

Title	Calmodulin kinases II and IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats.
Sub Title	白血病阻止因子誘発性心肥大におけるカルモデュリン依存性キナーゼII、IVおよびカルシニューリンの役割
Author	加藤, 隆弘
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.1 (2003. 3) ,p.13-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030304-0013

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Calmodulin kinases II and IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats.

(白血病阻止因子誘発性心肥大におけるカルモデュリン依存性キナーゼII、IVおよびカルシニューリンの役割)

加藤 隆弘

内容の要旨

当教室ではこれまでIL-6ファミリーの白血病阻止因子(LIF)が心肥大を誘発すること、成獣ラット心筋細胞においてLIFによりL型カルシウム(Ca)電流および細胞内Ca濃度が增大することを報告してきた。一方、近年の研究により、カルモデュリン依存性リン酸化酵素カルモデュリンキナーゼI、IV(CaMKI、CaMKIV)およびカルモデュリン依存性脱リン酸化酵素カルシニューリン(CN)がフェニレフリン誘発性心肥大形成に重要な働きをすることが報告された。以上のことから本研究ではLIFによる心肥大形成にこれらCa感受性酵素が関与しているのではないかと考え、ラット培養心筋細胞を用いてLIFによる心肥大反応におけるCaMKII、CaMKIVおよびCNの役割について検討した。パッチクランプ法によりCa電流はLIF刺激後15分で最大となることを確認した。Ca感受性色素Fluo-4を用いた測定ではLIF刺激により細胞内Ca濃度は増大し刺激後15分で最大となった。LIF刺激によりCaMKIIおよびCaMKIVのリン酸化酵素活性、およびCNの脱リン酸化酵素活性は刺激後15分後に最大となった。転写因子NFAT-3はCNにより脱リン酸化され核へ移行することが知られている。LIFはNFAT-3ルシフェラーゼ活性を3倍に増大し、この作用はCNの阻害薬サイクロスポリン(CsA: 50ng/ml)により完全に阻害された。L型Caチャネル遮断薬ニカルジピン(Ni)およびベラパミル(Ve)はLIF刺激によるCaMKII、CaMKIVおよびCNの活性化をほぼ完全に阻害した。NiおよびVeはLIF刺激による $[^3\text{H}]$ -フェニルアラニン(Phe)取り込み増大を阻害した。免疫沈降ウエスタンブロット法では、LIFはホスホリパーゼC- γ 1(PLC)をリン酸化しなかった。ラジオイミューノアッセイ法によるイノシトール3リン酸(IP3)の測定ではLIF刺激ではIP3の増大はみられず、Ca増大に対するPLCの関与は否定された。LIFはc-fos(30分)、BNP(1時間)、skeletal α -actin(24時間)、ANP(24時間)の発現を誘導し、CaMKII、CaMKIV阻害薬のKN62(10 μ mol/L)はその誘導を部分的に阻害した。KN62はLIFによる $[^3\text{H}]$ -Phe取り込み増大を濃度依存性に阻害した。LIF刺激によるc-fos、ANP、およびBNP(1時間)の発現誘導はCNの阻害薬FK506、CsAいずれの影響も受けなかったが、CsAにより刺激後2時間から24時間でのBNPの発現が抑制された。CsAはLIFによる $[^3\text{H}]$ -Phe取り込み増大を部分的に阻害した。以上を総合して、LIFは心筋細胞においてL型Ca電流を増大させることによりCaMKII、CaMKIVおよびCNを活性化し、これらの活性化はLIFによる心筋細胞肥大形成において重要な役割を果たしていることが示された。

論文審査の要旨

近年の研究により、CaMKI、CaMKIVおよびcalcineurin(CN)などのカルシウム(Ca)感受性酵素が心肥大形成に重要な働きをすることが注目されている。しかしながら白血病阻止因子(LIF)のようなgp130受容体を介するシグナル伝達においてはCaシグナルを作動させることは報告されていない。本研究では、LIFによる心肥大形成にCa感受性酵素が関与しているかを明らかにすることを試みた。その結果、LIFは胎生ラット培養心筋細胞においてL型Ca電流を増大させることによりCaMKII、CaMKIVおよびCNを活性化し、これらの活性化はLIFによる心筋細胞肥大形成において重要な役割を果たしていることが示された。

審査においては、まずLIFによるL型Ca電流増大の機序に関して、LIFの直接的作用によるものか、それともCaMKII、CaMKIVおよびCNの活性化により引き起こされたものが不明確であることが指摘された。これに対し、CaMKII、CaMKIVおよびCNさらにはPKA、PKC、PI3K、JAK、p38MAPK、チロシンキナーゼの阻害剤のいずれを用いてもLIFによるL型Ca電流増大は抑制されないこと、そしてその後の実験からL型Caチャネル α サブユニットのC末端に2つのMAPK認識配列があり、LIFによるL型Ca電流増大はそのうちの1つがMAPKによりリン酸化されることにより引き起こされることが示されたと回答された。続いて、細胞内Ca濃度測定において、その蛍光指示薬に定量性を出せるFura2を使用するべきであったとの指摘がなされた。Fura2は成獣ラット培養心筋細胞では良く取り込まれたが、胎生ラット培養心筋細胞では取り込み不良であったためと回答されたが、さらにFluo4を使用するならば、コントロールを設定し半定量化する工夫をするべきであったとの指摘がなされた。Ca濃度測定に関しては、心筋細胞の持つ拍動という特性が測定値に影響する可能性も指摘された。NFAT-3ルシフェラーゼアッセイではpositive controlとして用いられたイオノフォアは非生理的であり、より生理的なcontrolが望ましいとされた。臨床的意義についての審査も行なわれ、日常臨床で使用されているCaチャネル阻害剤の心肥大抑制における有用性の一部を説明するものと回答された。最後にLIFの持つ既知の心肥大作用機序と比較して、本研究で示されたカルシウム感受性酵素を介する機序の占める割合が質問された。これに対し $[^3\text{H}]$ -Phe取り込み増大や細胞面積増大に対する抑制作用の程度からMAPK系がメインであり、他がそれぞれ部分的に関与しているものと考えられると回答された。以上のように、本研究はさらに改善する点を残しているものの、心筋細胞肥大作用におけるLIFの新しい作用機序を明らかにした点が有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡
外科学 四津 良平 医化学 末松 誠
生理学 金子 章道 内科学 池田 康夫
学力確認担当者: 北島 政樹、四津 良平
審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成14年12月18日