

物質輸送における細胞間連携の重要性： 心臓組織および内耳血管条組織を例として

Physiological significance of intercellular communication mediated by tissue-specific membrane transport systems : insights from heart and inner-ear tissues

安藤 元紀
Motonori Ando

岡山大学大学院教育学研究科・自然教育学系理科教育講座・細胞生理学研究室
Laboratory of Cell Physiology, Department of Science Education, Division of Natural Science Education, Graduate School of Education, Okayama University

Summary

Intercellular communication has been recognized in various multicellular organisms, and has been implicated in a variety of those functions and dysfunctions. This review focuses on the intercellular communication mediated by tissue-specific membrane transport systems in rodent heart and inner-ear tissues. In the heart tissue, vagal nerve stimulation exerts antiarrhythmic effects during acute myocardial ischemia accompanied by prevention of the loss of gap-junction-mediated intercellular communication. This preserved function may improve ischemia-induced electrical instability of the heart. In the inner-ear tissue, the cochlear stria vascularis produces the positive endocochlear potential and high K^+ endolymph. The highly organized tissue structure and the membrane transport system in the stria vascularis contribute to the maintenance of the unique characteristic of the extracellular fluid. These studies indicate that tissue-specific functions depend on their structural and physiological integrity related to membrane transport systems.

1. はじめに

多細胞生物における統合的な生理機能において、細胞どうしのコミュニケーションは重要な役割を果たす。特に、外部環境の変化に対応した急性期の生体反応には、細胞膜に存在する膜輸送体を介した物質輸送機構が関係しており、その機能の破綻は深刻な病態を引き起こす。本稿では、著者がこれまでに携わってきた研究課題の中で齧歯目の心臓組織と内耳組織を実例として、組織特異的な機能の発現にはそのユニークな解剖学的構造と細胞間の巧妙な連携のしくみが関わっていることについて紹介する。

2. 心臓組織における細胞間連携

2-1. 迷走神経刺激による抗不整脈作用

近年、重篤な心疾患における病態進行や致死性不整脈発生に循環器系の神経性調節の破綻が関わっていることが明らかとなってきた (Li et al. 2004)。迷走神経の電気刺激により心筋梗塞急性期に誘発される致死性不整脈の発生頻度が抑制されること、その作用機序は細胞間連絡に関与するギャップ結合タンパク質の迷走神経刺激による発現調節であること、について報告する (Ando et al. 2005)。

ラット左冠状動脈起始部の結紮により、急性期の心筋虚血 (MI) 動物を作製し、迷走神経刺激群 (MI-VS)、偽刺激群 (MI-SS)、コントロール群 (偽手術-偽刺激, SO-SS) に分けた。神経刺激は頸部にて右迷走神経を切断後末梢側のみに入力した。その刺激強度は心拍数が 10% 低下する程度に調整した。心筋虚血時に誘発される致死性不整脈の

発生頻度を調べたところ、MI-SS 群では 67% の動物で頻脈性不整脈 (VT) が発生したのに対し、MI-VS 群でのそれは 9% のみであったその抗不整脈作用はアトロピンでブロックされた (Fig. 1)。

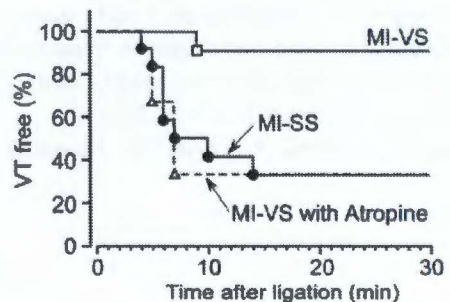


Fig. 1. Incidence and onset of the first ventricular tachyarrhythmia (VT) after the left coronary artery ligation. Myocardial ischemia rats treated with sham stimulation (MI-SS) or with vagal stimulation (MI-VS). (Modified from Ando et al. 2005)

心筋虚血時の不整脈発生機序としては、虚血部位の ATP 枯渇により一連の膜輸送分子の連携が障害され局所的な興奮の伝導遅延が起こりリエントリー性の心室性頻拍が誘発される、と説明されている。これら膜輸送分子の中で、心室に大量に発現しているギャップ結合タンパク質ファミリーの 1 つであるコネキシン 43 (Cx43) の機能障害が致死性不整脈の発生機序に関わっていることが示唆された。Cx43 のヘテロノックアウトマウス (Cx43^{-/-}/Cx43^{-/-}) に心筋梗塞を作成すると野生型に比べて心室性頻拍の発生率が 3 倍に増加すること (Lerner et al. 2000)、加えてコンディショナル

