

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590823
 研究課題名（和文） T型カルシウムチャネルのアポトーシスへの影響の解明とその制御による治療への応用
 研究課題名（英文） Investigations on the T-type Ca^{2+} channel as a trigger for cellular Ca^{2+} -overload and clinical insight to regulate cellular apoptosis.
 研究代表者
 小野 克重（ONO KATSUSHIGE）
 大分大学・医学部・教授
 研究者番号： 40253778

研究成果の概要：

心筋細胞におけるT型 Ca^{2+} チャネルは自動能の形成作用の他はその機能が知られていなかった。本研究は、僅かな細胞膜電位の変化が窓電流形成膜電位に達することでT型 Ca^{2+} チャネルを通過する Ca^{2+} 電流が細胞内 Ca^{2+} 過負荷を引き起こし、T型 Ca^{2+} チャネルが細胞のアポトーシスの引き金として機能することを初めて明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

低電位活性型T型 Ca^{2+} チャネルは1998年にクローニングされ、その後急速にその構造と機能に関する研究が進んだ。T型 Ca^{2+} チャネルはクローンの違いによって α_{1G} ($\text{Ca}_v3.1$)、

α_{1H} ($\text{Ca}_v3.2$) と α_{1I} ($\text{Ca}_v3.3$) に区別される。心臓では α_{1G} チャネルと α_{1H} チャネルが発現する。心臓のT型 Ca^{2+} チャネルは心筋細胞の肥大の形成や心臓のペースメーカー電位の形成に関与しており、しばしば細胞内 Ca^{2+} 増加に病的役割を果たす。またT型 Ca^{2+} チャネルは胎生

期と成人期で発現量が変化し、個体が成長するにつれて α_{1G} の割合が増加する。肥大心や血管中膜新生の増殖細胞に多量に発現することから、細胞の増殖や細胞間相互作用の機能構築に重要な役割を果たすと考えられている。

2. 研究の目的

心筋での興奮収縮連関はL型 Ca^{2+} チャネルから流入する Ca^{2+} が筋小胞体に作用してそこから放出される Ca^{2+} によって筋収縮が開始される。しかし、病的な心筋細胞ではT型 Ca^{2+} チャネルの発現が増大し、このT型 Ca^{2+} チャネルから流入した Ca^{2+} イオンが筋小胞体に作用するか、あるいは直接収縮蛋白に作用することで筋収縮を病的に制御する事が最近の研究で明らかになっており、細胞内 Ca^{2+} の過負荷の成因の一つであるとみなされている。本研究では心筋細胞内の Ca^{2+} 蓄積・過負荷に注目して、その病態形成に関与する心筋細胞のアポトーシス発生のシグナルとしての細胞内 Ca^{2+} がT型 Ca^{2+} チャネルにいかに関与するかを検証を試みた。

3. 研究の方法

新生ラット心筋細胞と培養細胞に発現させた $Ca_v3.2$ -T型 Ca^{2+} チャネル電流を電気生理学的手法、特にPatch clamp法を用いて測定・解析した。先述の電位依存性 Ca^{2+} チャネルは膜電位変化によってチャネル孔の開閉が規定される。Patch clamp法は細胞内外の電位や電流などの細胞の電気的條件を測定者自らが制御でき、細胞の機能を直接的に測定できる有用な手法であるためこれを用いることとした。Patch clamp法とは、細胞膜にガラス管微小電極(ピペット)をギガ・オーム($G\Omega$ 、 $10^9\Omega$)以上の高抵抗で密着(ギガ・シール)させ、その先端開口部の微小膜領域(patch膜)を電気的に他の領域と隔離した状態で電位固定し、そこに含まれるイオン電流($nA\sim pA$: $10^{-9}A\sim$

$10^{-12}A$)を計測する方法である。測定された電流はOPアンプで構成されるI-Vコンバーター

(Patch clampアンプのヘッドステージに内蔵)で増幅される。電流測定のための細胞は Ca_v3 のみを発現させたHEK293細胞を用いた。継代培養は CO_2 インキュベーター内(95% O_2 +5% CO_2 : $37^\circ C$)で2~3日細胞を培養し、プラスチック底面で70~90%コンフルエントの状態のものを用いた。培地はG418(1 g/l, GIBCO)、10%ウシ胎児血清、ペニシリン 100 units/ml、ストレプトマイシン 100 units/mlを含んだダルベッコ改変イーグル培地(以降、“イーグル培地”とする)を用いた。細胞培養をおこなったプラスチック内のイーグル培地をガラスピペットで採集・廃液し、phosphate buffered saline (PBS)、VTRで洗浄した後に CO_2 インキュベーター内で5分間保存した。5分後にプラスチックを軽くタッピングし、細胞がプラスチック底面から遊離しているのを確認した後に遊離した細胞をイーグル培地に集めて3.5mmディッシュとプラスチックに必要量分けた。3.5mmディッシュはイーグル培地を追加して総量2mlとした。Patch clamp法による細胞の電気生理学的測定はEPC7 (HEKA Electronic社: ドイツ)を用いておこなった。

