

Title	リアノジン受容体の機能解析および病態における意義
Author(s)	佐伯, 和彦
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44530">https://hdl.handle.net/11094/44530</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 佐 伯 和 彦

博士の専攻分野の名称 博士 (薬学)

学位記番号 第 17981 号

学位授与年月日 平成 15 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文名 リアノジン受容体の機能解析および病態における意義

論文審査委員 (主査)

教授 真弓 忠範

(副査)

教授 馬場 明道 教授 松田 敏夫 教授 東 純一

## 論文内容の要旨

細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を促進する現象は、カルシウム誘導性カルシウム放出 ( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release : CICR) と呼ばれ、骨格筋において遠藤らにより 1970 年に見出された。骨格筋において CICR 機構を担うチャンネルに対する薬理学的研究が展開され、カフェインは、CICR の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性を高めて定常状態の細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度でも CICR チャンネル開口を引き起こすこと、植物アルカロイドであるリアノジンは、低濃度では開口状態にある CICR チャンネルを固定し、一方、高濃度では開口を阻害することが明らかとなった。この構成蛋白を精製する試みは、標識リアノジンの結合活性を指標として骨格筋より 400 kDa 以上の高分子量蛋白として精製され、リアノジン受容体 (RyR) と名づけられた。さらに、1989 年に竹島らによってウサギ骨格筋 RyR の cDNA がクローニングされ、その塩基配列が決定された。さらに、哺乳動物には別々の遺伝子にコードされる骨格筋型 (RyR1)、心臓型 (RyR2)、脳型 (RyR3) と呼ばれる 3 種類の RyR サブタイプが存在することが明らかとなった。RyR のチャンネル活性を制御する物質としては、 $\text{Ca}^{2+}$  などの内因性物質以外に、外因性物質として、前述したリアノジン、カフェインのほかにドキシソルビシン (DOX) も知られている。DOX は、アントラサイクリン系抗癌剤であり広範囲な抗腫瘍活性を示すが、副作用としての心毒性が臨床上問題になっている。DOX 心毒性のメカニズムの一つが Sarcoplasmic Reticulum (SR) おける RyR に起因すること報告されているが、これまでの検討結果では、SR に対する  $\text{Ca}^{2+}$  放出および  $^3\text{H}$ -ryanodine を用いた間接的な実験である。したがって、DOX と RyR2 との直接的な相互作用を検討することは、DOX 心毒性のメカニズムを解明する上で重要な意義があると考えられた。

そこで、DOX と精製 RyR2 との直接的な分子間相互作用を検討した。精製 RyR2 に対する  $^{14}\text{C}$ -doxorubicin の Kd 値および pseudo Hill 係数はそれぞれ 19  $\mu\text{M}$ 、0.98 であった。さらに Ligand blot 解析の結果、精製 RyR2 に対して、分子量 400,000 蛋白質がラベリングされた。これらの結果より、DOX は直接的に RyR2 に結合し、その部位は 1 箇所であることが明らかとなった。また、DOX の結合部位が RyR2 の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性部位として機能しうるかどうか検討を行った。pCa=5.5 では、DOX およびカフェイン両化合物で  $^3\text{H}$ -ryanodine 結合量の増加が観察された。さらに、心臓 SR に対する DOX の  $^3\text{H}$ -ryanodine 結合量増加作用および  $\text{Ca}^{2+}$  放出作用の ED<sub>50</sub> 値は、それぞれ 31.7  $\mu\text{M}$ 、51  $\mu\text{M}$  であることが報告されているので、DOX 結合実験において心臓 SR に対する親和性 (1.97  $\mu\text{M}$ ) よりも RyR2 に対する親和性 (19  $\mu\text{M}$ ) に近く、RyR2 に対する DOX の結合が SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離作用に寄与していることが考えられ、その結果として心毒性の発現に関係している可能性が示唆された。

心筋細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  調節異常により引き起こされることが示唆されている疾患としては、心筋虚血再灌流障害、不整

脈などが知られている。特に心筋虚血再灌流時には、細胞内 pH 低下による種々のイオン交換体の活性化が生じ、最終的に  $\text{Ca}^{2+}$ -overload が引き起こされることが示めされている。さらに流入した過剰な  $\text{Ca}^{2+}$  は、SR から RyR2 を介した  $\text{Ca}^{2+}$  放出のトリガーとなり、 $\text{Ca}^{2+}$ -overload を増強することが示唆されている。そこで、RyR2 発現 CHO 細胞 (CRR4) を用いて、カフェイン惹起による RyR2 からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を抑制する物質を検索し、9-hydroxy-ellipticine (9HE) を見出した。9HE は、心臓 SR に対する  $[^3\text{H}]$ -ryanodine 結合を抑制した。また、9HE は、ランゲンドルフ灌流心を用いた虚血再灌流障害モデルで、再灌流性不整脈を有意に抑制し、さらに再灌流後の心機能回復作用も示す一方、正常乳頭筋の変力作用には影響を与えないことが明らかとなった。したがって、9HE は、RyR2 へ作用し、正常な収縮には影響を与えず、虚血再灌流障害を軽減することが示された。この知見は、SR からの RyR2 を介する  $\text{Ca}^{2+}$  放出を調節することは心筋虚血再灌流障害に対する新しい治療・予防のストラテジーになる可能性を示唆している。

