

原 著

心筋細胞興奮収縮連関におよぼす第3のキナーゼ系 Rhoキナーゼの役割について

茆原 るり

The Role of Rho Kinase : Third Kinase System in the Regulation of Excitation-Contraction Coupling of Cardiac Muscle

Ruri Chihara (Second Department of Internal Medicine, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

It has been known that various neurohumoral factors play important roles in the regulation of contraction and relaxation in cardiac muscle. Earlier reports suggested that angiotensin II play important roles in the pathogenesis of chronic heart failure. However, the roles of endothelin 1 have not been fully clarified. Thus, we investigated the roles of endothelin in excitation-contraction coupling and relaxation in isolated single ventricular myocytes. We focused on the third kinase system: Rho dependent protein kinase (ROCK) in addition to the protein kinase A and C. We isolated single ventricular myocytes from Wister rats and measured intracellular calcium transients and cell contraction simultaneously. When we pretreated cells with PKC inhibitor, exposure to endothelin-1 still produced positive inotropic and lusitropic effects. These effects were not observed when cells were pretreated with PKC inhibitor and ROCK inhibitor or myosin light chain kinase inhibitor. Effects of myosin light chain phosphatase inhibitor simulated those of endothelin-1. Inhibition of myosin light chain phosphatase accelerated the phosphorylation status of cardiac myosin light chain resulting in positive inotropic action similar to endothelin-1. Our results suggested that endothelin might activate myosin light chain not only via PKC but also via ROCK pathway.

Our working hypothesis is that endothelin 1 may produce positive inotropic effects via ROCK pathway. Thus we try to reveal the role of ROCK pathway in the regulation of contraction and relaxation in cardiac muscle.

Keywords: Endothelin, Cardiac muscle, Myosin light chain, Rho kinase, Protein kinase C, Excitation-contraction coupling

J Saitama Med School 2004;31:103-113

(Received January 13, 2004)

緒 言

心臓は一日に約10万回の収縮・弛緩を繰り返し全身へ血液を送り出している。この繰り返し収縮は心筋の自動性によって主として制御されているが、その収縮性そして最近注目されている弛緩機能や拡張期においても交感神経系、レニン-アンギオテンシン系、アルギニン、バソプレッシン、エンドセリンなどの神経体液因子による制御が深く関与していることがわかってきた。短期的な作用は膜受容体とそれに連なるG蛋白を介しての作用が主であり、古典的には β 受容体が刺激されGs蛋白を介してアデニルシクラーゼを活性化、さらにAキナーゼ系の活性化を介する作用

経路がよく知られていた。カテコラミンの静脈内投与は効率的に細胞内cAMP濃度を上昇させ、そして劇的に心筋と心室の収縮力を増大させFrank-Starlingメカニズムに依存せずまた肺うっ血を生じることなく十分な心拍出量を確保することができる。1980年代に基礎研究材料として心不全患者の心筋が得られ、その β 受容体が著明に減少していることが示された。これがいわゆる β 受容体のdown regulationである。レセプター薬理学の方法でも直接証明され、カテコラミンに対する反応性の点でも、摘出心筋標本やあるいは臨床データからも、 β 刺激が慢性心不全では正常心筋にくらべて有効ではないことが明らかとなった。また1996年Packerらにより発表されたU.S.Carvedilol Heart Failure Study¹⁾により1970年代に導入された β 遮断薬による慢性心不全の治療は生命予後改善効果があるこ

とがはっきりとし、1990年代に急速に普及することになった。この治療を行っている慢性心不全患者が急性増悪したときには、大量カテコラミン使用により強心効果が得られるとしてもその効果は不確実であり、また理論的にも矛盾のある治療となってしまう。この経緯から、心不全の治療において β 受容体を介する機序以外の経路の解明とその経路を用いた治療法の確立に注目がされた。

心筋に特異的に存在するphosphodiesterase IIIの阻害薬でcAMPの分解を抑制することで心筋の収縮力を増すことが試みられた。しかし短期的にはcAMPを上昇させるAキナーゼ系薬剤が心不全を改善するが、その後に生ずる心筋細胞の荒廃つまり病的肥大とリモデリングが長期予後を悪化させてしまう結果となった(アムリノン、ミルリノンなど)。この他にもVIP (vasoactive intestinal peptide) などの心筋細胞に存在するGs蛋白にカップルしcAMPを増加させるリガンドとその膜受容体の研究が盛んにおこなわれた。しかしこれらが実用化されることなく現在に至っている。

そしてカテコラミンのもう一方の受容体である α 受容体についての研究もおこなわれた。 α 刺激は血管収縮を生じ心筋に対する効果はあまり注目されていなかったがSimpsonら²⁾は α 刺激が心筋細胞の肥大に極めて重要な役割を演じているのに対して β 刺激の役割は小さいと提唱し、 α 受容体への注目が集まった。 α 受容体が刺激されるとGq蛋白を介してホスホリパーゼCを活性化しイノシトール三リン酸回路を活性化する。これにより細胞内 Ca^{2+} の上昇ならびにプロテインキナーゼC (PKC) の活性化をきたし、 Ca^{2+} による活性化の感度を著明に増強、心筋細胞の肥大・細胞外マトリックスの増生を生ずることが一連の研究で示された。PKCの活性化による細胞内アルカリ化が心筋の収縮力を増すこと、一定の条件下においてはイノシトール3リン酸が筋小胞体からの Ca^{2+} を放出し収縮に影響することも判明した。これまで強心作用の機序はcAMPによる制御だけが注目されてきたがそれ以外にもさまざまな経路があることが示唆されるようになった。また、この結果血管作動物質でGqにカップルした受容体を介するものは心筋に対して何らかの効果を持つことが想定された。Suematsuらの研究によると、不全心では $\text{G}\alpha_q$ とRhoAの蛋白発現やミオシン軽鎖(MLC)調節のリン酸化は明らかに増加し、この結果 α_1 receptor-GqシグナルがPKCの経路ではなく主にRhoA-Rho kinaseの経路を通して心筋線維の Ca^{2+} 感受性を増加させ、心不全の進行に関与すると推定される³⁾。

強力な血管収縮物質であるアンジオテンシンII(AT II)もまた心筋に対する強力な作用があることがわかった。1987年発表されたCooperative North

Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS)⁴⁾などによりアンジオテンシン変換酵素阻害薬が心不全の長期予後を改善し、その作用機序が血管拡張作用や腎臓への作用以外に直接の心筋への効果であることがわかってくると、心筋でのlocal renin angiotensin systemへの注目度は高くなった。AT IIは AT_1 受容体を刺激しGq蛋白を介してPKCを活性化しMitogen-activated protein kinaseなどを活性化する。これにより心筋肥大や繊維芽細胞の増殖・コラーゲンの合成が促進される。またAT IIとエンドセリン1(ET-1)が Na^+ - H^+ 交換体を活性化し細胞内をアルカリ化、その結果 Ca^{2+} の感受性が上昇するとの報告もある⁵⁾。心肥大初期や急性心不全の時期には伸展負荷によりAT IIの局所濃度が上昇するとともに AT_1 ・ AT_2 受容体の発現が急速に増加しAT IIの作用が増強するが、不全心では AT_1 ・ AT_2 受容体は共に発現が低下し、心臓線維芽細胞において AT_1 ・ AT_2 受容体の発現は亢進する。