本研究で用いたサイトメトリー (Cytometry) 法とは、短時間(数秒から数分)に多量(数千個から数百万個)の細胞を1個ずつ定量測定する統計的精度の高い細胞測定法である。その測定装置をサイトメーター (Cytometer) と呼ぶ。光や光センサーなどを用いて、細胞を観察し、細胞ごとの複数の測定情報から相関解析と統計解析を行った。サイトメトリーを大別すると、フローサイトメトリー (FCM) とイメージサイトメトリー (ICM) に分けられる。懸濁させた細胞を、シース流を用いて、1個ずつセンシングゾーンに細胞を導き、高速で散乱光と蛍光などを測定するフローサイトメトリー (Flow Cytometry) と、ガラス上の付着した細胞集団などを、3次元で走査して顕微鏡撮影し、細胞画像処理にて、1個の細胞ごとの情報を抽出するイメージサイトメト

リー (Image Cytometry) がある。アポトーシスを特徴づける生化学的、形態学的変化には、ミトコンドリア膜電位の消失、原形質膜非対称性および完全性の消失、細胞内DNAの凝縮と最終的な断片化があります。本研究では、フローサイトメトリーを利用してこの重要な細胞アポトーシスの様々な局面を検出した。使用したアポトーシスアッセイキットは、生細胞群、アポトーシス細胞群、死細胞群をマークする3種類の別々の染色剤を用いた。死細胞は核酸染色剤のプロピジウムアイオダイドまたはSYTOX®グリーンで染色した。ラット心筋細胞、及びHEK293-Ca_v3細胞を、20%のウシ胎仔血清を含むIscov 培養液で培養皿中に単層培養した。培養は培養器を用いて37°C, 5% CO₂の湿潤な環境で行い、細胞が培養皿に隙間なく増殖した時点で実験を行った。培養皿中の培養液を、HEPES 緩衝液 (組成: NaCl, 130 ; NaHCO₃, 5 ; NaH₂PO₄, 1 ; KCl, 5 ; CaCl₂, 2 ; MgCl₂, 1 ; HEPES, 10 ; glucose, 5. 単位mM) に置換し、1mM の過酸化水素 (H₂O₂) を添加して培養器内に1時間静置した。その後HEPES 緩衝液をIscov 培養液に置換し培養器内に3あるいは6時間静置した。その後は洗浄して細胞外液中のBAPTAAMを取り除いた。その他の薬物は、細胞をH₂O₂にさらす前の30分前から実験終了まで、培養液及びHEPES 緩衝液中に添加した。3-6時間後に細胞をトリプシンで剥がして遠心分離及び洗浄をした後に細胞を回収した。DNAの断片化は、細胞からDNA をフェノールで抽出しアガロース電気泳動を行った後に写真撮影をして解析した。アポトーシスを引き起こした細胞の割合を測定する実験では回収した細胞の核を蛍光色素 (propidium iodide) を用いて染色し、フローサイトメトリーを用いてアポトーシス分画の細胞の割合を求めた。ミトコンドリアの膜電位を調べる実験では膜電位感受性色素DiOC6-3で細胞を染色してフローサイトメトリーにより蛍光量の変化を調べた。

