

論文の内容の要旨

論文題目

心筋興奮収縮連関における Ca^{2+} シグナル制御機構に関する研究
-L 型 Ca^{2+} チャネルと $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の生理機能と病態への関与-

氏 名

高松 肇

【背景】

カルシウムイオン (Ca^{2+}) は細胞内局所で時間・空間的に制御され、細胞の機能発現・生存・死に関わる重要なシグナルを担う。心臓の拍動にとって Ca^{2+} シグナルは必須である一方で、細胞内 Ca^{2+} シグナル制御系の破綻は不整脈や心不全などの疾患に至る。心筋細胞に発現している電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの開口とそれによって惹起されるリアノジン受容体を介した筋小胞体から細胞質への Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release: CICR) は心収縮力の発生において重要なキーステップとなっている (Fig.1)。CICR は Ca^{2+} シグナルを介して Ca^{2+} チャネルとリアノジン受容体の両者によって相互的に制御されている。この相互制御機構の破綻は心疾患の一因を担う。よって CICR の制御機構を明らかにすることは心臓の病態生理を理解する上で重要である。一方 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX) は起電性を有しており、 Ca^{2+} を両方向 (排出・流入) に輸送する。これまで NCX には特異的阻害剤がなかったため、その生理機能は不明であった。NCX は心肥大・心不全といった心疾患時に発現・機能の上昇が報告されており、 Ca^{2+} チャネルとリアノジン受容体の相互制御を調節している可能性が考えられる。NCX は虚血・再還流障害や異所性不整脈にも深く関わっており、創薬ターゲットとして期待できる。そこで本研究は、 Ca^{2+} チャネルとリアノジン受容体の相互制御機構と NCX の心筋興奮収縮連関における生理機能と疾患への関与を解明することを目的とした。

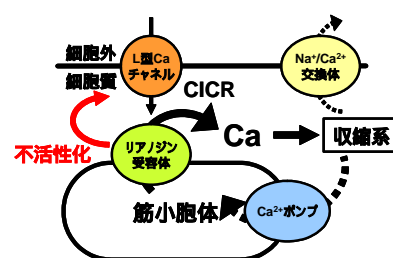


Fig.1 心筋細胞の収縮(実線)・弛緩(点線)における Ca^{2+} 動態

【結果】

1. 筋小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量のセンサーとしての Ca^{2+} チャネルの役割

CICRの引き金となる Ca^{2+} 電流は筋小胞体から放出された Ca^{2+} によって不活性化される(L型 Ca^{2+} チャネルの Ca^{2+} 依存性不活性化(Fig.1))。この負の制御機構の生理的役割は明らかでない。ラット単離心室筋細胞において筋小胞体の Ca^{2+} を枯渇し、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出を消失させることにより、 Ca^{2+} チャネルの Ca^{2+} 依存性不活性化が活動電位波形へ与える影響を検討した。筋小胞体の Ca^{2+} 枯渇によって Ca^{2+} 電流が形成する活動電位のプラトー層が約2倍に延長した(Fig.2a)。この

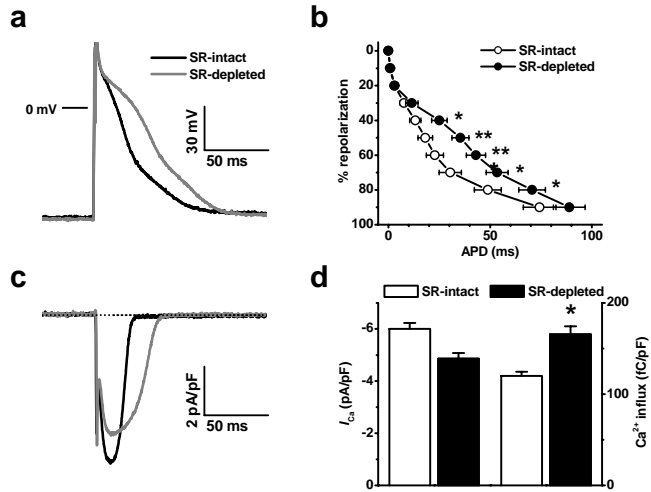


Fig.2 ラット単離心室筋細胞において測定した活動電位と Ca^{2+} 電流。 Ca^{2+} チャネルの Ca^{2+} 依存性不活性化を除くことによる活動電位の延長とそれによる総 Ca^{2+} 流入量の増加。*: $P < 0.05$ vs. SR-intact.