一方でわれわれのグループはET-1が正常の哺乳類の心筋細胞にどのような影響を与えるかを検討した(Kohmoto et al,⁶⁾)。成ラビットの心筋細胞では細胞内アルカローシス化により収縮力を増強する。それに対して不全心筋と類似性があるとされる新生ラットの培養心筋細胞においては逆に細胞内アシドーシスを生じて収縮力を減弱させることを示した。このことから心筋細胞へのGq蛋白系の情報伝達の場合によって陽性変力作用も陰性変力作用も生じることがわかった。Gqを介する血管作動物質あるいはサイトカイン受容体の遮断が心不全の生命予後を改善するのではないかと推測からエンドセリンあるいはバソプレシンの経口投与可能な受容体拮抗薬が開発され臨床研究がなされた。しかし V_1 受容体拮抗薬は開発されたものの臨床的有用性が小規模研究で明らかにできなかったこともあり実用化されていない。

それに対してエンドセリンは大規模研究では明確な効果が証明されていないが可能性を残しており、あらたなET受容体拮抗薬が開発され大規模研究が行われている。心筋細胞には主にET-1が作用する。ET-1は細胞内kinase pathwayを介して様々な生物学的効果を持っているが、心筋細胞ではET-1はPKCを介して陽性変力作用を持っていることが知られている。PKCは Na^+ - H^+ 交換体をリン酸化し、細胞内のアルカローシス化をする。 Na^+ - H^+ 交換体を加速することによって Na^+ イオンは細胞質内で蓄積され、一過性に Na^+ - Ca^{2+} 交換体の活性化を引き起こす。その結果心筋線維の Ca^{2+} 感受性を増加させ陽性変力作用をおこす。このようにPKCはET-1による心筋細胞の収縮において鍵となる酵素とされている。PKCはまたMLC2のリン酸化や、トロポニンI、トロポニンC、C蛋白を保持するために重要な酵素であると報告されている^{7,8)}。これらの収縮蛋白はアクチン・ミオシンの相互作用を直

接調節すると考えられている。一方ET-1の収縮効果は平滑筋細胞においてRho-dependent protein kinase (ROCK) を活性化し、MLCのリン酸化を惹き起こし細胞内 Ca^{2+} の増加による血管収縮を起こす。他の血管作動物質と異なりPKCを介するのみならずRho kinaseというまったく別のリン酸化過程を介して心筋の興奮収縮連関に作用する可能性が示唆されている。Rhoは低分子量G蛋白であり増殖・成長のシグナルを仲介する分子である。Rho kinaseはRhoの標的蛋白であり、Rhoと結合することで活性化される蛋白質リン酸化酵素である。これはMLC2のリン酸化を促進しMLC脱リン酸化酵素を阻害することでミオシンとアクチンの親和性を増加させることが知られている。以上よりET-1の作用機序として①PKCを介して Na^+ - H^+ 交換体に作用し細胞内をアルカローシスにし Ca^{2+} 感受性を上昇させる②PKCを介してMLCに作用しMLCのリン酸化をさせる以外に、Rho-ROCKを介してMLCをリン酸化することが知られている⁹⁾。ET-1-ROCK-MLCリン酸化の経路は主に平滑筋細胞において報告されているが¹⁰⁾、培養された新生のラットの心室筋細胞においても見られることが示されている¹¹⁻¹⁴⁾。

不全心ではMLC2の脱リン酸化による収縮の反応は、ベースのMLC2の脱リン酸化レベルが減少しているにもかかわらず増強されることが報告されている¹⁵⁾。このことから心不全心筋細胞の収縮におけるMLCリン酸化の役割は正常時と比較して大きくなることが推測され、心筋細胞におけるET-1の作用経路の解明、ET-1-ROCK-MLCリン酸化の経路の解明は心不全の治療において有用であると考えた。Rho/ROCK経路の解明のために、今回成ラットの心室筋細胞を用いて心筋細胞の興奮収縮連関におけるRhoキナーゼ系が演ずる役割について検討することにした。前述したようにET-1がMLCのリン酸化を惹き起こす経路としてPKCを介する経路とRho/ROCKを介する経路の二種類がある。このことからRho/ROCKの経路を見出すためにはPKCの経路を阻害する必要がある、PKC阻害剤を用いてその経路の存在を解明した。

方 法

心室筋細胞単離

我々はUS National Institutes of Healthにより認証されたGuide for the Care and Use of Laboratory Animalsに従ってWistar ratを飼育し実験使用した。(NIH Publication No.85-23, revised 1996) Wistar rat (200~250 g) の心臓から従来のコラゲナーゼ灌流法に基づいて心筋細胞を単離した⁹⁾。麻酔したラットより心臓を摘出し、素早く大動脈部分でランゲンドルフ灌流装置に接続した。0- Ca^{2+} 溶液(組成は126 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 1.0 mM MgCl_2 , 13 mM NaOH, 24 mM HEPES, 2.5 g/L taurine, 0.65 g/L creatine

monophosphate, 0.55 g/L sodium pyruvate, 0.14 g/L NaH_2PO_4 , 2 g/L glucose) で5分間灌流した後、0.1 mM Ca^{2+} の入った酵素液(0- Ca^{2+} 溶液に0.1 mM CaCl_2 を加え、100 mg/dL type II collagenase (Worthington Biochemicals, Freehold, NJ, USA) と10 mg/dLのprotease (Sigma)を加えて作成)で8~12分灌流した。灌流液は37℃・pH 7.4で維持した。灌流圧が十分に低下したことを確認した後、酵素を含まない0.1 mM Ca^{2+} 溶液(0- Ca^{2+} 溶液に0.1 mM CaCl_2 を加えた溶液)で5分間洗い、左心室を切り出し同溶液中で左心室を鉄で細かく切り細胞浮遊液は茶漉しを用いてフィルターした。細胞懸濁液の Ca^{2+} 濃度を1.0 mMまで上昇させて室温で保存し、単離後6時間以内に使用した。

細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

単離した細胞はLaminin (Collaborative Inc, USA)でコーティングしたchamberに付着させ、30分間3~4 μM の Ca^{2+} 蛍光色素であるfluo-3AMが含まれたHEPES溶液(126 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 1.0 mM MgCl_2 , 1.08 mM CaCl_2 , 13 mM NaOH, 11 mM glucose, 24 mM HEPES, 25℃, pH 7.4)で感作処理した。その後fluo-3の含まれないnormal HEPES溶液で15分以上洗った。細胞に485 nmの励起光を照射し、530 nmの蛍光を測定した。530 nmの蛍光強度の増加は細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を意味する。測定には蛍光顕微鏡システム(DX-1000, Solamere Technology Group, Salt Lake City, UT)を使用した。灌流速度は約2.0 ml/minとし、chamber内の還流液は実験中1~1.5 mlでほぼ一定に維持した。測定は30±1℃で行った。細胞内 Ca^{2+} の指標として F/F_0 を用いた。 F_0 は細胞を0.25 Hzで電気刺激した時の拡張終期の530 nmの蛍光値を、Fは実際の測定値を示す¹⁶⁾。

細胞収縮の測定

心室筋細胞はプラチナ電極を用いて4秒毎(0.25 Hz)にパルス幅4 msec, 閾値1.5倍の電圧で収縮を誘発した。細胞の両端の長さは持続的にvideo motion detector (Crescent Electronics, Salt Lake City, UT)で記録し、細胞内 Ca^{2+} 濃度と同時測定した。

