医共様式 1

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	循環病態科学領域　循環病態内科学教育研究分野 氏名　村上和男

（論文題目）

Role of protein kinase C in acetylcholine-induced Ca^{2+} influx under enhanced phospholipase C-δ1

(ホスホリパーゼ C-δ1 活性亢進下でのアセチルコリン誘発性カルシウム流入におけるプロテインキナーゼ C の役割)

（内容の要旨：和文で 2,000 字程度）

[目的]

冠攣縮性狭心症 (CSA) 患者から培養した皮膚線維芽細胞の膜分画 Phospholipase C (PLC) 活性は亢進しており、その主体が PLC-δ1 であること、さらに PLC 活性は冠動脈の basal tone と正相関することを報告した(1)。PLC 活性亢進の原因として男性患者の約 10%に構造異常 (R257H) が認められた(2)。また、R257H PLC-δ1 過剰発現マウスを作製し、エルゴメトリン投与により冠攣縮が誘発されることを報告した(3)。PLC 活性化の下流には protein kinase C (PKC) が存在し、血管収縮の維持に重要であるが、カルシウム流入に及ぼす影響は明らかではない。今回我々は PLC-δ1 過剰発現下で、アセチルコリン誘発性カルシウム流入における PKC の役割について Human embryonic kidney (HEK)-293 細胞を用いて検討した。

[方法]

1) 冠攣縮の原因遺伝子である PLC-δ1 とムスカリン M3 受容体遺伝子を TransIT-293 transfection reagent を用いて HEK-293 細胞に transfection した。PKC の活性化には TPA 10^{-7}M を用いた。また、PKC の不活性化には Human protein kinase A anchoring protein 5 (AKAP5) siRNA を DharmaFECT Duo transfection reagent を用いて transfection した。

2) アセチルコリン投与後の細胞内遊離カルシウムイオン濃度は fura-2 (excitation 340/380 nm, emission 510 nm) を用いて測定した。Calibration は ionomycin と EGTA-Tris で行った。

3) HEK-293 細胞をカルシウム無添加のバッファー中でアセチルコリン刺激し、カルシウム添加後の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇をカルシウム流入とした。

[結果]

1) アセチルコリン 10^{-5}M 投与により、細胞内遊離カルシウムイオンはスパイク状の上昇 (細胞内貯蔵部位からの遊離とカルシウム流入) とそれに続く sustained phase (カルシウム流入) を示した。PLC-δ1 過剰発現によりアセチルコリン投与後のスパイク状の上昇と sustained phase は有意に増加 ($p<0.05$) した。

2) アセチルコリン 10^{-5}M 投与後のカルシウム流入 (細胞内遊離カルシウムイオン濃度の上昇量) は、PLC-δ1 過剰発現により 21±2 nM から 52±6 nM へ増加 ($p<0.05$) した。PLC-δ1 過剰発現下で TPA により PKC を活性化すると、アセチルコリン投与によるカルシウム流入は 21±3 nM に減少 ($p<0.05$) した。さらに、PLC-δ1 過剰発現下で AKAP5 siRNA により PKC を不活性化すると、アセチルコリン投与によるカルシウム流入は 75±9 nM に増加 ($p<0.05$) した。

3) ニフェジピン 10^{-5}M で前処理後アセチルコリン 10^{-5}M を投与すると、カルシウム流入は PLC-δ1 過剰発現により未処理 HEK-293 細胞に比較して 2.9±0.1 倍増加 ($p<0.05$) し、PLC-δ1 過剰発現並びに AKAP5 siRNA 投与により 5.6±0.2 倍増加 ($p<0.05$) した。

[考察]

これまで我々は CSA 患者から培養した皮膚線維芽細胞では、PLC-δ1 の活性亢進が認められ(1)、その活性亢進の原因として男性患者の約 10%に構造異常 (R257H) が存在することを報告した(2)。また、大部分の CSA 患者で PLC-δ1 活性化因子 P122 (DLC1) の発現が亢進していることを明らかにした(4)。PLC-δ1 はカルシウムで活性化され、細胞内貯蔵部位からのカルシウム遊離と細胞外からのカルシウム流入を惹起し、その下流に PKC の活性化が位置する。今回の検討で、冠攣縮の病態である PLC-δ1 の過剰発現によりカルシウム流入は亢進したが、PKC はその流入に対して negative feedback 的に作用することが明らかとなった。

PKC はカルシウム流入関連チャネルに影響を及ぼし、その 1 つとして非選択的陽イオンチャネル classical transient receptor potential canonical (TRPC) がある。TRPC は PLC で産生される diacylglycerol で活性化され初期のカルシウム流入を惹起する。TRPC の活性化は脱分極を引き起こし電位依存性カルシウムチャネルを介するカルシウム流入が発生する。PKC はアセチルコリン誘発性カルシウム流入に対して負に作用し、ニフェジピン投与の影響をほとんど受けなかったことから、TRPC を抑制する可能性が推察された。PKC は血管収縮の維持に関与するが、冠攣縮の病態においては、むしろカルシウム流入を抑制し、冠攣縮の発生に拮抗的に作用する可能性が考えられた。

本研究では、アセチルコリン誘発性カルシウム流入は PLC-δ1 過剰発現並びに PKC の抑制により増加し、PKC の活性化により減少することが明らかとなった。従って、PKC は冠攣縮の病態形成におけるカルシウム流入調節に重要な役割を果たすことが示唆された。

[文献]

1) Okumura K, Osanai T, Kosugi T, Hanada H, Ishizaka H, Fukushi T, Kamada T, Miura T, Hatayama T, Nakano T, Fujino Y, Homma Y. Enhanced phospholipase C activity in the cultured skin fibroblast obtained from patients with coronary spastic angina: possible role for enhanced vasoconstrictor response. J Am Coll Cardiol. 2000;36:1847-1852.

2) Nakano T, Osanai T, Tomita H, Sekimata M, Homma Y, Okumura K. Enhanced activity of variant phospholipase C-δ1 protein (R257H) detected in patients with coronary artery spasm. Circulation. 2002;105:2024-2029.

3) Shibutani S, Osanai T, Ashitate T, Sagara S, Izumiyama K, Yamamoto Y, Hanada K, Echizen T, Tomita H, Fujita T, Miwa T, Matsubara H, Homma Y, Okumura K. Coronary Vasospasm Induced in Transgenic Mouse with the Increased Phospholipase C-δ1 Activity. Circulation. 2012;125:1027-1036.

4) Murakami R, Osanai T, Tomita H, Sasaki S, Maruyama A, Itoh K, Homma Y, Okumura K. p122 protein enhances intracellular calcium increase to acetylcholine: Its possible role in the pathogenesis of coronary spastic angina. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;10:1968-1975.