



Local control of mitochondrial membrane potential, permeability transition pore and reactive oxygen species by calcium and calmodulin in rat ventricular myocytes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小田切, 圭一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/812

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 550号	学位授与年月日	平成21年 3月18日
氏名	小田切 圭一		
論文題目	Local control of mitochondrial membrane potential, permeability transition pore and reactive oxygen species by calcium and calmodulin in rat ventricular myocytes (カルシウムおよびカルモジュリンによるラット心室筋細胞におけるミトコンドリアの膜電位、膜透過性遷移孔および活性酸素種の局所調節)		

博士(医学) 小田切 圭 一

論文題目

Local control of mitochondrial membrane potential, permeability transition pore and reactive oxygen species by calcium and calmodulin in rat ventricular myocytes

(カルシウム及びカルモジュリンによるラット心室筋細胞におけるミトコンドリアの膜電位、膜透過性遷移孔及び活性酸素種の局所調節)

論文内容の要旨

[はじめに]

心筋細胞において、細胞内 Ca^{2+} イオンとカルモジュリン (CaM) 及びカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) は、細胞機能の調節に重要な役割を果たしている。近年 CaM 及び CaMKII が心疾患の発症機構に密接に関連することが報告され、心不全においても慢性の交感神経刺激過剰により活性化された CaMKII が、心筋細胞のアポトーシスを惹起することが知られている。このアポトーシスは筋小胞体 (SR) の Ca^{2+} 含有量とも相関することが明らかになってきた。ミトコンドリアはアポトーシスにおいて中心的な役割を果たしており CaMKII によるアポトーシスにはミトコンドリアを介する機序の関与が推察されているが、CaM、CaMKII とミトコンドリア機能の関連を詳細に検討した報告はない。そこで我々は、CaM、CaMKII がミトコンドリア機能に及ぼす影響を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。

[材料ならびに方法]

雄 Sprague-Dawley ラット(7~10 週齢、体重 250-350 g)の心筋細胞を、コラゲナーゼを用いて単離し、続いてサポニン溶液 (0.05 mg/ml) により化学的に細胞膜除去処理した後に、室温で細胞内液(組成: 50 KCl、80 K-aspartate、4 Na-pyruvate、20 HEPES、3 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、2 Na_2ATP 、3 EGTA; 単位: mM、 $[\text{Ca}^{2+}] = 177 \text{ nM}$)で持続灌流した。ミトコンドリアの機能として、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\psi_m$) は tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE: 10 nM) を、ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mPTP) 開口の指標に calcein (1 μM) を、活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) 産生の指標に 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF: 10 μM)、及び 6-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di (acetoxymethyl ester) (C-DCDHF-DA: 5 μM)を、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度は rhod-2 (20 μM)を用いて、共焦点レーザー顕微鏡により、それぞれの蛍光強度の変化を測定した。

[結果]

1. CaM の $\Delta\psi_m$ 、mPTP、ROS 産生に対する効果: 10 nM の CaM 投与により、40 分後に $\Delta\psi_m$ は前値の $53.4 \pm 3.7 \%$ ($p < 0.05$)に低下し、 $\Delta\psi_m$ は CaM の濃度依存性に低下した。CaM の $\Delta\psi_m$ に対する効果は、CaM 及び CaMKII の阻害薬である W-7 と autocalmitide 2-related inhibitory peptide (AIP) により抑制され、CaM の下流シグナルとしての CaMKII の関連が示された。同様に mPTP の開口を示唆する calcein の蛍光強度も $73.5 \pm 1.9 \%$ ($p < 0.05$)と低下し、この効果も AIP により抑制された。さらに mPTP の阻害薬である cyclosporin A (CsA) は $\Delta\psi_m$ と calcein の低下を抑制した。
2. CaM 投与により DCF の蛍光強度は前値の 8.4 倍 ($p < 0.05$) に速やかに上昇し、これに対し、C-DCDHF-DA の蛍光強度は前値の 3.0 倍 ($P < 0.05$) まで緩やかに上昇した。これらの上昇は、ROS の消去剤である Trolox により抑制された。C-DCDHF-DA の蛍光強度の上昇は AIP によりほぼ完全に抑制された。また ROS 消去剤の Trolox は $\Delta\psi_m$ と calcein を低下のいずれも抑制した。

