85　カルシウム感受性に着目した冠攣縮性狭心症の機序解明	富田　泰史

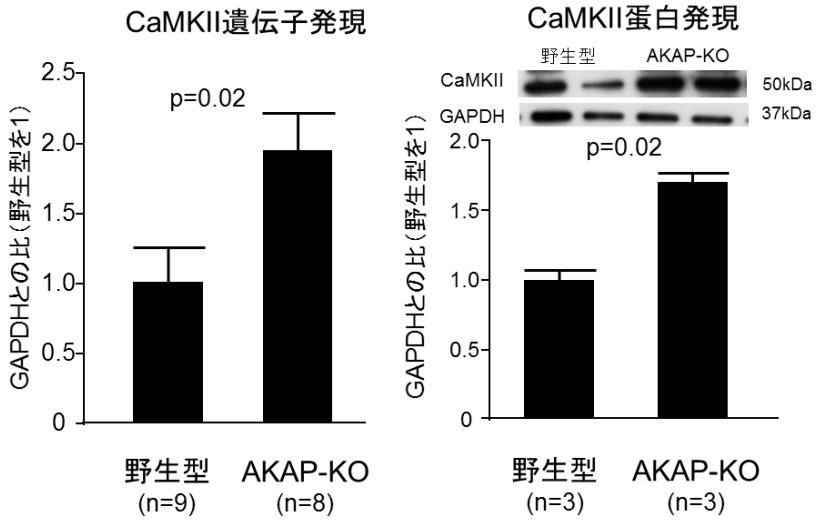
【目的】冠攣縮性狭心症は冠動脈平滑筋の収縮刺激に対する過剰反応を特徴とする。その機序は細胞内カルシウムイオン濃度上昇の亢進であり、その視点からこれまで多くの研究が行われてきた。一方、最近我々は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を伴わない冠攣縮の動物モデルを見出した。本研究では、冠攣縮におけるカルシウム感受性亢進の関与を検討し、さらにカルシウム感受性亢進を抑制するとされるカルベジロールの冠攣縮抑制効果を評価した。

【方法】A キナーゼアンカータンパク（A-kinase anchoring proteins、AKAP）79/150 ノックアウト（*AKAP -KO*）マウスにエルゴノビンを投与し、冠攣縮誘発の有無を検討した。続いて、野生型マウスと *AKAP -KO* マウスの血管平滑筋細胞を培養し、アセチルコリン刺激による細胞内カルシウム濃度上昇を Fura-2 により測定した。さらにカルシウム感受性関連物質であるカルモジュリンキナーゼⅡ（CaMKⅡ）の遺伝子発現ならびに蛋白発現を検討した。*AKAP -KO* マウスにカルベジロールを投与し、冠攣縮抑制効果を検討した。冠攣縮性狭心症患者より得られたゲノム DNA を使用し、*AKAP5*（マウスの AKAP79/150 に相当）の遺伝子変異を検討した。

【結果】*AKAP -KO* マウスにエルゴノビンを投与したところ、体表面心電図にて ST 上昇が観察され、冠攣縮が誘発された。*AKAP -KO* マウス由来の血管平滑筋細胞では、アセチルコリン刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇は、野生型マウスと同等であった。*AKAP -KO* マウスの血管平滑筋細胞における CaMKⅡの遺伝子ならびに蛋白発現は、野生型マウスと比較していずれも有意に増加していた。カルベジロールを *AKAP -KO* マウスに投与し冠攣縮を誘発したところ、冠攣縮が抑制された。一方、β遮断薬であるプロプラノロールを *AKAP -KO* マウスに投与しても、冠攣縮は抑制されなかった。AKAP5 の遺伝子解析では、冠攣縮性狭心症患者 62 名中 7 名に、コントロール群 64 名 5 名に 203 番目のアミノ酸置換を伴うヘテロ遺伝子変異（イソロイシン→スレオニン）を認め、さらにコントロール群 1 名では、同部位のホモ遺伝子変異を認めた（2 群間に有意差なし）。

