



Title	Small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} current is upregulated via the phosphorylation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11688
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60960
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuya_Mizukami.pdf



学位論文

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)

2015 年 3 月

北海道大学

水上 和也

学位論文

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)

2015 年 3 月

北海道大学

水上 和也

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
1. 緒言	2
2. 略語表	4
3. 実験方法	5
3.1 実験動物	
3.2 ランゲンドルフ灌流心	
3.3 単離細胞作製	
3.4 パッチクランプ法	
3.5 膜電位光学マッピング法	
3.6 ウェスタンブロット法	
3.6.1 蛋白抽出	
3.6.2 蛋白濃度測定	
3.6.3 電気泳動	
3.6.4 転写	
3.6.5 ブロッキング、抗体反応	
3.6.6 検出	
3.6.7 リブロット	
3.7 統計学的検討	
4. 実験結果	11
4.1 パッチクランプ法	
4.1.1 肥大心におけるアパミン感受性カリウム電流	
4.1.2 高カルシウム濃度下での正常心アパミン感受性カリウム電流	
4.2 膜電位光学マッピング法	
4.3 ウェスタンブロット法	
4.3.1 SK 蛋白の発現	
4.3.2 CaMKII 蛋白の発現	
5. 考察	18
5.1 心臓の SK チャネル蛋白発現	
5.2 肥大心における SK チャネル電流調節機序	
5.3 肥大心の CaMKII 活性	
5.4 CaMKII による SK チャネル蛋白調節	
5.5 SK チャネル阻害薬の可能性	
5.6 本研究の限界	

6. 総括および結論	22
7. 謝辞	23
8. 引用文献	24

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿しており、後日発表される予定である。

1. Kazuya Mizukami, Hisashi Yokoshiki, Hirofumi Mitsuyama, Masaya Watanabe, Taro Tenma, Shingo Takada, Hiroyuki Tsutsui. Small conductance Ca^{2+} -activated K^+ current is upregulated via the phosphorylation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. (投稿中)

本研究の一部は以下の学会にて発表予定である。

1. Kazuya Mizukami, Hisashi Yokoshiki, Hirofumi Mitsuyama, Masaya Watanabe, Taro Tenma, Shingo Takada, Hiroyuki Tsutsui. Small conductance Ca^{2+} -activated K^+ current is upregulated via the phosphorylation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy. 日本循環器学会(第79回日本循環器学会学術集会)、2015年4月24日～26日、大阪

1. 緒言

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^{1, 2}。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³。肥大心では活動電位持続時間が延長していること、カリウムチャネル電流の減弱が見られること、カルシウム動態の異常（L型カルシウム電流、T型カルシウムチャネルの出現、拡張期カルシウム濃度上昇）が報告されている⁴⁻⁷。不整脈発生機序として高血圧モデルラットにて高カルシウム条件下で遅延後脱分極が生じること、またカリウムチャネルブロッカーで早期後脱分極が生じることが報告されている⁸。同様に高血圧モデル犬にてカルシウムアゴニスト投与により早期後脱分極が生じ、心室性不整脈が誘発されることが報告されている⁹。

病的心に対する心室性不整脈の治療薬にはカリウムチャネルブロッカーであるアミオダロンが現在主体となっているが、Antiarrhythmics versus Implantable Defibrillators (AVID) 試験では突然死予防として十分な治療成績があげられていない¹⁰。また、一方でナトリウムチャネルブロッカーはCardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST)にて催不整脈作用によって予後を悪化させてしまうことが報告されている¹¹。そのため、新しい治療ターゲットとなりえる心室性不整脈の電気生理学的メカニズムの解明が求められている。

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^{12, 13}。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¹⁴。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^{15, 16}。

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¹⁷。心不全¹⁸、虚血¹⁹、心肥大⁷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¹⁷、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^{20, 21}。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。

不全心モデルウサギ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¹⁵。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、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することとした。

2. 本研究で使用する略語と記号

APD: Action potential duration

AVID: Antiarrhythmics versus Implantable Defibrillators

CAST: Cardiac Arrhythmia Suppression Trial

CaMKII: Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II

HRP: horseradish peroxidase

PAGE: poly acrylamide gel electrophoresis

PVDF: polyvinylidene difluoride

SDS: sodium dodecyl sulfate

SHR: Spontaneously hypertensive rat

SK: Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+}

TBS: tris buffered saline

WKY: Wistar-Kyoto rat

3. 実験方法

3.1 実験動物

本研究の動物実験は、北海道大学動物実験施設の動物使用指針に基づいて行った。高血圧性肥大心のモデルとして 18-30 週齢の Spontaneously hypertensive rat (SHR) のオスを、対照として同週齢の Wistar-Kyoto rat (WKY) のオスを使用した。

3.2 ランゲンドルフ灌流心

ラットに塩酸ヘパリン (400 IU/kg) を腹腔内投与し、10 分後にペントバルビタール (60 mg/kg) を腹腔内投与し鎮静を得た。その後、気管切開によりカニューレを直接的に挿入し人工呼吸を開始した。腹部を横切開し、剣状突起をけん引しながら横隔膜の腹側 (前面) に切開を加え胸骨および肋骨から切り離した。左右両側の肋骨を可能な限り背側で離断し前胸郭を反転させ、心臓を露出させた。胸腺組織を剥離し上行大動脈を露出させた後、下大静脈を離断した。上行大動脈を離断し、その部位より心臓側の大動脈をピンセットにて把持しながらランゲンドルフ装置に接続、3-0 絹糸にて固定するとともに肺動脈、上大静脈、肺静脈を離断し、37°C に保温した Tyrode 液にて逆行性灌流を開始した。Tyrode 液の組成 (mM) は、143 NaCl, 5.4 KCl, 0.33 NaH₂PO₄, 5 HEPES, 5.5 glucose, 0.5 MgCl₂, 1.8 CaCl₂ (NaOH を用いて pH 7.4 に調整) とし、100%酸素で飽和した。灌流心は 37°C に保温されたチャンバー内で固定し拍動を安定させた後実験に使用した。

3.3 単離細胞作製

ランゲンドルフ灌流心の拍動が安定した後カルシウム無添加の Tyrode 液 (37°C) にて置き換え 30 分灌流した。その後カルシウム無添加の Tyrode 液にコラゲナーゼ (0.5 mg/ml, Wako, Osaka, Japan) を加えた灌流液にて 40 分から 60 分灌流し、カルシウム無添加の Tyrode 液で 10 分灌流し、コラゲナーゼを除去した。心房及び右室組織を取り除き、心尖部の心外膜、心内膜より組織を小切片に切除し、Kraftbrühe