これまでの検討結果では、RyR2 のカフェイン作用部位が RyR2 の活性を調節するばかりではなく虚血再灌流障害においても重要な意義を持つ可能性を示した。RyR1 は RyR2 と同様にカフェイン応答性を有していることが知られているが、RyR3 に対するカフェイン応答性は未だ明らかではない。この原因として、RyR3 は RyR1 および RyR2 と共発現している組織が多く、脳および骨格筋における RyR3 の発現量はそれぞれ全 RyR 量の 1-2% あるいはそれ以下に過ぎない。したがって、組織より RyR3 を単離精製してその生理学的機能解析を進めることは難しいと考えられた。そこで、RyR3 発現細胞株を樹立し、RyR3 の機能解析を行った。まず、その発現細胞に対して  $[^3\text{H}]$ -ryanodine 結合実験を行った結果、リアノジンに対して、高親和性部位と低親和性部位の異なる 2 つの結合部位の存在が明らかとなった。さらに高親和性部位の Kd 値を比較すると、RyR1 および RyR2 に比べ、最もリアノジンに対する親和性が高いことが明らかとなった。RyR3 は、RyR1 および RyR2 の共通の性質として報告されてきた CICR 機能およびカフェイン応答性を示した。したがって、この RyR3 発現 CHO 細胞は、RyR1 および RyR2 の共発現がなく、かつ RyR3 を定常的に発現している細胞であるため、更なる RyR3 の機能解析および RyR3 に作用する薬物の検索ツールとして有用であると考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

リアノジン受容体 (RyR) は、1989 年にウサギ骨格筋 RyR の cDNA がクローニングされ、その塩基配列が決定された。さらに骨格筋型 (RyR1)、心臓型 (RyR2)、脳型 (RyR3) と呼ばれる 3 種類の RyR サブタイプが存在することが明らかとなった。RyR のチャンネル活性を制御する物質としては、 $\text{Ca}^{2+}$  などの内因性物質以外に、外因性物質として、リアノジン、カフェインのほかにドキシソルビシン (DOX) も知られている。DOX は、アントラサイクリン系抗癌剤であり、副作用としての心毒性が臨床問題になっている。DOX 心毒性のメカニズムの一つが Sarcoplasmic Reticulum (SR) における RyR に起因することが示唆されているが、直接的な相互作用を検討したものではない。さらに、RyR1 および RyR2 は生理学的機能解析が進んでいるが、RyR3 に関してはその生理学的機能はおろか病態との関連性が未だ明らかではない。RyR のさらなる生理学的機能および RyR の病態における意義を検討する目的で、分子生物学、生化学的および薬理学的手法を用いて実験的検討を行ってきた。その結果、以下の成果が得られた。

- 1) 心臓 SR に対するドキシソルビシン結合実験系を構築しその結合部位の特徴づけを行った結果、心臓 SR におけるドキシソルビシン結合部位の存在を明らかにした。
- 2) 精製 RyR2 とドキシソルビシンとの直接的な相互作用を検討した結果、ドキシソルビシンは、精製 RyR2 に直接結合することを示し、その結合が RyR2 を介した SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出に重要である可能性が示唆された。
- 3) RyR2 発現細胞 (CRR4) におけるカフェイン惹起による RyR2 からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を検討した結果、9HE は濃度依存的に RyR2 からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を抑制した。
- 4) SR に対する  $[^3\text{H}]$ -ryanodine 結合実験を行った結果、9HE は、その結合量を抑制した。
- 5) ランゲンドルフ灌流心を用いた虚血再灌流傷害モデルで 9HE の作用を検討した結果、9HE は、再灌流性不整脈を有意に抑制し、さらに再灌流後の心機能回復作用も示した。
- 6) 正常乳頭筋の変力作用に対する 9HE の影響を検討した結果、9HE はその変力作用に影響を与えないことが明らか

かとなった。

- 7) RyR3 のサブタイプ特異的な機構解析を検討する目的で、CHO 細胞に RyR3 遺伝子を導入し、RyR3 発現細胞株 (RyR3D1) を樹立した。その発現細胞株の生理学的機能解析をした結果、RyR3 は、RyR1 および RyR2 の共通の性質として報告されてきた CICR 機能およびカフェイン応答性を示した。

以上の検討結果より RyR と RyR に作用する薬物との分子間相互作用ならびに生理学的機能を明らかにした。さらに RyR2 と病態との関連性では、RyR2 の活性を調節する化合物は、心筋虚血再灌流傷害に対する新しい治療戦略になる可能性を示唆した点、博士 (薬学) の学位を授与するにふさわしいものとする。