

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790255

研究課題名(和文) 不全心筋における細胞内情報伝達系と細胞内カルシウム動態の変化

研究課題名(英文) The investigation of altered Ca²⁺ handling by the selective modulation of Ca²⁺ uptake rate of sarcoplasmic reticulum

研究代表者

森本 智 (MORIMOTO, Satoshi)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：30594593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：心不全において収縮不全と拡張不全の原因となる筋小胞体機能異常について検討を行った。筋小胞体のCa取込みを司るATP依存性CaポンプであるSERCAを過剰発現させた遺伝子改変マウス(SERCA-TG)と、SERCA抑制タンパクであるサルコリピンを過剰発現させた遺伝子改変マウス(SLN-TG)を用いた。筋小胞体のCa取込み速度はSERCA-TGでは増大、SLN-TGでは低下した。両者とも筋小胞体の最大Ca貯蔵量やCa放出、Caリークは不変であった。収縮張力はSERCA-TGで増大、SLN-TGで低下した。Ca取込みの変化は筋小胞体のCa貯蔵や放出機能には影響しないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of the alteration of sarcoplasmic reticulum (SR) which is known to be a cause of cardiac dysfunction in failing heart. We used saponin-treated thin trabeculae obtained from mice hearts with overexpression of SR-Ca²⁺ ATPase (SERCA-TG) and sarcolipin (SLN-TG), respectively. Ca²⁺ uptake rate was faster in SERCA-TG and slower in SLN-TG. Maximal Ca²⁺ content, Ca²⁺ induced Ca²⁺ release and Ca²⁺ leak were not altered in SERCA-TG and SLN-TG. In the papillary muscle experiment using Ca²⁺ sensitive photoprotein aequorin, peak tension and peak amplitude of Ca²⁺ transient were increased in SERCA-TG and decreased in SLN-TG. Relaxation time of tension and decline of Ca²⁺ transient were accelerated in SERCA-TG and prolonged in SLN-TG. Thus, we concluded that selective modulation of Ca²⁺ uptake into SR influenced the amplitude and time course of Ca²⁺ transient and tension, however, it did not influence maximal Ca²⁺ content, Ca²⁺ induced Ca²⁺ release and Ca²⁺ leak of SR.

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：細胞内Ca²⁺動態 心筋筋小胞体 ATP依存性筋小胞体Ca²⁺ポンプ

1. 研究開始当初の背景

心筋の収縮弛緩は細胞内 Ca^{2+} 濃度の増減によって調節されており、この細胞内 Ca^{2+} 濃度を主として調整しているのが心筋興奮収縮連関で中心的な役割を果たしている筋小胞体である。細胞膜の脱分極によって、細胞膜上の L 型 Ca^{2+} チャネルが開口して細胞外の Ca^{2+} が細胞内に流入する。流入した Ca^{2+} が細胞内の Ca^{2+} 貯蔵庫である筋小胞体を刺激して、貯蔵されていた Ca^{2+} が Ca^{2+} 放出チャネルであるリアノジン受容体を介して放出され急激に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する。細胞内で増加した Ca^{2+} が Ca^{2+} 受容タンパクであるトロポニン C に結合し、その結果、トロポニン I、トロポニン T、トロポミオシンの空間的位置が変化して抑制が解除され、アクチンとミオシンが反応して心筋収縮が惹起される。同時に、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は、制御タンパクであるホスホランパンにより制御を受けている ATP 依存性筋小胞体 Ca^{2+} ポンプ (SERCA) を活性化し再び筋小胞体内に取込まれるか、細胞膜上の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系により細胞外に排出され細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下し、その結果、トロポニン C から Ca^{2+} が外れてアクチン、ミオシン、トロポニンなどの空間的位置が回復して心筋弛緩が生じる。

心肥大は心臓の生理的な適応現象であるが、それが病的状態である心不全に進行するメカニズムについて、転写因子である p53 発現増大が血管新生を抑制した結果として心不全に進行するとして報告などがあるが、未だ十分に解明されていない。