ノックアウトマウス (Cx43^{-/-}/Cx43^{-/-}) では電気活動の伝導速度が有意に低下することが報告された (Gutstein et al. 2001)。そこで、迷走神経刺激の有無と Cx43 タンパク質発現との関連を免疫組織化学法により調べた (Fig. 2)。SO-SS 群では介在板に一致して Cx43 の陽性シグナルが観察された。MI-SS 群では陽性シグナルが著しく減弱しているのに対して、MI-VS 群では SO-SS 群と同様に介在板に局在して陽性シグナルが観察された。ウエスタンブロット法により Cx43 の発現量の変化についても検討し、免疫組織化学法による結果と矛盾しないことを確認した。



Fig. 2. Representative confocal images probed with anti-Cx43 antibody in left ventricles. Positive immunoreactive signals were concentrated in discrete dots at sites of intercellular apposition. Sham-operated rats treated with sham stimulation (SO-SS), myocardial ischemia rats treated with sham stimulation (MI-SS) or with vagal stimulation (MI-VS). (Modified from Ando et al. 2005)

虚血モデル動物を用いた実験から、迷走神経の電気刺激により虚血心において減少するギャップ結合タンパク質 Cx43 の発現量が保存されることを明らかにした。この結果から、虚血心の電氣的興奮の伝導異常 (電氣的リモデリング) が迷走神経刺激により劇的に改善していることが予想された。

2-2. 心筋細胞間連携の調節機構

迷走神経刺激の作用機序を解明するため、ラット心室より心筋細胞を急性単離し初代培養を行った。迷走神経の神経伝達物質であるアセチルコリン (ACh) によるギャップ結合タンパク質および細胞生存シグナルの発現調節の有無を検討した。動物実験系における左冠状動脈結紮による心筋虚血の誘発刺激に対応させるため、培養実験系では CoCl₂ による化学的低酸素負荷刺激を用いた。

ACh により Cx43 の発現量が保存されることが判明し、低酸素条件下においても心筋細胞どうしの細胞間連携機能が正常に維持されていることが予想された。そこで、Lucifer Yellow 細胞内注入法により、低酸素負荷による細胞間連絡への影響を調べた。コントロールでは色素注入細胞から周辺細胞への色素の拡散が確認された (Fig. 3A)。化

学的低酸素負荷条件下 (CoCl₂) では色素は注入細胞に留まったのに対して (Fig. 3B), ACh の添加により周辺細胞への色素の拡散が生じた (Fig. 3C, ACh-CoCl₂)。この効果はアトロピンでブロックされた (Fig. 3D, ACh-Atr-CoCl₂)。ACh 単独投与では色素の拡散と自発収縮による同期性が著しく増強された (Fig. 3E)。心筋細胞初代培養系においても、虚血モデル動物を用いた迷走神経刺激に相当する効果を再現することができた。

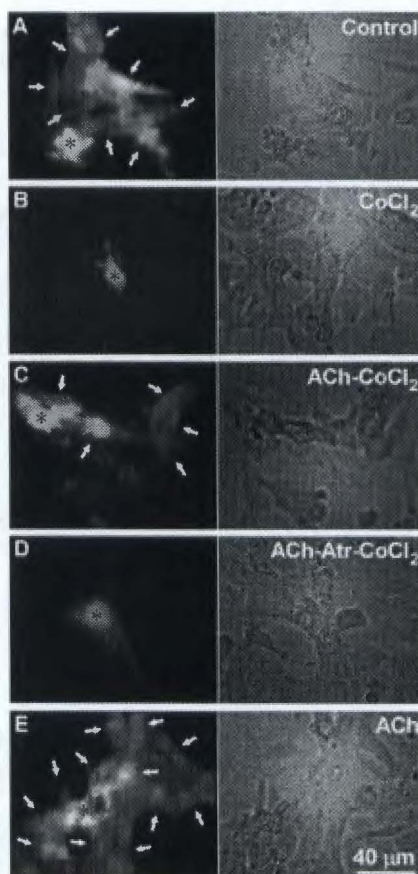


Fig. 3. Lucifer Yellow dye transfer assay in primary cultured cardiomyocytes. Each panel consists of fluorescent and transmission-light micrographs. Asterisks, dye-injected cells. Arrows, coupled neighbors. (Modified from Ando et al. 2005)