データ処理

カルシウム発光シグナルおよび細胞収縮はアナログアンプ(日本光電)により処理した後ADコンバーター(Digidata 1200)によりオンラインで時系列データ記録ソフト(Axoscope)を用いて汎用PC(コンパック社製)によりハードディスク装置に保存した。解析および図作成にはソフトウェア(Microcal Origin)を使用した。データは平均値±標準誤差で表示し比較を行った。また、細胞内 Ca^{2+} 濃度・細胞短縮(細胞径の変化)を比較する際、最大収縮までの時間の逆数(1/TP)を細胞の収縮性、50%まで弛緩する時間($T_{1/2}$)を細胞の弛緩性を示す指標として用いた。

結 果

- 1) 薬物処理をしない単離心筋細胞とエンドセリンを投与した後の細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), 細胞短縮 (FS) のピーク値に有意な変化は認めなかった (ET-1投与前細胞内 Ca^{2+} 濃度 2.448 から投与後 2.312, ET-1投与前細胞短縮 113.4 から投与後 119.3 とそれぞれ有意差はない). しかし細胞内 Ca^{2+} 濃度及び細胞短縮は, エンドセリンにより共に 1/TP は短縮, $T_{1/2}$ は有意に増加し, このことからエンドセリンが心筋細胞の収縮・弛緩速度を促進していることを示唆した (表 1). ET-1拮抗薬を投与するとこの収縮・弛緩の促進作用は消失することは以前の実験にて示されている⁹⁾.

エンドセリンの心筋細胞における興奮収縮連関におよぼす影響のうちPKCを介するメカニズムを取り除く目的で特異的なPKC阻害剤である bisindolylmaleimide (BIS, 100 nM) を十分に効果を出すために fluo-3AM で感作する際から 30 分以上加え前処理した. その濃度については文献を参考にした¹⁷⁻¹⁹⁾.

表 1. エンドセリンによる細胞内カルシウム濃度, 細胞短縮の変化

	細胞内 Ca 濃度		細胞短縮	
	ET-1 投与前	後	ET-1 投与前	後
1/TP(s ⁻¹)	6.25 ± 0.15	7.25 ± 0.267	5.05 ± 0.157	5.81 ± 0.202
$T_{1/2}$ (msec)	222.4 ± 13.7	213.6 ± 12.56	156.8 ± 9.394	99.6 ± 9.13

- 2) ついでBISに加えET-1 (250 nM)を含むHEPES溶液で還流した. 図1-Aに示すようにPKC経路が遮断された状態では細胞内 Ca^{2+} ピークや最大細胞短縮にはエンドセリンは影響を与えない. (細胞内 Ca^{2+} 濃度のピークは 2.72 ± 0.22 から 2.63 ± 0.21 , 最大細胞短縮のピークは 101.18 ± 3.18 から 102.19 ± 3.69 と有意な変化は認めなかった.) しかしそれらの波形に注目すると細胞内 Ca^{2+} 濃度, 細胞収縮ともにピークに達するまでの時間は短縮し, また弛緩過程が速くなっていることがわかる. つまりPKC以外の経路が収縮速度と弛緩速度に影響をあたえている.
- 3) 縦軸に1/TP, 横軸に $T_{1/2}$ をプロットした (図 1-B). 上段は細胞内 Ca^{2+} 濃度, 下段は細胞短縮についての解析を示す. PKC経路遮断の条件で有意に細胞収縮の大きさは変化しなかったが, 1/TPの有意な増加 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ の1/TPは 6.10 ± 0.32 から 6.56 ± 0.36 まで変化 (NS), FSのそれは 4.75 ± 0.34 から 5.81 ± 0.56 まで $p < 0.01$ で有意に変化した ($n=12$).) と

$T_{1/2}$ の有意な短縮を認めた. ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ の $T_{1/2}$ は 226 ± 10 msecから 211 ± 7 msecへ, FSのそれは 150 ± 14 msecから 126 ± 13 msecへ減少し, 共に $p < 0.05$ と有意であった ($n=12$).) (図 1-B).

ET-1の心筋細胞収縮作用において, PKCの活性化を必要としない収縮・弛緩速度を促進させる経路が存在する可能性がある.

- 4) ROCKがこの経路にかかわっているかどうかを調べるために, 心筋細胞をBISに加え, 更に Rho kinase inhibitor (ROCK inhibitor) である Y-27632 ($10 \mu\text{M}$) で処置した. その濃度は文献を参考にした^{14, 20, 21)}. 図2-ABに示すように, この条件下ではET-1を投与してもそのピークの大きさ, および収縮・弛緩時間は変化しなかった. ET-1の収縮・弛緩に対する作用の一部にROCKが関与していることが示唆された. (細胞内 Ca^{2+} 濃度のピークはET-1投与前後で 3.05 ± 0.32 から 2.73 ± 0.20 , 最大細胞収縮は 101.95 ± 8.78 から 107.53 ± 9.49 と有意な変化は認めなかった. また, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の1/TPは 5.50 ± 0.43 から 5.51 ± 0.35 まで, FSの1/TPも 4.19 ± 0.37 から 4.55 ± 0.46 と有意な変化はなかった ($n=4$). $T_{1/2}$ については $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の $T_{1/2}$ が 218 ± 16 msecから 239 ± 40 msec, FSのそれは 144 ± 28 msec to 132 ± 24 msec と共に有意な変化は認めなかった ($n=4$).)

ROCKはMLC脱 燐 酸 酵 素 (myosin light chain phosphatase; MLCP) をリン酸化することで不活化し, MLCの脱リン酸化が減少することによって, リン酸化されたMLCが増加すると報告されている⁹⁾. MLCP不活化が収縮速度と弛緩速度を促進するのに鍵となるステップであると考えられる. この経路が実際に機能していることを示すためにさらに以下の実験を行った.

- 5) 心筋細胞をBISと共にMLCK (myosin light chain kinase) inhibitorであるML-9 ($3 \mu\text{M}$) で処理した. その濃度はIC50値より決定した (K_i $3.8 \mu\text{M}$). PKCとMLCKの両者を遮断した条件下ではET-1は収縮・弛緩時間に影響を及ぼさなかった (図 3-AB). (細胞内 Ca^{2+} 濃度のピークはET-1投与前後で 2.52 ± 0.19 から 2.38 ± 0.23 , 最大細胞収縮は 119.34 ± 6.72 から 122.52 ± 6.97 と有意な変化は認めなかった. 1/TPにおいては $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が 6.2 ± 0.18 から 6.3 ± 0.32 , FSが 4.32 ± 0.23 から 4.55 ± 0.31 までと有意な変化を認めず ($n=5$), また $T_{1/2}$ も $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が 233 ± 13 msecから 234 ± 12 msec, FSのそれは 143 ± 29 msecから 132 ± 2 msecと有意な変化を認めなかった.)
- つまりET-1の作用はPKCとMLCKをあらかじめ阻害しておくことと認められないことが示された.
- 6) myosin light chain phosphatase (MLCP) inhibitor である calyculin Aの細胞収縮・細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化について検討した. その濃度はIC50値か