以上から、*AKAP -KO* マウスでは過剰な CaMKⅡの発現によってカルシウム感受性が亢進し、結果として冠攣縮が引き起こされるという新たな機序が示唆された。また、カルベジロールの冠攣縮に対する抑制効果は、新たな治療法の開発に寄与する可能性が考えられた。

AKAP -KO マウス由来の血管平滑筋細胞における CaMKⅡ発現



85. カルシウム感受性に着目した冠攣縮性狭心症の機序解明

富田　泰史

弘前大学 大学院医学研究科 循環器腎臓内科学講座

Key words：冠攣縮，カルシウム，A キナーゼアンカータンパク

緒　言

冠攣縮性狭心症は冠動脈平滑筋の収縮刺激に対する過剰反応を特徴とする。平滑筋の収縮に重要な Phospholipase C（PLC）が活性化されると、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する。我々はこれまでに PLC-delta1 に焦点を当て、様々な視点から冠攣縮のメカニズムについて研究を行ってきた［1～4］。さらに、冠攣縮性狭心症患者の遺伝子解析により、PLC-delta1 活性を亢進させる遺伝子変異（R257H）を見出し、変異型 PLC-delta1 を血管平滑筋特異的に過剰発現させたマウス（PLC-TG マウス）を作製した。このマウスにアゴニスト（エルゴノビン）を投与すると、体表面心電図にて ST 上昇が観察され、またアゴニスト刺激による冠動脈攣縮が観察された。これらから、この PLC-TG マウスは臨床例に即した冠攣縮性狭心症動物モデルであることを報告した［5］。

A キナーゼアンカータンパク（A-kinase anchoring proteins，AKAP）、特に AKAP79/150 は、シグナル伝達経路において PLC の下流に位置するプロテインキナーゼ C（PKC）に結合し、細胞外からのカルシウムイオン流入調節に重要な役割を担っている［6］。我々は AKAP79/150 の冠攣縮における役割を検討するため、PLC-TG マウスと AKAP ノックアウト（KO）マウスを交配し、PLC 過剰発現かつ AKAP79/150 蛋白が発現していないマウス（*PLC-AKAP*-KO）を作製した。予想に反し、*PLC -AKAP -KO* マウスではエルゴノビン投与による ST 上昇が全く抑制されず、さらに *AKAP-KO* マウスにおいても *PLC-TG* マウスと同様の ST 上昇が観察された。重要な知見として、*AKAP*-KO マウスの大動脈平滑筋細胞では、アゴニスト刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇は野生型マウスの平滑筋細胞と同等であり、全く亢進していなかった。すなわち、*AKAP-KO* マウスでは細胞内カルシウム濃度上昇の亢進を伴わずに、カルシウム感受性の亢進により冠攣縮が誘発された可能性が考えられた。さらにβ遮断薬であるカルベジロールは、カルシウム感受性の主要な物質であるカルモジュリンキナーゼⅡ（CaMKⅡ）を抑制すると報告されている［7］。臨床現場では冠攣縮性狭心症患者にβ遮断薬の単独投与は禁忌であるが、カルベジロールの冠攣縮に対する効果は全く検討されていない。本研究では冠攣縮におけるカルシウム感受性亢進の関与を明らかにし、さらにカルベジロールの冠攣縮に及ぼす影響について検討した。

方　法

1. *AKAP-KO* マウスにおける冠攣縮の誘発

AKAP-KO マウスに経静脈的にエルゴノビン（30 mg/kg）を投与し、体表面心電図による心電図変化（心拍数や ST-T 変化、房室ブロック）により冠攣縮誘発の有無を検討した。

