

助成番号 0737

Na⁺/H⁺交換輸送体の心肥大・心不全における病態的意義の解明

西谷 友重, 若林 繁夫, 岩田 裕子, 久光 隆, ヨセフ ベンアマー

国立循環器病センター研究所循環分子生理部

概要 細胞内 Na⁺ 濃度は様々なイオントランスポーターやチャネルなどにより精密に制御されている。その恒常性の破綻は、心筋においては例えば Na⁺/Ca²⁺ 交換輸送体(NCX1)などの活性を変化させ、セカンドメッセンジャーである Ca²⁺ シグナルの変化、ひいては様々な細胞応答の変化へとつながる可能性がある。

Na⁺/H⁺ 交換輸送体 1(NHE1, SLC9)は、全ての組織に存在する膜タンパク質であり、細胞内外の Na⁺ の濃度勾配を駆動力として細胞内の H⁺ を 1:1 でくみ出す主要な H⁺ 排出イオントランスポーターである。そのため細胞内 pH の他、細胞内 Na⁺ 濃度、細胞容積などを制御し、細胞の恒常性を保つ重要な働きを担っている。ところが近年、虚血-再灌流障害や心肥大・心不全などにおいて NHE1 の発現や活性の亢進が認められることなどから、NHE1 がこれら疾患のメディエータとする報告がある。今回、NHE1 が心肥大・心不全を起こす直接的原因になるかどうか、そのシグナル伝達機構の詳細を明らかにする目的で、活性化型 NHE1 を心筋特異的に高発現させたトランスジェニック(Tg)マウスを作製した。Tg マウス心筋は生後 20-40 日齢で心肥大を呈し、さらに拡張型心筋症の形態を示した。心エコーによる解析で収縮力低下が認められ、生後 200 日で Tg マウスのすべてが死亡した。Tg 由来単離心筋細胞では細胞内 pH および Na⁺ 濃度の上昇とともに、収縮、弛緩期両方における細胞内 Ca²⁺ 濃度も顕著に増加していた。弛緩期の Ca²⁺ 濃度上昇は Na⁺/Ca²⁺ 交換系との機能連関を介した Na⁺ 依存性 Ca²⁺ 過負荷によるものと考えられる。またそれに伴って、カルモデュリンキナーゼ II (CaMKII) によるフォスホランパンの著明なリン酸化が検出され、SR Ca²⁺ ポンプ活性上昇・Ca²⁺ ストア量の増大によって収縮期の Ca²⁺ 増大が起こることがわかった。Tg マウスでは、Ca²⁺ 依存性心肥大シグナル因子 CaMKII およびカルシニユリン(CN)の著明な活性化が見られた。これら蛋白質の活性化はそれぞれ下流の転写制御因子 HDAC および NFATc を介して心肥大遺伝子発現を惹起することが知られている。興味深いことに、ラット培養心筋細胞で NHE1 を高発現すると、NHE1 阻害剤カリポライド依存的な HDAC のほぼ完全な核外移行および NFATc の核内移行が認められた。しかし Tg マウス心筋細胞では NFATc の反応は部分的であり、これは心肥大抑制因子 p38 の活性化によるものと考えられた。これら NHE1 高発現による *in vivo*, *in vitro* の変化はカリポライドにより有意に抑制された。以上の結果は、細胞内 Na⁺ 濃度を制御する NHE1 の活性化が、遺伝子発現を変化させ心肥大・心不全を発症させる Ca²⁺ シグナルを惹起するのに充分であるという新しい概念を提示する。

1. 背景

心不全や心筋症などの心疾患において、肥大などの代償機構が破綻した心筋細胞は回復不能の機能不全に陥る。この際、正常時は恒常的に保たれている細胞内 pH や各種イオン濃度の異常が病態を誘発あるいは悪化させる直接的原因となる場合がある。心筋細胞の生死を決める細胞

