

# 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	齊藤 哲也
<b>学位論文題目</b>			
Roles of Calcineurin and Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy (心肥大におけるカルシニューリン及びカルモデュリンキナーゼIIの役割に関する研究)			
共著者名			
旭川医科大学内科学第一講座 <sup>1)</sup> 、市立根室病院 <sup>2)</sup> 、旭川医科大学薬理学教室 <sup>3)</sup> 、 旭川医科大学微生物学教室 <sup>4)</sup>			
福澤純 <sup>1)</sup> 、大崎純三 <sup>1)</sup> 、櫻木均 <sup>1)</sup> 、矢尾尚之 <sup>1)</sup> 、菊池健次郎 <sup>1)</sup> 、長谷部直幸 <sup>1)</sup> 、 羽根田俊 <sup>2)</sup> 、藤野貴行 <sup>3)</sup> 、若宮信隆 <sup>4)</sup>			
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, vol. 35, No. 9: 1153~1160 平成15年9月			
<b>研究目的</b>			
<p>高血圧による心肥大は、後負荷増大に対する代償機構の一つである。しかし、心肥大は心血管事故発生の重大な危険因子であることが疫学研究で明らかにされており、その機構の解明は心血管事故の予防、治療法の確立上きわめて重要となる。心肥大形成、すなわち心筋細胞の特異的遺伝子の発現、心筋蛋白合成の促進、心筋細胞の肥大には圧負荷による心筋への機械的刺激の他に、高血圧の成因や病態とも関連するカテコールアミンやアンジオテンシンIIなどの神経・体液性因子が関わっている。我々は、成熟ラット摘出灌流心臓系において灌流圧を上昇させ心筋に圧負荷を加えると極めて早期にcAMP-dependent protein kinase A系やprotein kinase C系を介して前癌遺伝子c-fos mRNAの発現が増加し、心筋蛋白合成速度の促進が起きることを報告している。一方、以前より心筋細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が心肥大の形成に重要な役割を担っていることが示唆されていたが、その機序の詳細は明らかにはされていない。最近、カルシウム依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリン ( calcineurin : CaN ) 及びカルシウム/カルモデュリン依存性リン酸化酵素 ( calcium/calmodulin-dependent protein kinase II : CaMK II ) が、心肥大形成に関</p>			

わる可能性が指摘されている。そこで、本研究では、流血中の因子を除外して検討できる純粋な圧負荷モデルである摘出灌流心臓系を用いて、圧負荷による心筋の CaN 経路と CaMK II 経路の心肥大形成に関わる役割について検討した。

## 方法・対象

### (1) 実験動物と摘出灌流心臓

10~12 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットから心臓を摘出、Langendorff 法にて大動脈灌流圧 60 mmHg で再循環定圧灌流した。灌流液として 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> で酸素化した Krebs-Henseleit 緩衝液 (37°C) を用いた。心収縮の影響を除くため、灌流液中にテトロドトキシン (9 µg/ml) を添加し心拍動を停止させた。大動脈灌流圧を 60 から 120 mmHg に上昇させることにより心臓に圧負荷を加え、灌流圧 60 mmHg を対照群、120 mmHg を圧負荷群とした。次に CaN 阻害薬 cyclosporin A (CsA; 0.1~100 µM)、FK506 (10 µM)、CaMK II 阻害薬 KN62 (1 µM) を前処置し、同様の条件で灌流した。

### (2) 心筋 CaN 及び CaMK II 活性

灌流開始 0、2.5、5、10、15、30、60、120 分の時点で心臓を凍結固定した後、CaN は抗カルモジュリン・ポリクローナル抗体を用いて免疫沈降後、抗カルシニューリン・モノクローナル抗体を用いてウェスタン解析にて測定した。CaMK II のリン酸化は、特異的抗リン酸化抗体を用いて、ウェスタン解析にて測定した。

### (3) *c-fos* mRNA の発現

灌流 30、60 分の時点でノーザン解析にて測定した。

### (4) 心筋蛋白合成速度

灌流 60 分目から 120 分目における心筋蛋白への <sup>14</sup>C-phenylalanine の取り込みより測定した。

### (5) 統計学的解析

測定値は平均値±標準誤差で表し、有意差の検定には分散分析を用い多重比較検定には Scheffe 法を用い、 $p < 0.05$  をもって有意とした。

## 結果

### (1) 圧負荷による心筋 CaN、CaMK II の活性化

心筋 CaN 活性は、前値に比し圧負荷群では灌流 30 分後 ( $1.3 \pm 0.06$  倍;  $p < 0.001$ ) より有意に増加し、灌流 60 分後でピーク ( $2.0 \pm 0.08$  倍;  $p < 0.001$ ) に達し、灌流 120 分後 ( $1.6 \pm 0.07$  倍;  $p < 0.001$ ) で減少傾向を示したが、非圧負荷群では灌流 120 分間の CaN 活性には有意な変化は認

