



Modification of SR Ca^{2+} release by FK506 induces defective excitation-contraction coupling only when SR Ca^{2+} recycling is disturbed

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 吉原, 修 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/260

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 440号	学位授与年月日	平成17年 3月15日
氏 名	吉 原 修		
論文題目	<p>Modification of SR Ca^{2+} release by FK506 induces defective excitation-contraction coupling only when SR Ca^{2+} recycling is disturbed</p> <p>(FK506 による筋小胞体からのカルシウム放出の修飾は、筋小胞体でのカルシウムの再利用が障害された時にのみ興奮収縮連関の障害を引き起こす)</p>		

博士(医学) 吉 原 修

論文題目

Modification of SR Ca^{2+} release by FK506 induces defective excitation-contraction coupling only when SR Ca^{2+} recycling is disturbed

(FK506による筋小胞体からのカルシウム放出の修飾は、筋小胞体でのカルシウムの再利用が障害された時にのみ興奮収縮連関の障害を引き起こす)

論文の内容の要旨

- [はじめに]

心筋細胞のFK506結合蛋白(FKBP)は、筋小胞体(sarcoplasmic reticulum: SR) Ca^{2+} 放出チャネル(r)アノジンレセプター: RyR) 1分子に対して4分子の割合で結合する修飾蛋白であり、RyRの協調的放出(coupled gating)を保ち、SRからの安定した Ca^{2+} 放出に寄与する。最近の研究により、心不全時にFKBPがRyRから解離する結果、収縮期にcoupled gatingが障害され、また拡張期にSRから Ca^{2+} の漏出が増加して興奮収縮連関が障害される可能性が示された。しかし、FK506によるFKBPのRyRからの解離が陽性変力作用をもたらすという報告もあり、興奮収縮連関におけるFKBP解離の意義は十分に解明されていない。心不全時にはまた、細胞質の Ca^{2+} を除去するSR Ca^{2+} ATPase(SERCA)と $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換(NCX)の活性が変化し、SRの Ca^{2+} 再利用が障害されることが報告されている。今回、我々はFK506投与時の細胞内 Ca^{2+} 動態の変化を、正常状態とSRの Ca^{2+} 再利用が障害された状態で比較することにより、心不全時の興奮収縮連関の異常におけるFKBP解離の意義を検討した。

[材料ならびに方法]

コラゲナーゼによりラット心室筋細胞を分離した後、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素のfluo-3/AM(20 μM)を細胞に30分間室温で負荷した。細胞内 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)は、共焦点レーザー顕微鏡のline scan modeを使用してfluo-3の蛍光強度の変化を測定し、pseudo-ratio法により算出した。また、細胞収縮は、line scan画像上の細胞長径の変化より求めた。細胞は、実験槽内で1mM Ca^{2+} 含有HEPES液にて灌流され、電気刺激時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化(Ca^{2+} transient)と細胞収縮を測定した。また、SRの Ca^{2+} 含量はcaffeine投与時の Ca^{2+} transientより、拡張期のSR Ca^{2+} 放出は微細な Ca^{2+} 放出信号(Ca^{2+} spark)の動態より評価した。SERCAの阻害にはthapsigargin(TG)を、またNCXを介した細胞外への Ca^{2+} 排泄の促進には低 Ca^{2+} 濃度(0.1mM)HEPES溶液(低 Ca^{2+} 溶液)の灌流を行った。

[結果]

- (1) 正常状態でのFK506の効果: 1mM Ca^{2+} 含有HEPES溶液の灌流を行った正常状態では、50 μM FK506の投与により0.1Hzで電気刺激時の Ca^{2+} transientと細胞収縮は、それぞれコントロールの $147.3 \pm 13.3\%$ 、 $194.0 \pm 9.2\%$ に増加した(平均 \pm 標準誤差、 $n=7$ 、 $p<0.05$)。
- (2) SR Ca^{2+} 再取り込み障害時のFK506の効果: $10^{-6} \sim 10^{-8}$ MのTG投与により、用量依存性に Ca^{2+} transientの振幅は低下し、減衰時間は延長した。TG存在下においても、FK506は Ca^{2+} transientと細胞収縮を増加させた。しかし、 10^{-8} M TGと低 Ca^{2+} 溶液を同時に灌流した状態では、FK506は Ca^{2+} transientと細胞収縮を低下させた($55.8 \pm 6.2\%$ 、 $35.3 \pm 7.4\%$ 、 $n=8$ 、 $p<0.05$)。
- (3) FK506による静止後のSR Ca^{2+} 含量の変化: 正常状態では、定常刺激直後のcaffeine Ca^{2+} transientと比

