




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ① 課 論	第 号	氏 名	Farzana Marni
審査委員会委員	主査氏名	仁木 一郎 	
	副査氏名	平川 隆典 	
	副査氏名	原 政英 	
<p>論文題目 17β-estradiol modulates expression of low-voltage-activated Cav3.2 T-type calcium channel via ERKs pathway in cardiomyocytes (17β-エストラジオールはERK経路を介して心筋細胞の低電位活性化型Cav3.2T型Ca²⁺チャネルの発現を制御する)</p> <p>論文掲載誌名：Endocrinology, 2009, in print</p> <p>論文要旨 申請者はエストロゲンの心筋に対する作用を <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> で検討した。 <i>In vivo</i> では成ラットの卵巣を切除し、エストロゲン (17β-estradiol) を与え、無麻酔無拘束下の心電図を、テレメトリー送信機を用いて記録した。その結果、卵巣切除によって増加した心拍数はエストロゲンの投与によって減少した。<i>In vitro</i> の検討には新生仔ラットの心筋を分散させた初代培養系を用いた。培養液にエストロゲンを加えると、4時間後には心筋の拍動数が減少し、さらに長時間 (24時間) の培養により活動電位自動能は抑制された。電気生理学的手法を用いた解析では、エストロゲンはT型Ca²⁺チャネル電流を減少させた。この作用の出現には24~28時間を要した。エストロゲンの作用は、不活性化型である17β-estradiolでは再現されなかった。エストロゲンは、T型Ca²⁺チャネルを構成するサブユニットであるCav3.2およびその発現に関与する転写因子Csx/Nkx2.5のmRNAレベルを減少させた。エストロゲンのT型Ca²⁺チャネル電流減少作用およびCav3.2とCsx/Nkx2.5の発現抑制作用は、核内受容体型のエストロゲンレセプターアンタゴニストであるICI182780では影響されなかった。 MAPキナーゼの阻害薬を用いた検討では、ERK1/2.5阻害薬 (PD98059) によってエストロゲンの発現抑制作用が脱抑制された。これらの結果から、申請者はエストロゲンによる心筋に対する慢性作用は、T型Ca²⁺チャネルのサブユニットであるCav3.2の転写の抑制を介していると結論している。さらに、薬理学検討から、この作用が核内型エストロゲン受容体を介さないこと、MAPキナーゼであるERK1/2.5の活性化を伴うことを証明した。 本研究は心疾患の性差および閉経女性における心疾患増加の原因を分子的に説明しうるものであり、その価値を考慮し、審査委員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 ファルザナ・マルニ

論 文 題 目

17 β -estradiol modulates expression of low-voltage-activated Cav3.2 T-type calcium channel via ERKs pathway in cardiomyocytes (17 β -エストラジオールは ERK 経路を介して心筋細胞の低電位活性型 Cav3.2 T型 Ca²⁺チャネルの発現を制御する)

要 旨

【緒言】

低電位活性型 Cav3.2 T型 Ca²⁺チャネルは特殊心筋細胞における自動能形成に関わるだけでなく、不全心や梗塞後心で病態生理学的機能に参与することが知られている。一方、女性ホルモン エストロゲンは心血管系を含む様々な標的臓器において多様な生理作用を発揮する。女性ホルモンは心筋保護的作用を有するが、一方で成熟期女性の心拍数は男性より優位に多く、閉経後の補充療法ではエストロゲンに依存する心拍数の増加が認められる。このようにエストロゲンの心拍数の規定に関わる作用は明らかではなく、心臓の電気生理学的な長期作用も明らかではない。本研究ではエストロゲンの心拍数制御に関わる作用を解明する目的でラット心筋細胞におけるペースメーカー・イオンチャネルの1つである低電位活性型 T型 Ca²⁺チャネルの発現に対して 17 β -estradiol がいかなる作用を発揮するかを検討した。

【方法】

成獣雌ラット (200-300g) に心電図(ECG)テレメトリー送信機を装着して卵巣摘出前後、及びエストロゲン (17 β -estradiol) 投与前後の ECG を無麻酔無拘束状態で長期間記録した。新生ラット心筋細胞を酵素法を用いて単離し、エストロゲン加培養液を用いて~24 時間培養し、その後パッチクランプ法 (Voltage-clamp 法、Current-clamp 法) を用いて T型 Ca²⁺チャネル電流、及び活動電位を記録した。更に、real time RT-PCR 法を用いて T型 Ca²⁺チャネル isoform (Cav3.1, Cav3.2)、及び転写因子 Csx/Nkx2.5 の発現を定量し、エストロゲン作用に対する MAPキナーゼ (ERK-1/2,5, p38-MAPK、JNK) 阻害剤やエストロゲン受容体拮抗薬の作用を明らかにした。また、ヒト Cav3.1、及び Cav3.2 を発現させた HEK293 細胞の T型 Ca²⁺チャネル電流密度に対するエストロゲンの長期作用 (24 時間) をパッチクランプ法で評価した。エストロゲンの作用はホルモン活性を持たない 17 α -estradiol を対照の一部として比較した。

