



Title	肥大心の心筋虚血における催不整脈機序の解明カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼIIを介したスモールコンダクタンスカルシウム感受性カリウムチャネル活性化の役割 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	天満, 太郎
Description	配架番号 : 2303
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12562号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66139
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Taro_Temma_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 天満 太郎

学 位 論 文 題 名

肥大心の心筋虚血における催不整脈機序の解明

カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ II を介したスモールコンダクタンスカルシウム感受性カリウムチャネル活性化の役割

(Ischemia-Induced Small-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel Activation

Deteriorates Ventricular Arrhythmias in Cardiac Hypertrophy through the CaMKII-Dependent Pathway)

【背景と目的】心筋虚血時に活性化する代表的なイオンチャネルがアデノシン三リン酸（ATP）感受性カリウムチャネル（ K_{ATP} チャネル）である。このチャネルは、心筋虚血に伴う電気生理学変化の主要な役割を担うと考えられているが、 K_{ATP} チャネルは虚血早期の細胞外カリウムイオン濃度上昇の主要因にはならないとの報告がなされている。SK チャネルは非電位依存性であり、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によって活性化されると報告されており、体内では広く分布しているが、心室筋における役割は未だ解明されていない。一方、不全心、肥大心の心室筋において、SK チャネル電流が機能的に発現し、活動電位形成に関与しているとの報告がある。さらに肥大心の心室筋において細胞内カルシウムイオンによって調節される calcium / calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) 活性（リン酸化 CaMKII）が上昇しており、SK チャネル電流の何らかの調節因子となり得る事も報告されている。以上のことを考慮し、急性虚血によるリン酸化 CaMKII が SK チャネルの開口を規定しており、肥大心では生理的条件下において、すでにリン酸化 CaMKII が亢進しているために虚血早期から SK チャネルの開口がおこるのではないかと仮説を立てた。虚血早期の SK チャネル活性が虚血による活動電位時間（APD）短縮をもたらす、特に肥大心において、持続性心室不整脈の催不整脈性を高めているのではないかと仮説を立てた。リン酸化 CaMKII は SK チャネルに直接的に結合しているのではないかと仮説を立てた。仮説を立てたことを検討することとした。

【材料と方法】肥大心モデルとして遺伝的肥大心モデルラットである Spontaneously hypertensive rat (SHR) を使用した。対照として Wistar-Kyoto rat (WKY) を使用した。低酸素 / 無グルコース Tyrode 液（100% 窒素で飽和したグルコースを含まない Tyrode 液）でランゲンドルフ灌流を行うことで急性心筋虚血を作製した。膜電位光学マッピング法でアパミン（SK チャネル阻害薬）、グリベクランミド（ K_{ATP} チャネル阻害薬）投与下での APD を評価した。また、急性心筋虚血中の心電図を測定することで急性虚血の催不整脈性とアパミン投与による抗不整脈効果を検討した。さらに免疫ブロット法で急性心筋虚血中の SK チャネル蛋白及びリン酸化 CaMKII の評価を行った。最後に免疫沈降法により SK チャネル蛋白とリン酸化 CaMKII の直接結合を検討した。

【結果】WKY 群、SHR 群共に虚血が進行するにつれて APD₉₀（脱分極点から活動電位の最大振幅における 90% 再分極点までの時間）の短縮を認めた。一方、SHR 群は WKY 群と比較してより

早期の虚血時間から APD_{90} の短縮を認めた。アパミン (100 nM) で灌流した WKY 群においては、虚血早期では虚血による APD_{90} 短縮の抑制は認められなかったが、虚血晚期では有意にその抑制が認められた。一方、SHR 群においては、両群で有意にその抑制を認めた。グリベンクラミド (10 μ M) で灌流した WKY 群においては、虚血早期、虚血晚期の両群で、虚血による APD_{90} 短縮は抑制される傾向にあった。特に、虚血晚期においては有意にその抑制が認められた。一方、SHR 群においては、両群で虚血による APD_{90} 短縮は減少したが、有意差を認める程度の減少は認めなかった。全虚血による持続性心室不整脈 (SVA) に対するアパミン効果の検討では、アパミン (100 nM) は SHR 群において効果的に虚血による SVA を抑制した。急性心筋虚血のタンパク評価では WKY 群、SHR 群の両群において、虚血中の SK チャネル蛋白はどのアイソフォームにおいても有意な変化は認められなかった。また、WKY 群において虚血が進行するにつれてリン酸化 CaMKII の上昇を認めたが、SHR 群においては虚血による変化は認めず、虚血前の高値を保っていた。上述の結果でリン酸化 CaMKII は SK チャネル活性に重要な役割を担っている可能性が考えられたため、同蛋白と SK チャネル蛋白に免疫沈降を行い、リン酸化 CaMKII と SK 2 チャネル蛋白の直接結合を確認した。

【考察】正常心でアパミンは活動電位を変化させないと報告されている。一方で、病的心モデルにおいては SK チャネル電流が存在し活動電位形成に関与していると報告されている。さらに、正常心においても低カリウム血症は SK チャネル電流を活性化すると報告されている。興味深いことに、これらの病態生理状態では CaMKII が活性化すると報告されている。本研究では正常心において急性虚血が進行するにつれてリン酸化 CaMKII が上昇し、これに呼応してアパミンが APD 短縮を抑制することを確認した。ゆえに SK チャネル活性はリン酸化 CaMKII と密接に関連している可能性が示唆される。急性心筋虚血における CaMKII の活動を検討した報告は少ない。CaMKII 活性は興奮頻度に制御されており、本研究では虚血中も心室ペーシング可能である低酸素/無グルコース Tyrode 液灌流心での疑似虚血状況を全虚血作製法として用いた。この条件下において、WKY から作製した正常心の心室筋細胞では急性虚血によるリン酸化 CaMKII の上昇を認めたが、SHR より作製した肥大心の心室筋細胞においては急性虚血でもリン酸化 CaMKII に有意な変化を認めなかった。この結果より急性虚血ではリン酸化 CaMKII が上昇するが、肥大心では非虚血状態で既にリン酸化 CaMKII が十分上昇しており急性虚血によるさらなる活性化は示さなかったと考察できる。本研究ではリン酸化 CaMKII と SK2 チャネル間に直接結合があることを発見した。過去の研究で、リン酸化 CaMKII はカルモジュリンとの親和性が 1000 倍に増加している事や SK チャネルがカルモジュリン結合部位を有している事が報告されている。このカルモジュリンを介して、リン酸化 CaMKII と SK チャネルが直接結合している事が考慮される。また、この結合が SK チャネルの細胞内カルシウムイオンに対する感受性を変化させ、結果として WKY と SHR における急性虚血時の SK チャネル活性の経時変化をもたらしている可能性が考えられた。

【結論】本研究では特に肥大心において、急性心筋虚血時の心室不整脈に対する新たな機序、CaMKII を介した SK チャネル活性による虚血時の不整脈性、を発見した点において有意義であると考えられる。CaMKII は多機能キナーゼ蛋白であり、虚血性不整脈の治療ターゲットとしては副作用が多く出る可能性がある。CaMKII の下流に存在する SK チャネルを制御することは最小限の副作用で急性虚血の突然死を抑制できる可能性が考えられる。一方で SK チャネルは様々な組織に存在しており、今後は心臓特異的な SK チャネルの現象を発見し、SK チャネル制御が心臓特異的な治療として発展することを期待したい。