3. 細胞内 Ca^{2+} 濃度、SR の Ca^{2+} 含有量と CaM によるミトコンドリア機能への影響: 細胞内 Ca^{2+} を BAPTA によりキレートとすると CaM の $\Delta\psi_m$ と mPTP、及び ROS 産生に対する効果は減弱した。また thapsigargin (TG) により SR の Ca^{2+} 含有量を減少させると、CaM の $\Delta\psi_m$ と mPTP 及び ROS 産生に対する効果は減弱した。
4. ミトコンドリア内 Ca^{2+} と CaM によるミトコンドリア機能への影響: ミトコンドリアの Ca^{2+} 汲み上げを Ru360 で阻害すると、CaM の $\Delta\psi_m$ と mPTP 及び ROS 産生に対する効果は不完全に抑制された。
5. ミトコンドリア内 Ca^{2+} に対する CaM の影響: CaM は rhod-2 の蛍光強度に影響を与えなかったが、灌流に用いる細胞内液組成を変更し(組成: 50 KCl、80 K-aspartate、4 K-pyruvate、20 HEPES、3 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、2 K_2ATP 、3 EGTA; 単位: mM、 $[\text{Ca}^{2+}] = 177 \text{ nM}$) 細胞内 Na^+ 濃度を 0 nM として、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 排泄に関連する $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換を抑制すると、20 分間の CaM の投与による rhod-2 の蛍光強度は $150.1 \pm 4.1 \%$ ($p < 0.05$) に増加したが、この効果は TG で完全に抑制された。ミトコンドリアの Ca^{2+} 汲み上げを Ru360 で阻害した場合、Ru360 は単独で rhod-2 の蛍光強度を $85.3 \pm 2.7 \%$ ($p < 0.05$) に減弱した。CaM はこの効果をさらに $78.2 \pm 3.3 \%$ へと促進した。以上により CaM はミトコンドリアからの Ca^{2+} 流出を促進したことが示唆された。

[考察]

CaM/CaMKII により、ROS の産生を介して mPTP は開口し、 $\Delta\psi_m$ は脱分極した。これらの効果は、SR から放出される Ca^{2+} の上昇と、引き続き生じるミトコンドリア内 Ca^{2+} の局所の変化により調節されていた。この結果は従来報告されている SR とミトコンドリアのクロストークと、CaM のミトコンドリアに対する効果が密接に関連していることを示唆している。さらに CaM/CaMKII はミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入を増大し、またミトコンドリアの $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換を活性化することによりミトコンドリアの Ca^{2+} 調節機構にも関与していることが明らかになった。

[結論及び展望]

心筋細胞における CaM、CaMKII はミトコンドリア機能調節において重要な役割を果たし、それは SR から放出される Ca^{2+} と近傍のミトコンドリアの Ca^{2+} 流入により厳密に調節されている。これらのシグナルは心不全の成立に深く関連しており、今後の心不全に対する新しい治療のターゲットとして期待される。

論文審査の結果の要旨

細胞内 Ca^{2+} とカルモジュリン (CaM) 及びカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) は心筋細胞機能の調節に重要で、心疾患の発症機構とも密接に関連する。心不全においても慢性の交感神経刺激過剰により活性化された CaMKII が、心筋細胞のアポトーシスを惹起するが、このアポトーシスは筋小胞体 (SR) の Ca^{2+} 含有量とも相関することが明らかになってきた。ミトコンドリアはアポトーシスにおいて中心的な役割を果たしており CaMKII によるアポトーシスにもミトコンドリアを介する機序が推察されているが、詳細に検討した報告はない。そこで申請者、CaM、CaMKII がミトコンドリア機能に及ぼす影響を共焦点レーザー顕微鏡によるイメージング法を用いて検討した。

雄 Sprague-Dawley ラット(体重 250-350 g)の心筋細胞を、コラゲナーゼで単離し、サポニン処理 (0.05

mg/ml) により細胞膜除去した後に、室温で人工細胞内液 (Ca^{2+} 濃度 177 nM) で持続灌流した。ミトコンドリアの機能として、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\psi_m$) は tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE: 10 nM) を、ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mPTP) 開口の指標に calcein (1 μM) を、活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) 産生の指標に 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF: 10 μM)、及び 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di (acetoxymethyl ester) (C-DCDHF-DA: 5 μM) を、ミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度は rhod-2 (20 μM) を用いて、各々の蛍光強度変化を経時的に測定した。