心不全で加療を要する患者は左室収縮障害を伴うと考えられてきたが、近年、心不全患者の約 40% は左室収縮機能が保たれた心不全であることが示され、左室収縮機能が保たれた心不全では拡張障害が病態の主であると考えられている。不全心筋では、慢性的な血中カテコラミン濃度上昇によってプロテインキナーゼ A と Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II のいずれかもしくは双方を介して筋小胞体のリアノジン受容体がリン酸化され、筋小胞体からの Ca^{2+} リーク量が増加し、心筋細胞内の Ca^{2+} が過剰となり心筋の収縮・拡張不全や致死性不整脈の原因になっている可能性が示唆される。

私はこれまでに、心筋における生理的条件下では β 受容体刺激がリアノジン受容体のプロテインキナーゼ A 依存性リン酸化部位のリン酸化上昇を介して、筋小胞体における Ca^{2+} の取り込み、放出量に変化し、特に筋小胞体からの Ca^{2+} リークの増大を導くことを報告してきた (Morimoto S, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 390: 87-92, 2009)。以上の検討から、心肥大から心不全に進行するメカニズムに β 受容体刺激を介した細胞内 Ca^{2+} 動態異常が関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、マウスの横行大動脈を縮窄す

ることで術後 2 週目には心肥大を、術後 4 週目には心不全を呈する胸部大動脈縮窄マウスを作製し、各段階での細胞内 Ca^{2+} 動態と、プロテインキナーゼ A と Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II などの細胞内情報伝達系を評価することで心肥大から心不全への進行メカニズムを解明する事を目的とした。しかし、実験に耐えうる精度の胸部大動脈縮窄マウスを作製することができなかった。そこで、心筋興奮収縮連関に中心的な役割を果たす筋小胞体の Ca^{2+} 取込み機能を亢進させた場合と低下させた場合に、筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵量や Ca^{2+} 放出量がどのように変化するかを評価し、左室心筋収縮弛緩への影響を検討することとした。

3. 研究の方法

筋小胞体の機能は Ca^{2+} 取込み、 Ca^{2+} 放出、そして Ca^{2+} 貯蔵により成り立っている。このうち、 Ca^{2+} 取込みのみを選択的に調整するために、 Ca^{2+} ポンプである SERCA を心筋特異的に過剰発現した遺伝子改変マウスと、SERCA をホスホランパンと同様に抑制するタンパクであるサルコリピンを心筋特異的に過剰発現した遺伝子改変マウスを実験に用いた。

心筋 α -ミオシン重鎖プロモーターを用いてラビット心筋 SERCA を心筋特異的に過剰発現する遺伝子改変マウス (SERCA-TG) を作製した。また、心筋 β -ミオシン軽鎖プロモーターを用いてサルコリピンを心筋特異的に過剰発現する遺伝子改変マウス (SLN-TG) を作製した。これらのマウスを用いて以下の検討を行った。

(1) SERCA-TG の筋小胞体関連タンパクの発現を評価した。

(2) サポニン処理スキンド標本に Ca^{2+} 蛍光指示薬である fluo-3 を用いて筋小胞体機能評価を行い、SERCA-TG、SLN-TG での結果をそれぞれのコントロールマウスと比較検討した。

(3) 多細胞左室乳頭筋標本に Ca^{2+} 感受性発光タンパクイクオリンを用いて、電気刺激下で収縮張力と細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の同時測定を行い、SERCA-TG、SLN-TG での結果をそれぞれのコントロールマウスと比較検討した。

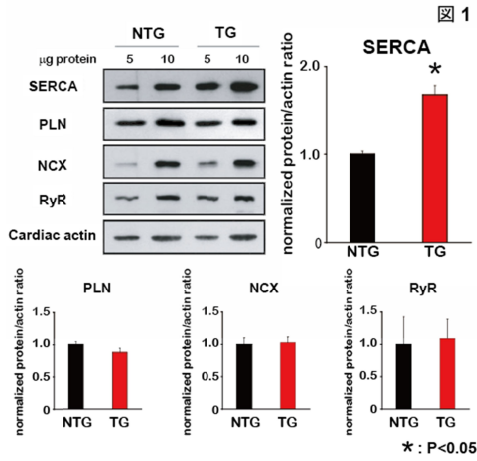
4. 研究成果

(1) SERCA-TG の筋小胞体関連タンパクの発現を評価

SERCA-TG において、コントロールマウス (SERCA-NTG) と比較して SERCA の発現量は約 1.68 倍であった。リアノジン受容体 (RyR)、ホスホランパン (PLN)、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ チャネル (NCX) では、タンパク発現量に有意差はなかった (図 1)。