液の中で攪拌し、100 μ m cell strainer (BD Biosciences, CA, USA) にて濾過し、冷蔵保存した (4°C)。単離心筋細胞は単離後 2 時間から 12 時間で使用した。Kraftbrühe 液の組成 (mM) は、70 KOH, 50 l-glutamic acid, 40 KCl, 20 taurine, 20 KH_2PO_4 , 10 glucose, 10 HEPES, 1 EGTA, 3 MgCl_2 (KOH を用いて pH 7.4 に調整) とした。

3.4 パッチクランプ法

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。パッチ電極はガラス管キャピラリーを牽引器 (Model P-97, Stutter Instrument Company, CA, USA) で引いて作成し、1-3 $\text{M}\Omega$ のものを使用した。単離心筋細胞が沈殿した Kraftbrühe 液を灌流槽に滴下し、灌流槽に Tyrode 液を満たした後、顕微鏡及び電極の抵抗の変化を指標に単離細胞と電極を接触させ、シリンジにて陽圧をかけギガオームシールを形成。さらに陽圧をかけることで細胞膜を破り、ホールセル法を形成した。細胞膜容量は、膜電位を 0mV の保持電位より過分極方向に -5 mV まで 25 ms で変化 (0.2 V/s) させる事により生じる電流の振幅から算出した。Tyrode 液から槽内液に切り替えた後、-50 mV の保持電位より、-100 mV から +50 mV のパルス電位へ 10 mV 毎、300 ms の膜電位固定を与えることにより生じる全細胞電流を 6 秒毎に計測した。槽内液への切り替えには従圧式液交換装置 (ALA Scientific Instrument, Inc, NY, USA) を使用した。コントロールでの電流測定後アパミン (100 nM) (Peptide Institute, Inc, Osaka, Japan) を加え再度全細胞電流を測定した。アパミン投与前投与後の電流の差をアパミン感受性カリウム電流として定義した。CaMKII の SK チャネルへの影響を確認する目的で KN93 (1 μ M) (Calbiochem, CA, USA) を槽内液に加えて上記と同様に実験を行った。電極内液は計算式²²に基づきカルシウム濃度が 863 nM もしくは 10,000 nM となるよう調整した。槽内液の組成は (mM) 140 N-methylglucamine, 4 KCl, 1 MgCl_2 , 5 glucose, 10 HEPES (HCl を用いて pH 7.4 に調整した) とした。電極内液 (カルシウム濃度 863 nM) の組成は (mM) 144 potassium gluconate, 1.15 MgCl_2 , 5 EGTA, 10 HEPES, 4.2 CaCl_2 (KOH を用いて pH 7.25 に調整した)、電極内液のカルシウム

濃度を 10,000 nM とする場合には CaCl_2 を 4.917 mM とした。パッチクランプ法は室温にて行った (24–25°C)。

3.5 膜電位光学マッピング法

摘出灌流心の心拍数が安定した後、心臓を固定し、10 分後灌流液を Di-4-ANEPSS (2.5 μM 、Wako, Osaka, Japan) を混和した Tyrode 液に切り替え 10 分間灌流した。続いて、心拍動によるアーチファクトを除くため、灌流液をミオシン II の特異的阻害剤であるブレビスタチン (10 μM 、Toronto Research Chemicals Inc, Ontario, Canada) を混和した Tyrode 液に切り替え灌流を継続した。心拍動が停止した後 (10–15 分後)、150 W ハロゲン光源からの光をフィルターを介して 531 ± 20 nm の波長に変換し、励起光源として標本心臓に照射した。標本からの放射蛍光はロングパスフィルタ (>590 nm) を介して高感度電荷結合素子 (CCD) カメラ (MiCAM02 High Resolution, BrainVision, Tokyo, Japan) にて撮影した。撮影時間は 2,500 ms、時間解像度は 2.5 ms/frame とした。撮影は左室心尖部からの 300 ms のペーシング下に行った。コントロールを撮影後、アパミン 100 nM を加えたブレビスタチンを混和した Tyrode 液に切り替え 5 分後に再度撮影した。活動電位波形の立ち上がり最大速度時点を局所の脱分極点とし、活動電位持続時間 (Action potential duration, APD) は局所の脱分極点から活動電位の最大振幅 90% 再分極点までの時間 APD_{90} を測定した。なお灌流用の Tyrode 液は 37°C に保温した。

3.6 ウェスタンブロット法

摘出した心臓は Tyrode 液にてランゲンドルフ灌流を行い、血液を洗い出した。その後、左室心尖部より心筋を迅速に切除し液体窒素で凍結し -80°C で保存した。

3.6.1 蛋白抽出

凍結保存した心筋サンプルを氷上で解凍した。ホモジナイズ用と保存用の 1.5 ml エッペンドルフチューブをそれぞれサンプル数分用意し

た。10 倍細胞溶解液 (Cell Signaling, MA, USA) を蒸留水で 10 倍希釈し、99.5%エタノール (Wako, Osaka, Japan) で希釈した 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (Sigma-Aldrich, MO, USA) およびセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼを阻害するプロテアーゼインヒビターカクテル錠である complete Mini (Roche, IN, USA) を 1 錠添加した後、ホモジナイズ用のエッペンチューブに 300 μ l ずつ入れた。細胞溶解液の組成は 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 μ g/ml leupeptin とした。解凍した心筋サンプルを 20 mg に切り揃え、氷上でホモジナイズした。ついでホモジナイズしたサンプルを遠心分離し (15,000 rpm $\times$ 20 分)、上清を新しいエッペンドルフチューブに移した。上清を入れたエッペンドルフチューブは氷上で保存した。長期保存する場合は、-80°C で冷凍保存した。

3.6.2 蛋白濃度測定

6000 μ l の BCATM Protein Assay Reagent A と 120 μ l の BCATM Protein Assay Reagent B (Thermo Scientific, IL, USA) の混合液を GREINER 96-Well CELLSTAR[®] Cell Culture Plates sterile, F-bottom (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) の各ウェルに 200 μ l ずつ分注した。ブランクとして 1 穴空白を置き、2 mg/ml 牛血清アルブミン (Thermo Scientific, IL, USA) をスタンダードとして 2, 4, 8, 16, 32 μ l ずつウェルに注入し、次のウェルから 2 μ l ずつ測定するサンプルを注入した。ついで 37°C、30 分インキュベートした後、蛋白濃度測定装置本体 (Immuno Mini Model NJ-2300, Biotec, Tokyo, Japan) およびソフト (immuno mini, Biotec, Tokyo, Japan) を立ち上げ、「ミキシングあり、単波長、フィルター 540 nm」の設定で測定した。スタンダード蛋白の平均値の一次直線を算出し、スタンダード蛋白濃度から得た検量線を基にサンプル蛋白濃度を算出した。