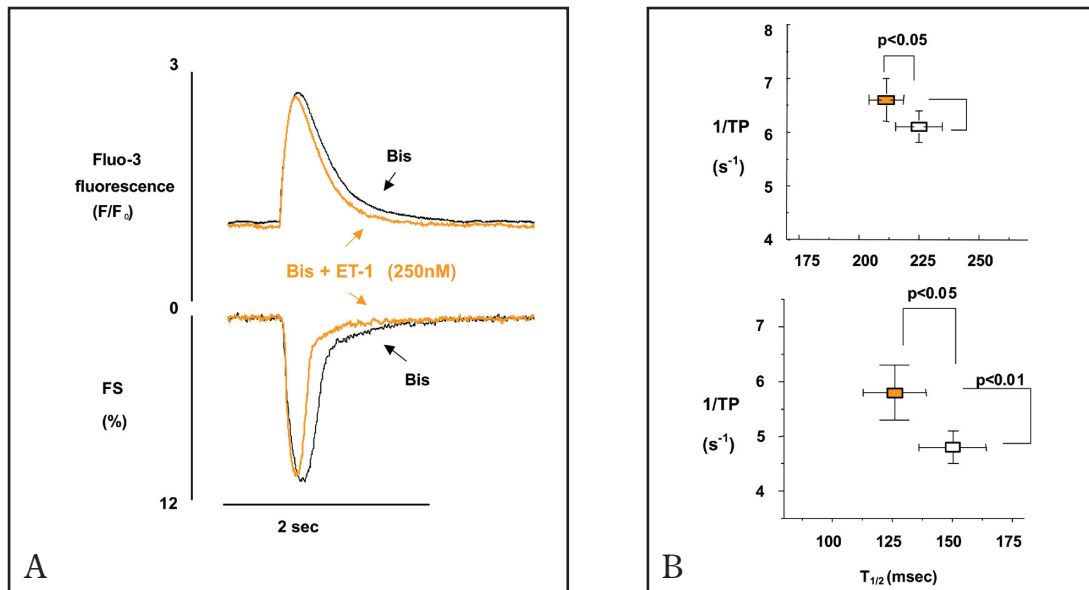


図 1. A: 黒色はPKC阻害剤であるbisindolylmareimide (BIS, 100 nM) のみ, 橙色はBISにET-1 (250 nM) を加えた際の結果である。F₀は細胞を0.25 Hzで電気刺激した時の拡張終期の530 nmの蛍光値, Fは実際の測定値, FSは細胞短縮の大きさの割合を示す。PKC阻害剤であるbisindolylmareimide (BIS, 100 nM) で心筋細胞を10分間前処置し, 加えてET-1 (250 nM) を含むHEPES溶液で還流すると, 細胞内カルシウムピークや最大細胞短縮にはET-1は影響を与えなかったが, 細胞内カルシウム濃度・細胞収縮ともにピークに達するまでの時間は短縮し, また弛緩過程の速度も速くなっている。**B:** 黒色はPKC阻害剤であるbisindolylmareimide (BIS, 100 nM) のみ, 橙色はBISにET-1 (250 nM) を加えた際の結果である。縦軸にピークまでの時間の逆数 (1/TP), 横軸にピークの50%まで弛緩する時間 (T_{1/2}) をプロットした (n=12)。上段は細胞内カルシウム濃度, 下段は細胞短縮についての解析を示す。細胞短縮のピークまでの時間と50%弛緩時間は共に明らかに短縮した。(1/TP は 4.75 ± 0.34 から 5.81 ± 5.6 へと $p < 0.01$ の, T_{1/2} は 150 ± 13.9 から 126 ± 13.1 へと $p < 0.05$ の有意な変化を認めた。) 同時に測定した細胞内Ca²⁺濃度もまたTP・T_{1/2}を短縮させたことに一致して明らかに減少した。(1/TP は 6.1 ± 0.03 から 6.63 ± 5.98 へ変化, T_{1/2} は 226 ± 9.72 から 211 ± 7.17 へと有意に変化した。)

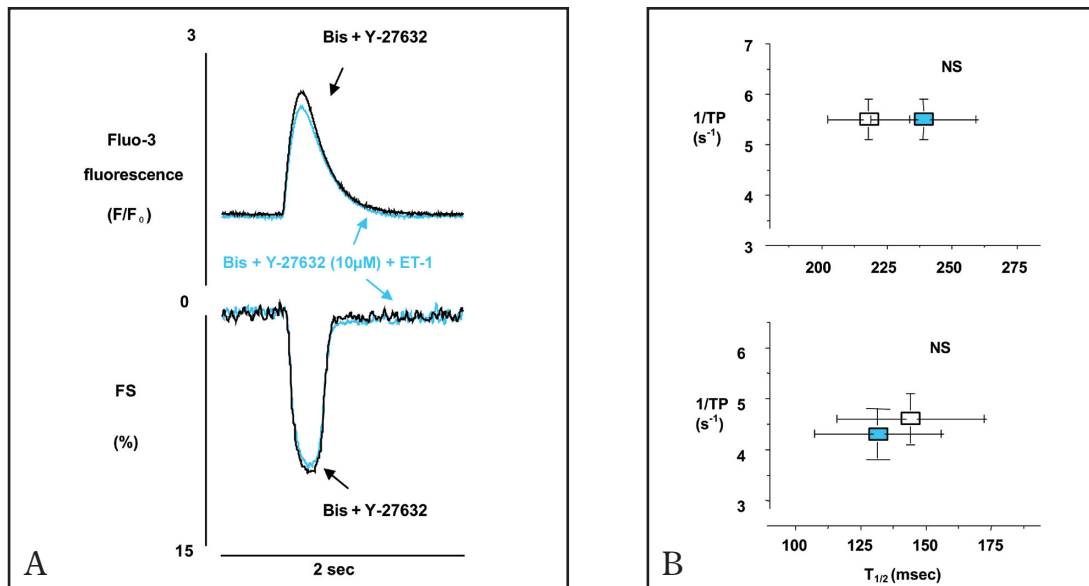


図 2. A: 心筋細胞をBISに加えて, Rho kinase inhibitorであるY-27632 (10 μM) で処理した。黒色はBISにY-27632 (10 μM) を加えたもの, 水色はさらにET-1を加えたものを示す。この条件下ではET-1は収縮・および弛緩時間を短縮させなかった。(n=4) **B:** 黒色はBISにY-27632 (10 μM) を加えたもの, 水色はさらにET-1を加えたものを示す。BIS+Y-27632+ET-1では細胞内カルシウム濃度, 細胞短縮において1/TPとT_{1/2}は共に変化しなかった。(1/TP において [Ca²⁺]_i は 5.50 ± 0.43 から 5.51 ± 0.35 まで, FSにおいても 4.19 ± 0.37 から 4.55 ± 0.46 と有意な変化はなかった (n=4)。T_{1/2} については [Ca²⁺]_i が 218 ± 16 msecから 239 ± 40 msec, FSが 144 ± 28 msec to 132 ± 24 msec と共に有意な変化は認めなかった (n=4)。(.)