2. 細胞内カルシウム濃度ならびに CaMKⅡ発現の検討

野生型マウスと *AKAP-KO* マウスの大動脈を速やかに摘出し、Explant 法により血管平滑筋細胞を培養した。アセチルコリン刺激による細胞内カルシウム濃度上昇を Fura-2 により測定した。さらにカルシウム感受性関連物質である CaMKⅡの遺伝子発現ならびに蛋白発現を Real-time RT-PCR 法ならびに Western blot 法にて検討した。

3. *AKAP-KO*マウスにおける冠攣縮に及ぼすカルベジロールの影響

*AKAP-KO*マウスを用いて、経静脈的エルゴノビン（30 mg/kg）投与により誘発された冠攣縮が、カルベジロール（19 mg/kg/日、ミニポンプ Alzet model 2002、DURECT により 14 日間投与）により抑制されるかどうかを、三種混合麻酔薬（塩酸メデトミジン＋ミダゾラム＋酒石酸ブトルファノール）による麻酔下で、体表面心電図による心電図変化により検討した。さらに CaMKⅡ抑制作用を有さない他のβ遮断薬（プロプラノロール 10 mg/kg/日、Alzet model 2002 により 14 日間投与）を用いて同様の実験を行い、β遮断薬による冠攣縮抑制がカルベジロール特有の効果である可能性を検討した。

4. *AKAP5*遺伝子変異の検討

冠攣縮性狭心症患者より得られたゲノム DNA を使用し、*AKAP5*（マウスの AKAP79/150 に相当）の遺伝子変異を検討した。*AKAP5*遺伝子は 1,282 塩基のエクソン 1 個からなり、3 個の primer set にて *AKAP*遺伝子エクソンの全領域を検討可能である。直接 DNA シーケンス法にて、冠攣縮性狭心症患者群ならびにコントロール群で遺伝子変異の有無を比較検討した。変異が存在した場合には、アミノ酸置換を伴う遺伝子変異（non-synonymus substitution）かどうかを検討した。

結　果

1. *AKAP-KO*マウスにおける冠攣縮の誘発

*AKAP-KO*マウスにエルゴノビンを投与したところ、体表面心電図にて ST 上昇が観察された（5 匹中 4 匹で ST 上昇あり）（図 1）。一方、野生型マウス（n＝5）では全てのマウスにおいて ST 上昇は観察されなかった（$p<0.05$ カイ 2 乗検定）。

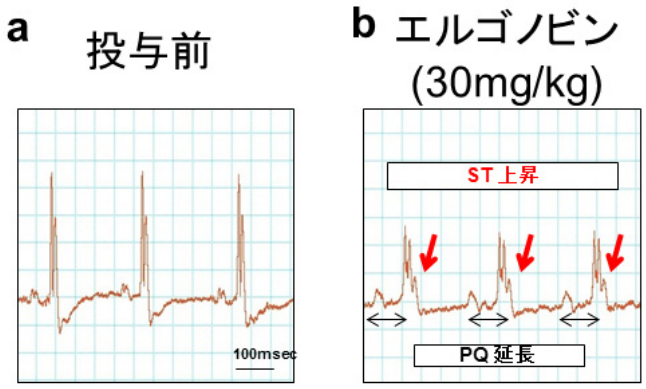


図 1. *AKAP-KO*マウスにおけるエルゴノビン投与による ST 上昇

a)　エルゴノビン投与前

b)　エルゴノビン投与後の ST 上昇（赤）と PQ 延長（黒）

2. 細胞内カルシウム濃度ならびに CaMKⅡ発現の検討

AKAP-KO マウス由来の血管平滑筋細胞では、アセチルコリン刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇は、野生型マウス由来の血管平滑筋細胞と同等であった（*AKAP-KO*110±14 nM vs 野生型 111±19 nM、n＝5、p＝ns）。*AKAP-KO* マウスの血管平滑筋細胞における CaMKⅡの遺伝子ならびに蛋白発現は、野生型マウスと比較していずれも有意に増加していた（図 2）。

