The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	心臓構成細胞の細胞膜マイクロドメインにおけるシグナル伝達の病態学的意義の解析
Author(s)	舎川, 洸太
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61706
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　舎川洸太　）	
論文題名	心臓構成細胞の細胞膜マイクロドメインにおけるシグナル伝達の病態学的意義の解析

論文内容の要旨

【背景・目的】

近年、我が国では生活習慣の欧米化や高齢化社会に伴い心血管病の罹患者が年々増加しており、心疾患は死因別死亡率の第２位を占めている。全ての心疾患の終末像である慢性心不全は、症状が顕在化してからの５年生存率が 50%以下と極めて予後不良である。現在、慢性心不全の治療には、βアドレナリン受容体遮断薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬などの神経体液性因子を標的とした薬剤が使用されているが、予後改善効果は未だ満足とは言い難い。そのため、心不全に対する新規治療薬開発が期待される。

カベオラは細胞膜に存在する直径 50-100nm の窪み様構造であり、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する。例えば、興奮収縮連関に不可欠なカルシウムイオン（Ca^{2+}）の流入経路である L 型カルシウムチャネル（LTCC）や上記の神経体液性因子の受容体であるβアドレナリン受容体（βAR）やアンジオテンシン II 受容体の局在が知られている。近年、心筋細胞や線維芽細胞におけるカベオラの欠損が心不全様症状を引き起こすことが報告され、カベオラにおけるシグナル伝達の重要性が示唆された。

また、心筋細胞においてカベオラでの LTCC を遮断すると心収縮力を変えることなく肥大シグナルを減少させたとの報告があり、カベオラとその他細胞膜とのシグナル伝達が異なる役割を有することが示唆された。これらの事からカベオラ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。

そこで、本研究はカベオラに着目し、心臓構成細胞におけるカベオラに限局したシグナル伝達を解析することで、新規心不全メカニズムを探索することを目的とした。

【方法・結果】

・カベオラにおけるシグナル活性評価系の構築

まず、カベオラにおけるシグナル伝達を解明するための新規評価系の確立を目指した。前述したように、カベオラにおけるシグナル伝達の重要性が示唆されているものの、今日までのカベオラ研究はカベオラを人為的に欠損させた検討や、カベオラ分画を利用した検討が多く、カベオラにおけるシグナル活性を直接評価したとは言い難い。そこで、本研究では、ホスホランバン（PLN）とカベオリン 3 (Cav3) という二つのタンパク質を用いて、融合タンパク質 cPLN-Cav3 を作製し、カベオラにおけるシグナルを直接的に評価できる系を構築した。

PLN は、16 番目の Serine がプロテインキナーゼ A (PKA) に、17 番目の Threonine がカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼ II (CaMKII) によってリン酸化されることが知られており、これらのリン酸化は特異的抗体によって検出可能である。Cav3 はカベオラ構造の維持に必須の分子である。この PLN と、Cav3 の融合タンパク質を作製し、シグナル評価系としての妥当性を検討した。検討の結果、cPLN-Cav3 を用いることで、PKA と CaMKII の活性をリン酸化の強度で評価することが可能であった。また、cPLN-Cav3 はカベオラに局在しており、cPLN-Cav3 を用いることで、カベオラ特異的な PKA と CaMKII の活性を適切に評価できることが明らかになった。

・心筋細胞膜カベオラにおける LTCC 活性化の機序と病態学的意義の解明

次に、作製した cPLN-Cav3 を用いて、心筋細胞膜カベオラにおける LTCC の心病態に対する意義について検討した。CaMKII は、心筋細胞の収縮や弛緩、恒常性に寄与するが、CaMKII の心病態に対する役割については、未だ一定の見解が得られていない。その原因として、我々はカベオラとそれ以外の CaMKII について役割が異なる可能性を想起した。LTCC は心筋細胞において Ca^{2+}の主な流入経路であり、ヒト不全心において LTCC のβ2a サブユニット (β2a) の発現量が上昇している。また、β2a は LTCC の開口率を制御しており、CaMKII による β2a のリン酸化は Ca^{2+}流入増加を伴う LTCC の活性化に寄与していることが報告されている。これらのことから、CaMKII とβ2a の相互作用が心病態に寄与している可能性を想起した。

