

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390212

研究課題名(和文)カルシウムチャネル細胞内サブユニットの機能制御による新規心不全治療開発基盤の確立

研究課題名(英文)Regulation of L-type calcium channel by intracellular subunit in cardiac hypertrophy and failure.

研究代表者

中山 博之(NAKAYAMA, HIROYUKI)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40581062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：L型カルシウムチャネルb2aサブユニットの病態的意義をリン酸化と細胞内局在から検討した。b2aサブユニットは心筋細胞においてカルモデュリン依存性キナーゼのリン酸化を受け、横行小管とカベオラのマイクロドメインに存在する。b2aサブユニットのリン酸化はカベオラマイクロドメインにて特異的に生じ、肥大反応を増強させた。また心筋特異的非リン酸化変異b2aサブユニット過剰発現マウスを作製し心肥大反応を検討した結果、リン酸化の抑制により $\alpha_1$ AR刺激によるb2aサブユニット発現時の過剰な肥大反応が消失した。以上の結果より、b2aサブユニットがカベオラにおいてリン酸化され心肥大を誘導する事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：L-type calcium channel (LTCC) localizes at T-tubules and caveolae in cardiomyocytes, and plays major roles in excitation-contraction coupling and cardiac hypertrophy. The expression of b2a subunit of LTCC (b2a) is increased in human failing heart. Phosphorylation of b2a by CaMKII enhanced LTCC activity. In the present study, we examined the pathological role of b2a phosphorylation in cardiac hypertrophy. We developed a method to examine caveolae-specific activation of CaMKII and found that b2a phosphorylation occurs specifically in caveolae and elicit myocyte hypertrophy in  $\alpha_1$  adrenergic stimulation. Thus, we generated transgenic mice (TG) overexpressing non phosphorylated mutant of b2a. The expressions of b2a in both mutant and wild-type TG were similar.  $\alpha_1$  adrenergic stimulation induced cardiac hypertrophy was attenuated in mutant TG compared to wild-type TG mice. In conclusion, we revealed that phosphorylated b2a localized at caveolae and exaggerates cardiac hypertrophy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：カルシウム チャネル 心肥大 心不全 カルモデュリン依存性キナーゼ マイクロドメイン

## 1. 研究開始当初の背景

慢性心不全患者において血中カテコラミンの上昇と、L型カルシウムチャネル(LTCC)の細胞内サブユニットである $\beta 2a$  subunit (以下LTCC $\beta 2a$ )の発現上昇が認められる。我々は野生型のLTCC $\beta 2a$ の心筋過剰発現マウスにおいて持続カテコラミン受容体刺激によりマウスの個体死が起こる事を報告し、LTCC $\beta 2a$ が心不全の予後改善のための治療標的として極めて重要である事を見出した。しかしながらカテコラミン刺激によるLTCC $\beta 2a$ の機能修飾と病態との関連は尚不明である。カテコラミンによる $\beta$ 受容体の活性化は細胞内におけるプロテインキナーゼA(PKA)やカルシウム/カルモデュリン依存性キナーゼ(CaMK)の活性化を惹起する(J.Clin.Invest. 111,617)。LTCC $\beta 2a$ は、プロテインキナーゼAやカルモデュリン依存性キナーゼのリン酸化により、LTCCの $Ca^{2+}$ 流入を増大させる。心筋細胞のLTCCは、チャネル孔を構成する $\alpha 1c$  subunitと制御subunitである $\beta$ 及び $\alpha 2\delta$ の3つから構成される。細胞内に存在する $\beta$  subunitは4つのisoformがあり、各々LTCCの制御機能が異なる。また $\beta$  subunitは、LTCC複合体の膜移行に必須の分子でもあり、そのマウスにおける遺伝子欠損は胎生致死となる。さらに近年LTCCの細胞内局在が従来考えられてきたT管のみでなくカベオラとよばれる形質膜のマイクロドメインにも存在する事が報告されているが(Proc.Natl.Acad.Sci. USA.103,7500)、その病態的意義は不明であった。カベオラは細胞膜に存在する直径50-100 nmの窪み様構造であり<sup>20</sup>、caveolinファミリータンパク質