ACh の培養上清への添加により細胞生存シグナルの一つと考えられている Akt (protein kinase B) のリン酸化 (P-Akt) が誘導されることがわかった。ACh により誘導される Akt のリン酸化作用が、wortmannin (PI3K inhibitor) でブロックされることから (Fig. 4A), ACh から始まるシグナル伝達系が、細胞生存シグナルの一つである PI3K/Akt 系を介することが示唆された。また ACh の作用により、低酸素誘導型転写因子 (HIF-1 α) の発現が誘導されることがわかった (Fig. 4B)。

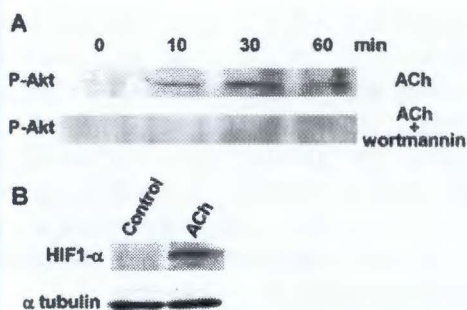


Fig. 4. ACh-induced phosphorylation of Akt (A) and ACh-induced expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α (B) in cultured cardiomyocytes.

AChによるCx43の保存効果が、その合成系に関係するのか、あるいは分解系に関係するのかを明確にするために、低酸素負荷条件下の心筋細胞初代培養系にプロテアソーム阻害剤のMG132を添加したところ、30分の低酸素負荷にもかかわらずCx43の発現量が保存されることがわかった (fig. 5)。培養実験系においてAChによるCx43発現の保存効果が証明された。その効果はAChによるCx43の翻訳後修飾、すなわちタンパク質分解系の抑制作用によることが示唆された (Zhang et al. 2006)。Cx43の半減期は1時間以内でそのターンオーバーは非常に速いとするこれまでの報告とも矛盾しない (Beardslee et al. 1998)。

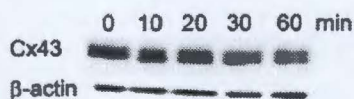


Fig. 5. Effect of MG132 on hypoxia-induced decrease of Cx43 expression in cultured cardiomyocytes.

上述した培養系から得られた結果を心臓に当てはめれば、虚血心におけるギャップ結合のダウンレギュレーション (電気的リモデリング) が迷走神経刺激により抑制されギャップ結合タンパク質が保存されることにより、心室における電気的興奮の伝導が正常に保たれる、と予想された。

2-3. 細胞工学的的手法による心筋リングの作成

単離心筋細胞における細胞間連絡の再構築の仕組みを解明するため、細胞工学的的手法を用いて心筋細胞初代培養系から心筋リングを作成した。持続的な伸展刺激を加えることにより、リング全体が同期して収縮・弛緩を繰り返す自動興奮性を獲得した (Fig. 6)。透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、心筋細胞と線維細胞の間にギャップ結合様構造が形成されていることがわかった (Fig. 7)。再同期のしくみは線維細胞を仲立ちとしたギ

ャップ結合を介する間接的な心筋細胞どうしの電気的ネットワークの再構築によることが示唆された (Katare et al. 2010a)。

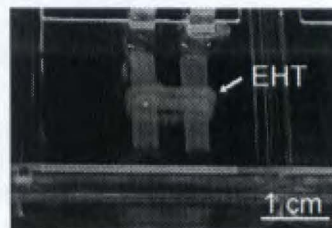


Fig. 6. Engineered heart tissues (EHTs) after transfer in a stretch device to culture under cyclic stretch.

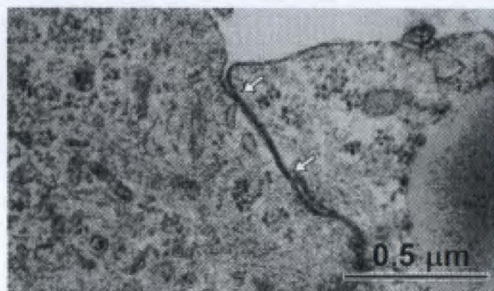


Fig. 7. Ultrastructural relationship between cultured cardiomyocytes and fibrocytes in engineered heart tissue. Arrows, gap junction structure.