そこで、野生型のβ2a (wt-β2a)、および CaMKII によるリン酸化サイトを変異させた変異型β2a (mt-β2a) を作製し、

心筋細胞に発現させた結果、β2a はカベオラに局在することが明らかとなった。また、β2a の過剰発現は心筋細胞肥大を誘導すること、また、CaMKII によるリン酸化を阻害することで心筋細胞肥大が抑制されることを見出した。LTCC の活性化による Ca^{2+} 流入増加は CaMKII の活性を上昇させる。すなわち、心筋細胞膜カベオラにおけるβ2a と CaMKII の正のフィードバックループが心肥大を誘導することを示す結果となった。また、wt-β2a、および mt-β2a 過剰発現マウスを用いた検討より、αアドレナリン受容体刺激がフィードバックループの起点になることを見出した。

これらの結果より、心筋細胞におけるカベオラにおいて、αアドレナリン受容体刺激を起点とした、LTCC β2a と CaMKII の正のフィードバックループが心肥大を誘導することが示唆された。

・心線維芽細胞膜カベオラにおけるβAR シグナリングの病態学的意義の解明

最後に、心線維芽細胞膜のカベオラにおけるβAR シグナリングの意義について cPLN-Cav3 を用いて検討した。心不全治療にはβAR 遮断薬が汎用されるが、不全心では作用点であるはずのβ1AR の数が減少するとの報告より、βAR 遮断薬による予後改善の機序には未だ不明な点が残されている。そこで、心線維芽細胞におけるβ2AR 刺激が種々のサイトカインの産生を惹起すること、それらサイトカインの産生により心筋細胞肥大が制御されることを考慮して、βAR 遮断薬の予後改善機序として、心線維芽細胞におけるβ2AR を標的とする可能性を想起した。

まず、全身性β2AR 欠失マウス（KO）を用いて、βAR 刺激後によって惹起される心肥大がβ2AR を介することを明らかにした。そこで、βAR 刺激による心肥大に心線維芽細胞のβ2AR が与える影響を検討するため、KO より単離した心線維芽細胞を用いた conditioned medium 実験を行った結果、心線維芽細胞のβ2AR が心筋細胞の肥大を惹起することが明らかとなった。また、β2AR が心線維芽細胞カベオラにおける PKA を活性化することを見出した。そこで、線維芽細胞特異的に PKA を過剰発現するマウスを作製したところ、生後 12 週でコントロールと比較して心肥大が惹起されたことから、心線維芽細胞のβ2AR 刺激による心肥大は PKA を介することが明らかになった。

以上の結果より、心線維芽細胞のカベオラにおけるβ2AR-PKA シグナリングがパラクライン効果を介して心筋細胞肥大に関与することが示唆された。

【結論】

本研究では、カベオラという細胞膜マイクロドメインに着目し、カベオラ特異的なシグナル伝達が有する病態学的意義について、心筋細胞、心線維芽細胞という二つの面から検討した。

本研究は、カベオラにおけるシグナル伝達が心病態と強く関連することを新規評価系を用いて示したものであり、この評価系を利用した心不全治療法の開発が進展することを期待する。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　舎川　洸太　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	藤尾　慈
	副 査　教授	八木　清仁
	副 査　教授	辻川　和丈

論文審査の結果の要旨

心不全の病態形成において、細胞内情報伝達機構の活性化による心肥大が重要であることが明らかとなっている。細胞内情報伝達機構において効率的なシグナルの活性化を可能にするための「場」が存在し、細胞膜マイクロドメインと呼ばれる。その中でもカベオラマイクロドメインには多くの受容体やイオンチャネルが存在し、その重要性が謳われてきたが、マイクロドメイン内におけるシグナル活性化を特異的に評価する方法が存在しないため、20年以上にわたり実際の意義は不明であった。本研究において、カベオラマイクロドメインにおけるプロテインキナーゼの活性の評価法を独自に確立し、そのカルシウムチャネルに及ぼす作用を解明する事を試みた。前者において、融合タンパク質を用いて簡便にカベオラマイクロドメインにおけるプロテインキナーゼの活性化を評価する系の構築に成功した。また、構築した系をもちいて電位依存性カルシウムチャネルの細胞内サブユニットのリン酸化が、αアドレナリン受容体刺激においてカルモデュリン依存性キナーゼの活性化を介して心肥大反応を増悪させる事を見出した。

以上、本研究は、これまで長年にわたり予想されてきた膜マイクロドメイン特異的なシグナルの存在を証明するとともに、その意義を同定し新たな学術領域の開拓の基盤を提示するものであり、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。