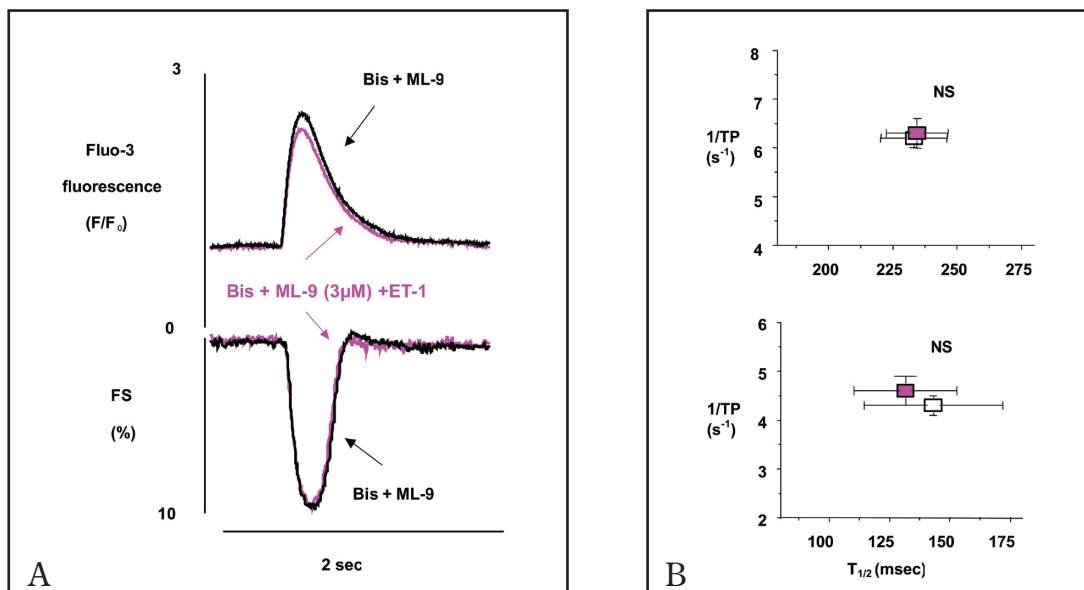


図3. **A:** BISと共にMLCK (myosin light chain kinase) inhibitorであるML-9 (3 μ M) で処理した. 黒色はBISにML-9を加えたもの, 桃色はさらにET-1を加えたものを示す. この条件下でET-1を加えると収縮・弛緩時間には影響しなかった. ($n=5$) **B:** 黒色はBISにML-9を加えたもの, 桃色はさらにET-1を加えたものを示す. BIS+ML-9+ET-1でも細胞内カルシウム濃度, 細胞短縮において1/TP と $T_{1/2}$ は共に変化しなかった. (1/TP は $[Ca^{2+}]_i$ が 6.2 ± 0.18 から 6.3 ± 0.32 , FSが 4.32 ± 0.23 から 4.55 ± 0.31 までと有意な変化を認めず ($n=5$), また $T_{1/2}$ も $[Ca^{2+}]_i$ が 233 ± 13 msecから 234 ± 12 msec, FSのそれは 143 ± 29 msecから 132 ± 2 msecと有意な変化を認めなかった.)

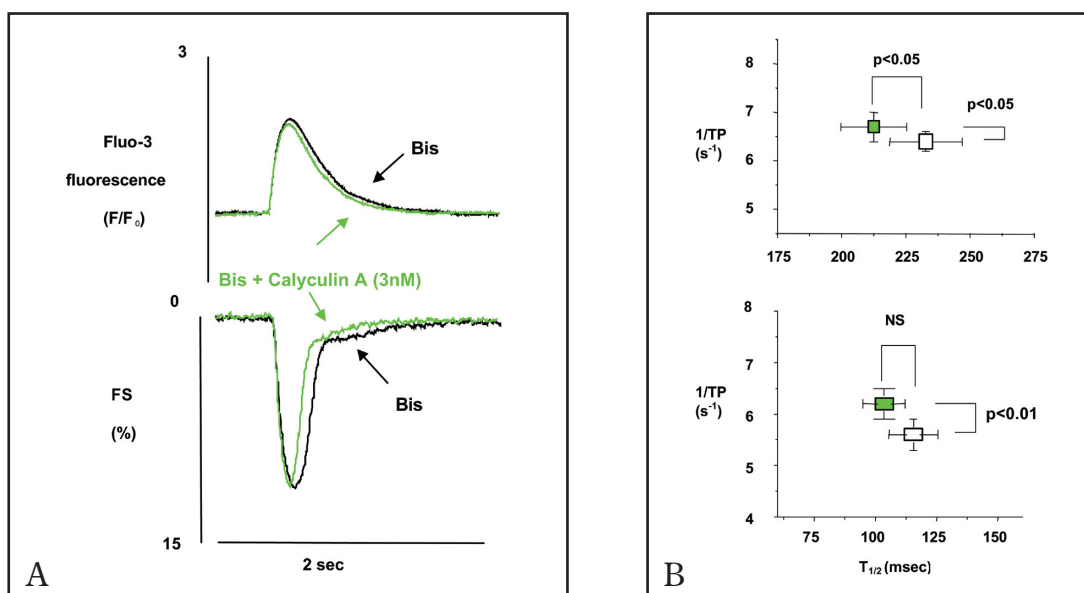


図4. **A:** 黒色はBISにcalyculin Aを加えたもの, 緑色はさらにET-1を加えたものを示す. MLCP inhibitorであるcalyculin Aで処理するとET-1と同じように細胞内カルシウムピークや最大細胞短縮を示さずに収縮・弛緩速度を速めた. ($n=8$) **B:** 黒色はBISにcalyculin Aを加えたもの, 緑色はさらにET-1を加えたものを示す. 細胞内カルシウム濃度においてET-1と同様に, 1/TP (6.37 ± 0.25 から 6.71 ± 0.27 へ変化 $p < 0.05$)と $T_{1/2}$ (233 ± 14 から 213 ± 13 へ変化 $p < 0.05$)は共に有意に短縮した. 細胞短縮においても1/TP (5.63 ± 0.3 から 6.24 ± 0.34 へ変化 $p < 0.01$)は有意に短縮し, $T_{1/2}$ (116 ± 10 から 104 ± 9 へ変化)は短縮傾向となった.

ら求めた (IC_{50} 2 nM²²⁾). 図 4-AB に示したように calyculin A 3 nM は ET-1 と同じように収縮・弛緩速度を速めた. (細胞内 Ca^{2+} 濃度のピークは calyculin A 投与前後で 2.47 ± 0.12 から 2.48 ± 0.14 , 最大細胞収縮は 79.59 ± 3.99 から 77.99 ± 3.68 と有意差は認めなかった. $1/TP$ は $[Ca^{2+}]_i$ で 6.37 ± 0.25 から 6.71 ± 0.27 と $p < 0.05$ で有意に変化した. FS でも 5.63 ± 0.3 から 6.24 ± 0.34 と $p < 0.01$ で有意に変化した ($n=8$). $T_{1/2}$ については $[Ca^{2+}]_i$ は 233 ± 1 msec から 213 ± 13 msec まで $p < 0.05$ と有意な変化を認め, FS のそれは 116 ± 10 msec から 104 ± 9 msec と変化した ($n=8$).)

- 7) MLCP inhibitor である calyculin A を BIS と ML-9 で前処置された心筋細胞に投与した場合にはやはり収縮・弛緩時間に影響を及ぼさなかった (図 5-AB). (細胞内 Ca^{2+} 濃度のピークは calyculin A 投与前後で 2.44 ± 0.12 から 2.43 ± 0.22 , 最大細胞収縮は 91.40 ± 2.76 から 91.37 ± 3.10 と有意差は認めなかった. $1/TP$ は $[Ca^{2+}]_i$ が 6.28 ± 0.11 から 6.1 ± 0.07 , FS のそれは 4.72 ± 0.23 から 4.67 ± 0.22 と共に変化を認めなかった ($n=3$). また, $T_{1/2}$ でも $[Ca^{2+}]_i$ が 218 ± 6 msec から 207 ± 8 msec, FS が 119 ± 5 msec から 105 ± 18 msec と共に有意な変化を認めなかった ($n=3$).) PKC と MLCK が不活性化された状態では calyculin A の効果は発揮されなかった.