2-4. 今後の展開

迷走神経刺激による心筋組織の保護作用は、アセチルコリンによる細胞間連絡の制御と細胞生存シグナルの増強作用に等しいことが明らかとなった。古典的の神経伝達物質であるアセチルコリンが細胞生存シグナルの増強作用を有することは、その後の研究の進展に大きな影響を与えた。コリンエステラーゼ阻害剤の一つである塩酸ドネペジル (認知症治療薬) により、心不全動物の長期予後が改善されることが判明した (Handa et al. 2009)。加えて、塩酸ドネペジルを服用している認知症患者と服用していない患者を比較すると、服用患者では心筋梗塞や狭心症などの発症率が有意に低下することが報告された (Sato et al. 2010)。細胞生存シグナルの増強作用はTNF- α およびTNF受容体の調節を介することも示唆されている (Katare et al. 2010b)。心不全に対する新たな治療戦略として大きな期待が寄せられている。

3. 内耳組織における細胞間連携

3-1. 内耳血管条におけるイオン輸送機構

哺乳類内耳血管条は、エネルギーを大量に消費しながら腎臓に匹敵する活発なイオン輸送を行い、内リンパ直流電位 (endocochlear DC potential,

EP) (+80 mV) の生成および内リンパ産生 (150 mM K^+) に中心的な役割を果たしている (Fig. 8)。この内リンパ液の特徴は聴覚機能の発現に必要な不可欠で、血管条の機能不全は直ちに難聴を引き起こす。

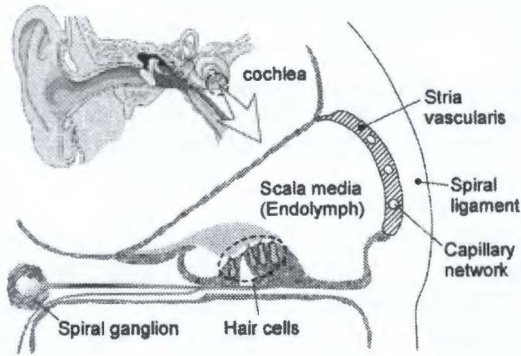


Fig. 8. Diagram of a cochlear cross section. The scala media is filled with the endolymph. The stria vascularis produces the endocochlear DC potential and the high K^+ endolymph.

血管条は、辺縁細胞 (marginal cell), 中間細胞 (intermediate cell), 基底細胞 (basal cell), 血管構成細胞から成る (Fig. 9)。辺縁細胞どうし、および基底細胞どうしは密着結合により、内リンパ液と外リンパ液を分断する障壁として機能している。

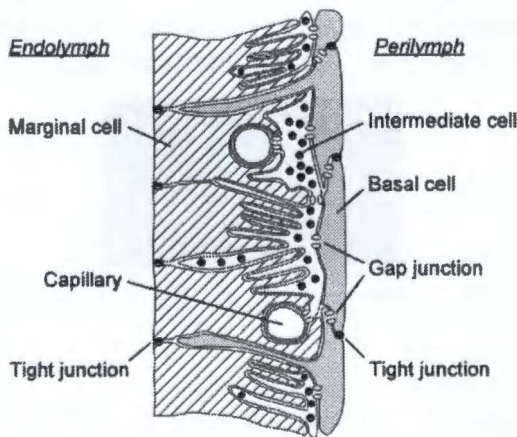


Fig. 9. Diagram of the stria vascularis. The stria vascularis consists of epithelial marginal cells, intermediate cells, basal cells, and capillary constituting cells. The interior of the stria vascularis (intrastrial space) is isolated by two distinct cell sheets connected by tight junctions; one sheet is the marginal cell layer, and the other is the basal layer.