3.6.3 電気泳動

上述のサンプル蛋白濃度から同量の蛋白となるようサンプルを調節した後、以下の手順にて電気泳動を行った。ゲル板 (Mini-PROTEAN® TGX™ precast Gels (Bio-Rad, CA, USA)) を泳動槽にセットし、泳動槽に泳動バッファーを注入した。20 µl のサンプルをピペットマンで各ウェルに注入し、必要に応じて分子量マーカである sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 用マーカ― (Cruz Marker Molecular Weight Standards, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), カラーマーカ― (Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range, BIO-RAD, CA, USA) を注入した。POWER PAC 300 (BIO-RAD, CA, USA) にて 40 mA/ゲル (定電流) で泳動した。サンプルがゲルの先端まで移動したのを確認の上、ゲル板を外した。泳動バッファーの組成は 3.03 g Tris, 14.4 g Glycine, 1 g SDS, 81.57 ml 蒸留水とした。

3.6.4 転写

電気泳動後ゲルを polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンである Trans-Blot Turbo™ (BIO-RAD, CA, USA) の上に乗せ、Trans-Blot Turbo™ Transfer System (BIO-RAD, CA, USA) によって、7 分間でゲルからメンブレンにタンパクを転写した。

3.6.5 ブロッキング、抗体反応

メンブレンを 0.1% Tween-tris buffered saline (TBS) で振盪、3% スキムミルク*にてブロッキング処理した。その後 0.1% Tween-TBS にて振盪 (10 分間×3 回) し、1 次抗体 (3% スキムミルクで希釈*) を室温で 1 時間もしくは 4℃ で 1 晩反応させた。0.1% Tween-TBS にて振盪 (10 分間×3 回) した後、2 次抗体 (Tween-TBS で希釈) を 1 時間反応させ、0.1% Tween-TBS にて振盪 (10 分間×3 回) した。0.1% Tween TBS の組成は 5 ml 10% Tween, 50 ml x 10 TBS, 445 ml 蒸留水とした。

* リン酸化蛋白質を観察する際には、3% スキムミルクではなく 3% 牛血清アルブミンを使用した。

SK チャネル, CaMKII, リン酸化 CaMKII 蛋白測定に以下の抗体を使用し

た。1次抗体として Anti-K_{Ca}2.1(SK1)、Anti-K_{Ca}2.2(SK2)、Anti-K_{Ca}2.3(SK3) (Almone, Jerusalem, Israel)、Anti-CaMKII antibody (Abcam, MA, USA)、Phospho-CaMKII (Thr286) Antibody (Cell Signaling technology, MA, USA) をそれぞれ用いて行い、2次抗体には horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) を用いて行った。

3.6.6 検出

ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, UK) を用い化学発光法で標識した後、ChemiDoc XRS system (BIO-RAD, CA, USA) で検出し可視化されたバンドを画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health, MD, USA) を用いて集積光濃度を定量して解析した。内部コントロールとして抗 GAPDH 抗体 (Cell Signaling technology, MA, USA) を用いて目的タンパクの発現量を標準化した。

3.6.7 リブロット

リブロットは 10 倍 Re-Blot Plus Strong Solution (MILLIPORE, CA, USA) を蒸留水で希釈し、メンブレンを室温で 15 分間振盪させ、のせていた抗体をはがした後に行った。

3.7 統計学的検討

得られた数値は、平均値±標準誤差で表した。2群間の平均値の差の検定には Student's t-test を用い、3群間の平均値の差の検定は ANOVA を用い、有意差が認められた場合に事後検定としてボンフェローニ法により検定した。解析には Prism 5 (GraphPad Software Inc, CA, USA) を使用し、p 値<0.05 を有意とした。

4. 実験結果

4.1 パッチクランプ法

4.1.1 肥大心におけるアパミン感受性カリウム電流

WKY、SHR 及び SHR に KN93 (CaMKII 阻害薬) を加えた単離左室心筋細胞における代表的な全細胞電流を図 1 に示す。左から順にコントロール (Baseline)、アパミン 100 nM 投与後 (Apamin 100 nM)、さらにアパミンによって抑制された電流 (Difference)、すなわちアパミン感受性電流を提示している。図 2 はアパミン感受性電流の電流-電圧曲線である。アパミン感受性電流の逆転電位 (reversal potential) は約 -70 mV であり、過去の報告¹⁵のアパミン感受性カリウム電流と近似していた。したがって、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。(40 mV の条件で SHR vs WKY 0.579 ± 0.046 vs 0.022 ± 0.062 pA/pF, $n=6$, $p<0.05$)。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 (40 mV の条件で -0.0832 ± 0.126 pA/pF, $n=4$)。

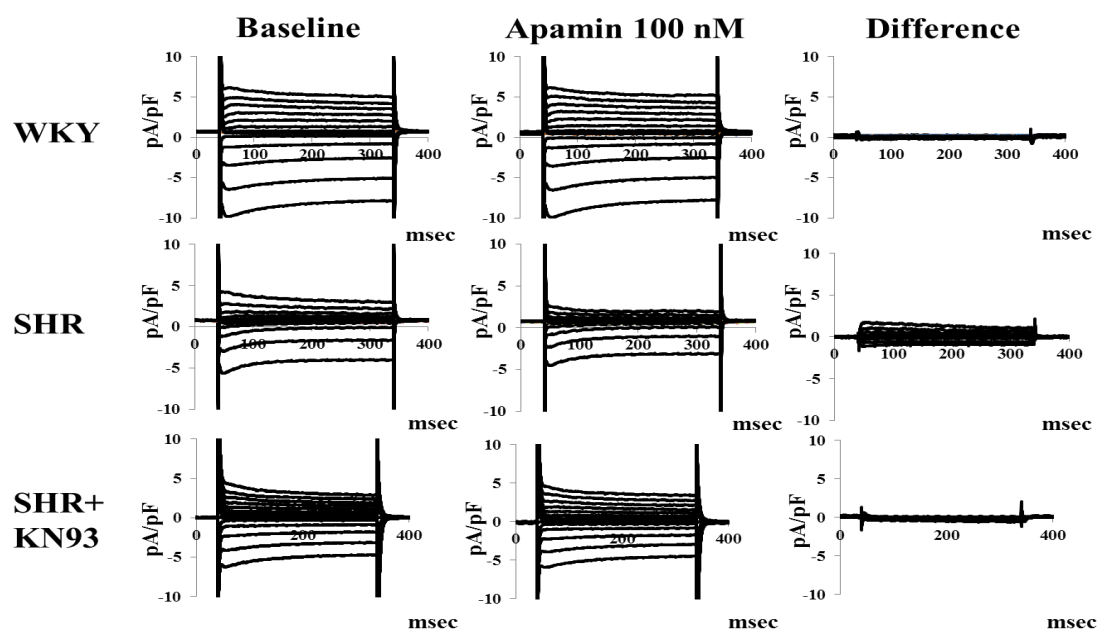


図1 WKY、SHR 及び SHR に KN93 (CaMKII 阻害薬) を加えた単離左室心筋細胞における代表的な全細胞電流。Baseline: アパミン投与前の全細胞電流、Apamin 100 nM: アパミン 100 nM 投与後の全細胞電流、Difference: Baseline-Apamin 100 nM (アパミン感受性電流)。(電極内液のカルシウム濃度: 863 nM)

