




## 学位論文審査の結果の要旨

| 審査区分<br>① 課・論                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 第 号  | 氏 名     | 康 林                                                                                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 審 査 委 員 会 委 員                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 主査氏名 | 仁 木 一 守 |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 副査氏名 | 佐 野 孝 之 |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 副査氏名 | 高 橋 尚 彦 |  |
| <p>論文題目 Bepridil upregulates cardiac Na<sup>+</sup> channel as a long-term effect by blunting proteasome signals through inhibition of calmodulin activity. (Bepridil は長期作用によってカルモジュリン経路を介して心筋プロテアソーム活性を抑制し Na<sup>+</sup>電流を増大させる)</p> <p>論文掲載誌名 : British Journal of Pharmacology, in print</p> <p>論文要旨</p> <p>申請者たちは、狭心症の治療に用いられる抗不整脈ベプリディルが、心筋細胞の Na<sup>+</sup>チャンネルに及ぼす長期的な影響と、その分子機序を検討した。ベプリディルは開発当初は Ca<sup>2+</sup>チャンネルのブロッカーとして知られていたが、今では Ca<sup>2+</sup>チャンネルのみならず数種類の K<sup>+</sup>チャンネルおよび Na<sup>+</sup>チャンネルにも作用を及ぼすことがわかっている。</p> <p>短期的な実験ではベプリディルは Na<sup>+</sup>チャンネルの抑制を起こすが、心筋細胞をベプリディルで 24-28 時間処理すると逆に Na<sup>+</sup>電流の増強が起こる。同様の現象はカルモジュリンアンタゴニストである W-7 による処理でも見られたが、W-7 とベプリディルを共存させてもベプリディルの追加作用は見られなかった。カルモジュリンキナーゼの阻害薬である KN-93 は、Na<sup>+</sup>チャンネル活性にもベプリディルの作用にも影響しなかった。ベプリディルの長期作用による Na<sup>+</sup>電流の増加は Nav<sub>1.5</sub> チャンネルを HEK293 細胞に発現させた系でも見られた。ベプリディルによる長時間処置は、Na<sup>+</sup>チャンネルの Nav<sub>1.5</sub>, Naβ<sub>1</sub>, Naβ<sub>2</sub> の各サブユニットのトランスクリプトレベルには影響しなかったが、Nav<sub>1.5</sub> 蛋白質の発現を増加させた。シクロヘキシミドで蛋白質合成を抑制した条件下では、ベプリディルの Nav<sub>1.5</sub> 蛋白質発現レベルに対する増加作用は小さくなった。プロテアソーム活性化剤である SDS は Nav<sub>1.5</sub> 蛋白質発現を減少し、Na 電流を小さくした。プロテアソームの阻害薬である MG132 による処置は、逆に Nav<sub>1.5</sub> 蛋白質の発現を増加し、Na<sup>+</sup>電流を大きくした。SDS、あるいは MG132 の存在下では、ベプリディルの長期作用は見られなくなった。これらの結果から申請者は、ベプリディルがカルモジュリン依存性にプロテアソーム活性を抑制して Na<sup>+</sup>電流を増す、と結論した。申請者らは 20S プロテアソームの β サブユニットにカルモジュリンのターゲット配列がふくまれていることを文献的に調べ、今回の結果を支持する、と考察している。</p> <p>本研究はベプリディルの薬理作用およびイオンチャンネルにおけるタンパク質量の制御機構に新たな理解を与えるものである。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 康 林

## 論 文 題 目

Bepidil upregulates cardiac  $\text{Na}^+$  channel as a long-term effect by blunting proteasome signals through inhibition of calmodulin activity (Bepidil は長期作用によってカルモジュリン経路を介して心筋プロテアソーム活性を抑制し  $\text{Na}^+$ 電流を増大させる)

## 要 旨

【緒言】 Multi-channel blocker である bepidil は、心房細動や心房粗動の停止、及び再発予防薬として使用されている。Bepidil は長期使用において電氣的逆リモデリング作用を有することが報告されているが、 $\text{Na}^+$ チャネルに対する長期作用は不明である。そこで本研究では  $\text{Na}^+$ チャネルに対する bepidil の長期作用を検討した。