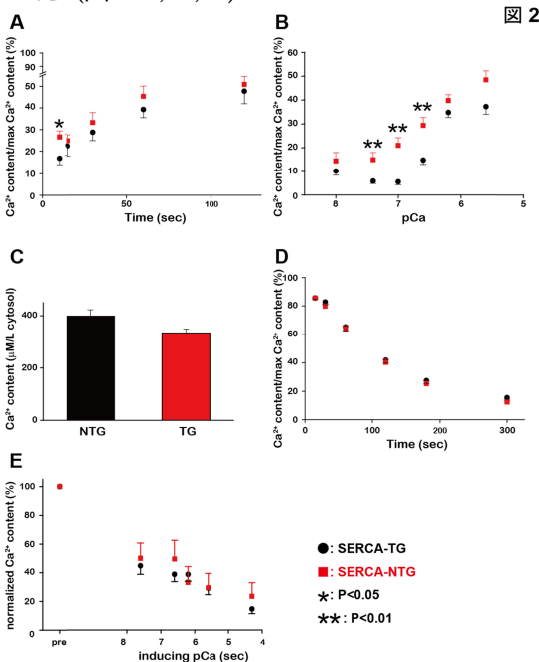
SLN-TG については、コントロールマウス (SLN-NTG) との比較で、筋小胞体関連タンパクの発現に有意な変化がないことを既に

我々のグループが論文として報告している (Asahi M, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 101:9199-9204, 2004) .



(2) サポニン処理スキンド標本を用いた筋小胞体機能の評価

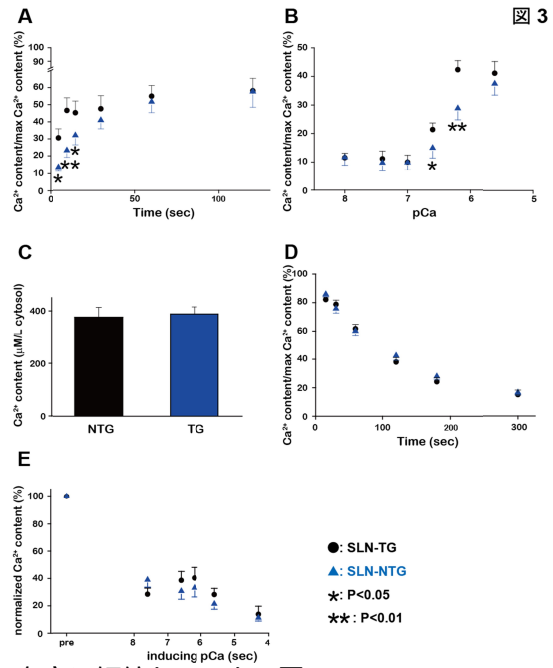
SERCA-TG では SERCA-NTG と比較して, Ca^{2+} 取込み速度が有意に上昇していた (図 2 A, B) . 一方で, 最大 Ca^{2+} 貯蔵量, Ca^{2+} リーク量, Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出量では変化がなかった (図 2 C, D, E) .



SLN-TG では SLN-NTG と比較して, Ca^{2+} 取込み速度が有意に低下していた (図 3 A, B) . 一方で, 最大 Ca^{2+} 貯蔵量, Ca^{2+} リーク量, Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出量では変化がなかった (図 3 C, D, E) .

