



## CaMK II-dependent reactivation of SR Ca<sup>2+</sup> uptake and contractile recovery during intracellular acidosis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 野村, 紀之 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1231">http://hdl.handle.net/10271/1231</a>

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 378号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏名	野村紀之		
論文題目	<p>CaMKII-dependent reactivation of SR Ca<sup>2+</sup> uptake and contractile recovery during intracellular acidosis                      (心筋細胞内アシドーシス時のカルシウム-カルモデュリンキナーゼ II を介する筋小胞体カルシウム取込みの再活性化と収縮回復)</p>		

博士(医学) 野村紀之

## 論文題目

CaMK II -dependent reactivation of SR Ca<sup>2+</sup> uptake and contractile recovery during intracellular acidosis

(心筋細胞内アシドーシス時のカルシウム-カルモデュリンキナーゼ II を介する筋小胞体カルシウム取込みの再活性化と収縮回復)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

細胞内アシドーシスは心筋虚血や腎不全、呼吸不全時の心収縮力低下の重要な原因である。細胞内アシドーシス時には、心室筋細胞の収縮は収縮蛋白の Ca<sup>2+</sup> 反応性の低下により減少する。しかし、低下した細胞収縮は、その後、徐々に回復することが報告されている。今回、我々はラット単離心室筋細胞において細胞収縮と Ca<sup>2+</sup> transient (CaT) の同時測定を行ない、この収縮回復の機序について検討した。

### 〔材料と方法〕

酵素法によりラット心室筋細胞を分離し、細胞内 pH (pH<sub>i</sub>) の測定には BCECF/AM (1 μM) を、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) の測定には indo-1/AM (10 μM) を負荷した。細胞を 0.5 Hz で電気刺激し、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は 340 nm の波長で励起した時の 405/485 nm の indo-1 蛍光比を計測して算出した。細胞長は photodiode 上の image sensor により計測した。細胞内アシドーシスは、重炭酸含有灌流液中の CO<sub>2</sub> ガス濃度を 5% から 20% へ増加することにより作成した。

### 〔結果〕

#### 1. pH<sub>i</sub> の変化

アシドーシス溶液の灌流により、pH<sub>i</sub> は約 1 分間で 7.1 ± 0.1 (平均 ± 標準誤差, n = 10) から 6.8 ± 0.1 に低下し、その後 15 分間の安定した細胞内アシドーシスが得られた。また溶液の洗い出し後、pH<sub>i</sub> は速やかに回復した。

#### 2. 細胞収縮と CaT に対するアシドーシスの影響

アシドーシスにより収縮は低下し、拡張期 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> と CaT の振幅は軽度上昇した。収縮は約 4 分後に最小となり、その後徐々に回復した。収縮回復時には、拡張期 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> と CaT の振幅はさらに上昇した。アシドーシス解除後には自動収縮と振動性の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇をきたした。収縮が最も低下した時点を低下期とし、拡張期長の 1% 以上の収縮回復が認められた時点を回復期と定義した。caffeine (10 mM) の急速灌流で評価した筋小胞体 (SR) の Ca<sup>2+</sup> 含有量は、低下期で有意に増加し、回復期でさらに増加した。

#### 3. アシドーシス中の収縮回復の細胞による差

アシドーシスによる収縮低下は全ての細胞で認められたが、その後の収縮の回復は、14 個中 9 個 (64%) の細胞において認められた。回復群では、アシドーシス中の CaT の振幅は増加したが、拡張期 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の増加は軽度であった。一方、非回復群では CaT の振幅の増加は軽度で、拡張期 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の増加がより顕著であった。以上より、アシドーシス中の収縮回復は、SR の Ca<sup>2+</sup> 含有量の増加による CaT の振幅の増大が原因と考えられた。

#### 4. CaT の減衰に対するアシドーシスの効果

SR の  $\text{Ca}^{2+}$  含有量は SR  $\text{Ca}^{2+}$  pump による  $\text{Ca}^{2+}$  取込みによって決定されるため、SR の  $\text{Ca}^{2+}$  取込みを CaT の減衰速度から評価した。CaT の減衰速度の時定数は、低下期で延長したが回復期で再短縮し、この再短縮は収縮非回復群では認められなかった。

#### 5. SR 阻害時の収縮と CaT に対するアシドーシスの影響

thapsigargin ( $1\mu\text{M}$ ) と ryanodine ( $10\mu\text{M}$ ) により SR を阻害した状態での、アシドーシス中の収縮と CaT を測定した。アシドーシスにより、収縮は消失し、その後の回復は認めなかった。拡張期  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は持続的に増加し、CaT の振幅は増加せず、CaT の減衰は延長して再短縮は認められなかった。以上より、SR による  $\text{Ca}^{2+}$  取込みの再活性化がアシドーシス中の CaT の減衰の再短縮、CaT の振幅の増加と、収縮の回復に重要であることが示された。

#### 6. $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) の関与

アシドーシス中の SR の  $\text{Ca}^{2+}$  取込みの再活性化の機序として、上昇した  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  により CaMKII が活性化されてホスホランパンをリン酸化する可能性が考えられる。よって、(1) isoproterenol ( $10\mu\text{M}$ ) と cantharidin (phosphatase 阻害薬;  $10\mu\text{M}$ ) の前処置により、ホスホランパンがリン酸化をうけた状態でのアシドーシスの効果、(2) CaMKII の選択的阻害薬である KN-93 ( $1\mu\text{M}$ ) の効果を検討した。これらの処置によりアシドーシス中の収縮回復は有意に抑制 (0%、27%) され、拡張期  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は持続的に増加したが、CaT の振幅は増加しなかった。CaT の減衰は持続的に延長し、再短縮は認められなかった。

