

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15874

研究課題名(和文)病的心のリン酸化CaMKIIによるSKチャネルの構造および機能制御機構の解明

研究課題名(英文)Functional and structural regulations of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase

研究代表者

天満 太郎 (Tema, Taro)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：00801614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：さまざまな病的心でSKチャネル活性化を認めた。このSKチャネル機能の制御機能の一つとして、活性化CaMKIIの関与を認めた。本結果は査読付き海外雑誌に2編掲載された(Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2018;315(2):H262-H272, Eur J Pharmacol. 2019;844:110-117)。さらにCaMKII抑制病的心(肥大心にCaMKII阻害薬を長期間投与)において、SKチャネルの細胞膜分画の減少傾向を認めた。CaMKIIはSKチャネルの機能制御にとどまらず、構造制御もつかさどっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、病的心における致死的不整脈に関する新たな機序、つまりは病的心における致死的不整脈には、従来心室筋での機能が不明確であったSKチャネルの活性化が関与しており、このチャネルはCaMKIIによって機能・構造制御を行っているという機序があきらかとなった。この研究結果を発展させることにより、致死的不整脈の分子標的治療薬の開発に結び付くことが期待される。さらにSKチャネルの活性を未然に防ぐことに着目することで病的心の致死的不整脈に対する予防治療にも大きく寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：SK channels were activated in the several diseased hearts. The function of SK channels was regulated with activated CaMKII. These results were published at peer reviewed journals (Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2018;315(2):H262-H272, Eur J Pharmacol. 2019;844:110-117). The inhibition of the hearts with CaMKII inhibitor made the SK channels expression decreased in the cell membrane fractions. CaMKII regulated the both function and structure of SK channels.

研究分野：不整脈

キーワード：致死的不整脈 SKチャネル CaMKII

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

過去の臨床研究において、肥大心では心室性不整脈が有意に増加していることや急性心筋梗塞の発症早期に心室細動が発生することが報告されている。また、食生活をふくむ生活習慣が欧米化しつつあるわが国においても動脈硬化や高血圧による心肥大や虚血性心疾患は増加しており、これらに伴う致死的な心室性不整脈に対する治療は社会的に着目されている。

これらの不整脈はカリウムチャネルの機能異常が原因のひとつであると考えられているが、分子学的・電気生理学的機序に関しては不明な点が多く、現在においても治療法は確立されていない。治療法確立のためにはより詳しい機序の解明が不可欠である。近年、われわれや他のグループから病的な心筋や病的状態においてカリウムチャネルのひとつである SK チャネルが活性化されることや、細胞内のカルシウムイオン濃度調節の一旦を担っている CaMKII が活性化されることが報告されている。これらの研究を踏まえると、『CaMKII と SK チャネルの相互作用が心室性不整脈に関与している』という、新しいメカニズムが想定された。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は、活性化 CaMKII と SK チャネルの相互作用が、SK チャネルの活性化<機能異常>や発現亢進<構造異常>に関与し、致死的不整脈の原因となっているとの仮説をあきらかにし、循環器分野において未開発の分子標的治療薬の開発にむけた臨床応用につなげることである。

#### 3. 研究の方法

##### (1) 活性化 CaMKII-SK チャネル複合体の評価

免疫沈降法を用いて、抗 SK チャネル抗体に対して免疫沈降した試料に抗活性化 CaMKII 抗体を用いて免疫プロットを行い、活性化 CaMKII-SK チャネル複合体を確認する。免疫蛍光細胞染色法で、肥大心から単離心筋細胞を抗 SK チャネル抗体、抗活性化 CaMKII 抗体で染色し、超解像度顕微鏡をもちいて活性化 CaMKII-SK チャネル複合体を確認し、同複合体の定量評価をおこなう。