められなかった。

CsA、FK506 の前処置は心筋 CaN 活性の基礎値には影響を与えなかったが、圧負荷時の心筋 CaN 活性の増加を濃度依存性に有意 ( $p < 0.01$ ) に抑制した。

心筋 CaMK II 活性は、前値に比し圧負荷群では灌流 5 分後 ( $5.2 \pm 0.34$  倍;  $p < 0.0001$ ) より有意に増加し、灌流 15 分後でピーク ( $6.9 \pm 0.61$  倍;  $p < 0.0001$ ) に達し、灌流 120 分後 ( $5.2 \pm 0.49$  倍;  $p < 0.0001$ ) で減少傾向を示したが、非圧負荷群では灌流 120 分間の CaMK II 活性には有意な変化は認められなかった。

KN62 の前処置は心筋 CaMK II 活性の基礎値には影響を与えなかったが、圧負荷時の心筋 CaMK II 活性の増加を濃度依存性に有意 ( $p < 0.007$ ) に抑制した。

## (2) 圧負荷による *c-fos* mRNA 発現の亢進とその抑制

圧負荷により *c-fos* mRNA の発現は灌流 30—60 分で前値の約 3.0 倍と有意 ( $p < 0.002$ ) に亢進した。この圧負荷による *c-fos* mRNA 発現の亢進は、CaN 阻害薬 CsA、FK506 の前処置によりほぼ完全に抑制されたが、CaMK II 阻害薬 KN62 の前処置によっては抑制されなかった。

## (3) 圧負荷による心筋蛋白合成速度の促進

心筋蛋白合成速度は、圧負荷により 78% (非圧負荷群:  $511.8 \pm 17.77$ , 圧負荷群:  $912.8 \pm 27.06$ ) 有意 ( $p < 0.0001$ ) に促進した。CaN 阻害薬 CsA、FK506 および CaMK II 阻害薬 KN62 の前処置は心筋蛋白合成速度の基礎値には影響を与えなかったが、圧負荷によるこの促進をそれぞれ 74%、73%、69% 有意 (いずれも  $p < 0.0001$ ) に抑制した。

## 考察

圧負荷などの機械的刺激や液性因子が、心筋特異的遺伝子の発現を高め、心筋蛋白の合成を促進させて心肥大を形成する。これまでの研究により細胞内カルシウムイオンの上昇が心肥大形成に関連していることが示唆されていたが、その機序の詳細は不明であった。最近、カルシウム依存性酵素である、CaN および CaMK II が各種の刺激による心肥大形成に重要な分子であることが *in vivo* の実験を中心に報告された。In vivo の系においては、圧負荷による心筋肥大の機序を検討する際に圧負荷による機械的伸展刺激の他に、血行動態の変化に伴う流血中の神経・体液性因子の変化による影響を受け、その機序の解析が複雑化する。そこで、本研究では、神経・体液性因子の影響を除外でき、圧負荷としてより純粋な機械的伸展刺激による影響とその機序を検討できる成熟ラット摘出灌流心臓モデルを用いて、圧負荷による心肥大形成の機序に関わる CaN 経路、CaMK II 経路の意義を検討した。

実験の結果、圧負荷により灌流 30—60 分をピークとする心筋 CaN の活性化と、*c-fos* mRNA の

発現増大が生じ、灌流 60—120 分にかけて心筋蛋白合成速度が促進した。そしてこれらの現象は CaN 阻害薬 CsA、FK506 を前処置することによりいずれも有意に抑制された。また、圧負荷は、5 分後の早期から心筋 CaMK II を活性化し、CaMK II 阻害薬 KN62 の前処置によりこの圧負荷時の CaMK II 活性及び心筋蛋白合成速度の促進は有意に抑制された。一方、圧負荷による *c-fos* mRNA 発現の亢進は CaMK II 阻害薬では抑制できず、CaN 阻害薬前処置時とは差違が認められた。これらの成績は、成熟ラット摘出灌流心臓において、圧負荷により、まず CaMK II 経路が、次いで CaN 経路が異なった Time course により活性化され、心筋蛋白合成速度が促進することを示すもので、これらが心肥大形成に重要な役割を担っていることを強く支持するものと考えられる。加えて、CaN 経路の活性化は *c-fos* mRNA の発現増大を伴うのに対し、CaMK II 経路の活性化は *c-fos* mRNA の発現増大を伴わないことが明らかとなった。この CaN、CaMK II 両経路の活性化時の *c-fos* mRNA 発現の相違の意義は不明であるが、両経路を介するの転写因子レベルでの制御に差違が存在する可能性が示唆された。