著者らはこれまでに、血管条における構成細胞どうしの連携に着目した一連の細胞生理学的研究を行ってきた。中間細胞に内向き整流性 K^+ チャン

ルが存在し EP の薬剤感受性と類似した特徴を有していること (Takeuchi and Ando 1998b; Takeuchi et al. 2000), およびその候補となる K^+ チャンネル (Kir4.1) が中間細胞に発現していること, を報告した (Fig. 10) (Ando and Takeuchi 1999)。中間細胞が EP の生成と血管条内での K^+ の輸送に重要な役割を果たしていることが示唆された (Takeuchi et al. 2000; Kakigi et al. 2002)。

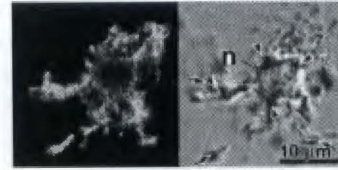


Fig. 10. Immunoreactivity for Kir4.1 in dissociated intermediate cells. This panel consists of an optical section of immunofluorescence (left) and a transmission light micrograph (right). Note pigment (arrowheads) and dendrite-like projections (arrows) of intermediate cells (n nucleus). (Modified from Ando and Takeuchi 1999)

血管条はその名の由来にもなった密な毛細血管網を有している (Fig. 11)。中間細胞に Lucifer Yellow を注入したところ, 他の中間細胞や基底細胞に加えて, 血管構成細胞にまでその色素が拡散することがわかった (Takeuchi and Ando 1998a)。EP 生成に関わる中間細胞と毛細血管網がギャップ結合で連絡していることが示唆された。血管条の生理機能は, そのユニークな組織構築と密接に関係していると考えられた (Ando and Takeuchi 1998; Ando et al. 1999; Takeuchi et al. 2001)。

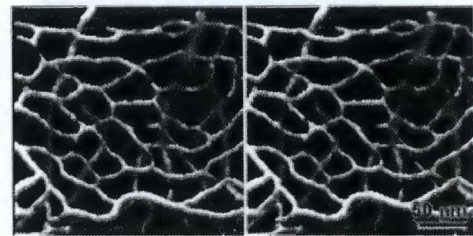


Fig. 11. Three-dimensional observation of the vascular networks in the lateral wall of the rat cochlea duct. A stereo pair of confocal fluorescent images of capillary networks labeled with blue Mercox resin. To obtain a stereo image, view the left panel with the left eye and the right panel with the right eye at a distance of 30 cm. (Modified from Edamatsu et al. 2012)

3-2. 内耳血管条における糖輸送機構

血管条辺縁細胞は, その基底側膜に発現している $Na^+-K^+-ATPase$, $Na^+-K^+-2Cl^-$ cotransporter, Cl^- channel によりエネルギーを大量に消費しながら

活発なイオン輸送を行い、中間細胞との連携により EP の生成と K^+ の輸送に関与している (Takeuchi et al. 1997; Ando and Takeuchi 2000; Takeuchi et al. 2000)。辺縁細胞は、エネルギー要求性の高い心筋細胞や脳神経細胞と同様に、虚血に対して極めて脆弱であることがわかった (Ando et al. 2002)。グリコーゲンなどのエネルギー源の貯蔵も少ないことから、そのエネルギー供給システム (糖輸送経路) の解明が重要となるが、その全体像は未だ明らかとなっていない。一般に、糖輸送体としては、促進拡散型のグルコース単輸送体 (GLUT) と二次性能動輸送体の Na^+ /グルコース共輸送体が知られている。著者らは生理学的実験から血管条における主なグルコース取り込み機構は GLUT 型の可能性が高いことを既に報告している (Takeuchi and Ando 1997)。

GLUT 型については現在までに 13 のアイソフォームが同定されているが、血管条では GLUT1 が報告されているのみである (Ando et al. 2008)。基底細胞と血管が GLUT1 陽性で、辺縁細胞は GLUT1 陰性であることがわかった (Fig. 12)。

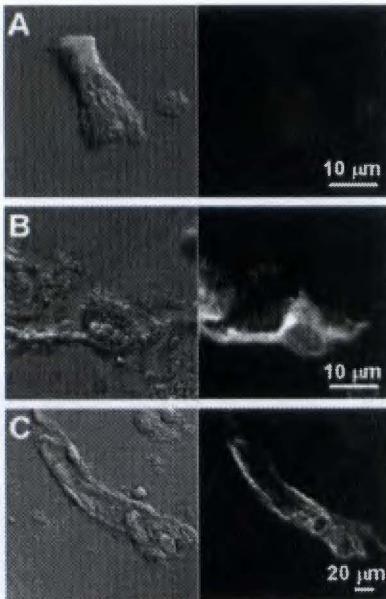


Fig. 12. Immunoreactivity for GLUT1 in dissociated stria cells. Marginal cell (A), basal cell (B), strip of capillary (C). The scala media is filled with the endolymph. Each panel consists of a transmission light micrographs (left) and an optical section of immunofluorescence (right). (Modified from Ando et al. 2008)