【方法】 新生ラット単離心筋細胞、及び  $\text{Na}^+$ チャネルを発現させた培養細胞に bepidil、あるいはカルモジュリン (CaM) 阻害剤 W-7 を投与して24時間以上培養し、パッチクランプ法にて  $\text{Na}^+$ 電流を測定した。また、Real-time PCR 法と Western blot 法で  $\text{Na}^+$ チャネル mRNA と蛋白の発現を定量した。更に、蛋白合成阻害剤 cycloheximide、プロテアソーム (proteasome) 阻害剤 MG132、あるいは proteasome 活性化剤 SDS を用いて  $\text{Na}^+$ チャネルの分解過程に対する bepidil の作用を特定した。

【結果】 1) Bepidil の急性作用は  $\text{Na}^+$ 電流を抑制し ( $\text{IC}_{50}$  96.3  $\mu\text{M}$ )、24時間投与は急性作用とは逆に

Na<sup>+</sup>電流を増大させた (EC<sub>50</sub> 9.5 μM)。2) CaM の特異的な阻害剤 W-7 は bepridil の作用と同様に Na<sup>+</sup>電流を増加させた。W-7 存在下では bepridil による Na<sup>+</sup>電流の更なる増大は得られなかった。3) CaM キナーゼの特異的な阻害剤 KN93 は Na<sup>+</sup>電流に影響を及ぼさなかった。4) Bepridil の長期作用は HEK293 細胞を用いた発現系 Na<sup>+</sup>チャネル電流を濃度、及び時間依存的に増加させた。5) Bepridil 投与前後で Na<sup>+</sup>チャネルαサブユニット及びβサブユニットの mRNA の発現に差はなかった。6) Bepridil と CaM 阻害剤 W-7 の長期作用により Na<sub>v</sub>1.5 チャネル蛋白は有意に増加した。7) 蛋白合成阻害剤 cycloheximide 存在下で bepridil は Na<sup>+</sup>電流と Na<sub>v</sub>1.5 チャネル蛋白の減少を部分的に抑制した。8) Proteasome 活性化剤 SDS は Na<sup>+</sup>電流と Na<sub>v</sub>1.5 チャネル蛋白を有意に減らし、proteasome 阻害剤 MG132 は Na<sup>+</sup>電流と Na<sub>v</sub>1.5 チャネル蛋白を有意に増加させたが、bepridil と W-7 は MG132 存在下で Na<sup>+</sup>電流と Na<sub>v</sub>1.5 チャネル蛋白の更なる増大作用を示さなかった。9) Bepridil と W-7、及び MG132 はほぼ同等に 20S proteasome 活性を抑制した。

【考察】 Bepridil は CaM 経路を介して心筋細胞 20S proteasome 活性を抑制し、Na<sup>+</sup>チャネル蛋白の分解を抑制して Na<sup>+</sup>電流を増大させるという新知見が本研究によって得られた。Na<sup>+</sup>チャネルはユビキチン-プロテアソーム系 (ubiquitin-proteasome) を介して分解されることが報告されている。Proteasome 阻害剤は、Na<sub>v</sub>1.5 の分解を抑制して Na<sup>+</sup>電流を増加させるが、bepridil はこの ubiquitin-proteasome 系を抑制して Na<sup>+</sup>チャネルを up-regulate することを示した。Na<sup>+</sup>チャネルは心房細動の慢性化に伴って減少することが報告されている。一方、bepridil は様々なイオンチャネルを遮断するだけでなく、CaM も抑制することが知られている。よって bepridil は CaM 経路の抑制を介して Na<sup>+</sup>チャネル蛋白質の発現を増加させ、心房細動等の頻脈性不整脈における Na<sup>+</sup>チャネルのリモデリングを抑制し長期的に抗不整脈作用を発揮していることが示唆される。

【結語】 Bepridil の長期作用は、心筋細胞において CaM 経路の抑制を介して Na<sup>+</sup>チャネル蛋白 (Na<sub>v</sub>1.5) の proteasome における分解を抑制することで Na<sup>+</sup>電流を維持・増大させることが示唆される。