以上より MLCP を阻害した場合 MLCK を介して

収縮弛緩が促進することが判明した. まとめを図 6・7 に示す. この結果より心筋細胞において, ET-1 が MLC を活性化する経路として PKC を介する経路のほか ROCK を介する経路が作動していることが再確認された.

考 察

ET-1 は強力な血管収縮物質であり, 血管収縮作用・血管平滑筋増殖作用・陽性変時変力作用・心肥大作用などを持つ. 心筋細胞では ET_A 受容体, ET_B 受容体共に発現しており, 心不全時には血中の ET-1 レベルは増加し, 血管収縮・血管平滑筋増殖・心収縮力増加, アルドステロン分泌・心肥大などの作用を及ぼすことが知られている. その血中濃度は NYHA クラスや左室駆出率・心係数などの重症度と相関していることが知られている²³⁾. また, 心筋虚血や心不全などの際には心室壁に圧や容量などの応力がかかり, AT II と共に ET-1 が産生され Na^+ - H^+ 交換体を活性化し心筋細胞内をアルカリ化する. その結果 Ca^{2+} の感受性が上昇することが知られている⁵⁾. さらに ET-1 が未熟な細胞においては細胞内 Ca^{2+} 濃度を減少させ筋収縮を抑制しわずかに細胞内をアシドーシスに, 一方成熟した心筋細胞においては細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加なしで筋収縮を増大し, 細胞内をアルカローシスへ変化させたという報告⁶⁾もあり, ET-1 の効果は不全心では細胞内 pH の

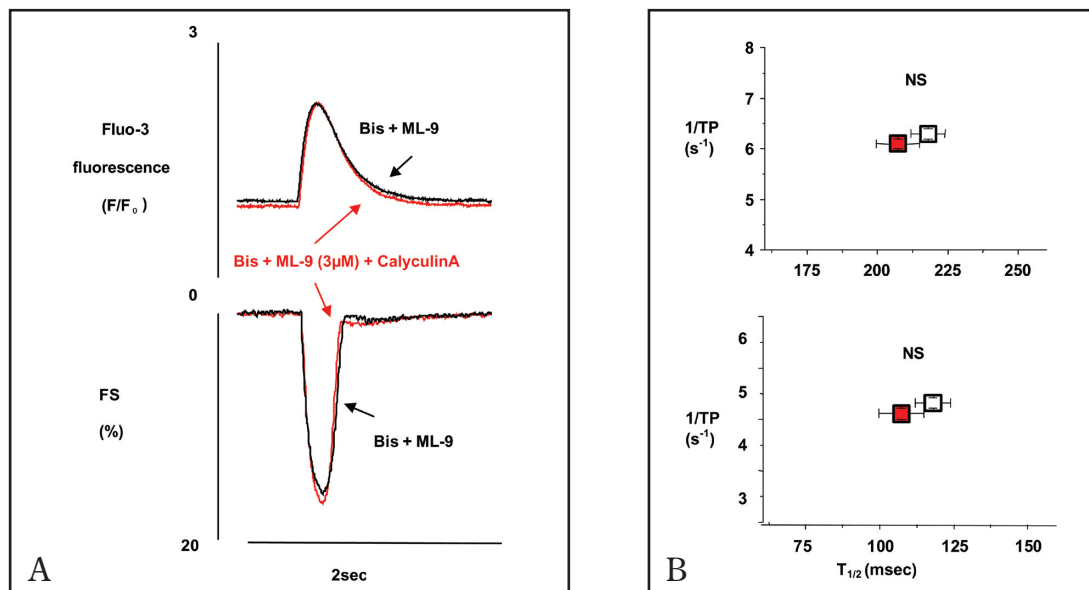


図 5. A: 黒色は BIS と ML-9 を加えたもの, 赤色はさらに calyculin A を加えたものを示す. calyculin A に BIS と ML-9 を加えて処理すると ET-1 と同様, 収縮・弛緩時間を短縮させなかった. ($n=3$) B: 黒色は BIS と ML-9 を加えたもの, 赤色はさらに calyculin A を加えたものを示す. calyculin A + BIS + ML-9 では細胞内カルシウム濃度, 細胞短縮において $1/TP$ と $T_{1/2}$ は共に変化しなかった. ($1/TP$ は $[Ca^{2+}]_i$ が 6.28 ± 0.11 から 6.1 ± 0.07 , FS のそれは 4.72 ± 0.23 から 4.67 ± 0.22 と共に変化を認めなかった ($n=3$). また, $T_{1/2}$ でも $[Ca^{2+}]_i$ が 218 ± 6 msec から 207 ± 8 msec, FS が 119 ± 5 msec から 105 ± 18 msec と共に有意な変化を認めなかった ($n=3$).)

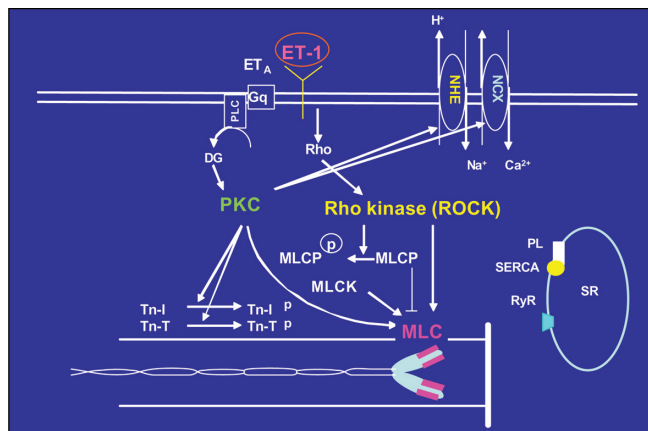


図 6. ET-1の心筋細胞における作用機序. PKAを介して筋小胞体からの Ca^{2+} の放出を亢進し細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる以外に, PKCを介して Na^+ - H^+ 交換体に作用し細胞内をアルカローシスにし Ca^{2+} 感受性を上昇させる経路とPKCを介してMLCをリン酸化させる経路がある. その他に今回Rho-ROCKを介してMLCをリン酸化し細胞内 Ca^{2+} を変化させる経路が明らかとなった.

変化の点でも細胞収縮を低下させることが考えられた. さらにMLC2の脱リン酸化による収縮の反応は, 不全心においてMLC2の脱リン酸化レベルが減少しているにもかかわらず増強されることが報告されていることから¹⁵⁾, 心不全時におけるエンドセリンの役割は正常時と比較してより大きくなると考えられた.

Rhoは低分子量G蛋白でありアクチン細胞骨格系の再編成を介し細胞運動や細胞接着など細胞内において多岐に渡る細胞反応の調節に関与している. 平滑筋細胞ではカルシウム感受性機構による収縮への寄与の報告がある¹⁰⁾. RhoはMLCのリン酸化に関与してアクチンミオシン相互作用を惹き起こし, Rho-kinaseの活動を通じてミオシン軽鎖の脱リン酸化酵素を阻害するように作用しMLCのリン酸化を促進する⁹⁾. 一方 RhoAは心臓の洞結節機能・房室結節機能を調節し, その過発現は徐脈や心不全の進行を起こすことが示されており²⁵⁾, 平滑筋のみならず心筋細胞においてもその作用が関与することが考えられる. 心臓発生の点で心筋細胞と血管平滑筋細胞は共に中胚葉より発生することから, 心不全において幼若化した心筋細胞は平滑筋細胞に類似すると大胆な推測をすれば, ET-1及びその作用機序はより重要なものとなると考えられる.