活動電位持続時間の変化は筋小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量に依存した Ca^{2+} transient の変化と相関した。この Ca^{2+} 依存性不活性化による活動電位持続時間の調節は細胞内に高濃度の Ca^{2+} キレート剤を適用しても消失しなかった。よって Ca^{2+} チャネルは Ca^{2+} 依存性不活性化を介して極めて近傍のリアノジン受容体からの Ca^{2+} 放出量、すなわち筋小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量を感じ、活動電位持続時間を調節していることを明らかにした。次に Ca^{2+} 依存性不活性化による活動電位持続時間の調節の生理的意義を検討するため、正常型および枯渇型それぞれの活動電位波形で電位固定したときの Ca^{2+} 電流を測定し、 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入量を算出した。筋小胞体枯渇前に正常型活動電位波形で電位固定した場合に比べて筋小胞体枯渇後に枯渇型活動電位波形で電位固定した場合には、電流ピークが減少したものの、活動電位中の総 Ca^{2+} 流入量が増加した(Fig.2c&2d)。また、このCICRによる Ca^{2+} 流入量の制御はPKA刺激によりCICRを亢進することで増強された。以上より、 Ca^{2+} チャネルはCICRによる Ca^{2+} 依存性不活性化を介して筋小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量を感じ、精密に活動電位持続時間を調節することで筋小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量に応じて活動電位中の総 Ca^{2+} 流入量を制御していることを明らかにした。

2. 心筋興奮収縮連関の制御因子としての $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の生理的役割

心筋興奮収縮連関におけるNCXの生理的役割を明らかにするため、野生型に比べてNCXのタンパク発現量およびその電流密度が約0.5倍のNCXノックアウトヘテロマウス(NCX(+/-))および約2倍の心臓特異的NCX過剰発現マウス(NCX(tg))の解析を行った。

NCX(+/-)では野生型に比べて Ca^{2+} 電流がわずかに減少しているにもかかわらず、大きな Ca^{2+} transient が観察され、CICR の効率が亢進していることが示された (Fig.3)。カフェイン投与により筋小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量を検討したところ、NCX(+/-)では筋小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量が野生型と比較して増加していた (Fig.4)。よって、CICR 効率の亢進は筋小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量の増加によることが示された。すなわち NCX の発現量の減少に伴って細胞外への Ca^{2+} 排出が減少した結果、筋小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量が増加したと考えられる。実際に、野生型において細胞外の Na^+ 濃度を下げることによって NCX による Ca^{2+} 排出活性を抑制して NCX(+/-)を模倣すると Ca^{2+} transient の増大が観察された。

NCX(tg)はわずかに心肥大を呈していた。CICR の指標として単離心室筋細胞の細胞収縮能を測定した。NCX(tg)では 0.5Hz で刺激した場合には野生型と収縮率に差がなかったが、2Hz に刺激頻度を上げると、野生型に比べて著しい収縮率の低下が観察された (Fig.5)。NCX の過剰発現が細胞外への Ca^{2+} 排出を増加させたために収縮率の低下に陥ったと考えられる。そこで細胞外 Na^+ 濃度を下げたところ、NCX(tg)における頻度依存的な収縮率の低下が改善した。また、マウスの心拍数は約 8Hz であることから、NCX(tg)では NCX 過剰発現により、心収縮力が低下していると考えられる。これを代償するために血中カテコラミン濃度が上昇し、心肥大に至ったのではないかと考え、血中ノルエピネフリン濃度を測定した。その結果、NCX(tg)では血中ノルエピネフリン濃度が顕著に上昇していた。このことから、NCX 過剰発現による収縮率の低下を代償するための交感神経の亢進が NCX(tg)における心肥大の一因を担うことが示唆された。以上のことから、生理的条件下では NCX は Ca^{2+} 排出が主な生理機能であり、CICR の効率を制御していること、および心不

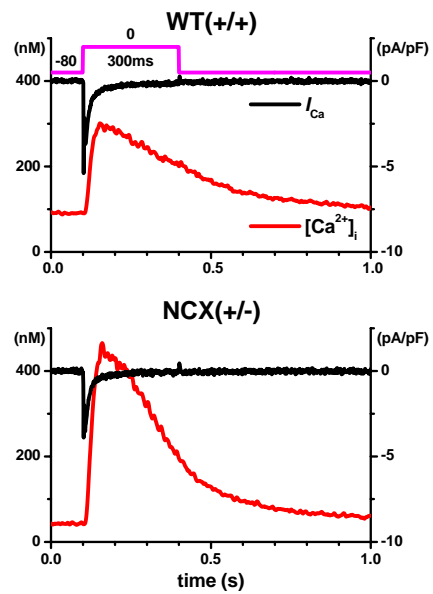


Fig.3 マウス単離心室筋細胞で測定した Ca^{2+} 電流 (黒線)とそれによって惹起された筋小胞体からの Ca^{2+} 放出 (グレー線) (右縦軸: 電流密度、左縦軸: Ca^{2+} 濃度)。

