

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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 (β AR) 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ずに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局限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、ホスホランパン (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 β 2aサブユニット (β 2a) の発現量が上昇している。また、 β 2aはLTCCの開口率を制御しており、CaMKIIによる β 2a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 β 2a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 β 2a (wt- β 2a)、およびCaMKIIによるリン酸化サイトを変異させた変異型 β 2a (mt- β 2a) を作製し、

心筋細胞に発現させた結果、 $\beta 2a$ はカベオラに局在することが明らかとなった。また、 $\beta 2a$ 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 $\beta 2a$ 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- $\beta 2a$ 、および mt- $\beta 2a$ 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 $\beta 2a$ 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 β AR 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 β AR 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 β AR 遮断薬が汎用されるが、不全心では作用点であるはずの $\beta 1AR$ の数が減少するとの報告より、 β AR 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 $\beta 2AR$ 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、 β AR 遮断薬の予後改善機序として、心線維芽細胞における $\beta 2AR$ を標的とする可能性を想起した。

まず、全身性 $\beta 2AR$ 欠失マウス (KO) を用いて、 β AR 刺激後によって惹起される心肥大が $\beta 2AR$ を介することを明らかにした。そこで、 β AR 刺激による心肥大に心線維芽細胞の $\beta 2AR$ 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 $\beta 2AR$ 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、 $\beta 2AR$ 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 $\beta 2AR$ 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 $\beta 2AR$ -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。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (舎 川 洸 太)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	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。