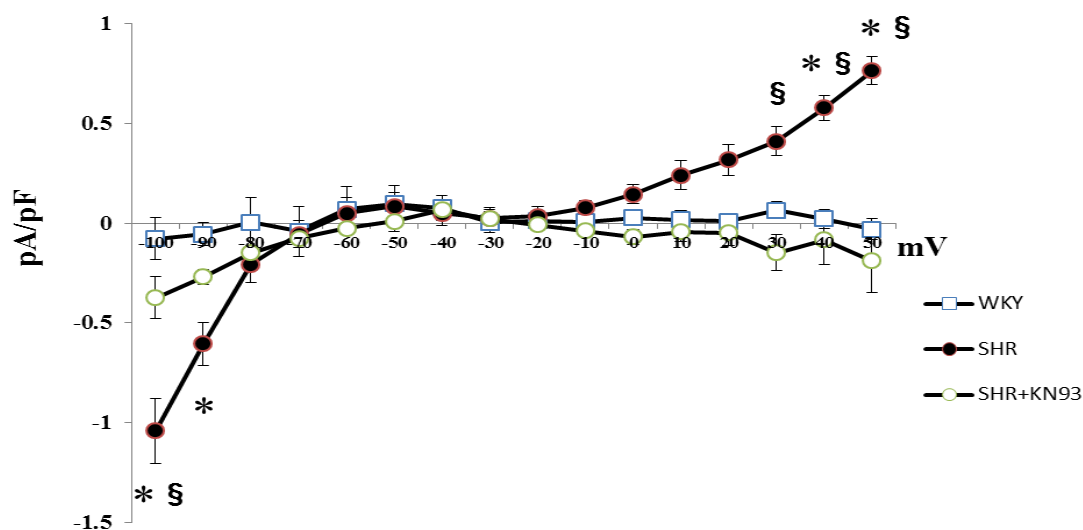


図2 WKY 群、SHR 群、SHR+KN93 群における各電圧での アパミン感受性カリウム電流。WKY: $n=6$, SHR: $n=6$, SHR+KN93: $n=4$ 。(電極内液のカルシウム濃度: 863 nM)。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。

* $p < 0.05$ vs WKY, § $p < 0.05$ vs SHR+KN93

4.1.2 高カルシウム濃度下での正常心のアパミン感受性カリウム電流

図3に高カルシウム濃度(10,000 nM)でのWKY群の各電圧のアパミン感受性カリウム電流を示す。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。(40 mVの条件で 0.203 ± 0.158 pA/pF, $n=3$)。

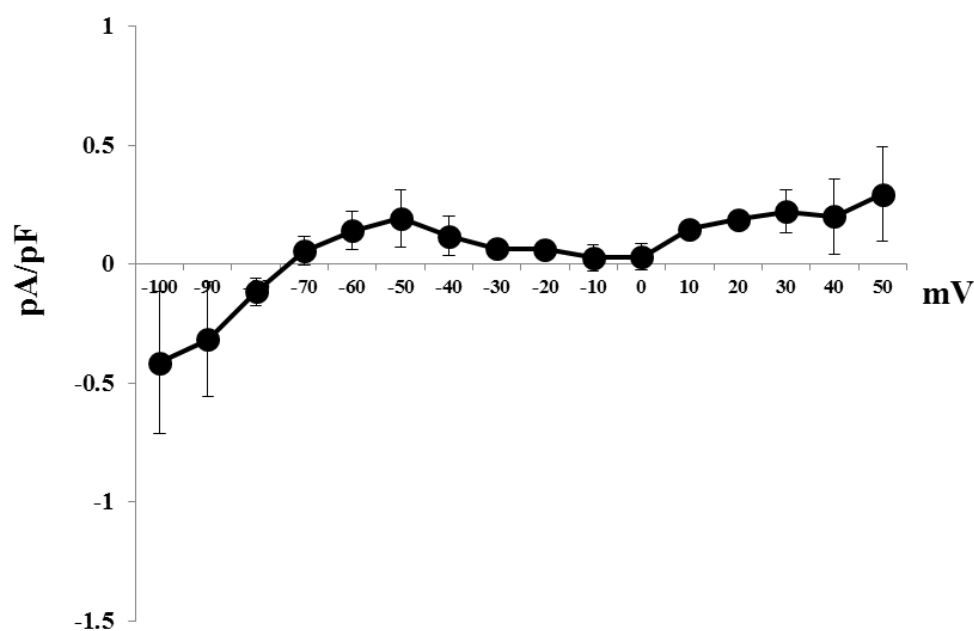


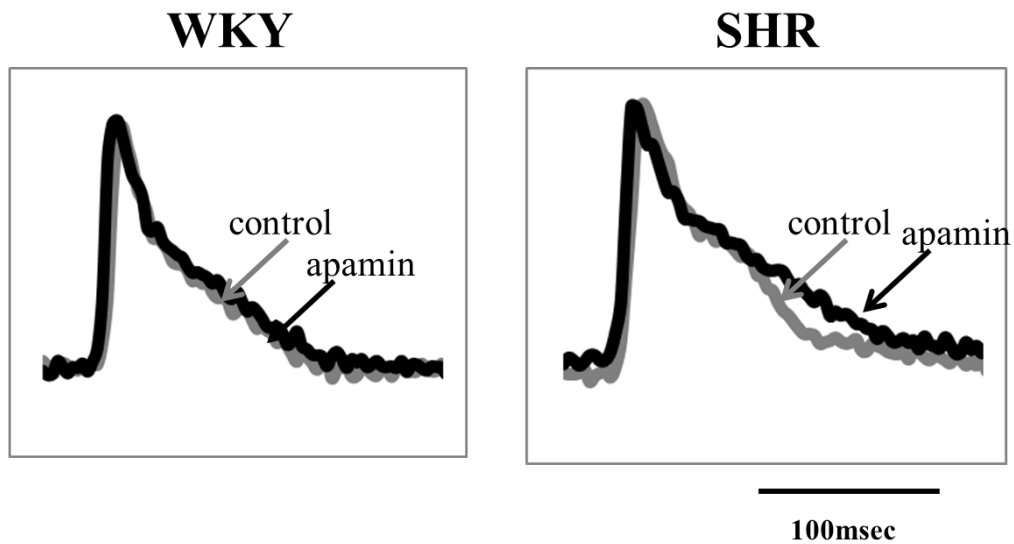
図3 電極内液のCa濃度10,000 nMでのWKY($n=3$)の各電圧におけるアパミン感受性カリウム電流。データは平均値±標準誤差。