そこで、GLUT gene family について網羅的な遺伝子解析を行ったところ、GLUT1 を含めて 8 つの遺伝子アイソフォームの発現が確認された (Fig. 13) (Edamatsu et al. 2011)。現在、各アイソフォームの局在を解析中である。

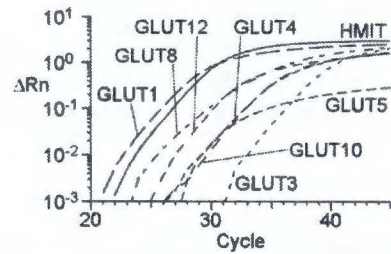


Fig. 13. Representative real-time PCR amplification plots for the GLUT isoform genes in the stria vascularis. (Modified from Edamatsu et al. 2011)

3-3. 今後の展開

血管条において 8 つの糖輸送体遺伝子の発現が確認された。このことは、血管条組織の極めて高い代謝活性を維持するためだけでなく、一過性の血流障害など急性期の病態に対応するための調節性の糖輸送機構の存在を示唆する。また、血管条において HMIT (GLUT13) の発現が初めて確認された。HMIT は GLUT 型に属するがその糖輸送活性は低く、実質的には H^+ と *myo*-inositol の共輸送体で、辺縁細胞および基底細胞に局在していることがわかった (fig. 14)。pH および浸透圧調節に関与する可能性が高く、内耳液性制御機構に重要な役割を果たしていると予想される。

内耳における物質輸送機構を明らかにすることはその正常機能の理解に留まらず、メニエル病や新たな遺伝性難聴の解明につながる可能性が高い。聴覚機能障害の解明および病態の原因究明は超高齢化社会を目前にした我が国の喫緊の課題である。



Fig. 14. Immunoreactivity for HMIT in the stria vascularis.

4. おわりに

心臓組織と内耳組織を実例として、細胞間の物質輸送や情報伝達の連携のしくみについて紹介した。組織特異的な生理機能を理解するためには、個々の細胞に発現している膜輸送体分子の同定だけでなく、その組織構築や高次構造など細胞どうしの連携のしくみに着目した解析を進める必要がある。今後も、生体の構造と機能の連関に着目した研究を進めて行く予定である。尚、本稿で紹介した関連論文のデータベースへのリンク、研究室全体の活動を含めて、ホームページにて公開している。以下 URL を参照されたい。