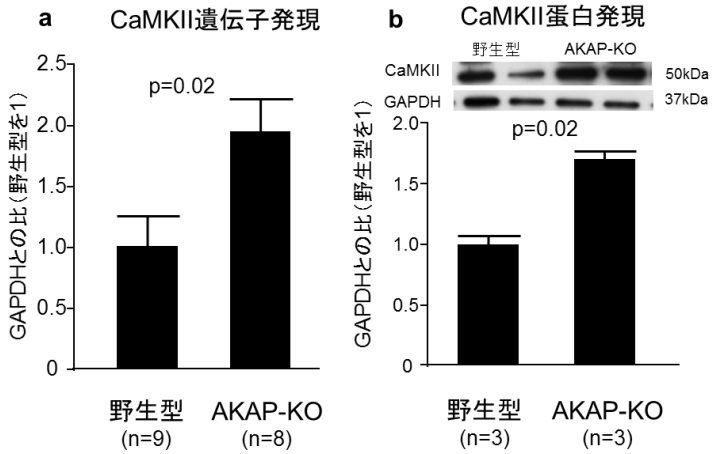


図 2. *AKAP-KO* マウス由来の血管平滑筋細胞における CaMKⅡ発現

a) *CaMKII* 遺伝子発現

b) CaMKⅡ蛋白発現

2 群間の比較は、unpaired Student's t test で行った。

3. *AKAP-KO* マウスにおける冠攣縮に及ぼすカルベジロールの影響

カルベジロールを *AKAP-KO* マウスに投与し冠攣縮を誘発したところ、6 匹中 3 匹で ST 上昇が抑制された。一方、β遮断薬であるプロプラノロールを AKAP-KO マウス（n＝5）に投与しても、全てのマウスにおいて ST 上昇が抑制されなかった（$p < 0.05$ カイ 2 乗検定）。

4. *AKAP5* 遺伝子変異の検討

冠攣縮性狭心症患者 62 名ならびにコントロール群 64 名より得られたゲノム DNA を使用し、*AKAP5* の遺伝子変異を検討した。冠攣縮性狭心症患者 7 名ならびにコントロール群 5 名に 203 番目のアミノ酸置換を伴うヘテロ遺伝子変異（イソロイシン→スレオニン）を認めた（図 3）。さらにコントロール群 1 名では、同部位のホモ遺伝子変異を認めた（2 群間にはカイ二乗検定による有意差なし）。さらに、遺伝子変異を伴う冠攣縮性狭心症患者では 71%（7 名中 5 名）に多枝冠攣縮を認めたが、遺伝子変異を伴なわない冠攣縮性狭心症患者では 51%（55 名中 28 名）に認めるのみであった。