4.2 膜電位光学マッピング法

図4に刺激周期300 msでのアパミン投与前、投与後の活動電位波形及び、アパミン投与による APD_{90} の延長率を示す。SHRではコントロール(APD_{90} : 122.89 ± 4.45 ms)、アパミン投与後(APD_{90} : 136.38 ± 6.01 ms)とアパミン投与によりAPDの延長が認められたが、WKYではコントロール(APD_{90} : 115.46 ± 6.01 ms)、アパミン投与後(APD_{90} : 116.2 ± 5.94 ms)と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_{90} の延長率は、SHRではWKYと比較し有意に上昇していた($10.9 \pm 4.7\%$ vs $0.66 \pm 0.46\%$, $p < 0.05$)。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。

A Membrane potential



B

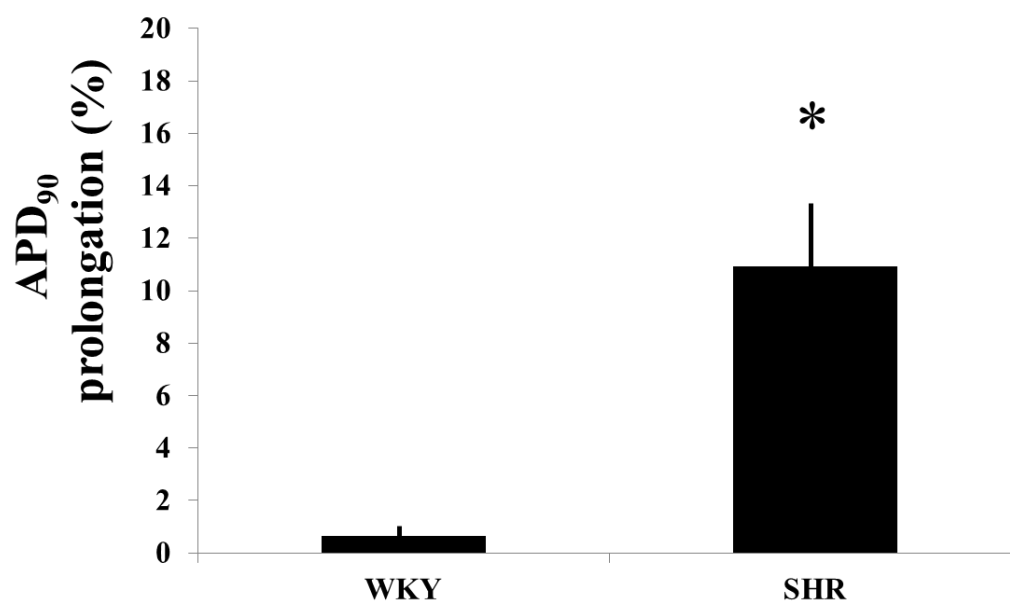


図4 WKY群、SHR群の左心室の活動電位波形の代表例(A)(アパミン投与前(control)、アパミン投与後(apamin))とアパミン投与によるAPD₉₀の延長率(B)。(SHR群のコントロールのAPD₉₀は122.89±4.45 ms、SHR

群のアパミン投与後の APD_{90} は 136.38 ± 6.01 ms、WKY 群のコントロールの APD_{90} は 115.46 ± 6.01 ms、WKY 群のアパミン投与後の APD_{90} は 116.2 ± 5.94 ms。) 各群 $n=5$ 。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。

* $p < 0.05$ vs WKY

4.3 ウェスタンブロット法

4.3.1 SK 蛋白

SK 蛋白には SK1, SK2, SK3 のアイソフォームが存在することが知られており²³、それぞれの発現量について評価した(図 5)。いずれのアイソフォームも左心室筋での発現が認められた。SK1、SK3 は WKY 群、SHR 群両者に発現量の差は認めなかった(SK1/GAPDH 0.72 ± 0.03 vs 0.77 ± 0.03 , $n=6$, SK3/GAPDH, 0.57 ± 0.06 vs 0.63 ± 0.05 , $n=6$)。一方で、SK2 蛋白は SHR 群で有意に発現量が増加していた(SK2/GAPDH 0.66 ± 0.07 vs 0.40 ± 0.02 , $n=6$, $p < 0.05$)。

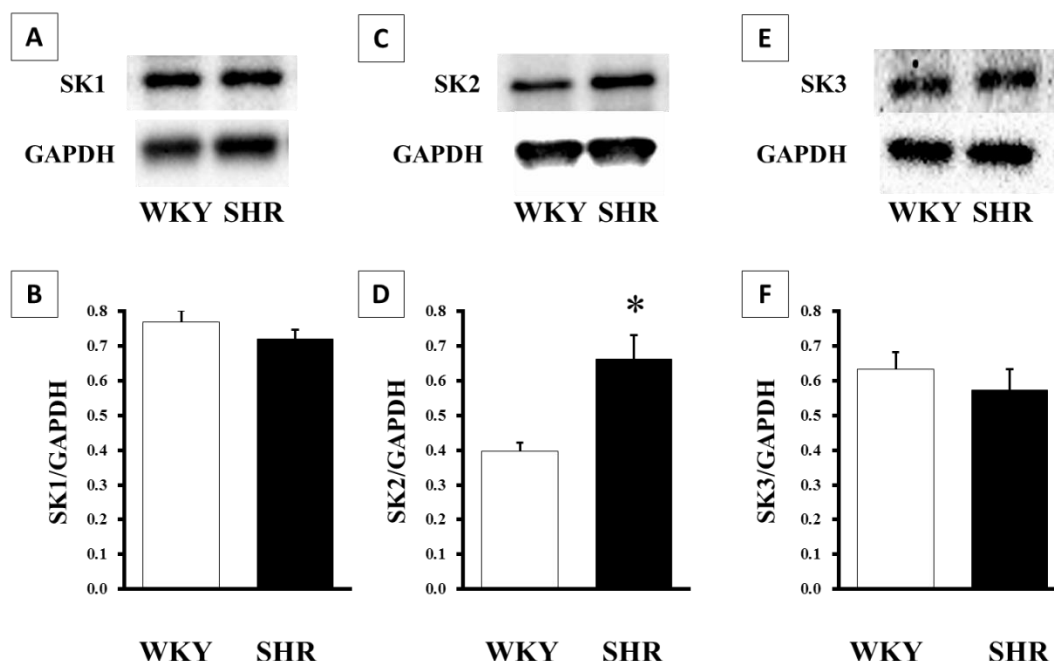


図 5 WKY 群、SHR 群の心筋における SK 蛋白発現 (A, C, E) と定量解析 (B, D, F)。それぞれの蛋白レベルは内部標準 (GAPDH) に対する比で示している。(各群の $n=6$) データは平均値 $\pm$ 標準誤差。* $p < 0.05$ vs WKY

