



Protein phosphatase inhibitor-1 augments a protein kinase A-dependent increase in the SR Ca<sup>2+</sup> loading without changing the SR Ca<sup>2+</sup> release

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 河島, 広貴 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1927">http://hdl.handle.net/10271/1927</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 5 5 1 号	学位授与年月日	平成 2 1 年 4 月 1 7 日
氏 名	河 島 広 貴		
論文題目	Protein phosphatase inhibitor-1 augments a protein kinase A-dependent increase in the SR Ca <sup>2+</sup> loading without changing the SR Ca <sup>2+</sup> release (Protein phosphatase inhibitor-1 は、筋小胞体の Ca <sup>2+</sup> 放出を変化させることなく、プロテインキナーゼ A 依存性に筋小胞体の Ca <sup>2+</sup> 取り込みを増加させる)		

博士(医学) 河島 広 貴

## 論文題目

Protein phosphatase inhibitor-1 augments a protein kinase A-dependent increase in the SR  $\text{Ca}^{2+}$  loading without changing the SR  $\text{Ca}^{2+}$  release

(Protein phosphatase inhibitor-1 は、筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  放出を変化させることなく、プロテインキナーゼ A 依存性に筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みを増加させる)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  調節の異常は、心不全の病態において重要な役割を有する。不全心筋においては筋小胞体 (SR) の  $\text{Ca}^{2+}$  含有量の低下と細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の上昇が認められるが、これらの変化は SR への  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みを担う SR  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA) 機能の低下および SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を担うリアノジン受容体 (RyR) からの  $\text{Ca}^{2+}$  漏出の増加が原因と考えられている。従って、不全心筋の  $\text{Ca}^{2+}$  代謝を改善させるためには、RyR からの  $\text{Ca}^{2+}$  漏出を増加させることなく SR への  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みを促進することが求められる。心筋細胞における SERCA の機能は、その調節蛋白であるホスホランパン (PLB) のリン酸化により調節されており、交感神経刺激時には、 $\beta$  受容体とその細胞内伝達物質であるプロテインキナーゼ A (PKA) やカルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) により PLB がリン酸化されて機能が促進する一方、蛋白脱リン酸化酵素 (PP: protein phosphatase) 1, 2A により PLB が脱リン酸化を受けると機能は低下する。実際、心不全では PP1, PP2A 活性の促進と PLB の脱リン酸化が報告されている。一方、SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  漏出の増加は、PKA, CaMKII により RyR が過剰にリン酸化を受けることが原因と考えられている。PP 阻害薬は、PLB のリン酸化を促進して SR への  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みを増加させると期待されるが、反面、RyR のリン酸化により  $\text{Ca}^{2+}$  漏出を増加させることも予想される。細胞内脱リン酸化抑制蛋白である inhibitor-1 (I-1) は、PP1 に選択的な阻害作用を持つことが報告されている。しかし、これまで I-1 の SR 機能への影響を検討した研究は行われていない。本研究は、心不全治療における PP 阻害薬の可能性を探る目的で、(1) 非選択的 PP 阻害薬である calyculin A (Caly A) の電気刺激時の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の変化 ( $\text{Ca}^{2+}$  transient) と細胞収縮に及ぼす効果、(2) I-1 が、SR の  $\text{Ca}^{2+}$  含有量と  $\text{Ca}^{2+}$  放出に及ぼす効果を検討した。

[材料と方法]

正常細胞: コラゲナーゼによりラット心室筋細胞を分離した後、 $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色素の fluo-3/AM (20  $\mu\text{M}$ ) を 30 分間室温で負荷した。  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  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。細胞を 1 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  を含有する HEPES 液にて灌流し、 $\text{Ca}^{2+}$  transient と細胞収縮を測定した。スキンド細胞: 単離心筋細胞に対しサポニンにより化学的に細胞膜除去を行った。細胞内液の灌流により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を 50 nM に固定した。SR の  $\text{Ca}^{2+}$  含有量は caffeine 投与時の  $\text{Ca}^{2+}$  transient (CaffCaT) より、SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出は  $\text{Ca}^{2+}$  spark の動態より評価した。

[実験結果]

