

## 審査の結果の要旨

氏名 高松 肇

カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は細胞の分化・増殖・機能・生存・死に関わる多様な役割を持つシグナル分子である。これらの  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルは細胞内において時間・空間的に厳密に制御されて使い分けられている。心臓の拍動にとって  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルは必須であるが、一方、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  放出機構 ( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release : CICR) は心収縮力の発生において重要なステップである。CICR は  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルとリアノジン受容体の間のナノ・スペースの  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを介して制御されている。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生理機構のみならず病態生理を理解する上でたいへん重要である。一方、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換体 (NCX) は  $\text{Ca}^{2+}$  を両方向 (排出・流入) に輸送する膜蛋白であり、細胞膜直下の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の制御に重要な役割を担う。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、心肥大・心不全といった心疾患時にその発現レベルや機能の上昇が報告されている。NCX は  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルとリアノジン受容体の間の  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングを制御していると考えられるが、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。

高松肇氏は、 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルおよび NCX の心筋興奮収縮連関における生理的役割と疾患への関与を明らかにすることを目的として本研究に取り組んだ。形態的・機能的に分化した心筋細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル、リアノジン受容体、および NCX の共局在や制御機構は、現在のところ発現系では再構築することができない。そこで、高松肇氏は心筋細胞を用いて薬理学的手法と遺伝子改変マウスを駆使することにより解析を進めた。

これまで  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの不活性化は心筋細胞への  $\text{Ca}^{2+}$  流入量を制御するネガティブ制御機構であろうと漠然と理解されて来たが、数 10~数 100 ミリ秒という短い活動電位幅の中で  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの不活性化機構がどのような生理的意味を持つのか疑問視もされてきた。そこで高松肇氏は、CICR により誘起される  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの  $\text{Ca}^{2+}$  依存性不活性化機構が心筋細胞の活動電位波形や

Ca<sup>2+</sup>シグナル制御においてどのような意味を持つのかを明らかにする目的で、ラットおよびマウスの単一心筋細胞における活動電位波型と Ca<sup>2+</sup>流入量および細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルの連関を検討した。Thapsigargin (1 μM) で筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase を阻害し放出可能な Ca<sup>2+</sup>を枯渇させることにより L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルの CICR 依存性不活性化機構を排除すると活動電位持続時間が延長することを見出した。活動電位中に流れる Ca<sup>2+</sup>チャネル電流を測定することにより Ca<sup>2+</sup>流入量 (I<sub>Ca</sub>) を算出し、活動電位持続時間の延長に伴い Ca<sup>2+</sup>流入量が増大することを見出した。また、交換神経活動を模した PKA 刺激条件下では、活動電位波形および活動電位中の総 Ca<sup>2+</sup>流入量に対する Ca<sup>2+</sup>依存性不活性化の関与が強まることを見出した。さらに、Ca<sup>2+</sup>キレート剤を用いて遊離 Ca<sup>2+</sup>の拡散距離を制限した条件下においても結果は変わらなかったことから、個々の L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルとその近傍のリアノジン受容体間のナノスペースにおける Ca<sup>2+</sup>を介した相互制御機構 (CICR と Ca<sup>2+</sup>依存性不活性化) が心筋細胞全体の Ca<sup>2+</sup>シグナルを制御することを示した。以上のことから、L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルの Ca<sup>2+</sup>依存性不活性化機構は、活動電位幅を短縮して活動電位中の総 Ca<sup>2+</sup>流入量を制限することにより筋小胞体の Ca<sup>2+</sup>過負荷を防ぎ、一方、筋小胞体の Ca<sup>2+</sup>貯蔵量が減少すると活動電位幅を延長し総 Ca<sup>2+</sup>流入量を増加させて筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>貯蔵量を回復させることを明らかにした。即ち、心筋細胞の興奮収縮連関において L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルが Ca<sup>2+</sup>依存性不活性化機構を介して筋小胞体の Ca<sup>2+</sup>貯蔵量を監視・制御するセンサーとして Ca<sup>2+</sup>放出量を安定化する役割を担うことを初めて明らかにした。

さらに、高松肇氏は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。その結果、NCX(+/-)においては NCX の発現量の減少に伴って細胞外への Ca<sup>2+</sup>排出が減少するために、筋小胞体の Ca<sup>2+</sup>貯蔵量が増加し、CICR の効率が高まることを明らかにした。一方、NCX(tg)の心筋細胞では、NCX の過剰発現が細胞外への Ca<sup>2+</sup>排出を増加させるために心筋細胞の収縮率が低下することを見出した。NCX(tg)は軽度ではあるが心肥大を呈していた。その理由として、NCX(tg)では NCX 過剰発現による心収縮力の低下を代償するために交感神経が亢進し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ることを見出した。以上のことから、生理的条件下では NCX は  $\text{Ca}^{2+}$  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を初めて明らかにした。

高松肇氏は、心筋細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  制御機構とその破綻から心疾患に至るメカニズムを明らかにする目的で心筋梗塞後の心筋細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングを解析し、心肥大から心不全への移行初期に NCX 活性が亢進していることを見出した。NCX のタンパク発現量に変化はなかったことから、NCX 活性そのものの増大によることを示した。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学的に検討した。その結果、AngII は NCX に対する直接作用と  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換体の活性化を介する間接的作用により NCX 電流を増加させることを示した。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を初めて示した。さらに、AngII を介した心肥大に関わることが報告されている MAPKKK の ASK1 の NCX の機能制御への関与を ASK1(-/-)マウスを用いて検討した。その結果、ASK1(-/-)マウスにおいては AngII 慢性投与による心肥大が消失することを確認したものの、AngII による NCX 電流の増大作用には野生型との差が認められなかった。よって、AngII の急性作用には ASK1 は関与しておらず、心肥大に至る AngII の慢性作用とは異なるシグナル経路を介することを示した。

以上の通り、高松肇氏は心筋細胞において CICR の効率を恒常的に最適に保つために  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルと NCX が協同的に筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵量を制御しており、また NCX は細胞膜直下の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を精密に制御することで  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルとリアジン受容体の機能的カップリングを制御していることを初めて明らかにした。これらの研究成果は心臓における  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル制御機構の生理的・病態生理的役割と心疾患発症のメカニズムの解明に貢献する重要な知見であり、博士（薬学）の学位に値するものと判定した。