4. 研究成果

その結果、T型Ca²⁺チャネルの発現増加が細胞内Ca²⁺濃度の上昇に直接関わり、そのシグナルがアポトーシスの誘因として作用することを見いだした。このT型Ca²⁺チャネル由来アポトーシスシグナルがいかなる細胞内分子の活性化を介するかを解明するため、カスパーゼ isoform活性の制御に関わるT型Ca²⁺チャネル依存性調節を検討した結果、T型Ca²⁺チャネルの発現増加は、1) hypodiploid cell (アポトーシス細胞)の増加、2) ミトコンドリア膜電位喪失細胞の増加、3) カスパーゼ3活性の上昇、4) カスパーゼ9活性の上昇を伴い、この結果はHEK292細胞でも確認されると同時にT型Ca²⁺チャネル拮抗薬ミベフラジルの存在下で観察されなかった。一方、death受容体を介するアポトーシスの細胞内シグナルの1つであるカスパーゼ8活性はT型Ca²⁺チャネルの発現に影響を受けなかった。更に、T型Ca²⁺チャネルの機能が細胞内Ca²⁺濃度の上昇に直接関わることを明確にするために、T型Ca²⁺チャネル電流の窓電位領域に細胞膜電位がとどまるように培養液カリウム濃度を調節した結果、[K⁺]_oを7.2mMにした際に最大のアポトーシス誘導効果が発揮された。電位依存性Ca²⁺チャネルは連続した電気刺激や自動拍動能に依存した周期的細胞膜電位変化によって活性化され、細胞内Ca²⁺濃度の調節に関わるが、チャネルの不活性化と活性化の相互遷移が生じる窓電位領域における細胞では連続した細胞内Ca²⁺の流入が生じることになる。よって本結果より、膜電位の深い (過分極した) 細胞電位でT型Ca²⁺チャネルの窓電流を通過して生じた細胞内Ca²⁺過負荷がミトコンドリア経路を介して細胞のアポトーシス誘導に関わるという知見を初めて明確に確認することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Uchino T, Sanyal SN, Yamabe M, Kaku T, Takebayashi S, Shimaoka T, Shimada T, Noguchi T, Ono K: Rescue of Pulmonary Hypertension with an Oral Sulfonamide Antibiotic Sulfoxazole by Endothelin Receptor Antagonistic Actions. *Hypertension Research* 31(9):1781-90, 2008 (査読有)
- ② Marni F, Wang Y, Morishima M, Shimaoka T, Uchino T, Zheng M-Q, Kaku T, Ono K: 17β -estradiol modulates expression of low-voltage-activated Cav3.2 T-type calcium channel via ERKs pathway in cardiomyocytes. *Endocrinology* 150(2): 879-888, 2008 (査読有)
- ③ Yamabe M, Sanyal SN, Miyamoto S, Hadama T, Isomoto S, Ono K: Three different bradycardic agents, zatebra dine, diltiazem and propranolol, distinctly modify heart rate variability and QT-interval variability. *Pharmacology* 80:293-303, 2007 (査読有)
- ④ Wang Y, Morishima M, Zheng M, Uchino T, Mannen K, Takahashi A, Nakaya Y, Komuro I, Ono K: Transcription factors Csx/Nkx2.5 and GATA4 distinctly regulate expression of Ca^{2+} channels in neonatal rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 42:1045-1053, 2007 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 王岩: PKCは新生ラット心筋細胞のT型 Ca^{2+} チャネルのSubtype変換を制御する. 第19回日本病態生理学会大会, 2009.1.24, 所沢
- ② Wang Y: Ethanol-induced Tachycardia is Mediated by T-Type Ca^{2+} Channel Regulation Caused by Transcription Factor Csx/Nkx2.5 Activation. 第72回日本循環器学会学術集会, 2008.3.28, 福岡
- ③ 鄭明奇: 電位依存性T型 Ca^{2+} チャネルに対

するリゾホスファチジルコリンの作用. 第18回日本病態生理学会大会, 2008.1.26, 神戸

- ④ 鄭明奇: リゾホスファチジルコリンは PKC α を介して Cav3.2-T型 Ca^{2+} チャネルを制御する. 第24回日本心電学会学術集会, 2007.10.4, 名古屋
- ⑤ 嶋岡徹: 心筋細胞内マグネシウムは Ca^{2+} channelの発現を制御する. 第24回日本心電学会学術集会, 2007.10.4, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯本 正二郎 (ISOMOTO SHOJIRO)
大分大学・医学部・助教授
研究者番号: 80273671

小野 克重 (ONO KATSUSHIGE)
大分大学・医学部・教授
研究者番号: 40253778

(2) 研究分担者

小野 克重 (ONO KATSUSHIGE)
大分大学・医学部・教授
研究者番号: 40253778

李 泰成 (LEE TAE-SEONG)
大分大学・医学部・助教
研究者番号: 10336266

鄭 明奇 (ZENG MING-QI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号: 90433052

森島 真幸 (MORISHIMA MASAKI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号: 40437934