我々はRho kinaseとMLC kinaseが成ラットの心室筋細胞における細胞収縮と細胞内 Ca^{2+} 濃度へのET-1の効果に関与することを示した. ET-1はPKC阻害下においてピーク値を変化させることなく細胞収縮・弛緩のスピードを加速させた. これらの結果はET-1がMLCリン酸化と細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存した経路を介して収縮・弛緩を加速させると考えさせる. Clementらはすでに心筋細胞においてPKCがトロポニンIや

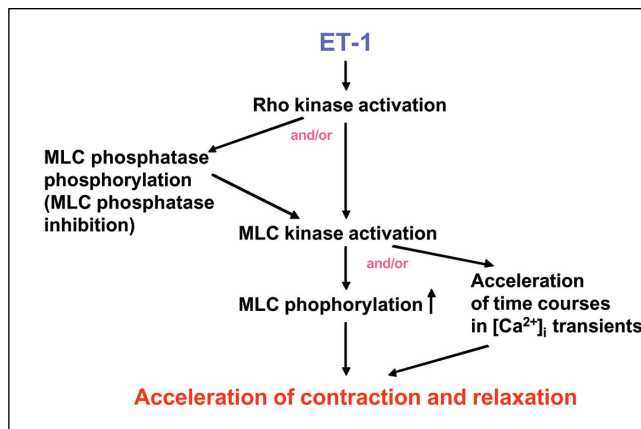


図 7. 今回明らかとなった経路は, ET-1によってRho kinaseが活性化し, MLC脱リン酸化酵素がリン酸化されることで脱リン酸化作用が阻害され, 結果MLCリン酸化が持続しMLC kinaseと同様に心筋の収縮・弛緩作用にpositiveに関与していると考えられた.

トロポニンC, C蛋白のような収縮機構と同様にMLCを直接リン酸化することを示している^{7, 8)}. また, PKCの活性は Na^+/H^+ 交換体を活性化することによってアルカローシスを惹き起こす. それに伴い流入した Na^+ は Na^+/K^+ ATPase活性が十分にあればすぐにくみ出されるが虚血や不全心筋あるいはジギタリスの存在下では $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体に依存する可能性があり, Ca^{2+} の蓄積を起こす可能性がある⁵⁾. ジメチルアミロライド(Na^+/H^+ 交換体阻害薬)は部分的にET-1の陽性変力作用をブロックするがET-1が誘導する収縮作用は増加しなかったとの報告があり必ずしも生理的条件下でのメカニズムではない可能性もある²⁶⁾.

また, MLCはMLC kinaseと同様にPKCによりリン酸化されることが報告されている^{7, 8, 27)}. ET-1がGq依存性の経路を介するレセプターを通してPKCを活性化する強い因子の一つであるため, PKCが機能的に有効である場合にMLCのリン酸化の機能的な意味を検出することはとても難しい.

我々の実験では, PKC阻害に特異的な阻害薬であるbisindolylmaleimide (BIS) 100 nMを使用し, ET-1のPKCを介する陽性変力作用を完全に阻害した²⁸⁾. この条件でET-1の収縮・弛緩の促進作用を検討したのは我々が最初である. ET-1拮抗薬を投与するとこの収縮・弛緩の促進作用は消失することは以前の実験にて示されている⁶⁾. ET-1の収縮・弛緩の促進作用はさらにRho kinase阻害薬であるY-27632 (10 μM) またはMLC kinase阻害薬であるML-9 (5 μM) で処理すると完全に阻害された²⁶⁾. ET-1の代わりにMLCP inhibitorであるcalyculin Aを投与するとET-1と類似した反応を観察することができ, その作用もまたMLCK阻害薬

ML-9で阻害された²²⁾。つまりMLCPの阻害はMLCKによるMLCのリン酸化作用を優位とすることで、ET-1の陽性変力作用と同様の作用を行うことが推測された。今回の結果より心筋細胞において、ET-1がPKCを介する経路のほかにROCKを介して収縮弛緩の速度を上昇させることが判明し、その機序としてMLCのリン酸化が考えられた(図7)。今回の実験結果および今までの文献の結果を合わせると図6のようになる。正常心筋におけるET-1の作用機序は①PKCを介して Na^+ - H^+ 交換体に作用②PKCを介してMLCに作用③Rho/ROCKを介してMLCに作用する機序が認められた。どの経路が最も重要であるかについては今回の実験のみからでは推測の範囲をでない。しかしPKC阻害剤下においてもET-1の効果は認められ、さらにROCKを阻害することで消失することからRho/ROCK経路は微々たる存在ではなく重要な因子のひとつであることは確かである。心筋細胞の興奮収縮連関に最も重要な役割を演じているのはカテコラミンを中心とするPKAを介する経路でありその意味ではPKCの役割も小さいといえる。しかし生理的条件下では小さな役割を演じているに過ぎないPKC系も心不全などの病的条件下では重要であると推定されている。Rho/ROCK系はさらに生理的条件下ではその興奮収縮連関に対する寄与は小さいとしても病的条件下ではクリティカルな役割を演じている可能性がある。そこで我々のグループでは心筋リモデリングを生じたモノクロタリン心不全ラットモデルでの実験を開始しておりその役割を検討している。心不全の心筋細胞においても同様の作用が存在するのか、その役割は重要になってくるのかについて今後さらなる研究を行っていく必要がある。

以上に述べた様に不全心において細胞内の神経体液因子の変化が生じると、ET-1の役割も正常時よりも重要になることが予想されET-1の制御が必要と考えられる。現在エンドセリン拮抗薬(エンドセリン受容体遮断薬)の臨床応用が検討されている。特にET_Aレセプター阻害薬・ET_A/ET_Bレセプター阻害薬が心不全の悪化を予防する効果があると考えられ²⁹⁾、非選択的ET_A/ET_Bレセプター阻害薬であるボセンタンを急性投与すると全肺血管抵抗や肺動脈圧、肺毛細血管圧の低下と心係数の増加を示し、心不全に対して血管拡張作用を引き起こして有効であると考えられた³⁰⁾。ET-1による左室収縮のインデックスE_{max}の増加はET_Aレセプター阻害薬(S-0139)によって完全にブロックされ、ET_Bレセプター阻害薬ではブロックされなかったとの報告もある²⁶⁾。また、ET_Aレセプター阻害薬であるBQ-123が三ヶ月の治療で慢性心不全のラットの生存率を改善することが示されている^{29, 31, 32)}。BQ-123投与により明らかに肺高血圧と右室肥大の進行を阻害し、組織検査にてBQ-123は肺動脈内膜の肥

厚化の予防に効果があるとの報告もある³³⁾。非選択的ET_A/ET_Bレセプター阻害薬であるボセンタンは現在肺高血圧症に対し経口投与にて米国では認可され、慢性心不全においても治験中である。

今回我々はPKC系の興奮収縮連関への影響検討にくわえてエンドセリンによる作用の一部をなす第3の系Rhoキナーゼ系が演ずる役割について検討した。心筋細胞においてET-1がMLCを活性化する機序としてROCKを介する経路の重要性を示した。