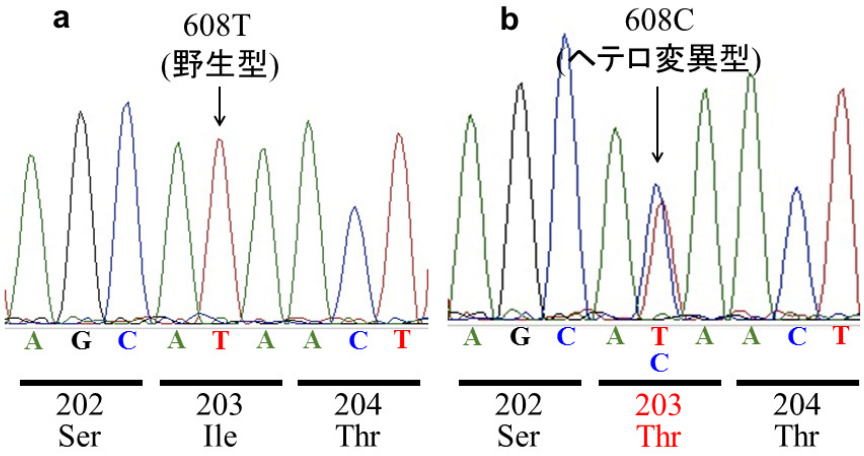


図 3. *AKAP5* 遺伝子解析

a) 野生型では 608 番目の塩基は T である。203 番目のアミノ酸はイソロイシンである。

b) 608 番目の塩基が T→C に変異している。203 番目のアミノ酸置換を伴うヘテロ遺伝子変異（イソロイシン→スレオニン）を認めた。

考　察

AKAP 蛋白は細胞内カルシウム動態ならびに血管トーヌスに関与している。*AKAP-KO* マウスの血管平滑筋細胞では、アセチルコリン刺激による過剰な細胞内カルシウム濃度の上昇は観察されなかった。一方、カルシウム感受性関連物質である CaMKⅡは過剰に発現していた。すなわち、*AKAP-KO* マウスでは過剰な CaMKⅡの発現によってカルシウム感受性が亢進し、結果として冠攣縮が引き起こされるという新たな機序が示唆された。

カルベジロールは CaMKⅡ活性を抑制することが報告されている［7］。*AKAP-KO* マウスで誘発された冠攣縮が、細胞外からのカルシウム流入増加を伴わずに CaMKⅡ活性亢進に依存するとすれば、理論上カルベジロールは有効である。本研究では、カルベジロール投与により冠攣縮誘発が抑制され、一方、カルシウム感受性抑制作用を有さないβ遮断薬であるプロプラノロール投与では、冠攣縮は抑制されなかった。これまでカルベジロールの冠攣縮に対する効果は全く検討されておらず、本研究の成果は新しい作用機序に基づく新たな治療法の開発に寄与する可能性がある。臨床的にもカルシウム拮抗薬抵抗性の難治性冠攣縮性狭心症患者は少なくなく、その機序解明ならびに治療法の開発への応用が今後期待される。

AKAP5 の遺伝子解析では、203 番目のアミノ酸置換を伴う変異が同定された。しかし、冠攣縮性狭心症群とコントロール群において、同遺伝子変異の頻度に有意差を認めず、*AKAP5* 遺伝子変異の冠攣縮への直接的な関与の可能性は低いのかもしれない。しかしこの遺伝子変異は、突然死のリスク因子である多枝攣縮に関与している可能性が考えられた。冠攣縮による突然死予防は、臨床的にも極めて重要であり、さらなる解析を進めている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、弘前大学大学院医学研究科循環器腎臓内科学講座の花田賢二助教、西崎公貴、成田憲紀である。

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 Nov 15;36(6):1847-52. PMID: 11092655 DOI: 10.1016/S0735-1097(00)00966-9

2） Nakano T, Osanai T, Tomita H, Sekimata M, Homma Y, Okumura K. Enhanced activity of variant phospholipase C-delta1 protein (R257H) detected in patients with coronary artery spasm. Circulation. 2002 Apr 30;105(17):2024-9. PMID: 11980680 DOI: 10.1161/01.CIR.0000014613.36469.3F

3） Tomita H, Sasaki S, Osanai T, Nakano T, Higuma T, Yokoyama J, Hanada H, Yasujima M, Okumura K. Mutational analysis of Kir6.1 in Japanese patients with coronary spastic angina. Int J Mol Med. 2006 Oct;18(4):589-91. PMID: 16964409 DOI: 10.3892/ijmm.18.4.589

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 Oct;30(10):1968-75. PMID: 20634475 DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.203083

5） 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 increased phospholipase C-δ1 activity. Circulation. 2012 Feb 28;125(8):1027-36. PMID: 22265909 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.064303

6) Scott JD, Santana LF. A-Kinase Anchoring Proteins: Getting to the heart of the matter. Circulation. 2010 Mar 16;121(10):1264–1271. PMID: 20231544 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.896357
7) Li X, Matta SM, Sullivan RD, Bahouth SW. Carvedilol reverses cardiac insufficiency in AKAP5 knockout mice by normalizing the activities of calcineurin and CaMKII. Cardiovasc Res. 2014 Nov 1;104(2):270-9. doi: 10.1093/cvr/cvu209