##### (2) SK チャネルの「機能的」制御機構の解析

病的心における SK チャネル活性化の確認

オプティカルマッピング法を用いて、肥大心・虚血心で SK チャネルが活性化していることや CaMKII 阻害薬で活性が抑制されることをあきらかにする。

SK チャネルと心室性不整脈の確認

病的心における致死的不整脈の発生率とアパミン (SK チャネル阻害薬) 投与後の発生率を比較する。

##### (3) SK チャネルの「構造的」制御機構の解析

SK チャネルならびに CaMKII の発現の確認

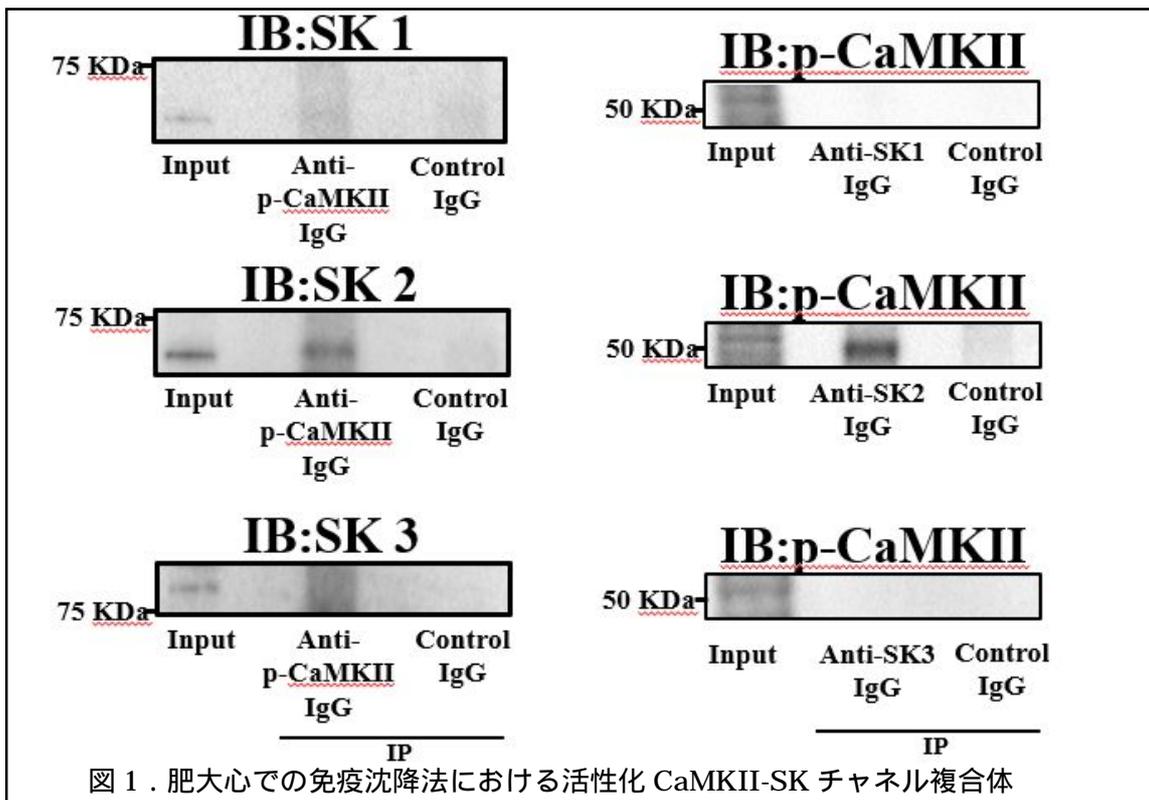
免疫プロット法を用いて、SK チャネル、CaMKII および活性化 CaMKII のタンパク発現の定量評価を行う

CaMKII を抑制した病的心に対する SK チャネル発現の確認

肥大心に KN-93 (CaMKII 阻害薬) を腹腔内投与 (5 mg/kg 体重、4 日間) した活性化 CaMKII 抑制肥大心において、SK チャネル発現が抑制されているかを検討する。