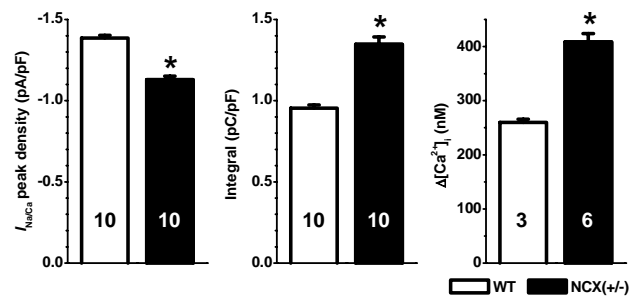


Fig.4 マウス単離心室筋細胞で測定したカフェイン投与による筋小胞体からの Ca^{2+} 放出とそれに伴って生じる内向き NCX 電流。電流の積分値と Ca^{2+} transient の大きさが筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵量を示す。*: $P < 0.05$ vs. WT.

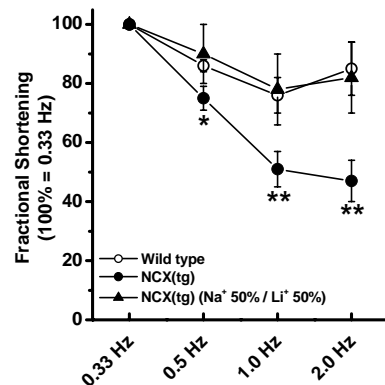


Fig.5 マウス単離心室筋細胞で測定した収縮率の頻度依存性。*: $P < 0.05$ **: $P < 0.05$ vs. WT.

全のような心疾患時に見られる NCX の過剰亢進は収縮不全の一因を担うことも明らかにした。

3. 活性酸素種を介した angiotensin II による NCX の活性化機構

心筋梗塞後のラット単離心室筋細胞では、心肥大から心不全への移行初期に NCX のタンパク発現量に変化はなかったにもかかわらず、NCX 活性が亢進していることを見出した。NCX は endothelin-1 や angiotensin II (AngII) といった心疾患と関わる液性因子によって活性化されるが、その細胞内分子機構に関してはほとんど報告されていない。そこで AngII が NCX を活性化する分子機構を薬理的に検討した。AngII で心筋細胞を刺激すると、NCX の電流・電圧曲線の傾きが大きくなり、NCX

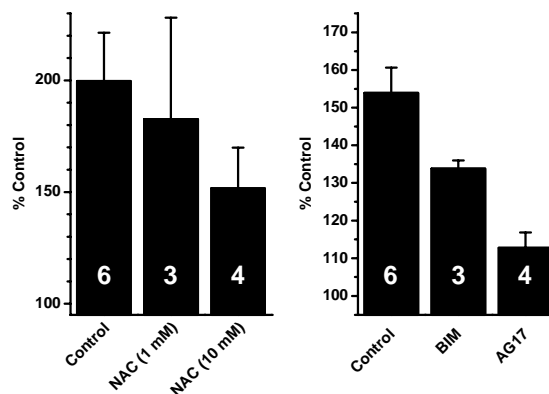


Fig.6 マウス単離心室筋細胞で測定した AngII 刺激による NCX 電流の増加に対する各種阻害剤の効果。BIM (10 μ M) は細胞外から、AG17 (10 μ M) はパッチ電極を介し、細胞内から処置した。

電流の逆転電位はマイナス側に約 10mV シフトし、NCX 電流は約 2 倍に増加した。よって、この電流増加は AngII の NCX に対する直接作用と Na⁺/H⁺ 交換体の活性化を介した細胞内 Na⁺ 濃度変化による間接的作用によることが示された。この AngII による電流増加作用は抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) の前処置によって濃度依存的に抑制された (Fig.6)。PKC 阻害剤である bisindolylmaleimide によっても NAC と同程度まで抑制された。また、非受容体型チロシンキナーゼの 1 種である proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) の阻害剤である AG17 は AngII による NCX 電流増加をほぼ完全に抑制した。以上のことから、AngII 刺激による NCX の活性化には PKC 活性化、活性酸素種の発生、チロシンキナーゼ活性化が関与していることが示唆された。