較し、刺激停止 5 分後のcaffeine Ca^{2+} transientには有意な変化を認めなかった($90.7 \pm 10.2\%$, $n=8$)。刺激停止後にFK506を投与することにより、5 分後のcaffeine Ca^{2+} transientは増加した($173.8 \pm 19.9\%$, $n=8$, $p<0.05$)。一方、刺激停止後のTGと低 Ca^{2+} 溶液の灌流は、5 分後のcaffeine Ca^{2+} transientを低下させたが($19.7 \pm 3.9\%$, $n=9$, $p<0.05$)、FK506の投与によりcaffeine Ca^{2+} transientは更に低下した($9.1 \pm 2.9\%$, $n=9$, $p<0.05$)。

- (4) FK506による Ca^{2+} sparkの変化：正常状態では、FK506の投与は Ca^{2+} sparkの頻度を増加させた。一方、TGと低 Ca^{2+} 溶液の灌流時には、FK506の投与により Ca^{2+} sparkの頻度は増加しなかったが、持続時間の長い Ca^{2+} sparkが惹起された。

[考察]

心不全時の Ca^{2+} 代謝異常としては、 Ca^{2+} transientの振幅の減少およびピークからの減衰時間の延長が報告されている。これらの Ca^{2+} transientの変化は、主にSERCAの低下、NCXによる Ca^{2+} 排出の増加によるが、今回の我々の研究により、SRの Ca^{2+} 再利用が低下した状態では、FKBPのRyRからの解離も Ca^{2+} transientの変化に寄与しうることを示した。FK506は、正常状態においては Ca^{2+} transientと細胞収縮、および Ca^{2+} sparkの頻度を増加させた。この結果は、FKBPの解離によりSRからの Ca^{2+} 漏出が増加しても、SERCAによるSRの Ca^{2+} 再利用が保たれた状態ではSRの Ca^{2+} 含量は減少せず、むしろRyRの Ca^{2+} 感受性の増加が、SRからの Ca^{2+} 放出を促進させることを示唆した。また、TGの投与時においてもFK506が Ca^{2+} transientと細胞収縮を増大させたことは、ラットでは Ca^{2+} 除去機構におけるNCXの関与が小さいため、SRの Ca^{2+} 含量が維持されたことによると考えられた。しかし、これらのFK506の作用については、NCXの抑制を含む非特異作用も考慮する必要がある。

一方、TGと低 Ca^{2+} 溶液の併用時には、FK506は Ca^{2+} transientと細胞収縮を低下させた。これは、FKBP解離によりSRから漏出した Ca^{2+} が、細胞外により排出されやすい状態となり、SRの Ca^{2+} 含量が減少したためと考えられた。実際、FK506はTGと低 Ca^{2+} 溶液の併用時には、静止後のcaffeine Ca^{2+} transientをより低下させた。さらにFK506が Ca^{2+} sparkの頻度を増加させず、持続時間の長い Ca^{2+} sparkを惹起したことは、SRの Ca^{2+} 再利用が障害された状態においてのみ、FKBP解離によるSRからの Ca^{2+} 放出の修飾が、興奮収縮連関の障害に寄与することを示すと考えられた。

[結論]

ラット心室筋細胞において、FKBPの解離によるSRからの Ca^{2+} 放出の修飾は、正常状態では興奮収縮連関を促進するが、SRの Ca^{2+} 再利用が障害された状態では、SRの Ca^{2+} 含量を減少させて興奮収縮連関の障害を助長する要因となる。

論文審査の結果の要旨

心筋細胞のFK506結合蛋白(FKBP)は、筋小胞体(sarcoplasmic reticulum:SR) Ca^{2+} 放出チャネル(リアノシンレセプター: RyR)1分子に対して4分子の割合で結合する修飾蛋白であり、RyRの協調的放出(coupled gating)を保ち、SRからの安定した Ca^{2+} 放出に寄与する。最近の研究により、心不全時にFKBPがRyRから解離する結果、収縮期にcoupled gatingが障害され、また拡張期にSRから Ca^{2+} の漏出が増加して興奮収縮連関が障害される可能性が示された。しかし、FK506によるFKBPのRyRからの解離が陽性変力作用をも