により裏打ちされている。カベオラにはシグナル伝達に関わる受容体やシグナル伝達分子が多数存在しシグナル伝達の中心的な場の一つであると考えられている。

LTCC  $\beta 2$  subunitはこのように多様な種類、局在、機能を持つが、その心不全病態形成における役割は不明な点が多かった。我々は前記の如く野生型LTCC $\beta 2a$ を心筋特異的に過剰発現したモデルにおいてイソプロテレノール(Iso)による $\beta$ アドレナリン受容体( $\beta$ 受容体)刺激後に細胞死を伴ったマウスの個体死を報告した。ヒト慢性心不全において、LTCC $\beta 2a$ の発現が増大する事が報告されており(PLoS One.2:e292)、同時に血中カテコラミン濃度の上昇が病態形成に重要な役割を果たしている。この事より、LTCC $\beta 2a$ のPKAやCaMKのリン酸化の心病態における意義を明らかにする事が必要であると考えられていた。

## 2. 研究の目的

### (1) LTCC $\beta 2a$ のリン酸化機構の解明:

LTCCは心筋細胞内において横行小管とカベオラに存在するが、その局在における病態的意義は明らかではない。LTCC  $\beta 2$  subunitはPKAによりS478/479がリン酸化されCaMKIIによりT498がリン酸化されるが、真菌剤某においてかかるリン酸化が実際に生じるかどうかは明らかではない。本研究において、これらのリン酸化が培養心筋細胞や心不全病態において生じているかを検討すると伴にリン酸化と細胞内局在との関連を明らかにする事を第一の目的とする。

### (2) LTCC $\beta 2a$ リン酸化の意義の解明:

LTCCβ2a の PKA リン酸化部位変異 (S478/479A) と CaMKII リン酸化部位変異 (T498A) の二重変異体を作成し非リン酸化 LTCCβ2a 変異体の過剰発現マウス (TG) を作成する。持続β受容体刺激を初めとするストレス刺激に対する応答を野生型 LTCCβ2a TG と比較する事により、かかるリン酸化の心病態における意義を同定する事を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) LTCCβ2a のリン酸化機構の解明：

LTCCβ2a のリン酸化を評価する目的で、CaMKII リン酸化部位に対するリン酸化抗体を作製した。またマイクロドメインにおける分子の活性の評価やその制御法は非常に重要であると考えられるが、未だに確立されていないため、カベオラにおける PKA と CaMKII の活性の評価法を新規に確立する事とした。方法として、PKA と CaMKII の双方においてリン酸化される蛋白質であるホスホランバン (PLN) の細胞質ドメインを基質として利用する事とした。PLN のリン酸化は PKA によるものは 16 番目のセリンのリン酸化抗体により、また CaMKII のリン酸化は 17 番目のトレオニンのリン酸化抗体に評価可能である。この PLN 細胞質ドメインとカベオラの構造を維持する蛋白質である caveolin 3 の融合蛋白質 (cPLN-Cav3) を作製し、カベオラ特異的な CaMKII と PKA のリン酸化評価法を確立した。さらに、caveolin binding domain (CBD) を用いてカベオラ特異的な CaMKII 制御機構を構築する事により、カベオラにおける LTCC β2a リン酸化を検証した。

#### (2) LTCCβ2a リン酸化の意義の解明：

生体において、心筋細胞における LTCCβ2a リン酸化の病態的意義を解明するために、

αMHC プロモーター制御下に非リン酸化変異 LTCCβ2a 遺伝子を発現させる TG を作製する。本 TG は、αMHC tetO (tTA) をドライバー遺伝子として用いる事により、テトラサイクリンによる遺伝子発現制御が可能であり、DTG (αMHC tetO 非リン酸化変異 LTCCβ2a TG × tTA TG) マウスで心筋特異的に非リン酸化変異 LTCCβ2a が過剰発現する。同様のシステムにて以前に作製している野生型 LTCCβ2a DTG との比較を病態モデル (持続βもしくはα受容体刺激、圧負荷等) を用いて、心臓超音波法を用いた心機能解析、組織学的解析、心重量等の形態解析及び分子マーカー等の遺伝子発現解析を施行する。

### 4. 研究成果

#### (1) LTCCβ2a のリン酸化機構の解明：

LTCCβ2a のリン酸化を、アデノウイルスベクターを用いてラット胎生仔心筋細胞に LTCCβ2a を発現させ CaMKII リン酸化部位に対するリン酸化抗体を用いて心筋細胞におけるリン酸化を検討した。その結果、培養心筋細胞において LTCCβ2a が恒常的にリン酸化されている事が明らかとなった (図 1)。

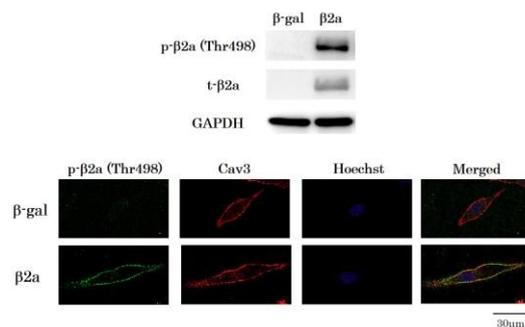


図 1. ラット新生仔心筋細胞に LTCCβ2a を過剰発現しリン酸化抗体にて CaMKII によるリン酸化を評価した (上図)。また同リン酸化抗体と caveolin3 (Cav3) の抗体を用いて免疫蛍光染色を行った (下図)。

