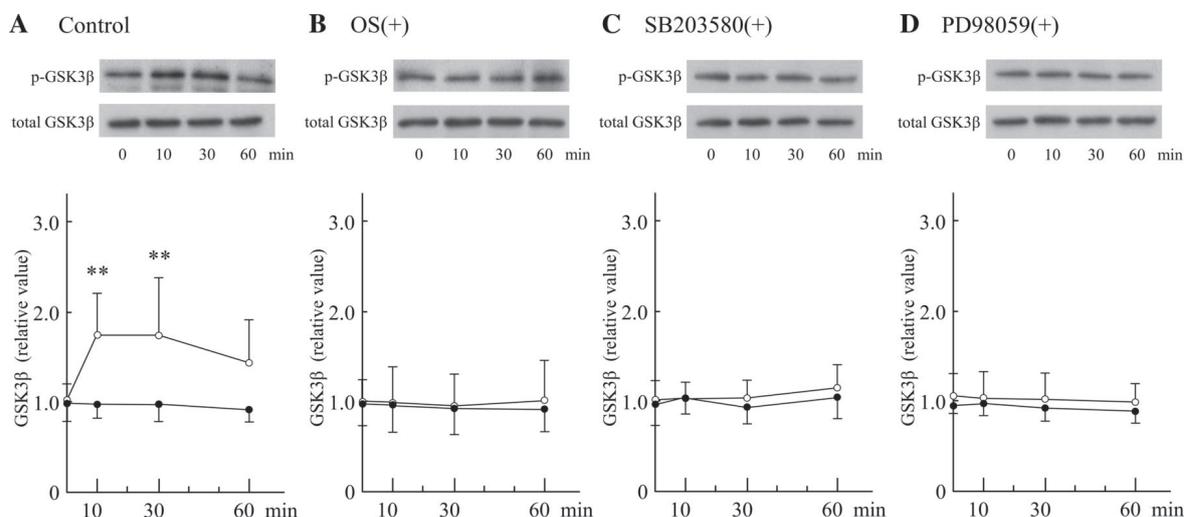


### 5) グリコーゲン合成酵素キナーゼ3β (GSK3β) に対するRESの影響

Wnt/ $\beta$ 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GSK3 $\beta$ を検討した。GSK3 $\beta$ は活性化MAPKによりリン酸化され、 $\beta$ カテニンの分解を阻害することが知られている。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<sup>(6)</sup>。RESによるGSK3 $\beta$ 全体の変化はなかったが、リン酸化GSK3 $\beta$  (p-GSK3 $\beta$ )はRES10分負荷後に有意に増加した(2.0 ± 0.4倍、0分と比較してp < 0.01)。これらの結果は、RES負荷によりMAPK活性化が生じ、p-GSK3 $\beta$ が増加したと考えられた。

### 6) オルメサルタン、MAPK阻害剤添加時のRESによる $\beta$ カテニン/Cx43発現増加とp-GSK3 $\beta$ 発現量増加の阻害

$\beta$ カテニン増加が、RESの結果、MAPKが活性化され、P-GSK3 $\beta$ による $\beta$ カテニン分解の阻害によるものであれば、RES誘発性のGSK3 $\beta$ リン酸化と $\beta$ カテニン/Cx43の増加は、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。ベースラインのCx43と $\beta$ カテニンレベルは、100nmol/Lオルメサルタン処理により影響を受けなかった。



免疫組織化学染色では、オルメサルタン存在下でRES60分間負荷したとき、Cx43及び $\beta$ カテニン陽性面積に有意な変化は生じなかった。オルメサルタン存在下でのRES60分間負荷は、細胞分画全体及び核分画の両方におけるCx43 mRNA、Cx43蛋白及び $\beta$ カテニン発現量を有意に増加させた。さらにRES60分間負荷した心筋細胞では、伝導速度の増加がオルメサルタンにより減弱した。興味深いことに、RES10分間負荷後のp-GSK3 $\beta$ の増加は、オルメサルタンによって消失した。以上の結果は、RESによる $\beta$ カテニン/Cx43増加とp-GSK3 $\beta$ 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証明した。