4. MAP キナーゼを介した Ca²⁺ 制御タンパク質の発現制御

心肥大や心不全といった心疾患時には NCX のタンパク発現量が増加していることが報告されている。NCX のタンパク発現には MAP キナーゼが関与することが示唆されている。また AngII を介した心肥大に MAPKKK のひとつである ASK1 が関わるので、ASK1 の NCX の発現亢進への関与を検討した。野生型および ASK1 ノックアウトマウスにおいて、AngII や Iso の慢性投与によって NCX のタンパク発現は上昇しなかった。しかし、野生型では慢性投与によ

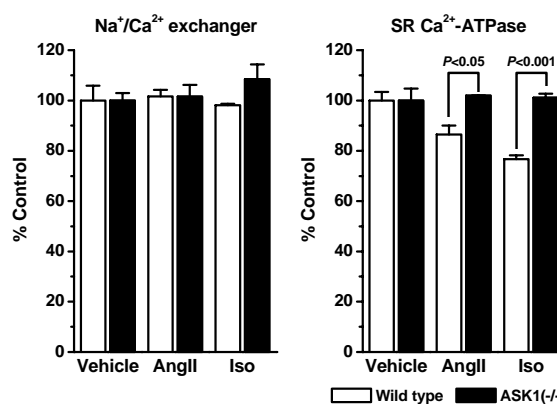


Fig.7 AngII または isoproterenol 慢性投与による NCX と筋小胞体 Ca²⁺-ATPase のタンパク発現量の変化と ASK1 の関与。

って、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase のタンパク発現量が減少した。これに対し、ASK1 ノックアウトマウスでは Iso 投与によって心肥大を呈していたにもかかわらず、AngII および Iso により筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase の発現量は減少しなかった (Fig.7)。

【まとめ】

以上のことから、私は心筋細胞では収縮に必要な CICR の効率を恒常的に最適に保つために、 Ca^{2+} チャンネルと NCX が協同的に筋小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量を制御している、また NCX は細胞膜直下の Ca^{2+} 濃度を精密に制御することで Ca^{2+} チャンネルとリアノジン受容体の機能的カップリングを補助しているという新しいモデルを提唱した。心疾患時の NCX のタンパク発現量の増加や AngII などの液性因子を介した NCX の過剰亢進は収縮不全に至るだけでなく、遅延性後脱分極による不整脈の発生にも関わる。これらの知見は心臓における電位依存性 Ca^{2+} チャンネルと $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体の生理的・病態生理的役の解明および新世代の心疾患治療薬の創薬に貢献するものと考えられる。

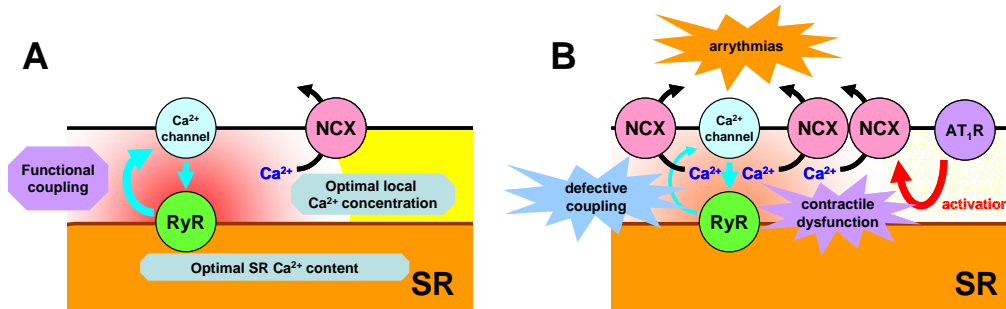


Fig.7 Ca^{2+} チャンネルと $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体による心筋興奮収縮連関制御モデル。A、生理的条件下では CICR の効率を最適にするため、 Ca^{2+} チャンネルは筋小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量を監視、制御し、NCX は膜直下の Ca^{2+} 濃度を精密に制御する。B、病態時には Ca^{2+} チャンネルとリアノジン受容体の機能的カップリングの破綻から Ca^{2+} チャンネルによる筋小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量の監視がはずれたり、NCX による過剰な Ca^{2+} 排出によって膜直下の Ca^{2+} 濃度制御が崩れたりすることで、CICR 効率が低下する。