(1) イソプロテレノール (ISO; 10 nM) と Caly A の  $\text{Ca}^{2+}$  動態と細胞収縮に及ぼす効果: ISO の灌流

により  $\text{Ca}^{2+}$  transient のピーク値、細胞収縮、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度減衰速度は増加し、拡張期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は低下した。ISO に Caly A を追加投与することにより  $\text{Ca}^{2+}$  transient の peak 値と細胞収縮はさらに増加したが、拡張期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度減衰速度は変化しなかった。

- (2) PKA catalytic subunit ( $\text{PKA}_{\text{cat}}$ ) および I-1 の SR  $\text{Ca}^{2+}$ 含有量に及ぼす効果: $\text{PKA}_{\text{cat}}$  5-50 U/ml 灌流により、CaffCaT は用量依存性に増加した。 $\text{PKA}_{\text{cat}}$  5-10 U/ml 灌流後に I-1 (1.6 nM) を追加投与することにより、CaffCaT はさらに増加したが、I-1 単独あるいは、 $\text{PKA}_{\text{cat}}$  50 U/ml 灌流後の I-1 投与では CaffCaT は変化しなかった。
- (3)  $\text{PKA}_{\text{cat}}$  及び I-1 の  $\text{Ca}^{2+}$ spark に及ぼす効果: $\text{PKA}_{\text{cat}}$  (10, 50 U/ml) の灌流により  $\text{Ca}^{2+}$  spark の頻度は増加した。 $\text{PKA}_{\text{cat}}$  (50 U/ml) の灌流では  $\text{Ca}^{2+}$ spark のピーク値は上昇し、減衰時間が延長した。I-1 の追加投与により  $\text{Ca}^{2+}$ spark の頻度はさらに増加したが、 $\text{Ca}^{2+}$ spark のピーク値、減衰時間は影響を受けなかった。
- (4) SR の  $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み阻害時の  $\text{Ca}^{2+}$  spark の頻度および CaffCaT の減衰と両者の関係: $\text{PKA}_{\text{cat}}$  灌流後の  $\text{Ca}^{2+}$  spark の頻度および CaffCaT は、SERCA を阻害する cyclopiazonic acid (CPA: 10  $\mu\text{M}$ ) 投与により時間依存性に減少したが、I-1 存在下でもそれらの減衰速度に差はなかった。また、CPA 投与後の経過時間ごとの  $\text{Ca}^{2+}$  spark の頻度と CaffCaT の関係は、 $\text{PKA}_{\text{cat}}$  単独と I-1 存在下で差を認めなかった。

#### [考察]

正常細胞において Caly A は、拡張期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させることなく、ISO の陽性変力作用を増強した。しかし、Caly A は PP の非選択的阻害薬であり、かつ非特異的作用を有する可能性があるため、スキンド細胞において選択的 PP1 阻害薬である I-1 の効果を検討した。 $\text{PKA}_{\text{cat}}$  の灌流は SR の  $\text{Ca}^{2+}$ 含有量および  $\text{Ca}^{2+}$ 放出をともに増加させた。SR の  $\text{Ca}^{2+}$ 放出の増加は、SR の  $\text{Ca}^{2+}$ 含有量の増加によることが考えられるが、高濃度  $\text{PKA}_{\text{cat}}$  の灌流は  $\text{Ca}^{2+}$  spark の特徴も変化させたため、RyR への直接作用が考慮される。一方、I-1 の追加投与は、SR の  $\text{Ca}^{2+}$ 含有量をさらに増加させ、 $\text{Ca}^{2+}$ 放出を促進した。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$ spark の特徴を変化させず、また SERCA 阻害後の  $\text{Ca}^{2+}$  spark の頻度および CaffCaT の減衰とその関係に影響しなかったことから、I-1 は、RyR に対して大きな作用をしないと考えられた。

#### [結論]

心不全治療において、 $\beta$  受容体刺激は、PKA を介して一過性には収縮能および拡張能を改善させるが、SR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出を増加させて  $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷をきたすため、慢性的には心毒性作用がある。一方、PP1 の選択的阻害は、PLB をリン酸化することにより SERCA の機能を促進して SR の  $\text{Ca}^{2+}$ 含有量を増加させるが、SR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 漏出を大きくは増加させないことが示された。今後、I-1 の細胞内発現の増加や選択的 PP1 阻害薬の開発が、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 代謝の改善により新たな心不全治療となることが期待される。