#### 結論

本研究の結果、成熟ラット摘出灌流心臓において、心筋への圧負荷により、まず CaMK II 経路が、次いで CaN 経路が活性化されること、両経路とも圧負荷時の心筋蛋白合成速度の促進を介して心肥大形成に重要な役割を担っていることが明示された。また、*c-fos* mRNA の発現については、CaN 系の活性化と CaMK II 系の活性化では異なった動態を示すことが明らかとなり、両経路の転写因子レベルでの制御に相違のある可能性が示唆された。




### 引用文献

- (1) Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 93: 215-228, 1998
- (2) Sussman MA, Lim HW, Gude N, Taigen T, Olson EN, Robbins J, Colbert MC, Gualberto A, Wieczorek DF, Molkentin JD. Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science*. 281: 1690-1693, 1998
- (3) Zhu W, Zou Y, Shiojima I, Kudoh S, Aikawa R, Hayashi D, Mizukami M, Toko H, Shibasaki S, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I.  $Ca^{2+}$ /calmodulin dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1 induced cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 15239-15245, 2000

### 参考論文

- (1) Fukuzawa J, Nishihira J, Hasebe N, Haneda T, Osaki J, Saito T, Nomura T, Fujino T, Wakamiya N, Kikuchi K. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to extracellular signal-regulated kinase activation by oxidative stress in cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 24889-24895, 2002
- (2) 福澤純, 高橋文彦, 齊藤哲也, 大崎純三, 長谷部直幸, 菊池健次郎. 心疾患を伴う高血圧の治療. *内科*. 90: 101-104, 2002
- (3) 福澤純, 矢尾尚之, 櫻木均, 齊藤哲也, 大崎純三, 長谷部直幸, 菊池健次郎. 高血圧治療におけるCa拮抗薬の適応と使いかた. *メディカルプラクティス*. 19: 1553-1536, 2002
- (4) 長谷部直幸, 齊藤哲也, 竹原有史, 角地祐幸, 菊池健次郎. 腎疾患アプローチ 心不全と腎障害 高血圧性心疾患による心不全に合併した腎機能障害の1例. *診断と治療*. 87: 2063-2068, 1999
- (5) 羽根田俊, 岡本清貴, 福澤純, 大崎純三, 柏木雄介, 宮田節也, 大井信治, 中村泰浩, 山崎誠治, 齊藤哲也, 菊池健次郎. Angiotensin II 受容体拮抗薬による高血圧性心肥大形成の抑制機序. *心筋の構造と代謝—1994—*. 17: 407-413, 1995

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	齊藤哲也
<p>審査委員長 <u>牙有文隆</u> </p> <p>審査委員 <u>高井章</u> </p> <p>審査委員 <u>菊池健次郎</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>Roles of Calcineurin and Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy</b>            （心肥大におけるカルシニューリン及びカルモデュリンキナーゼ II の役割に関する研究）</p>			
<p>高血圧に起因する肥大は、心臓の圧負荷に対する代償反応の一つである。一方、心肥大は心血管イベントの主要な危険因子でもあり、その機構の解明はこれらイベントの予防、治療法の確立に極めて重要である。心肥大の形成には、圧負荷による心筋への機械的刺激の他に、カテコールアミンやアンジオテンシン II などの神経・体液性因子が係わっている。また最近、カルシウム一依存性脱リン酸化酵素である calcineurin (CaN) 及び calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) の心肥大形成への関与が指摘されている。そこで本研究は、神経・体液性因子を除外した純粋な圧負荷モデルである摘出灌流心臓系を用い、圧負荷による心肥大形成に関わる CaN と CaMK II の役割について検討した。</p>			

その結果、

- (1) 心筋 CaN 活性は、圧負荷群で灌流 30 分後より増加し、灌流 60 分後でピークに達した。また、シクロスポリンA (CsA)、FK506 は、圧負荷時の心筋 CaN 活性の増加を濃度依存的に抑制した。一方、心筋 CaMK II 活性は、圧負荷群で灌流 5 分後より増加し、灌流15 分後でピークに達した。また、KN62 は圧負荷時の心筋 CaMK II 活性の増加を濃度依存的に抑制した。
- (2) 圧負荷により *c-fos* mRNA の発現は前値の約 3 倍に増加した。この *c-fos* mRNA 発現の増加は、CaN 阻害薬 CsA、FK506 によりほぼ完全に抑制されたが、CaMK II 阻害薬 KN62 では抑制されなかった。
- (3) 心筋蛋白質合成は、圧負荷により亢進した。また、この現象は CsA、FK506 および KN62 により抑制された。

これらの成績は、圧負荷摘出灌流心臓において、CaMK II と CaN の両者が活性化され、心筋蛋白合成速度を促進して心肥大を惹起することを示している。一方、これらの分子の *c-fos* mRNA 発現への効果に差異があることから、その心肥大関連因子の転写制御は異なることが示された。

この成果は、純粋な圧負荷により惹起される心肥大での CaMK II と CaN の役割や意義を解明する上で、重要な貢献をするものと考えられる。

なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。

以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。