謝 辞

本研究の遂行および本論文作成に際し、終始ご指導ご鞭撻を賜りました埼玉医科大学第二内科学教室西村重敬教授、同 河本修身助教授、埼玉医科大学非常勤講師、東京大学循環器内科 八尾厚史助手のご厚意に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, et al. The effect of Carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *N Engl J Med* 1996;334:1349-55.
- 2) Simpson P. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an α_1 adrenergic response. *J clin Invest* 1983;72:732-8.
- 3) Suematsu N, Satho S, Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, Nakamura R, et al. α 1-Adrenoceptor-Gq-RhoA signaling is upregulated to increase myofibrillar Ca^{2+} sensitivity in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ physiol* 2001;281:H637-46.
- 4) The CONSENSUS trial study group. Effects of Enalapril on mortality in severe congestive heart failure: Results of the cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* 1987;316:1429-35.
- 5) Dostal DE, Baker KM. Angiotensin and endothelin-messengers that couple ventricular stretch to the Na^+ / H^+ exchanger and cardiac hypertrophy. *Circ Res* 1998;83:870-3.
- 6) Kohmoto O, Ikenouchi H, Hirata Y, Momomura S, Serizawa T, Barry WH. Variable effects of endothelin-1 on $[\text{Ca}^{2+}]$ transients, pHi and contraction in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1993;265:793-800.
- 7) Noland TA Jr, Kuo JF. Phosphorylation of cardiac myosin light chain 2 by protein kinase and myosin light chain kinase increases Ca^{2+} -stimulated actomyosin MgATPase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:254-60.

- 8) Clement O, Puceat M, Walsh MP, Vassort G. Protein kinase C enhances myosin light-chain kinase effects on force development and ATPase activity in rat single skinned cardiac cells. *Biochem J* 1992;285:311-7.
- 9) Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 1996;273:245-8.
- 10) Hashimoto T, Nakano Y, Yamashita M, Fang YI, Ohata H, Momose K. Role of Rho-associated protein kinase and Histamine in lysophosphatidic acid-induced airway hyperresponsiveness in guinea pig. *Jpn J Pharmacol* 2002;88:256-61.
- 11) Kuwahara K, Saito Y, Nakagawa O, Kishimoto I, Harada M, Ogawa E, et al. The effects of the selective ROCK inhibitor, Y27632, on ET-1-induced hypertrophic response in neonatal rat cardiac myocytes-possible involvement of Rho/ROCK pathway in cardiac muscle cell hypertrophy. *FEBS Lett* 1999;452:314-8.
- 12) Nishimaru K, Tanaka Y, Tanaka H, Shigenobu K. Inhibition of Agonist-Induced Positive Inotropy by a Selective Rho-Associated Kinase Inhibitor, Y-27632. *J Pharmacol Sci* 2003;92:424-7.
- 13) Kawanabe Y, Okamoto Y, Nozaki K, Hashimoto N, Miwa S, Masaki T. Molecular Mechanism for Endothelin-1-Induced Stress-Fiber Formation: Analysis of G Proteins Using a Mutant Endothelin A Receptor. *Mol Pharmacol* 2002;61:277-84.
- 14) Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahata T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997;389:990-4.
- 15) van der Velden J, Papp Z, Boontje NM, Zaramba R, de Jong JW, Janssen PML, et al. The effects of myosin light chain 2 dephosphorylation on Ca^{2+} -sensitivity of force is enhanced in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 2003;57:505-14.
- 16) 八尾厚史. 細胞内カルシウムイオン濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 測定法の進歩と課題. *Clinical Calcium* 2001;11:726-32.
- 17) Shimoni Y, Liu XF. Role of PKC in autocrine regulation of rat ventricular K^+ currents by angiotensin and endothelin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H1168-81.
- 18) Wang L, Rolfe M, Proud CG. Ca^{2+} -independent protein kinase C activity is required for α 1-adrenergic-receptor-mediated regulation of ribosomal protein S6 kinases in adult cardiomyocytes. *Biochem J* 2003;373:603-11.
- 19) Ku WC, Cheng AJ, Wang TCV. Inhibition of Telomerase activity by PKC inhibitors in Human nasopharyngeal cancer cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:730-6.
- 20) Nishimura K, Tanaka Y, Tanaka H, Shigenobu K. Inhibition of agonist-induced positive inotropy by a selective Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632. *J Pharmacol Sci* 2003;92:424-7.
- 21) Sakamoto K, Hori M, Izumi M, Oka T, Kohama K, Ozaki H, et al. Inhibition of high K^+ -induced contraction by the ROCKs inhibitor Y-27632 in vascular smooth muscle: possible involvement of ROCKs in a signal transduction pathway. *J Pharmacol* 2003;92:56-69.
- 22) Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, et al. Calyculin A and Okadaic acid: inhibition of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:871-7.
- 23) Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor GA, Brandt RR, Wright S, et al. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994;89:1580-6.
- 24) Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S, Kaibuchi K, Matsuura Y, et al. Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem* 1992;267:8719-22.
- 25) Sah VP, Minamasawa S, Tam SP, Wu TH, Dorn GW 2nd, Ross J Jr, et al. Cardiac-specific overexpression of RhoA results in sinus and atrioventricular nodal dysfunction and contractile failure. *J Clin Inv* 1999;103:1627-34.
- 26) Takeuchi Y, Kihara Y, Inagaki K, Yoneda T, Sasayama S. Endothelin-1 has a unique oxygen-saving effect by increasing contractile efficiency in the isolated rat heart. *Circulation* 2001;103:1557-63.
- 27) Venema RC, Raynor RL, Noland TA, Kuo JF. Role of protein kinase C in the phosphorylation of cardiac myosin light chain 2. *Biochem J* 1993;294:401-6.
- 28) Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, et al. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 1991;266 24 :15771-81.
- 29) Yamauchi-Kohno R, Miyauchi T, Hoshino T, Kobayashi T, Aihara H, Sakai S, et al. Role of Endothelin in deterioration of heart failure due to cardiomyopathy in Hamsters: Increase in endothelin-1 production in the heart and beneficial effect of endothelin-A receptor antagonist on survival and cardiac function. *Circulation* 1999;99:2171-6.

- 30) Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P, Muller P, Kim J, Oechslin E, et al. Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* 1995;346:732-6.
- 31) Sakai S, Miyauchi T, Yamaguchi I. Long-term endothelin receptor antagonist administration improves alterations in expression of various cardiac genes in failing myocardium of rats with heart failure. *Circulation* 2000;101:2849-53.
- 32) Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 1996;384:353-5.
- 33) Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993;73: 887-97.
- 34) 酒井俊, 宮内卓. *Annual Review 2002 循環器*. 東京: 中外医学社; 2002. p. 152-8.
- 35) 小室一成. *心不全のNew Concept -分子生物学:発生工学から考えた病態生理*. 東京: 中外医学社; 2003.
- 36) 篠山重威編. *心不全*. 東京: 医薬ジャーナル社; 1997.
- 37) 白井敏雄監修. *カールソン 人体発生学 - 分子から個体へ*. 新潟: 西村書店; 2002.
- 38) Goldberg AT, Bond BR, Mukherjee R, New RB, Zellner JL, Crawford FA Jr, et al. Endothelin receptor pathway in human left ventricular myocytes: Relation to contractility. *Ann Thorac Surg* 2000;69:711-6.