### 論文審査の結果の要旨

不全心筋においては筋小胞体 (SR) の  $\text{Ca}^{2+}$ 含有量の低下と細胞質  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の上昇が認められるが、これらの変化は SR への  $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みを担う SR  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA) 機能の低

下および SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を担うリアノジン受容体 (RyR) からの  $\text{Ca}^{2+}$  漏出の増加が原因と考えられている。心筋細胞における SERCA の機能は、ホスホランバン (PLB) のリン酸化による取り込み促進と蛋白脱リン酸化酵素 (PP: protein phosphatase) 1, 2A による抑制作用により調節されている。一方、SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  漏出は、RyR のリン酸化による排出作用により調節されている。そこで、申請者は非選択的 PP 阻害薬である calyculin A (Caly A) および PP1 の選択的阻害薬である inhibitor-1 (I-1) の SR 機能への影響を検討した。

正常細胞: コラゲナーゼによりラット心室筋細胞を分離した後、 $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色素の fluo-3/AM を 30 分間室温で負荷した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  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。細胞を 1 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  を含有する HEPES 液にて灌流し、 $\text{Ca}^{2+}$  transient と細胞収縮を測定した。

スキンド細胞: 単離心筋細胞に対しサポニンにより化学的に細胞膜除去を行った。細胞内液の灌流により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を 50 nM に固定した。SR の  $\text{Ca}^{2+}$  含有量は caffeine 投与時の  $\text{Ca}^{2+}$  transient (CaffCaT) より、SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出は  $\text{Ca}^{2+}$  spark の動態より評価した。

以下の結果を得た。

- 1) イソプロテレノール (ISO) の灌流により  $\text{Ca}^{2+}$  transient のピーク値、細胞収縮、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度減衰速度は増加し、拡張期  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は低下した。ISO に Caly A を追加投与することにより  $\text{Ca}^{2+}$  transient の peak 値と細胞収縮はさらに増加したが、拡張期  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  と  $\text{Ca}^{2+}$  濃度減衰速度は変化しなかった。
- 2) PKA catalytic subunit ( $\text{PKA}_{\text{cat}}$ ) 灌流により、CaffCaT は用量依存性に増加し、 $\text{PKA}_{\text{cat}}$  灌流後に I-1 を追加投与することにより、CaffCaT はさらに増加した。
- 3)  $\text{PKA}_{\text{cat}}$  の灌流により  $\text{Ca}^{2+}$  spark の頻度は増加した。 $\text{PKA}_{\text{cat}}$  の灌流では  $\text{Ca}^{2+}$  spark のピーク値は上昇し、減衰時間が延長した。I-1 の追加投与により  $\text{Ca}^{2+}$  spark の頻度はさらに増加したが、 $\text{Ca}^{2+}$  spark のピーク値、減衰時間は影響を受けなかった。

以上の結果から、PP1 の阻害薬は PLB をリン酸化することにより SERCA の機能を促進して SR の  $\text{Ca}^{2+}$  含有量を増加させるが、SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  漏出を増加させなかった。

審査委員会では、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  代謝の改善作用を有した PPI 阻害薬が新たな心不全治療の候補となることを示したものであることを高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 細胞内カルシウム濃度測定法について
- 2) Inhibitor-1 の作用について
- 3) Inhibitor-1 の組織分布について
- 4) PKA と PP1 関係について
- 5) PP1 のホスホランバンおよびリアノジンへの作用について
- 6) 不全心筋におけるリアノジン受容体の感受性について
- 7) カテコラミン関連薬物とリアノジン受容体の感受性との関係について
- 8) Calyculin A を実験に使用した理由について
- 9) Cyclopiazonic acid の作用について
- 10) 単離心室細胞の処理方法と収縮能について

- 11) Calyculin A による拡張期 $[Ca^{2+}]_i$  への影響について
- 12) 不全心筋における inhibitor-1 の効果について
- 13) 心不全時の PKA 活性の変化について

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 梅村 和夫  
副査 佐藤 重仁 副査 山本 清二