上記の結果より、心筋細胞におけるリン酸化がカベオラにて生じている可能性が示唆されるが、カベオラにおける CaMKII の恒常的

な活性化が生じているという報告はない。そこで cPLN-Cav3 によるカベオラ特異的に CaMKII 活性を評価する系を構築した。その結果、ラット新生仔心筋細胞のカベオラにおける CaMKII の恒常的な活性化が明らかとなった。さらに、CaMKII の特異的阻害ペプチドである AIP と CBD の融合蛋白質 (CBD-GFP-AIP) を発現させるとカベオラ特異的に CaMKII のリン酸化が抑制された (図 2)。

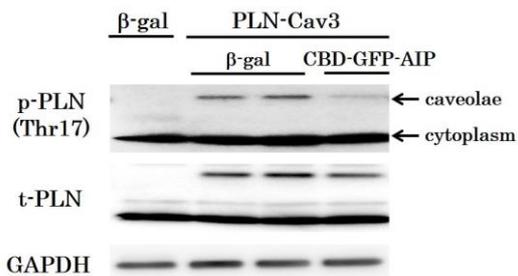


図 2. ラット新生仔心筋細胞に PLN-Cav3 を過剰発現し PLN の CaMKII リン酸化抗体にてリン酸化を評価した。また CBD-GFP-AIP 同時発現によりリン酸化の抑制を確認した。

次に CBD-GFP-AIP を LTCCβ2a と共発現したところリン酸化の消失を認めた (図 3)。

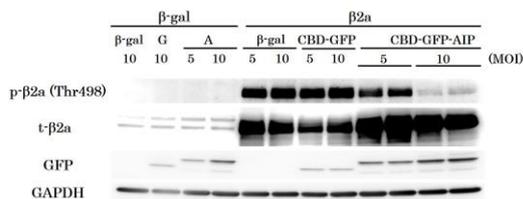


図 3. ラット新生仔心筋細胞に LTCCβ2a を過剰発現し CBD-GFP-AIP にてカベオラ特異的に CaMKII を抑制し、リン酸化抗体にて LTCCβ2a の CaMKII によるリン酸化を評価。以上の結果より、そのリン酸化がカベオラ内に限局して生じている事が明らかとなった。さらに、その生理的意義を検討した結果、フェニレフリン (PE) による α1 受容体刺激により LTCCβ2a がリン酸化され肥大反応を増強する事が明らかとなった。

## (2) LTCCβ2a リン酸化の意義の解明：

本研究ではテトラサイクリンを投与せず恒常的に 非リン酸化変異 LTCCβ2a を発現さ

せた。この TG の心筋において過剰発現されている事をウエスタンブロットによりタンパク質レベルで確認した。またその発現レベルの比較を既報の野生型 LTCCβ2a 過剰発現マウスの心筋サンプルを用いて行った。その結果、作製した 2 ラインの DTG で 野生型 DTG と同程度の LTCCβ2a の過剰発現が確認された。また生後 9 週齢において非リン酸化変異 LTCCβ2a TG は明らかな心重量の増大を認めなかった。続いて、生後 8 週齢の雄性 tTA マウスおよび 2 ラインの DTG マウスの心機能を心エコー法により解析した。その結果 tTA 群と比較して、心機能の明らかな低下を認めず生理条件下にて病態を呈さなかった。次に LTCCβ2a の非リン酸化変異体 DTG と野生型 LTCCβ2a と比較し、病態改善効果の検討を行った結果以下の結果を得た。

① 持続β受容体刺激モデルを用いて野生と非リン酸化変異 LTCCβ2a DTG における表現型についてまず生存率を基準に解析を行った。しかしながら、両群においてイソプロテレノールポンプ挿入後の生存率に有意な差を認めなかった。

② 持続α受容体刺激モデルを用いて野生型と非リン酸化変異 LTCCβ2a DTG における心肥大の解析を施行した。野生型 LTCCβ2a DTG において心肥大の増悪を認めたが変異 LTCCβ2a DTG では、心肥大の程度にコントロールと差を認めず、これらの結果より LTCCβ2a のリン酸化が、カベオラにおいて心肥大を惹起することが示された (図 4)。

