HOKKAIDO UNIVERSITY

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［全文の要約］
Author(s)	天満, 太郎
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2303 他
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/2115/66140
Type	doctoral thesis
File Information	Taro_Temma_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

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)

2017 年 3 月

北　海　道　大　学

天満　太郎

【背景と目的】心筋虚血は致死的不整脈が起こりやすく、致命的な転機となることは広く知られている。急性心筋虚血に伴う代表的な電気生理学的変化としては活動電位時間（APD: action potential duration）の短縮が挙げられ、催不整脈性との関連性が示唆されている。活動電位形成に主に関与するイオンチャネルとしては内向きチャネル電流を形成するナトリウムチャネルやカルシウムチャネルと外向きチャネル電流を形成するカリウムチャネルがある。APD 短縮の原因はこのバランスの欠如によると考えられ、実際に QT 短縮症候群のような先天的に APD 短縮をもたらす病態ではカリウムチャネルやカルシウムチャネルをコードする遺伝子の異常によるカリウムチャネル電流の増加（gain-of-function）やカルシウムチャネル電流の減少（loss-of-function）が報告されている。一方、急性心筋虚血では細胞外カリウムイオン濃度が上昇すると報告されており、この機序としては、Na^+-K^+ポンプの抑制、細胞内水素イオンやナトリウムイオンの上昇に伴う二次的な細胞外流出、カリウムチャネルの開口による細胞外流出等が提唱されている。このカリウムチャネル開口によるカリウムチャネル電流の増加が急性心筋虚血による APD 短縮の主要因と考えられているが、急性心筋虚血による細胞内 ATP 濃度低下により L 型カルシウムチャネルが抑制されカルシウムチャネル電流が減少する事や、細胞外カリウムイオン濃度の上昇により静止膜電位の形成を担うバックグラウンドのカリウムチャネル電流のコンダクタンスが上昇しカリウム電流が増加する事も報告されており、これらが APD 短縮の要因となっている可能性も示唆される。

カリウムチャネルには電位依存性かつ時間依存性に制御される一過性外向きカリウムチャネルと遅延整流カリウムチャネル、静止膜電位を担うバックグラウンドのカリウムチャネル電流を形成する内向き整流カリウムチャネル、リガンド依存性に制御されるアセチルコリン感受性カリウムチャネル、ATP 感受性カリウムチャネル（K_{ATP} チャネル）等が存在する。特に、K_{ATP} チャネルは内向き整流作用を有し、細胞内 ATP 濃度低下により活性化されるカリウムチャネルであり、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きた。一方で、K_{ATP} チャネルの開口薬を使用しても虚血時の細胞外カリウムイオン濃度を変えることはできないとの報告や、K_{ATP} チャネルの構成タンパク質である Kir6.2 を特異的にノックアウトしたマウスにおいて、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。さらに、我々のグループにおいても肥大心の虚血類似条件下では心内膜側心筋の K_{ATP} チャネルの活性化が障害されている事を報告している。故に、K_{ATP} チャネルとは異なる機序が心筋虚血時の細胞外カリウムイオン濃度上昇により強く寄与している可能性が考えられるが、この機序を明示した研究はいまだ存在せず、心筋虚血に伴う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。そこで、我々は K_{ATP} チャネルに代わる機序として、small conductance Ca^{2+}-sensitive K^+ channel（SK チャネル）に着目した。SK チャネルは C 末端にカルモジュリン結合部位を有する 6 回膜貫通型の α サブユニット 4 個から形成され、電位非依存性であり、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いる。生体内では、心筋、末梢神経、骨格筋、平滑筋、血管内皮等に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、Peng-Sheng Chen らのグループならびに我々のグループでは、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ことを初めて報告した。また、我々のグループでは、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活性化 calcium / calmodulin-dependent protein kinase II（CaMKII）（リン酸化 CaMKII）が上昇していると報告している。CaMKII はカルシウムカルモジュリン複合体と結合することで活性化され、ライアノジン受容体、ホスホランバン、L 型カルシウムチャネル等をリン酸化し、細胞内カルシウム濃度調整の重要な役割を担うプロテインキナーゼである。さらに、イソプロテレノールにより CaMK Ⅱを活性化した単離心筋細胞では K_{ATP} チャネル電流が抑制される事やマウスの腸管では CaMK Ⅱが SK チャネルを制御している事が報告されており、活性化 CaMK Ⅱ（リン酸化 CaMKII）は心筋カリウムチャネルを制御し、APD 短縮に関与している可能性が示唆された。また、左室肥大（LVH: left ventricular hypertrophy）は正常心と比較して急性虚血時の心室細動発生率が高い事や、肥大心筋細胞は正常心筋細胞と比較して疑似虚血による APD の短縮が増大していると報告されている。しかしながら、これらの分子生物学的ならびに電気生理学的機序に関しては不明な点が多い。

以上のことを考慮し、本研究では、①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。②虚血早期の SK チャネル活性が虚血による APD 短縮をもたらし、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。③リン酸化 CaMKII は SK チャネルと結合しているのではないかと仮説をたて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。疑似虚血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）、グリベンクラミド（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】

本実験に使用した SHR 群は WKY 群に比較して、左室重量、左室重量体重比ともに有意に高く、実験に用いた週数齢において SHR は肥大心となっている事を確認した。WKY 群、SHR 群共に虚血が進行するにつれて APD_{90} の短縮を認めた。また、SHR 群は虚血のどの時間帯においても WKY 群と比較して APD_{90} の延長を認めた。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 群においてはアパミンを灌流していない対照群と比較して、虚血早期（全虚血 15 分後）では APD_{90} 短縮の抑制は認められなかったが、虚血晩期（全虚血 30 分後）では有意にその抑制が認められた。アパミンで灌流した SHR 群においてはアパミンを灌流していない対照群と比較して、虚血早期（全虚血 15 分後）、虚血晩期（全虚血 30 分後）の両群で有意にその抑制が認められた。グリベンクラミド（10 μM）で灌流した WKY 群においてはグリベンクラミドを灌流していない対照群と比較して、虚血早期（全虚血 15 分後）、虚血晩期（全虚血 30 分後）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、虚血晩期においては有意にその抑制が認められた。グリベンクラミドで灌流した SHR 群においてはグリベンクラミドを灌流していない対照群と比較して、虚血早期（全虚血 15 分後）、虚血晩期（全虚血 30 分後）の両群で虚血による 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られなかった。アパミンは効果的に SHR 群において虚血による SVA を抑制した。WKY 群、SHR 群の両群において虚血中の SK チャネルタンパク質は SK1 チャネル、SK2 チャネル、SK3 チャネルの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。リン酸化 CaMKII は SK チャネルタンパク質と相互作用していることが明らかとなった。

【考察】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。本研究では 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。また、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。

【結論】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治療として発展することを期待したい。