HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Small conductance Ca2+-activated K+ current is upregulated via the phosphorylation of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	水上, 和也
Description	配架番号：2170
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11688号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58822
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuya_Mizukami_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　水上　和也

学位論文題名

Small conductance Ca^{2+}-activated K^+ current is upregulated via the phosphorylation of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy
（カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII活性化による肥大心のSKチャネル調節機序の検討）

【背景と目的】心肥大患者は心臓突然死の独立した危険因子であることが知られている。また心臓突然死の80%以上が心室性不整脈の関与と考えられている。しかし肥大心において心室性不整脈が起こるメカニズムについては未だ十分に検討されていない。
Small-conductance Ca^{2+}-activated K^+チャネル(SKチャネル）はカリウム選択性、電位非依存性イオンチャネルに分類され、神経組織、心臓、骨格筋、血管内皮など生体に広く発現していることが報告されている。このSKチャネルはハチ毒であるアパミンによって特異的に阻害されることからアパミン感受性カリウムチャネルとも呼ばれている。正常心室筋においてSKチャネルは活動電位形成に関与しないと報告されている。一方、不全心、虚血心では、心室筋の電気生理学的特性にSKチャネルの活性化が関わっており、心室性不整脈発生との関連性が指摘されている。Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)はカルシウムカルモジュリン複合体により活性化され、リアノリジン、ホスホランバン、電位依存性カルシウムチャネルなどをリン酸化することで細胞内カルシウム濃度の調整に重要な役割を担っているプロテインキナーゼである。心不全、虚血、心肥大では拡張期のカルシウム濃度が上昇していることが報告されている。またカルシウム濃度の上昇はCaMKII活性の亢進を引き起こすことが知られており、病的心ではCaMKII活性が亢進していることが考えられる。一方、SKチャネルのC末端にカルシウムセンサーを担うカルモジュリンが結合することが、カルシウムによるチャネル開口機序に重要な役割を担っていることが報告されている。しかしながらSK チャネルのカルシウムによる開口機序については、カルシウムの結合が直接関与しているのか、もしくはカルシウム依存性の細胞内伝達系を介するものなのかなど詳細については不明な点が多い。不全心モデルラビットでは正常心と比較してアパミン感受性カリウム電流が有意に増大していることが報告されている。その機序として不全心ではSKチャネルのカルシウムに対する感受性が亢進していることが報告されている。しかし、不全心でのSKチャネルの活性化ならびにカルシウム感受性の制御機構については明らかにされていない。そこで我々は肥大心ではCaMKII依存性機序によりSKチャネルが活性化していると仮説を立て検証した。
【材料と方法】高血圧肥大心モデルとしてspontaneously hypertensive rat(SHR),対照としてWistar-Kyoto rat (WKY)を使用した。パッチクランプ法による膜電位固定を行い、全細胞電流を測定した。アパミン(SKチャネル阻害薬)投与前投与後の全細胞電流の差にてアパミン感受性電流を評価した。また膜電位光学マッピング法にてアパミン投与下での活動電位持続時間(APD)を評価した。さらにウエスタンブロット法にてSK蛋白及びCaMKII蛋白、リン酸化CaMKII蛋白の評価を行った。
【結果】パッチクランプ法で測定したアパミン感受性電流の逆転電位は過去の報告のアパミン感受性カリウム電流と近似していた。従って、以下アパミン感受性カリウム電流とし