4.3.2 CaMKII 蛋白

CaMKII の活性評価を目的としたリン酸化 CaMKII 蛋白 (スレオニン-286) と CaMKII 蛋白総量を評価した (図 6)。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 (CaMKII/GAPDH 1.02 ± 0.06 vs 1.02 ± 0.05 , $n=6$)。一方で、リン酸化 CaMKII は SHR 群で有意に増加していた (リン酸化 CaMKII/GAPDH 0.80 ± 0.06 vs 0.58 ± 0.06 , $n=6$, $p<0.05$)。KN93 の CaMKII 阻害効果を確認するために vehicle 群、KN93 群、KN92 群 (KN93 の非活性アナログ) にてリン酸化 CaMKII 蛋白を評価した (図 7)。Vehicle 群、KN92 群と比較して KN93 群では有意にリン酸化 CaMKII 発現は減少しており (リン酸化 CaMKII/GAPDH vehicle 群 vs KN92 群 vs KN93 群 1.31 ± 0.11 vs 1.26 ± 0.09 vs 0.87 ± 0.13 , $n=6$, $p<0.05$ vehicle 群 vs KN93 群)、KN93 はリン酸化 CaMKII 蛋白を抑制することが示された。

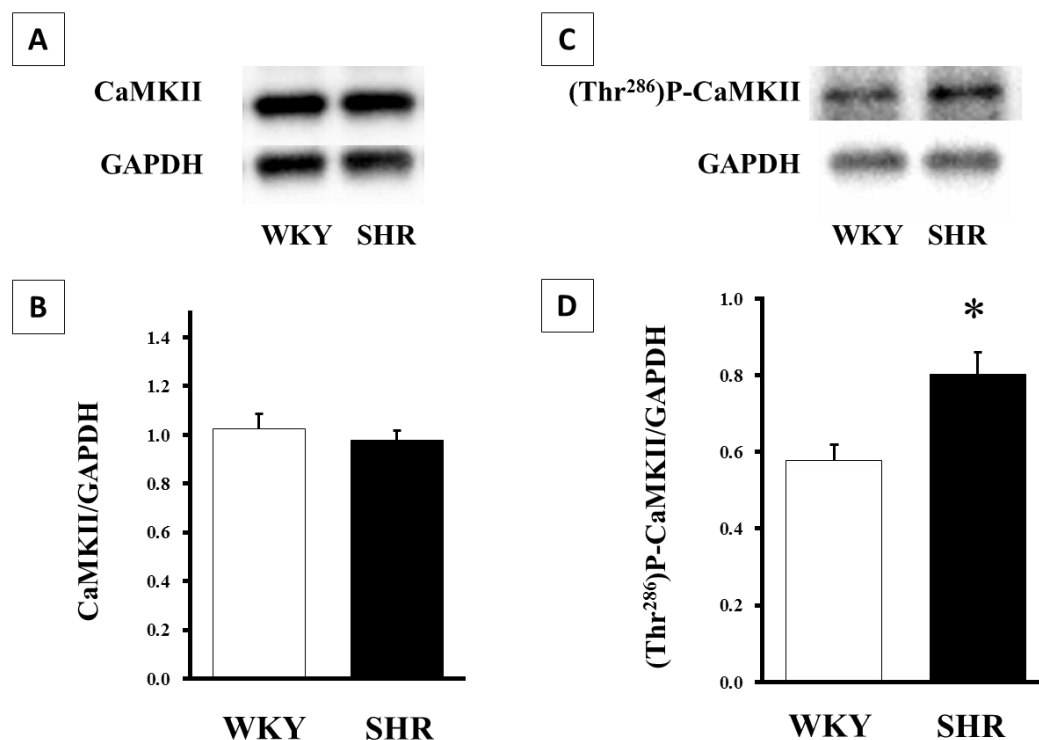


図 6 WKY 群、SHR 群の心筋における CaMKII 及びリン酸化 CaMKII の発現 (A, C) と定量解析 (B, D)。それぞれの蛋白レベルは内部標準 (GAPDH) に対する比で示している。(各群 $n=6$) データは平均値 $\pm$ 標準誤差。

*p<0.05 vs WKY

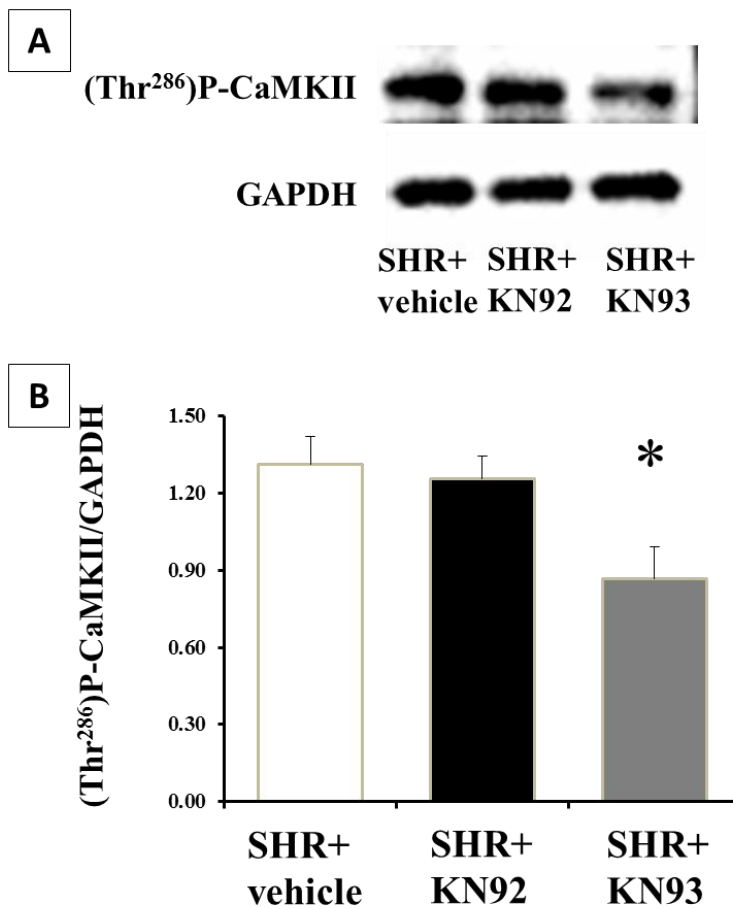


図7 SHR群の心筋におけるリン酸化CaMKIIに対するKN93並びにKN92の効果。Aはウエスタンブロット法による蛋白発現の実例。Bの棒グラフは定量解析(各群 n=6)を示している。それぞれの蛋白レベルは内部標準(GAPDH)に対する比で示している。データは平均値±標準誤差。

*p<0.05 vs vehicle

5. 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活動電位持続時間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。