## 考 察

本研究の新たな知見は、RESが心筋細胞間構成蛋白の変化を惹起すること、ならびに心筋細胞 $\beta$ 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という点である。アンジオテンシンIIタイプ1受容体の阻害は、Wnt/ $\beta$ カテニンシグナル伝達系の一部を介した細胞間結合リモデリングの制御に重要な役割を果たしていると考えられる。核内 $\beta$ 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質、いわゆるゆ介在板リモデリングを調節し、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。

### 1) 介在板リモデリングと催不整脈性について

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<sup>(7)</sup>。病的心筋細胞では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<sup>(8)</sup>、AJリモデリングは不整脈基質の重要な因子の一つである。培養心筋細胞のGJとAJに関する幾つかの研究から、介在板のAJ形成にGJが必ずしも必要でないことが報告されている<sup>(2)</sup>。さらにGutsteinらは、AJと他に心筋細胞介在板蛋白の構築にGJが必要でないことも報告している<sup>(9)</sup>。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<sup>(2)</sup>。しかし、心筋細胞のGJとAJの関係、特に病的状態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ある。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<sup>(10)</sup>。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<sup>(11)</sup>。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<sup>(12)</sup>。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

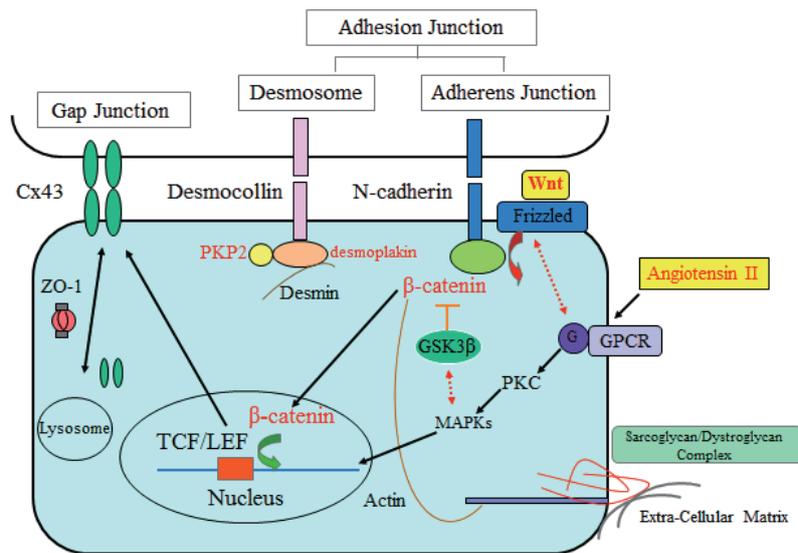
にしている<sup>(3)</sup>。UM-X7.1心筋症ハムスターモデルを用いた我々の研究から、 $\beta$ カテニンAJ蛋白の変化がCx43 GJの変化に先行すること、心不全の発生時には介在板リモデリングが心室性不整脈発生に寄与すること、またアンジオテンシンIIタイプ1受容体阻害剤が介在板リモデリングを調節することで致死性不整脈に対する新たなアップストリーム治療薬となり得ることを明らかにしている<sup>(3)</sup>。さらに我々は、培養心筋細胞を用いたin vitroの実験で、短時間のRESにより、心筋細胞から産生されたアンジオテンシンIIがERKとp38 MAPKsを活性化させることを報告した。その結果、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<sup>(6)</sup>。我々のこれまでの報告に基づき、本研究では、RES負荷により、心筋細胞の $\beta$ カテニンおよびCx43蛋白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、 $\beta$ 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、 $\beta$ カテニンの増加がCx43 GJリモデリングに先行し、それにより短時間のRES負荷にある心筋細胞では、容易に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 $\beta$ カテニンの変化が先行することは、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、並びに従来の報告に基づき<sup>(3,5,10,11)</sup>、 $\beta$ 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。