研究室 URL : http://ed-www.ed.okayama-u.ac.jp/~rika/cell_physiology/index.html

5. 参考文献

- Ando M, Takeuchi S (1998). Postnatal vascular development in the lateral wall of the cochlear duct of gerbils: quantitative analysis by electron microscopy and confocal laser microscopy. *Hear Res*, 123, 145-156.
- Ando M, Takeuchi S (1999). Immunological identification of an inward rectifier K^+ channel (Kir4.1) in the intermediate cell (melanocyte) of the cochlear stria vascularis of gerbils and rats. *Cell Tissue Res*, 298, 179-183.
- Ando M, Takeuchi S (2000). mRNA encoding 'ClC-K1, a kidney Cl^- channel' is expressed in marginal cells of the stria vascularis of rat cochlea: its possible contribution to Cl^- currents. *Neurosci Lett*, 284, 171-174.
- Ando M, Kakigi A, Takeuchi S (1999). Elongated pericyte-like cells connect discrete capillaries in the cochlear stria vascularis of gerbils and rats. *Cell Tissue Res*, 296, 673-676.
- Ando M, Edamatsu M, Fukuizumi S, Takeuchi S (2008). Cellular localization of facilitated glucose transporter 1 (GLUT-1) in the cochlea stria vascularis: its possible contribution to the transcellular glucose pathway. *Cell Tissue Res*, 331, 763-769.
- Ando M, Takeuchi S, Kakigi A, Raicu V, Yagyu K, Sato T (2002). Acute ischemia causes 'dark cell' change of strial marginal cell in gerbil cochlea. *Cell Tissue Res*, 309, 229-235.
- Ando M, Katare RG, Kakinuma Y, Zhang D, Yamasaki F, Muramoto K, Sato T (2005). Efferent vagal nerve stimulation protects heart against ischemia-induced arrhythmias by preserving connexin43 protein. *Circulation*, 112, 164-170.
- Beardslee MA, Laing JG, Beyer EC, Saffitz JE (1998). Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res*, 83, 629-635.
- Edamatsu M, Kondo Y, Ando M (2011). Multiple expression of glucose transporters in the lateral wall of the cochlear duct studied by quantitative real-time PCR assay. *Neurosci Lett*, 490, 72-77.
- Edamatsu M, Hishikawa S, Kondo Y, Ando M (2012). Three-dimensional observation of the vascular networks and functional proteins in the cochlear stria vascularis using a non-corroded casting method combined with an immunohistochemical analysis. *Bioimages*, 20:9-15.
- Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman GI (2001). Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res*, 88, 333-339.
- Handa T, Katare RG, Kakinuma Y, Arikawa M, Ando M, Sasaguri S, Yamasaki F, Sato T (2009). Anti-Alzheimer's drug, donepezil, markedly improves long-term survival after chronic heart failure in mice. *J Card Fail*, 15, 805-811.
- Kakigi A, Takeuchi S, Ando M, Higashiyama K, Azuma H, Sato T, Takeda T (2002). Reduction in the endocochlear potential caused by Cs^+ in the perilymph can be explained by the five-compartment model of the stria vascularis. *Hear Res*, 2002, 166, 54-61.
- Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Sato T (2010a). Engineered heart tissue: a novel tool to study the ischemic changes of the heart in vitro. *PLoS One*, 5, e9275.
- Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Yamasaki F, Sato T (2010b). Differential regulation of TNF receptors by vagal nerve stimulation protect heart against acute ischemic injury. *J Mol Cell Cardiol*, 49, 234-44.
- Lerner DL, Yamada KA, Schuessler RB, Saffitz JE (2000). Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx43-deficient mice. *Circulation*, 101, 547-552.
- Li M, Zheng C, Sato T, Kawada T, Sugimachi M, Sunagawa K (2004). Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation*, 109, 120-124.
- Sato K, Urbano R, Yu C, Yamasaki F, Sato T, Jordan J, Robertson D, Diedrich A. (2010). The effect of donepezil treatment on cardiovascular mortality. *Clin Pharmacol Ther*, 88, 335-338.
- Takeuchi S, Ando M (1997). Marginal cells of the stria vascularis of gerbils take up glucose via the facilitated transporter GLUT: application of autofluorescence. *Hear Res*, 114, 69-74.
- Takeuchi S, Ando M (1998a). Dye-coupling of melanocytes with endothelial cells and pericytes in the cochlea of gerbils. *Cell Tissue Res*, 293, 271-275.
- Takeuchi S, Ando M (1998b). Inwardly rectifying K^+ currents in intermediate cells in the cochlea of gerbils: a possible contribution to the endocochlear potential. *Neurosci Lett*, 247, 175-178.
- Takeuchi S, Ando M, Irimajiri A (1997). Changes in the volume of marginal cells induced by isotonic ' Cl^- depletion/restoration': involvement of the Cl^- channel and $Na^+-K^+-Cl^-$ cotransporter. *Hear Res*, 113:99-109.
- Takeuchi S, Ando M, Kakigi A (2000). Mechanism generating endocochlear potential: role played by intermediate cells in stria vascularis. *Biophys J*, 79, 2572-2582.
- Takeuchi S, Ando M, Sato T, Kakigi A (2001). Three-dimensional and ultrastructural relationships between intermediate cells and capillaries in the gerbil stria vascularis. *Hear Res*, 155, 103-112.
- Zhang Y, Kakinuma Y, Ando M, Katare RG, Yamasaki F, Sugiura T, Sato T (2006). Acetylcholine inhibits the hypoxia-induced reduction of connexin43 protein in rat cardiomyocytes. *J Pharmacol Sci*, 101, 214-222.