5.1 心臓の SK チャネル蛋白発現

哺乳類の脳で SK チャネルの 3 つのアイソフォーム (SK1, SK2, SK3) が初めて発見された²³。心臓においては Xu ら²⁴が SK2 の mRNA、蛋白発現がマウスと人の心房筋、マウスの心室筋で発現している事を最初に報告している。その後 SK1, SK3 についてもマウスの心房、心室筋で発見された²⁵。また SK1 の mRNA²⁵ 及び SK2 の mRNA、蛋白^{24, 26, 27} は心室筋より心房筋において発現が亢進していると報告されている。

心不全モデルウサギにおいてアパミン感受性カリウム電流は増加しているに関わらず、SK2 の mRNA 量に変化が無い事が報告された¹⁵。同様に虚血においてラットの心室筋で SK チャネル蛋白の変化は認めなかったと報告している¹⁶。一方で心不全モデルラットでは SK1, SK3 の mRNA 及び蛋白の増加が報告されている²⁸。さらに最近 Chang ら²⁶は人の不全心で SK2 蛋白の増加を報告しており、この結果は本研究結果と合致している。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いない。今後 SK1, 2, 3 それぞれのノックアウト動物での電気生理学的検討を行うことでそれぞれのアイソフォームの役割の解明が期待できる。

5.2 肥大心における SK チャネル電流調節機序

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

(図 2)。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(図 3)。後者についてはラットの心室筋細胞において 100 nM のアパミンが活動電位に影響を与えないとする報告¹⁴と矛盾しない。これらの結果からは 2 つの異なるメカニズムが関与していると考えられる。

メカニズムのひとつとしては 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可能性があげられる。実際 SK2 チャネルの構成成分であるプロテインキナーゼ CK2, プロテインホスファターゼ 2A は SK2 チャネル蛋白に結合するカルモジュリンへのリン酸化/脱リン酸化でカルシウム感受性を変化させていると報告されている²⁹。Adelman は SK2, SK3 チャネル自体には厳密にはカルシウム感受性はない、つまり SK チャネル自体はカルシウム濃度の変化で活性が変化するのではなく、SK チャネル蛋白への修飾がカルシウムの感受性を変化させるのだと報告している¹³。この観点から考慮すると、肥大心における SK2 チャネルの活性化は、カルシウムゲーティングに重要な役割を担っている SK 蛋白に結合しているカルモジュリンを CaMKII が修飾することで生じていると考えられる^{13, 20}。またマウスの腸管細胞のインサイドアウトパッチ法による検討では、カルシウム濃度を一定にした条件 ($pCa=7$) で、リン酸化 CaMKII を添加することにより SK チャネルが活性化すると報告³⁰されており、本研究で得られた CaMKII による SK チャネル活性の亢進機序と矛盾しない。

別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可能性である。本研究においては CaMKII の総量に変化はないが、リン酸化 CaMKII の増加が認められた(図 6)。この結果は CaMKII とカルシウム/カルモジュリンが多く結合したことを意味する。SK2 チャネルでは細胞膜への発現にカルモジュリンとの結合が重要であることが報告されており³¹、肥大心において CaMKII と同様に SK2 チャネルへカルモジュリンが多く結合すると考えると、本研究で示した肥大心における SK チャネル活性の亢進及び正常心で SK チャネ

ルが活性化しない事が説明できる。またカルモジュリンの作用とは反対にサイクリック AMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) による SK2 チャネルの C 末端のリン酸化では SK2 チャネルの細胞膜での発現低下が報告されている³²。本研究では肥太心筋において SK2 蛋白が増加している事を示したが、細胞膜分画での SK 蛋白の変化については検討していない。今後の研究にて細胞膜分画での SK2 蛋白の増加の有無の検証が必要と考えられる。

5.3 肥太心の CaMKII 活性

CaMKII はカルシウム/カルモジュリンと結合する事で活性化する。また活性化した CaMKII は自己リン酸化を起こす事が知られている¹⁷。したがって、リン酸化 CaMKII は CaMKII 活性の指標となりえる。

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 (図 6)。本研究のデータは過去の SHR^{33, 34}、横行大動脈縮窄 (TAC) マウス³⁵ で CaMKII 活性が上昇していたという報告に矛盾しない。これらの結果は肥太心において CaMKII 活性が上昇していることを示している。

5.4 CaMKII による SK チャネル蛋白調節

CaMKII は nuclear factor of activated T cells (NFAT)³⁶ や myocyte enhancer factor-2³⁷ といった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、calcinerurin/NFAT 機構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³⁸。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³⁹。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。KN93 の長期投与を行い、SK2 蛋白及びメッセンジャー RNA の測定実験を行う事で解明が可能と考えられる。

5.5 SK チャネル阻害薬の可能性

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¹⁴。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^{15, 16}。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可能性がある。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、臨床上有用な薬剤になると期待される。

5.6 本研究の限界

本研究にはいくつかの限界が存在する。まず、今回の研究が SK チャネル阻害薬、CaMKII 阻害薬という薬剤を用いた研究である点である。アパミン、KN93 による非特異的な作用を完全に除外することが出来ない。また肥大モデルとして SHR という遺伝的な高血圧モデル動物を使用した点である。したがって、今回の研究結果が他の肥大心においても観察されるか否かは不明である。次に CaMKII による SK チャネル制御の詳細な機序を証明出来ていない点があげられる。最後に SK チャネル電流と不整脈の直接的な因果関係を証明出来ていない点があり、今後の課題である。

6. 総括及び結論

本研究では、肥大心ラット、正常対照ラットの心室筋において、下記のような電気生理学的ならびに生化学的变化が確認された。

- (1) 肥大心での SK チャネル電流の増加。
- (2) 肥大心での CaMKII による SK チャネル電流の調節。
- (3) 正常心での高カルシウム濃度下での不十分な SK チャネル電流の活性化。
- (4) 肥大心での SK チャネル電流活性化による活動電位持続時間の短縮。
- (5) 肥大心での SK2 蛋白の増加。
- (6) 肥大心での CaMKII 活性亢進。

結論として、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¹³、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。

7. 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて頂くとともに，終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学分野 筒井裕之教授に深謝申し上げます，また，本研究全般にわたり親身なご助言と懇切丁寧な御指導を頂きました北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学分野 横式尚司講師、三山博史助教に深く感謝の意を表します。また、本研究を行うにあたり、御協力をいただきました循環病態内科学教室員、実験助手の皆様、医局秘書の皆様に厚く御礼を申し上げます。

