

Title	CaMKII activates ASK1 and NF- $\kappa$ B to induce cardiomyocyte Hypertrophy
Author(s)	柏瀬, 一路
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45418">https://hdl.handle.net/11094/45418</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	かしわ 柏 瀬 一 路
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 19245 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	CaMKII activates ASK1 and NF- $\kappa$ B to induce cardiomyocyte Hypertrophy. (CaMKII が ASK1、NF- $\kappa$ B を活性化することにより心筋細胞の肥大が誘導される)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 安井 義善 教授 荻原 俊男

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

心筋細胞の肥大をもたらす細胞内シグナル伝達機構として、細胞内  $Ca^{2+}$  の濃度上昇から  $Ca^{2+}$ /calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) が活性化することにより、心筋細胞の肥大や心内腔の拡大がもたらされることが報告されているが、CaMKII 活性化による心筋肥大誘導における分子機構は不明であった。近年、線虫 (*C. elegans*) における嗅神経の発現に関する研究において、CaMKII の哺乳類ホモログである UNC-43 が MAP kinase kinase kinase である NSY-1 を活性化することや、その NSY-1 が哺乳類の ASK1 と相同性が高いことが報告された。そこで、本研究では、線虫と同様に哺乳類においても、CaMKII が ASK1 を活性化する経路が存在するか、また、それが心筋細胞の肥大に関与しているかについて検討した。

#### 【方法】

##### 1. 単离心筋細胞の調整

生直後のウイスターラットの心室筋よりコラゲナーゼ法にて心筋細胞を単離した。10%ウシ胎児血清含有のダルベッコ改変培地において 24 時間培養した後に、無血清培地に交換し実験に供用した。

##### 2. アデノウイルスベクター

組換えアデノウイルスとして、ASK1 のドミナントネガティブ体であるアデノウイルス AdASK (KM) や、NF- $\kappa$ B の核内移行を妨げ活性化を阻害するアデノウイルス AdI $\kappa$ B $\alpha$ 32/36A を使用した。また、CaMKII のアイソフォームのうち心筋肥大に関与していることが示されている  $\delta$ 3 分画の cDNA からアデノウイルス AdCaMKII  $\delta$ 3 を作成した。心筋細胞へのウイルスの感染は multiplicity of infection = 50~100 の間で行い、24 時間後に実験に供用した。

##### 3. ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ

NF- $\kappa$ B の活性化の測定として、 $\kappa$ B 依存性のルシフェラーゼ発現ベクターをリポフェクション法により導入した。アデノウイルス感染やフェニレフリン刺激 24 時間後にルシフェラーゼ活性をルミノメーターにて測定した。

##### 4. 心筋細胞肥大の評価

[<sup>3</sup>H]-ロイシン：アデノウイルス感染やフェニレフリン刺激後に [<sup>3</sup>H]-ロイシンを添加した。48 時間培養後に [<sup>3</sup>H]-ロイシンの細胞内への取り込みを液体シンチレーションカウンターにて測定し、蛋白合成の亢進を評価した。

アクチン染色：アデノウイルス感染やフェニレフリン刺激 48 時間後に心筋細胞をローダミン蛍光色素にてアクチン染色を行い、蛍光顕微鏡にてサルコメア形成の有無を評価した。

ANF の発現：アデノウイルス感染やフェニレフリン刺激 48 時間後に心筋細胞に対して、ANF を一次抗体、fluorescein isothiocyanate (FITC) 共役二次抗体を用いて免疫染色を行い、ANF の発現を評価した。

#### 5. ASK1 活性化の測定

フェニレフリン刺激 10 分後やアデノウイルス感染 8 時間後の細胞溶解液を ASK1 抗体にて免疫沈降させ、MKK6 を基質としてインビトロキナーゼアッセイ法にて ASK1 の活性を測定した。