たらずという報告もあり、興奮収縮連関におけるFKBP解離の意義は十分に解明されていない。また、心不全時には細胞質の Ca^{2+} を除去するSR Ca^{2+} ATP ase (SERCA) と $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換(NCX)の活性が変化し、SRの Ca^{2+} 再利用が障害されることが報告されている。今回、申請者はFK506投与時の細胞内 Ca^{2+} 動態の変化を、正常状態とSRの Ca^{2+} 再利用が障害された状態で比較することにより、心不全時の興奮収縮連関の異常におけるFKBP解離の意義を検討した。

コラゲナーゼによりラット心室筋細胞を分離した後、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素を細胞に負荷した。細胞内 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)は、共焦点レーザー顕微鏡のline scan modeを使用して蛍光強度の変化を測定し、pseudo-ratio法により算出した。また、細胞収縮は、line scan画像上の細胞長径の変化より求めた。細胞は、実験槽内でHEPES液にて灌流され、電気刺激時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化(Ca^{2+} transient)と細胞収縮を測定した。また、SRの Ca^{2+} 含量はcaffeine投与時の Ca^{2+} transientより、拡張期のSR Ca^{2+} 放出は微細な Ca^{2+} 放出信号(Ca^{2+} spark)の動態より評価した。SERCAの阻害にはthapsigargin(TG)を、またNCXを介した細胞外への Ca^{2+} 排泄の促進には低 Ca^{2+} 濃度(0.1mM) HEPES溶液(低 Ca^{2+} 溶液)の灌流を行った。

- (1) 正常状態でのFK506の効果：正常状態では、FK506の投与により電気刺激時の Ca^{2+} transientと細胞収縮は増加した。
- (2) SR Ca^{2+} 再取り込み障害時のFK506の効果：TG投与により、用量依存性に Ca^{2+} transientの振幅は低下し、減衰時間は延長した。TG存在下においても、FK506は Ca^{2+} transientと細胞収縮を増加させた。しかし、TGと低 Ca^{2+} 溶液を同時に灌流した状態では、FK506は Ca^{2+} transientと細胞収縮を低下させた。
- (3) FK506による静止後のSR Ca^{2+} 含量の変化：正常状態では、定常刺激直後のcaffeine Ca^{2+} transientと比較し、刺激停止5分後のcaffeine Ca^{2+} transientには有意な変化を認めなかったが、刺激停止後にFK506を投与することによりcaffeine Ca^{2+} transientは増加した。一方、刺激停止後のTGと低 Ca^{2+} 溶液の灌流は、caffeine Ca^{2+} transientを低下させたが、FK506の投与によりcaffeine Ca^{2+} transientは更に低下した。
- (4) FK506による Ca^{2+} sparkの変化：正常状態では、FK506の投与は Ca^{2+} sparkの頻度を増加させた。一方、TGと低 Ca^{2+} 溶液の灌流時には、FK506の投与により Ca^{2+} sparkの頻度は増加しなかったが、持続時間の長い Ca^{2+} sparkが惹起された。

以上のことから、ラット心室筋細胞において、FKBPの解離によるSRからの Ca^{2+} 放出の修飾は、正常状態では興奮収縮連関を促進するが、SRの Ca^{2+} 再利用が障害された状態では、SRの Ca^{2+} 含量を減少させて興奮収縮連関の障害を助長する要因となることが示された。

審査委員会では、心不全時のSRの Ca^{2+} 遊離、再取り込み機能に対するFKBPの役割を解明したところを高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 心不全時の Ca^{2+} transientについて
- 2) Ca^{2+} sparkについて
- 3) 心不全時にリアノジン受容体からFK506結合蛋白が解離するメカニズムについて
- 4) 心不全時のSERCA、NCXおよびリアノジン受容体の機能変化について
- 5) FK506がFK506結合蛋白を受容体から解離するメカニズムについて
- 6) thapsigarginのSERCA抑制作用の選択性について
- 7) FK506のSERCAおよびNCXへの作用について
- 8) FK506の Ca^{2+} transientへの影響について

- 9) カルシニューリンと Ca^{2+} transientとの関係について
- 10) thapsigarginおよび細胞外低 Ca^{2+} 濃度溶液を用いた心不全モデルの妥当性について
- 11) flou-3の蛍光を細胞内 Ca^{2+} 濃度に変換する際に使用したpseudo-ratio法について

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梅 村 和 夫
 副査 前 川 真 人 副査 山 本 清 二