$\Delta\psi_m$ を反映する TMRE 蛍光は CaM の濃度依存性に低下し、10 nM では $53.4 \pm 3.7\%$ ($p < 0.05$) に低下した。この効果は、CaM 及び CaMKII の阻害薬である W-7 と autocalmitide 2-related inhibitory peptide (AIP) により抑制され、CaM の下流シグナルとしての CaMKII の関連が示された。mPTP の開口を反映するミトコンドリア内 calcein の蛍光強度も $73.5 \pm 1.9\%$ ($p < 0.05$) と低下し、この効果も同様に AIP により抑制された。さらに mPTP の阻害薬である cyclosporin A (CsA) は calcein のみならず TMRE 蛍光の低下も抑制した。CaM 投与により DCF の蛍光強度は 8.4 倍 ($p < 0.05$) に速やかに上昇し、C-DCDHF-DA の蛍光強度は 3.0 倍 ($P < 0.05$) まで緩やかに上昇した。これらの上昇は、ROS の消去剤である trolox により抑制された。C-DCDHF-DA の蛍光強度の上昇は AIP によりほぼ完全に抑制された。また ROS 消去剤の trolox は TMRE と calcein 蛍光の低下をいずれも抑制した。以上から CaM/CaMKII は、ROS の産生を介して mPTP を開口し、その結果 $\Delta\psi_m$ を脱分極すると考えられた。

細胞内 Ca^{2+} を BAPTA によりキレートとすると CaM の $\Delta\psi_m$ と mPTP、及び ROS 産生に対する効果は減弱した。また thapsigargin (TG) により SR の Ca^{2+} 含有量を減少させた場合も、CaM の $\Delta\psi_m$ と mPTP 及び ROS 産生に対する効果は減弱した。さらに、ミトコンドリアの Ca^{2+} 汲み上げを Ru360 で阻害すると、CaM の $\Delta\psi_m$ と mPTP 及び ROS 産生に対する効果は不完全ながら抑制された。すなわち、CaM/CaMKII による ROS 産生、mPTP 開口、 $\Delta\psi_m$ 脱分極は SR から放出される Ca^{2+} による細胞内 Ca^{2+} の上昇と、引き続き生じるミトコンドリアへの Ca^{2+} の流入により調節されることが示唆された。これは従来報告されている SR とミトコンドリアのクロストークに、CaM の働きが密接に関連していることを示唆している。

CaM はミトコンドリア内の rhod-2 の蛍光強度に影響を与えなかったが、細胞内 Na^+ を除去してミトコンドリアからの Ca^{2+} 排泄を担う $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換を抑制すると、 $150.1 \pm 4.1\%$ ($p < 0.05$) に増加し、これは TG で完全に抑制された。Ru360 存在下では rhod-2 の蛍光強度は $85.3 \pm 2.7\%$ ($p < 0.05$) に減弱したが、CaM の追加でさらに $78.2 \pm 3.3\%$ まで減弱した。以上から CaM/CaMKII はミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入を増大し、同時にミトコンドリアの $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換を活性化することによりミトコンドリアの Ca^{2+} 調節機構にも関与していることが明らかになった。

審査委員会では、申請者が CaM、CaMKII が SR からの Ca^{2+} 放出と近傍のミトコンドリアへの汲み上げによりミトコンドリア機能を調節していることを初めて示し、将来の心不全の病態解明と治療法開発に示唆を与えた点を高く評価した。

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) rhod-2 の Ca^{2+} 解離定数はどれくらいか

- 2) 自己リン酸化 CaMKII の細胞内局在と活性化の持続時間について
- 3) TMRE と $\Delta\psi_m$ を反映するメカニズムとその相関関係について
- 4) 添加した薬物の濃度等の実験条件はどのようにして決めたか
- 5) ROS 産生、mPTP 開口、 $\Delta\psi_m$ 脱分極の因果関係とその機序について
- 6) DCF と C-DCDHF-DA 反応の時間経過の違いは何を意味しているか
- 7) calcein 蛍光変化が mPTP 開口の指標といえる根拠について
- 8) CaMKII が核に作用してどのようなメカニズムで心筋肥大を起こすのか
- 9) 実験で投与した CaM の濃度は生理的範囲か
- 10) CsA がミトコンドリア内に入るメカニズムについて
- 11) CaM と無関係に ROS を産生させた場合でも mPTP や $\Delta\psi_m$ は変化したか
- 12) $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換を抑制した状態で CaM のミトコンドリアへの作用をみたか
- 13) この実験条件は実際の β_1 受容体刺激による Ca^{2+} 動態を反映しているか
- 14) SR とミトコンドリアの Ca^{2+} のクロストークは物理的距離と矛盾しないか
- 15) AIP 存在下でミトコンドリア呼吸鎖を阻害すると $\Delta\psi_m$ は過分極するのか

これらの質問の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 福田 敦夫

副査 川上 純一

加藤 孝澄