また，本研究は多くの実験動物の尊い生命の犠牲の賜物であることをここに銘記いたします。

8. 引用文献

- 1 Levy, D. *et al.* Risk of ventricular arrhythmias in left ventricular hypertrophy: the Framingham Heart Study. *Am. J. Cardiol.* **60**, 560-565 (1987).
- 2 Haider, A. W., Larson, M. G., Benjamin, E. J. & Levy, D. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J. Am. Coll. Cardiol.* **32**, 1454-1459 (1998).
- 3 Bayes de Luna, A., Coumel, P. & Leclercq, J. F. Ambulatory sudden cardiac death: mechanisms of production of fatal arrhythmia on the basis of data from 157 cases. *Am. Heart J.* **117**, 151-159 (1989).
- 4 Ryder, K. O., Bryant, S. M. & Hart, G. Membrane current changes in left ventricular myocytes isolated from guinea pigs after abdominal aortic coarctation. *Cardiovasc. Res.* **27**, 1278-1287 (1993).
- 5 Nuss, H. B. & Houser, S. R. T-type Ca^{2+} current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ. Res.* **73**, 777-782 (1993).
- 6 Furukawa, T. *et al.* The ionic mechanism of reperfusion-induced early afterdepolarizations in feline left ventricular hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **91**, 1521-1531 (1993).
- 7 Sipido, K. R. *et al.* Enhanced $\text{Ca}^{(2+)}$ release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. *Circulation.* **102**, 2137-2144 (2000).
- 8 Aronson, R. S. Afterpotentials and triggered activity in hypertrophied myocardium from rats with renal hypertension. *Circ. Res.* **48**, 720-727 (1981).
- 9 Ben-David, J., Zipes, D. P., Ayers, G. M. & Pride, H. P. Canine left ventricular hypertrophy predisposes to ventricular tachycardia induction by phase 2 early afterdepolarizations after administration of BAY K 8644. *J. Am. Coll. Cardiol.* **20**, 1576-1584 (1992).
- 10 A comparison of antiarrhythmic-drug therapy with implantable defibrillators in patients resuscitated from near-fatal ventricular arrhythmias. The Antiarrhythmics versus Implantable Defibrillators (AVID) Investigators. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1576-1583 (1997).

- 11 Echt, D. S. *et al.* Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *N. Engl. J. Med.* **324**, 781-788 (1991).
- 12 Mahida, S. Expanding role of SK channels in cardiac electrophysiology. *Heart Rhythm.* **11**, 1233-1238 (2014).
- 13 Adelman, J. P., Maylie, J. & Sah, P. Small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels: form and function. *Annu. Rev. Physiol.* **74**, 245-269 (2012).
- 14 Nagy, N. *et al.* Does small-conductance calcium-activated potassium channel contribute to cardiac repolarization? *J. Mol. Cell. Cardiol.* **47**, 656-663 (2009).
- 15 Chua, S. K. *et al.* Small-conductance calcium-activated potassium channel and recurrent ventricular fibrillation in failing rabbit ventricles. *Circ. Res.* **108**, 971-979 (2011).
- 16 Gui, L. *et al.* Ventricular tachyarrhythmias in rats with acute myocardial infarction involves activation of small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **304**, H118-130 (2013).
- 17 Erickson, J. R. & Anderson, M. E. CaMKII and its role in cardiac arrhythmia. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **19**, 1332-1336 (2008).
- 18 Hasenfuss, G. & Pieske, B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**, 951-969 (2002).
- 19 Tsujii, E. *et al.* In situ visualization of the intracellular Ca^{2+} dynamics at the border of the acute myocardial infarct. *Mol. Cell. Biochem.* **248**, 135-139 (2003).
- 20 Xia, X. M. *et al.* Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature.* **395**, 503-507 (1998).
- 21 Maylie, J. *et al.* Small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels and calmodulin. *J. Physiol.* **554**, 255-261 (2004).
- 22 Bers, D. M., Patton, C. W. & Nuccitelli, R. A practical guide to the preparation of $\text{Ca}^{(2+)}$ buffers. *Methods Cell Biol.* **99**, 1-26 (2010).
- 23 Kohler, M. *et al.* Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science.* **273**, 1709-1714 (1996).
- 24 Xu, Y. *et al.* Molecular identification and functional roles of a $\text{Ca}^{(2+)}$ -activated K^+ channel in human and mouse hearts. *J. Biol. Chem.* **278**, 49085-49094 (2003).

- 25 Tuteja, D. *et al.* Differential expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels SK1, SK2, and SK3 in mouse atrial and ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**, H2714-2723 (2005).
- 26 Chang, P. C. *et al.* Heterogeneous upregulation of apamin-sensitive potassium currents in failing human ventricles. *J Am Heart Assoc.* **2**, e004713 (2013).
- 27 Skibsbye, L. *et al.* Small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels contribute to action potential repolarization in human atria. *Cardiovasc. Res.* **103**, 156-167 (2014).
- 28 Ni, Y. *et al.* Bisoprolol reversed small conductance calcium-activated potassium channel (SK) remodeling in a volume-overload rat model. *Mol. Cell. Biochem.* **384**, 95-103 (2013).
- 29 Allen, D., Fakler, B., Maylie, J. & Adelman, J. P. Organization and regulation of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel multiprotein complexes. *J. Neurosci.* **27**, 2369-2376 (2007).
- 30 Kong, I. D., Koh, S. D., Bayguinov, O. & Sanders, K. M. Small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels are regulated by Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II in murine colonic myocytes. *J. Physiol.* **524 Pt 2**, 331-337 (2000).
- 31 Lee, W. S. *et al.* Small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels and calmodulin: cell surface expression and gating. *J. Biol. Chem.* **278**, 25940-25946 (2003).
- 32 Ren, Y. *et al.* Regulation of surface localization of the small conductance Ca^{2+} -activated potassium channel, Sk2, through direct phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **281**, 11769-11779 (2006).
- 33 Boknik, P. *et al.* Enhanced protein phosphorylation in hypertensive hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **51**, 717-728 (2001).
- 34 Mitsuyama, H. *et al.* Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II increases the susceptibility to the arrhythmogenic action potential alternans in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **307**, H199-206 (2014).
- 35 Colomer, J. M., Mao, L., Rockman, H. A. & Means, A. R. Pressure overload selectively up-regulates Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Mol. Endocrinol.* **17**, 183-192 (2003).
- 36 MacDonnell, S. M. *et al.* CaMKII negatively regulates calcineurin-NFAT

- signaling in cardiac myocytes. *Circ. Res.* **105**, 316-325 (2009).
- 37 Zhang, T. *et al.* CaMKII δ isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses. *J. Biol. Chem.* **282**, 35078-35087 (2007).
- 38 Xiao, L. *et al.* Mechanisms underlying rate-dependent remodeling of transient outward potassium current in canine ventricular myocytes. *Circ. Res.* **103**, 733-742 (2008).
- 39 Mustroph, J., Maier, L. S. & Wagner, S. CaMKII regulation of cardiac K channels. *Front. Pharmacol.* **5**, 20 (2014).