

学位論文題名

実験的糖尿病ラットの心室筋を用いた筋小胞体
ホスホランバンリン酸化障害に関する薬理学的研究

学位論文内容の要旨

【背景】

糖尿病は心筋虚血や高血圧の合併にかかわらず、心不全を発症しやすいことが知られており、糖尿病患者ではカテコラミンに対する心反応性低下や心拡張不全がみられることが報告されている。その機序の中心は心筋細胞内 Ca^{2+} 調節機構の異常にあると考えられており、筋小胞体機能障害の関与が示唆されている。筋小胞体内への Ca^{2+} 流入は Ca^{2+} -ATPase(SERCA2a)により調節されていて、このポンプ活性はホスホランバンにより抑制されている。ホスホランバンはリン酸化を受けることにより SERCA2a への抑制を解くことができるが、リン酸化部位は3ヶ所あり、プロテインキナーゼ C(PKC)による Ser¹⁰、プロテインキナーゼ A (PKA)による Ser¹⁶、 Ca^{2+} -カルモジュリン依存性キナーゼによる Thr¹⁷ が知られている。糖尿病病態では、細胞内の diacylglycerol の濃度の増加により PKC 活性が増加するため、PKC によりホスホランバンがリン酸化された結果、その機能が修飾され、筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み能に異常がおこる可能性が推測される。

本研究では streptozotocin 誘発性実験的糖尿病ラットを用いて、糖尿病病態ではホスホランバンとそのリン酸化が筋小胞体機能に与える影響がどのように変化しているかを検討した。また、糖尿病心筋での筋小胞体機能における PKC の役割を明確にするため、PKC 活性の測定および PKC isoforms の蛋白発現の検討を行った。

【方法】

1. 実験的糖尿病ラットの作成

8週齢の Wistar ラットに streptozotocin 45mg/kg を尾静脈より静注し、実験的糖尿病ラットを作成した。対照群には溶媒のみを静注し、糖尿病のある群にはインスリン治療を行った。

2. ホスホランバンと SERCA2a のイムノ・プロット解析

ラットの心室筋より膜標品を精製し、sodium dodecyl sulfate (SDS)の存在下でポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動後、ウェスタン・プロットにより蛋白の発現を検討した。

3. ホスホランバンの特異的リン酸化の検出

ランゲンドルフ法で灌流したラットの摘出心臓から膜標品を精製し、isoproterenol 刺激の有無によるホスホランバンの部位特異的なリン酸化をウェスタン・プロットで検討した。

4. PKC isoforms の同定

ラットの心室筋から細胞質分画と膜分画を精製しウェスタン・ブロットにより PKC isoforms の発現を検討した。

5. ホスホランバンの mRNA のノーザン・ブロット解析

ラットの心室筋より Poly(A)⁺RNA を精製し、ノーザン・ブロットによりホスホランバンの mRNA の発現を検討した。

6. 筋小胞体のリン酸化の定量

ラットの心室筋より筋小胞体胞を抽出し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を加えてリン酸化させ、SDS 電気泳動後、リン酸化ホスホランバンの定量を行った。

7. 筋小胞体の Ca^{2+} uptake の定量

筋小胞体胞を用いて筋小胞体への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込み量を測定した。

8. PKC 活性の測定

ラットの心室筋より抽出した細胞質分画と膜分画を用いて PKC 活性を測定した。

【結果ならびに考察】

本研究において、糖尿病病態ではホスホランバンの蛋白と mRNA が同程度増加することにより、ホスホランバンは転写段階で増加すると評価できた。ホスホランバンのリン酸化の基礎レベルが糖尿病病態で上昇していることを見いだしたが、ウェスタン・ブロットの結果から、ホスホランバンの Ser¹⁶ と Thr¹⁷ の部位特異的なリン酸化は糖尿病で変化しないことを確認した。非刺激時での糖尿病病態におけるホスホランバンのリン酸化の増加は Ser¹⁶ と Thr¹⁷ 以外、すなわち Ser¹⁰ のリン酸化が増加するためと推測され、PKC の関与が強く示唆された。

糖尿病病態では、isoproterenol や PKA 刺激によるホスホランバンの Ser¹⁶ のリン酸化は保たれており、PKC も PKA と同程度にホスホランバンをリン酸化させたが、PKA による筋小胞体への Ca^{2+} 取り込み効果は対照群と比較し有意に減弱していた。対照標本（非糖尿病群）において、PKC の存在下では PKA による Ca^{2+} 取り込み効果は有意に低下することから、糖尿病群での PKA による Ca^{2+} 取り込み能減弱は、内因性 PKC によるリン酸化に起因しているものと考えられた。

糖尿病ラットの心臓より抽出した膜分画では Ca^{2+} の存在によらず、PKC 活性が増加していたが、細胞質分画では有意な増加を認めなかった。糖尿病群の膜分画では、PKC isoforms のうち、 δ 、 η 、 ι 、 λ の発現の増加が認められ、これらが PKC 活性の増加に関与していると考えられた。