## 2) RES負荷による $\beta$ 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について

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<sup>(13)</sup>。特に $\beta$ 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シグナル伝達系にも関わる<sup>(14)</sup>。特徴が最も明らかにされているWntシグナル伝達経路は、Wnt/ $\beta$ カテニン経路である<sup>(15)</sup>。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 $\beta$ 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<sup>(16)</sup>。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シグナル伝達が障害された病的状態では、 $\beta$ カテニンがユビキチン化され、プロテオーム内でGSK-3 $\beta$ により分解される<sup>(17)</sup>。GSK-3 $\beta$ は蛋白合成の負の調節因子であり、Wnt/ $\beta$ カテニン系のダウンレギュレーションを起こす<sup>(18)</sup>。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 $\beta$ カテニンの発現量がRES10分後より劇的に増加し、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- $\beta$ 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<sup>(3)</sup>。さらに、TCF/LEF転写因子を介する $\beta$ 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<sup>(19)</sup>。 $\beta$ 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 $\beta$ 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。

下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、GSK3βの調節を受けながら核内でTCF/LEF転写因子と結合し、転写を活性化する。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Gprotein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GSK3βとでクロストークが存在するという報告もある<sup>(17, 18, 19, 20)</sup>。



### 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カテニン発現量に及ぼす影響について

本研究ではオルメサルタンが培養心筋細胞の細胞間結合リモデリングを調節し、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詳細な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カテニン増加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<sup>(6)</sup>。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<sup>(17)</sup>。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<sup>(19)</sup>、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<sup>(18)</sup>。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-3 $\beta$ のリン酸化を減少させ、 $\beta$ 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-GSK3 $\beta$ - $\beta$ カテニンのシグナル伝達相互作用については、今後の研究が待たれるところである。

#### 4) 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 $\beta$ 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、 $\beta$ 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。

#### 要 約

心筋細胞間結合を担う介在板には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担い、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 $\beta$ 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、および培養心筋細胞の興奮伝播特性の解析には細胞外電位マッピングシステムを用いて検討した。心筋細胞のCx43蛋白発現量はRES負荷60分後に有意に増加した。細胞分画全体の $\beta$ カテニン発現量は30分後に有意に増加した。核内 $\beta$ 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 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )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。興奮伝播速度は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 $\beta$ 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、 $\beta$ カテニンの分解を阻害するが、リン酸化GSK3 $\beta$ の増加はオルメサルタンによって減弱することが判明した。RES負荷による $\beta$ カテニンの変化は、Cx43 GJのリモデリングに先行し、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、 $\beta$ カテニン情報伝達系を介して細胞間結合リモデリングを制御することにより、新たな不整脈のアップストリーム予防・治療薬になると思われる。

## 文 献

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Sen-Chowdhry S, Syrris P, McKenna WJ. Genetics of right ventricular cardiomyopathy. *J Cardiovasc Electrophysiol* 16: 927-935, 2005.
5. 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.
6. 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.
7. Akar FG, Tomaselli GF. Conduction abnormalities in nonischemic dilated cardiomyopathy: basic mechanisms and arrhythmic consequences. *Trends Cardiovasc Med* 15: 259-264, 2005.
8. 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.
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. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
  14. Dale TC. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J* 329: 209-223, 1998.
  15. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810, 2004.
  16. 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.
  17. Kikuchi A. Regulation of  $\beta$ -catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 243-248, 2000.
  18. Hardt SE, Sadoshima J. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ : a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res* 90: 1055-1063, 2002.
  19. Garcia-Gras E, Lombardi R, Giocondo MJ, Willerson JT, Schneider MD, Khoury DS, Marian AJ. Suppression of canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest* 116: 2012-2021, 2006.
  20. 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  $\beta$  inactivation. *Science* 320: 667-670, 2008.