た。WKY 群ではアパミン感受性カリウム電流はほとんど認められなかった。一方、SHR 群ではアパミン感受性カリウム電流は認められ、WKY 群と比較し有意に増加していた。また SHR のアパミン感受性カリウム電流は KN93(CaMKII 阻害薬) を投与する事でほぼ消失した。また高カルシウム濃度条件でも WKY ではアパミン感受性電流は減弱していた。刺激周期 300 ms でのアパミン投与前、投与後の活動電位波形を膜電位光学マッピング法にて評価した。SHR ではアパミン投与により APD の延長が認められたが、WKY ではアパミン投与前後で APD に変化が認められなかった。また APD の延長率は、SHR では WKY と比較し有意に上昇していた。以上から SHR ではアパミン感受性カリウム電流が APD を短縮しているが、WKY では APD に影響を与えないことが示唆された。SK 蛋白、CaMKII 蛋白をウエスタンブロット法にて評価した。SK1、SK3 は WKY 群、SHR 群両者に発現量の差は認めなかった。一方で、SK2 蛋白は SHR 群で有意に発現量が増加していた。CaMKII 蛋白の総量は WKY 群、SHR 両者に発現量の差は認めなかった。一方で、リン酸化 CaMKII は SHR 群で有意に増加していた。

【考察】本研究の重要な所見として、肥大心において SK チャネルの活性及び蛋白が増加していることが示された。また肥大心のみで SK チャネル阻害薬であるアパミンにて活動電位持続時間が延長しており、肥大心における SK チャネル電流増大が APD を短縮させる事が示された。さらに CaMKII 阻害薬である KN93 にて肥大心において増大していた SK チャネル電流が顕著に抑制されたことから、SK チャネル電流の調節に CaMKII が関与している事が示唆された。本研究では SK1, SK3 蛋白は両群間で変化せず、SK2 蛋白は SHR で増加が認められた。しかし心臓電気生理学上、どのアイソフォームが最も重要な役割を担っているかは未だ確定しておらず、今後の研究課題と考えられる。本研究において肥大心モデルラットの心筋細胞において増加していた SK チャネル電流は CaMKII 阻害薬である KN93 において抑制された。一方で正常対照群ラットの心筋細胞においては高濃度の細胞内カルシウム濃度(pCa=5)でも SK チャネル電流の活性化は極めて減弱していた。これらの結果からは 2 つの異なるメカニズムの関与が考えられる。1 番目に SK チャネルのカルシウム感受性がチャネル本体あるいは付属部へのリン酸化、脱リン酸化により変化するというメカニズムがあげられる。2 番目のメカニズムとしては正常心と肥大心では SK2 チャネルの細胞膜への発現に違いがあるというものである。本研究において CaMKII の総量及びリン酸化 CaMKII 量を SHR、WKY で測定した。CaMKII 総量については SHR、WKY 両群に差は認められなかったが、リン酸化 CaMKII は SHR で有意に増加していた。我々のデータは過去の肥大心モデルで CaMKII 活性が上昇していた報告に矛盾しない。これらの結果は肥大心において CaMKII 活性が上昇していることを示している。CaMKII は転写因子を介して蛋白発現に関与している事が知られている。また、CaMKII が一過性外向きカリウムチャネルのダウンレギュレーションに重要な役割を担っていることが報告されている。さらに CaMKII は他のカリウムチャネルにおいても主要な調節因子であるとされている。これらの知見から、CaMKII 活性の上昇が SK 蛋白発現に関与している可能性が考えられる。SK チャネル電流は正常心の電気生理学的特性に関与していないと報告されている。一方で病的心においては活動電位時間に影響を与え、不整脈に関連すると報告されている。これらの事から SK チャネル阻害薬は正常心筋にはほとんど影響せず、病的心筋のみに特異的に効果のある薬剤となりうるかもしれない。病的心のみに特異的な効果が期待できる SK チャネル阻害薬は副作用が少ない事が予想され臨床上非常に魅力的な薬剤になると考えられる。

【結論】今回の研究では肥大心において SK チャネルの活性化及び蛋白の増大が認められた事、また CaMKII が SK チャネル電流を調節する事が明らかとなった。また SK チャネルは正常心での活動電位時間に影響を与えないことが示された。したがって, SK チャネル阻害薬は病的心における特異的な新規治療薬になり得ることが考えられる。SK チャネルは脳神経分野において数多くの研究がなされているが、今後の循環器領域での研究が推進され、心臓特異的な治療に発展することを期待したい。