#### 4. 研究成果

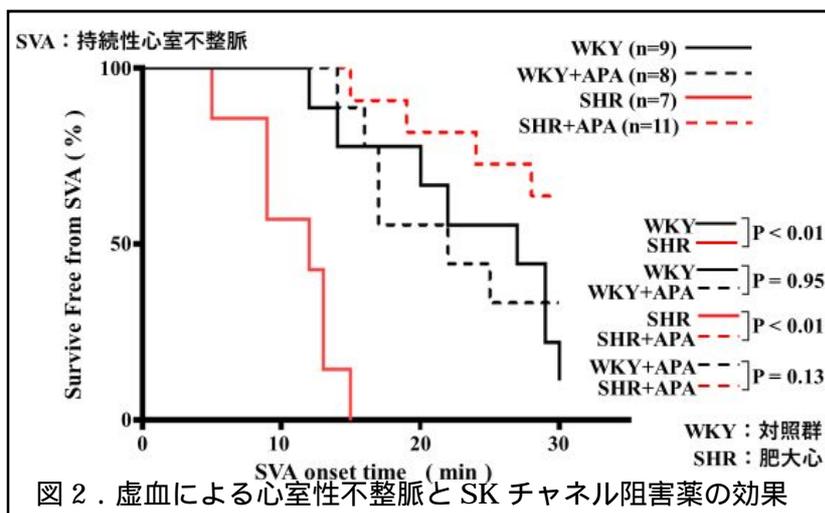
(1) 肥大心において SK チャンネルのアイソフォームのうち SK2 チャンネルでのみ活性化 CaMKII との複合体を認めた (図 1)。免疫蛍光細胞染色法でも活性化 CaMKII-SK チャンネル複合体を確認し、肥大心では正常心に比較して増加していた。



#### (2)

肥大心、虚血心 (虚血 30 分後)、肥大虚血心、交感神経活性化 (イソプロテレノール投与下) 肥大心のいずれの病的心においても、病的心での活動電位持続時間 (APD<sub>90</sub>) の短縮を認め、この短縮はアパミンによる改善を認めた。さらに肥大虚血心においては、アパミンによる細胞内カルシウムトランジェントの改善を認めた。また、交感神経活性化肥大心では、KN-93 投与によるアパミン効果の消失を認めた。

上記のいずれの病的心においても、心室性不整脈を認めたが、アパミン投与により心室性不整脈の誘発頻度または出現時間が優位に改善した (図 2)。



#### (3)

正常心と比較して肥大心において、SK2 チャンネルの発現が亢進していた。また、CaMKII および活性化 CaMKII の発現も同様に肥大心で亢進していた。正常心の虚血では、虚血が進行するにつれて活性化 CaMKII の亢進が進行していた。一方で、肥大心においては虚血中の活性化 CaMKII の発現に変化を認めなかった。CaMKII の活性化を測

定すると、肥大心では薬剤による交感神経刺激で CaMKII の活性化を認めた。

CaMKII 抑制群 ( KN-93 投与群 ) では対照群と比較し、細胞膜分画の SK2 チャネルの発現が減少傾向であることを認めた。

病的心における CaMKII を介した SK チャネル機能と構造制御機構の一旦を発見した。CaMKII は多機能キナーゼタンパクであり、病的心における不整脈治療ターゲットとしては副作用が多く出る可能性が考えられる。そこで心室筋での役割が十分に理解されていない SK チャネルに着目し、リン酸化 CaMKII との協同が不整脈機序に関与している可能性を検討することができた。今後は本研究結果を踏まえ、活性化 CaMKII-SK チャネル複合体に対する特異的分子標的治療薬の開発を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tenma Taro, Mitsuyama Hirofumi, Watanabe Masaya, Kakutani Naoya, Otsuka Yutaro, Mizukami Kazuya, Kamada Rui, Takahashi Masayuki, Takada Shingo, Sabe Hisataka, Tsutsui Hiroyuki, Yokoshiki Hisashi	4. 巻 315
2. 論文標題 Small-conductance Ca <sup>2+</sup> -activated K <sup>+</sup> channel activation deteriorates hypoxic ventricular arrhythmias via CaMKII in cardiac hypertrophy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H262 ~ H272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpheart.00636.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamada Rui, Yokoshiki Hisashi, Mitsuyama Hirofumi, Watanabe Masaya, Mizukami Kazuya, Tenma Taro, Takahashi Masayuki, Takada Shingo, Anzai Toshihisa	4. 巻 844
2. 論文標題 Arrhythmogenic -adrenergic signaling in cardiac hypertrophy: The role of small-conductance calcium-activated potassium channels via activation of CaMKII	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 110 ~ 117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2018.12.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----