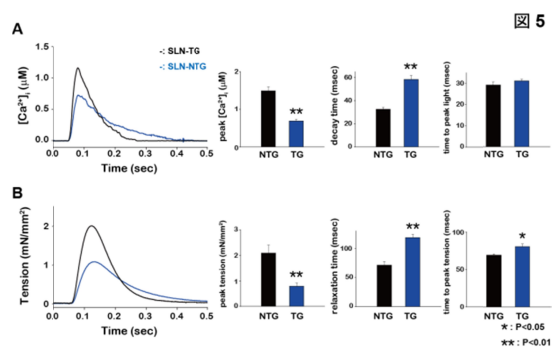
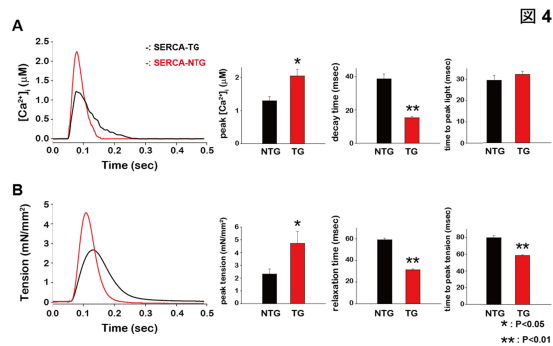
(3) 多細胞左室乳頭筋標本を用いた収縮張力と細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の同時測定

SERCA-TG では SERCA-NTG と比較して, 細胞内 Ca^{2+} 濃度のピーク値と発生した収縮張力は有意に増大していた . 一方で, Ca^{2+} のピークからの減衰時間と心筋の弛緩時間は



有意に短縮していた (図 4) .

SLN-TG では SLN-NTG と比較して, 細胞内 Ca^{2+} 濃度のピーク値と発生した収縮張力は有意に低下していた . 一方で, Ca^{2+} のピークからの減衰時間と心筋の弛緩時間は有意に延長していた (図 5) .



以上から, 筋小胞体の Ca^{2+} 取込みを変化させた場合には, 定常状態での Ca^{2+} 放出や Ca^{2+} 貯蔵量に変化は生じず, しかし一方で各心拍での細胞内 Ca^{2+} 動態や発生する収縮張力や弛緩能には影響を与えることが明らかとなった .

心不全は治療薬の進歩に伴って予後の改善が見られてはいるが, 未だに癌などの悪性腫瘍と同等に予後不良な疾患である . 特に, 左室収縮機能が保たれた拡張障害が主である心不全においては, 現段階では予後改善効果を示した薬剤はなく収縮機能が低下した

心不全と同様の治療を行っているのが現状である。また、収縮機能が低下した心不全治療において中心的な役割を果たすβ遮断薬などのこれまでの薬剤では、陰性変力作用を有する薬剤がほとんどであり、陽性変力作用を有しながらも予後改善効果を示した薬剤はなかった。今回の実験結果は、陽性変力作用を有しつつ拡張障害も改善するという新たな治療へのターゲットを期待するものであり、今後、病態モデルを用いて更なる検討を行うことで、新たな治療戦略が示されうる。

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1件)

Morimoto S, Hongo K, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, O-Uchi J, Nakayama H, Asahi M, Otsu K, Yoshimura M, Kurihara S. Genetic modulation of the SERCA activity does not affect the Ca²⁺ leak from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Cell Calcium. 2014 Jan; 55(1): 17-23. doi: 10.1016/j.ceca.2013.10.005. 査読有。

[学会発表](計3件)

Morimoto S, Hongo K, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Kurihara S, Yoshimura M. Selective modulation of SERCA did not affect the Ca²⁺ leak from the sarcoplasmic reticulum in transgenic mouse models. American Heart Association Scientific Sessions 2012 (米国心臓学会2012). 2014年11月4日. Los Angeles, CA, USA.

Morimoto S, Kusakari Y, O-Uchi J, Komukai K, Kawai M, Yoshimura M, Hongo K, Kurihara S. Modulation of Ca²⁺ uptake by changing of SERCA activity in mouse myocardium did not alter Ca²⁺ leak from sarcoplasmic reticulum in physiological condition. IUPS2013 (第37回国際生理学会議). 2013年7月22日. Birmingham, UK.

森本智, 本郷賢一, 草刈洋一郎, 小武海公明, 川井真, 吉村道博, 栗原敏. SERCAもしくは sarcolipin の過剰発現はマウス心筋における Ca²⁺誘発性 Ca²⁺放出と Ca²⁺リークに影響を与えない. 第91回日本生理学会大会 2014年3月16日 鹿児島県鹿児島市.

6. 研究組織

(1)研究代表者

森本 智 (MORIMOTO, Satoshi)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30594593