#### [結論]

細胞内アシドーシスにより SR の  $\text{Ca}^{2+}$  取込みは低下するが、その後に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  負荷と CaMKII を介して SR の  $\text{Ca}^{2+}$  取込みが再活性化されることが示された。この再活性化は、CaT の振幅を増大させて収縮蛋白の  $\text{Ca}^{2+}$  応答性の低下を代償するが、pH<sub>i</sub> 回復時には  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷を引き起こして細胞傷害の原因になりうることを示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

心筋収縮は様々な要因で変化することが知られている。血液のアシドーシスも心筋の収縮力を弱めるが、この収縮力の減弱は多くの場合一過性であり、もとに戻る適応反応が見られる。さらに、アシドーシスの改善後には収縮力が過大になるリバウンドの時期がある。このような反応は虚血再灌流による心筋障害に大きな影響を与えていると考えられるが、それらの反応の分子レベルにおける機構は分かっていた。そこで、申請者は細胞内の pH と収縮を同時計測し、薬理的な手法を用いて、これらの反応に関与する分子を同定しその動態を調べた。

#### [方法]

コラゲナーゼ処理によりラットから単離心室筋細胞を得て、ガラス上に付着させ、顕微鏡下に置いた。細胞は連続的に生理溶液で灌流した。細胞内へ indo-1 を負荷し、2 波長の近紫外光で励起して、青色の蛍光強度から細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を測定した。また、BCECF を負荷し、同様に細胞内 pH を測定した。赤色光で細胞の位相差像を作り、リニア CCD アレイを用いて細胞の端を検出することにより、上記蛍光測定と同時に細胞の長さを計測した。HEPES バッファーまたは炭酸バッファーを使用して溶液の pH を

調節し、細胞内 pH を下げた。溶液に薬剤を混ぜて、アシドーシスにおける  $\text{Ca}^{2+}$  反応と収縮能の変化に対する効果を調べた。

#### 〔結果〕

酸性溶液の灌流の間、細胞内 pH は、正常の 7.1 から 6.8 へ低下して一定を保つことと、中性溶液の灌流でもとに戻ることが確認できた。アシドーシスの間、収縮能は低下し、その後徐々に回復した。 $\text{Ca}^{2+}$  反応は初め軽度で増強し、その後徐々に増大した。筋小胞体 (SR) 内に貯蔵されている  $\text{Ca}^{2+}$  量を、カフェイン投与によって遊離する  $\text{Ca}^{2+}$  量から調べると、アシドーシス中に大きく増大していくことが明らかになった。SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を抑えるリアノジンと SR 内の貯蔵  $\text{Ca}^{2+}$  量を減らす thapsigargin を使用すると、アシドーシス中の収縮の回復反応が見られず、アシドーシス改善後のリバウンドも見られなかった。フォスフォランバンの活性を、cAMP 系の賦活剤である isopreterenol とフォスファターゼ阻害薬である cantharidin の使用によって最大にしておくこと、収縮の回復反応は見られなかった。フォスフォランバンの活性調節をしているカルモジュリンキナーゼ (CaMKII) のリン酸化作用を、選択的阻害薬である KN-93 を用いて抑制すると、やはり回復反応が見られなかった。

#### 〔考察〕

これらの観察から、アシドーシス中には CaMKII が働いて、フォスフォランバンをリン酸化し、その結果 SR の  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプの活性が上がり、SR 内に貯蔵される  $\text{Ca}^{2+}$  量が上昇する、という一連の連鎖が、収縮能の回復とその後のリバウンドに結びつくことが結論された。

審査員委員会では、心筋障害に繋がる恐れのある心筋細胞の過大収縮の原因が、SR における CaMKII の作用によることを明らかにし、分子信号系の一端を解明したことを高く評価した。将来的に、この信号経路を薬剤によって制御し、虚血再灌流における心筋障害を防ぐ可能性を探索する道を拓いた点も評価した。

上記のような申請者の論文の示説に対し、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) Na/Ca 交換体に及ぼす細胞外 pH の効果はどのようなものか
- 2) 細胞内アシドーシスが  $\text{Ca}^{2+}$  の収縮タンパクへの作用を低下させる機構は
- 3) 生体内循環心での pH 低下実験との比較はどうか
- 4) Inod-1 の細胞内での分布はどのようになるか
- 5) 観察した心筋細胞の収縮は張力無しの等張性の条件か
- 6) 細胞収縮と  $\text{Ca}^{2+}$  反応の時間経過の解離はなぜ起こるのか
- 7) なぜ拡張反応が収縮反応より速いのか
- 8) アシドーシス後の収縮回復のよしあしはなぜ 2 群に分かれるのか
- 9)  $\text{Ca}^{2+}$  反応の減衰部は SR への  $\text{Ca}^{2+}$  取込みだけで説明できるか
- 10) フォスファターゼ抑制と CaMKII 抑制において  $\text{Ca}^{2+}$  反応の時間経過が異なるのはなぜか
- 11) CaMKII 障害モデルでは、長期変化はどのようになるか
- 12) CaMKII が作用する基質分子としてはどのようなものがあるか
- 13) フォスフォランバンの直接的阻害はできないか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、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 寺川 進  
副査 梅村和夫 副査 橋本久邦