今回の研究は、糖尿病病態でアドレナリン作動性 β 受容体を介した陽性変力作用が減弱する機序を、筋小胞体機能を制御するホスホランバンの観点より捕らえたものである。糖尿病病態では PKC 活性の増加が認められ、それによりホスホランバンの Ser¹⁰ のリン酸化が増加することにより、PKA を介したホスホランバンの Ser¹⁶ のリン酸化に伴う筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み能の増強作用が損なわれる事を初めて示す報告であり、選択的 PKC 阻害剤が糖尿病性心不全の発症阻止に貢献しうる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 輪 聡 一
副 査 教 授 吉 岡 充 弘
副 査 教 授 丸 藤 哲

学 位 論 文 題 名

実験的糖尿病ラットの心室筋を用いた筋小胞体 ホスホランバンリン酸化障害に関する薬理学的研究

糖尿病における心機能低下の機構として、心筋細胞が収縮する際の細胞内 Ca^{2+} を調節する機能タンパクの異常が想定されている。これには L 型 Ca^{2+} チャンネル及び Na^+ - Ca^{2+} 交換系に加え、筋小胞体(SR)が含まれるが、当研究室では、実験的糖尿病ラットモデルの心筋細胞では L 型 Ca^{2+} チャンネルには変化がなく、 Na^+ - Ca^{2+} 交換系及び SR 機能が低下していることを報告してきた。本研究では streptozotocin 誘発性実験的糖尿病ラットモデルを用いて、糖尿病心筋におけるホスホランバン(PLB) のリン酸化と SR 機能の変化について、また、SR 機能における protein kinase C (PKC) の影響について検討した。

実験動物としては、8 週齢の Wistar ラットに streptozotocin 45mg/kg を尾静脈より静注し、実験的糖尿病ラットを作成した。対照群には溶媒のみを静注し、糖尿病のある群にはインスリン治療を行った。PLB 及び PKC isoforms の蛋白発現の検討、ランゲンドルフ灌流法による isoproterenol 刺激時の PLB の特異的リン酸化の評価はウェスタン・プロットにより行った。PLB の mRNA 発現はノーザン・プロットにより検討した。放射性同位元素を用いて、*in vitro* における PLB リン酸化の評価と SR Ca^{2+} uptake 及び PKC 活性の測定を行った。

本研究において、糖尿病病態では PLB の蛋白量は転写段階で増加していた。PLB のリン酸化の基礎値は糖尿病病態で上昇していたが、PLB の Ser¹⁶ と Thr¹⁷ の部位特異的なリン酸化は変化していなかった。つまり、非刺激時での PLB のリン酸化の増加は Ser¹⁶ と Thr¹⁷ 以外、すなわち Ser¹⁰ のリン酸化が増加するためと推測され、PKC の関与が強く示唆された。糖尿病病態では、cAMP-dependent protein kinase (PKA) 刺激による PLB の Ser¹⁶ のリン酸化は保たれており、PKC も PKA と同程度に PLB をリン酸化させたが、PKA による SR への Ca^{2+} uptake 効果は対照群と比較し有意に減弱していた。対照標本(非糖尿病群)では、PKA による Ca^{2+} uptake 効果は PKC の存在下で有意に低下するため、糖尿病群での PKA による Ca^{2+} uptake 能減弱は、PKC によるリン酸化によるものと考えられた。糖尿病ラットの心臓より抽出した膜分画では、PKC 活性の増加が認めら

れ、また、PKC isoformsのうち、 δ 、 η 、 ι 、 λ の発現が増加していたことより、これらの isoforms が PKC 活性の増加に関与していると考えられた。以上の結果より、糖尿病病態では PKC 活性の増加が認められ、それにより PLB Ser¹⁰のリン酸化が増加することにより、PKA を介した PLB の Ser¹⁶のリン酸化に伴う SR の Ca²⁺ uptake の増強作用の減弱が認められ、選択的 PKC 阻害剤が糖尿病性心不全の発症阻止に貢献しうる可能性が示唆された。

口頭発表に際し、副査吉岡教授から、糖尿病ラットモデルの心機能障害の程度について、PLB の蛋白発現増加の機序について、PKC isoforms の機能の違いについての質問がなされた。副査丸藤教授から、PLB のリン酸化の検出方法について、糖尿病での Ca²⁺ uptake 障害に対する PKC の関与について、糖尿病ラットモデルでの心臓の拡張能について、糖尿病の心筋細胞における Ca²⁺調節機構の検討について、さらに PKC 阻害剤の臨床応用への展望についての質問がなされた。また三輪教授からは、PKC の活性化の機序について、今回の *in vitro* 実験における糖尿病による Ca²⁺ uptake の変化のもつ意義について質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は今回の実験結果と過去の文献を引用し、概ね適切に回答した。

この論文は、糖尿病病態において増加した PKC が、PKA を介した PLB リン酸化に伴う SR 機能を損なうことを初めて示したことで高く評価され、今後、糖尿病性心不全に対する選択的 PKC 阻害剤の臨床応用について更なる研究の発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。