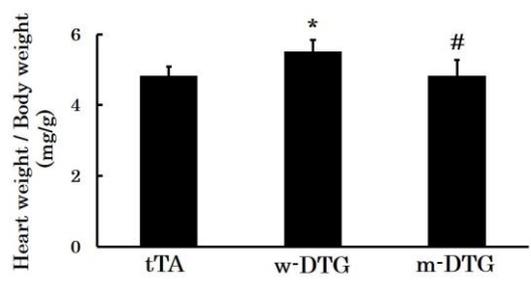


図 4. PE 持続刺激 2 週間後のコントロール (tTA) 野生型(w-DGT)および非リン酸化変異型 LTCCβ2a (m-DTG)における心重量の評価。\*p<0.05 vs tTA, #p<0.05 vs w-DTG。

以上の検討により、LTCCβ2a のカベオラにおけるリン酸化が心肥大の治療標的となる事が明らかとなった。

#### 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 7 件) (すべて査読あり)

1. Shintani Y, Drexler HC, Kioka H, Terracciano CM, Coppen SR, Imamura H, Akao M, Nakai J, Wheeler AP, Higo S, Nakayama H, 他 3 名. (2014) Toll-like receptor 9 protects non-immune cells from stress by modulating mitochondrial ATP synthesis through the inhibition of SERCA2. *EMBO Rep.* 15(4):438-45.
2. Morimoto S, Hongo K, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, O-Uchi J, Nakayama H, 他 4 名. (2014) Genetic modulation of the SERCA activity does not affect the Ca<sup>2+</sup> leak from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* 55(1):17-23.
3. Oyabu J, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Murakawa T, Yasui H, Ueda H, Nakayama H 他 5 名, Autophagy-mediated degradation is necessary for regression of cardiac hypertrophy during ventricular unloading. *Biochem Biophys Res Commun.* 441(4):787-92.
4. Kumagai S, Matsui K, Kawaguchi H, Yamashita T, Mohri T, Fujio Y, Nakayama H: Cathelicidin antimicrobial peptide inhibits fibroblast migration via P2X7 receptor signaling *Biochem Biophys Res Commun.* 437(4):609-14.
5. Mohri T, Ueno M, Nagahama Y, Gong ZY, Asano M, Oshima H, Oshima M, Fujio Y, Takakura N. Requirement of SLD5 for early embryo-genesis. *PLoS One.* 8(11): e78961.
6. Nakayama H, Fujio Y, Yamaguchi O. Calcium dependent signaling in cardiac hypertrophy and cell death. *Clin Calcium.* 2013 Apr;23(4):505-15.
7. Tamai T, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Taneike M, Oka T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, 他 6 名 (2013) Ras Homologue Enriched in Brain

(Rheb)-dependent mTORC1 Activation Becomes Indispensable for Cardiac Hypertrophic Growth after Early Postnatal Period. *J Biol Chem.* 288(5):10176-87.

[学会発表] (計 5 件)

1. Hiroyuki Nakayama : Caveolae-specific phosphorylation of L-type calcium channel b2a subunit exaggerates cardiac hypertrophic responses after adrenergic stimulation in mice. American Heart Association, Las Vegas, 14-17 July, 2014.
2. 早水菜緒 : Phosphorylation of L-type Ca<sup>2+</sup> channel b2a subunit induce cardiomyocyte hypertrophy. 第 87 回日本薬理学会, 仙台, 2014 年 3 月.
3. 舎川洗太 : Excessive BIN1 expression results in adverse remodeling through cardiomyocyte death. 第 87 回日本薬理学会, 仙台, 2014 年 3 月.
4. Shohei Kumagai : Inhibition of P2X7 Receptor Signaling Promote Adverse Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction thorough Enhanced Cardiac Fibroblast Migration, American Heart Association, Dallas, 17-19 November, 2013.
5. 熊谷渉平 : Inhibition of P2X7 Receptor Signaling Promote Adverse Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction thorough Enhanced Cardiac Fibroblast Migration. 第 21 回血管生学会, 大阪, 2013 年 9 月.

[図書] (計 1 件)

中山 博之 他、メディカルドゥ、遺伝子医学 MOOK 別冊 細胞死研究の今 38-43

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中山 博之 (NAKAYAMA HIROYUKI)  
大阪大学・薬学研究科・准教授  
研究者番号 : 40581062

##### (2) 研究分担者

朝日 通雄 (ASAHI MICHIO)  
大阪医科大学・薬理学・教授  
研究者番号 : 10397164

##### (3) 研究分担者

藤尾 慈 (FUJIO YASUSHI)  
大阪大学・薬学研究科・教授  
研究者番号 : 20359839