【結果】

- 1) 卵巣摘出術によって雌ラット心拍数は有意に増加したが、エストロゲン (17 β -estradiol) の補充は投与後 4 時間後からこれを有意に減少させた。
- 2) エストロゲン加培養液で培養した新生ラット心筋細胞の拍動数はエストロゲン投与後 4 時間より有意に減少した。一方、その活動電位自動能はエストロゲンの長期作用(24 時間)によって有意に抑制され、-50 mV における緩徐脱分極速度は減少したが、最大立ち上がり速度と最大拡張期電位は変化しなかった。
- 3) エストロゲンの短期作用は心筋細胞の T 型 Ca²⁺チャンネル電流には作用を示さなかったが、24-28 時間の長期作用によって T 型 Ca²⁺チャンネル電流は 63 \pm 5% (n=12) 抑制された。一方、生理活性を有さない 17 α -estradiol の添加は T 型 Ca²⁺チャンネル電流密度に影響を与えなかった。
- 4) エストロゲンの T 型 Ca²⁺チャンネル電流に対する抑制作用はエストロゲン受容体拮抗薬 (ICI 182 780, 1 μ M) の影響を受けなかった。
- 5) エストロゲンは濃度依存的に T 型 Ca²⁺チャンネル isoform Cav3.2 mRNA、及び転写因子 Csx/Nkx2.5 mRNA の発現を抑制したが、isoform Cav3.1mRNA の発現はエストロゲンの添加によって影響を受けなかった。
- 6) T 型 Ca²⁺チャンネル isoform Cav3.2 mRNA、及び転写因子 Csx/Nkx2.5 mRNA のエストロゲンによる抑制はエストロゲン受容体拮抗薬 (ICI 182 780, 1 μ M) の影響を受けなかった。
- 7) MAP キナーゼのサブタイプである ERK-1/2,5 阻害剤 (PD98059, 1 μ M) は、T 型 Ca²⁺チャンネル isoform Cav3.2 mRNA、及び転写因子 Csx/Nkx2.5 mRNA のエストロゲンによる抑制を遮断した。
- 8) エストロゲン受容体を持たない HEK293 細胞に発現させたヒト Cav3.1、及び Cav3.2-T 型 Ca²⁺チャンネル電流密度に対してエストロゲンの長期作用 (24 時間) は Cav3.2-T 型 Ca²⁺チャンネル電流のみを濃度依存的に抑制した。

【考察、結語】

エストロゲン (17 β -estradiol) は心筋細胞の 2 種の T 型 Ca²⁺チャンネル isoform の内、Cav3.2-T 型 Ca²⁺チャンネルを受容体非依存的に genomic 作用で抑制し、その作用は ERK-1/2,5 MAP キナーゼの作用を介するという新知見を本研究は初めて明らかにした。

T 型 Ca²⁺チャンネルは刺激伝導系細胞の発現し、その slow conduction の一部を担う他に歩調取り細胞ではペースメーカー・イオンチャンネルとして機能することが知られている。一方、作業心筋細胞では T 型 Ca²⁺チャンネルの発現は少なく生理的機能は明らかではない。しかし、心不全や心筋梗塞後では T 型 Ca²⁺チャンネルは発現が増加するため病的イオンチャンネルであるとみなされている。このような心筋イオンチャンネルリモデリングは不整脈の基質となることが知られている。女性ホルモンであるエストロゲンは急性作用によってイオンチャンネルに直接、あるいは NO や cGMP 等の細胞内シグナルを介して心筋の急速活性型遅延整流 K⁺チャンネル電流 (I_{Kr}) と緩徐活性型遅延整流 K⁺チャンネル電流 (I_{Ks})、さらには電位依存性 L 型 Ca²⁺チャンネルを抑制することが報告されているが、本研究によって示されたように、エストロゲンは転写因子 Csx/Nkx2.5 の作用を介した genomic 作用によって心筋のイオンチャンネルの発現を調節する作用を有することが明らかにされた。このような性ホルモンのチャンネル発現制御作用は、心拍数や心電図の QT 時間等の性差を規定する機序の成因であると共に心血管系疾患の性差に起因する病態の分子機序を理解する上で有益な情報となりうると思われる。