### 【結果】

1. ASK1 のインビトロキナーゼアッセイにより AdCaMKII  $\delta 3$  の感染により ASK1 の活性化が認められた。同様に、フェニレフリン刺激でも ASK1 の活性化が見られたが、CaMKII 特異的な阻害薬である KN93 の前投与により、フェニレフリンによる ASK1 の活性化は阻害された。

2. AdCaMKII  $\delta 3$  感染により、 [<sup>3</sup>H]-ロイシンの細胞内取り込みの亢進、サルコメアの形成、ANF の発現の増加を認めた。これらの肥大反応は、AdCaMKII  $\delta 3$  と AdASK (KM) の共感染では抑制された。

3. フェニレフリン刺激により [<sup>3</sup>H]-ロイシンの細胞内取り込みの亢進、サルコメアの形成および、ANF の発現の増加を認めた。これらの肥大反応は、KN93 の前投与により抑制された。

4. AdCaMKII  $\delta 3$  感染により、 $\kappa B$  依存性ルシフェラーゼ活性の上昇を認め、 $I\kappa B\alpha$  のウエスタンブロットでは、 $I\kappa B\alpha$  の分解が見られ、AdCaMKII  $\delta 3$  感染により NF- $\kappa B$  が活性化していることが示された。これらの NF- $\kappa B$  の活性化は、AdCaMKII  $\delta 3$  と AdASK (KM) の共感染では抑制された。また、フェニレフリン刺激でも NF- $\kappa B$  の活性化が認められたが、KN93 の前投与により抑制された。

5. Ad $I\kappa B\alpha 32/36A$  投与による NF- $\kappa B$  の活性化阻害を行なった際の AdCaMKII  $\delta 3$  による心筋肥大反応への影響を検討したところ、AdCaMKII  $\delta 3$  感染による心筋肥大反応は、Ad $I\kappa B\alpha 32/36A$  と AdCaMKII  $\delta 3$  の共感染では抑制された。

6.  $Ca^{2+}$  イオノフォアである Ionomycin 投与による ASK1 の活性化は KN93 の前投与により抑制されたが、 $H_2O_2$  による ASK1 の活性化は KN93 の前投与では抑制されなかった。

### 【総括】

CaMKII  $\delta 3$  による心筋細胞肥大に至るシグナル伝達経路について検討した。CaMKII  $\delta 3$  により ASK1 や NF- $\kappa B$  が活性化され、心筋細胞肥大に至る経路が証明された。

## 論文審査の結果の要旨

心筋細胞の肥大は心不全の発症と進展に関与する重要な心形態変化過程であるが、その分子生物学的メカニズムや関与するシグナル伝達機構は明らかになっていない。本研究は  $Ca^{2+}$ /calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) 活性化による心筋肥大誘導における分子機構において、ASK1 を活性化する経路の有無を検討したものである。発表者はラット新生仔心筋細胞において、CaMKII 発現アデノウイルスベクター、ASK1 のドミナントネガティブ体アデノウイルスベクター、NF- $\kappa B$  の活性化を妨げるアデノウイルスベクターの感染が心筋細胞の肥大に与える影響や、G 蛋白共役受容体アゴニストによる心筋細胞肥大に CaMKII の阻害剤がおよぼす影響を検討した。その結果、CaMKII が ASK1 の活性化とそれに続く NF- $\kappa B$  の活性化により心筋細胞の肥大を誘導する経路が存在することを示した。本研究は哺乳類の心筋細胞の肥大に CaMKII が ASK1 と NF- $\kappa B$  の活性化する経路が存在していることを初めて報告したものである。また、ASK1 の活性化には、活性酸素種による活性化に加えて、 $Ca^{2+}$  から CaMKII

による活性化という経路が存在し、活性酸素種とは違う様式で活性化することを示した。今回の研究により、G 蛋白共役受容体アゴニストから心筋肥大に至る経路において、ASK1 が key molecule として働いている可能性があると考えられ、ASK1 の活性化を抑えることで、今後の新たな心不全治療開発につながる可能性を示唆しており、学位の授与に値すると思われる。