内ネットワークを“サバイバル”方向に維持することが筋変性を防ぐ上で有効であるが、これに関し病態を引き起こすキーとなる原因およびそのシグナル伝達経路を明らかにすることは、心筋細胞を保護する新たな治療戦略につながる基盤研究として極めて重要である。

Na⁺/H⁺ 交換輸送体 1(NHE1, SLC9)は、全ての組織に

存在する膜タンパク質であり、細胞内外の Na^+ の濃度勾配を駆動力として細胞内の H^+ を 1 : 1 でくみ出す主要な H^+ 排出イオントランスポーターである¹。そのため細胞内 pH の他、細胞内 Na^+ 濃度、細胞容積などを調節し、細胞の恒常性を保つ重要な働きを担っている。また、病態の際などに誘発されるさまざまな刺激(ホルモンやストレッチ刺激など)によって活性化を受けることが知られている。NHE1 の活性化は細胞内アルカリ化のほか細胞内 Na^+ 濃度の上昇も引き起こす。細胞内 Na^+ 濃度の増加は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送系(NCX1)をはじめとした細胞内 Na^+ 依存性のトランスポーターなどを活性化し、様々なイオン環境の変化が生じると予測される。近年、NHE1 の活性化と各種心疾患とで関連がある可能性が示唆されている。例えば心筋虚血や心不全の際、NHE1 の発現量や活性が増加したり²、NHE 阻害剤により心筋障害が軽減される³などである。また近年では、心肥大や心筋リモデリングなどの形成にも NHE1 の関与が示唆されている。その例として ANP 受容体である *ganylyl cyclase A* (GC-A) KO マウス⁴ や β 1 アドレナリン受容体 TG マウス⁵ に見られる心筋リモデリングの発症機構の一つとして NHE1 の活性化が提唱されている。しかし、このようなマウス心筋では受容体刺激などを伴う複数のシグナル経路が同時に活性化されており、NHE1 の活性化そのものが心肥大・心不全を引き起こす最初のシグナルになり得るのか、また NHE1 の活性化に伴いどのようなイオン環境が生じ、どのようなシグナル伝達経路が活性化されるのかなど明らかでなかった。そこで私達は活性化型 NHE1 を心筋特異的に高発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製したところ、このマウスは心肥大を起こし、やがて拡張型心筋症の様態を呈し心機能が著しく低下することが明らかとなった。この結果は、NHE1 と心肥大形成・心不全との直接的因果関係を示す新しい概念を提示している。本研究ではこれをさらに発展させ、NHE1 を介した心肥大形成シグナルの詳細なシグナル経路を分子・細胞レベルで解明し、NHE1 の各種心疾患における病態的意義を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

NHE1 を恒常的に活性化した TG マウスは、NHE1 のカルモジュリン結合ドメイン(AA 637-656)が自己阻害ドメインであり、これを欠失させると pH 依存性カーブがアルカリ

側にシフトすることにより生理的条件下では活性化状態になるという当研究室の以前の知見^{6,7}をもとに、心筋 α -MHC プロモータの制御下で心筋特異的に発現させて作製した。

私達は、NHE1 の活性化が心肥大・心機能不全を導く原因として、細胞内 pH の変化というよりは、むしろ細胞内 Na^+ 濃度の異常な上昇によるのではないかと推測している。これが起これば、 Na^+ 濃度に依存して $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体(NCX)の逆モードの比率が増加し、通常とは逆反応である Ca^{2+} 流入がおこる。急激な細胞内 Ca^{2+} 過剰負荷は心筋細胞を死に至らせ、また微量であるが恒常的な細胞内 Ca^{2+} の増加はカルモジュリン(CaM)、CaM 依存性キナーゼ(CaMKII)などを活性化させて種々の興奮-収縮相関(EC-coupling)に関連のあるタンパク質をリン酸化させ、筋小胞体内 Ca^{2+} 量や筋収縮力を変化させ得る。またカルシニューリンなどを活性化することにより心肥大を引き起こす遺伝子を誘導する可能性もある。このようなカスケードの存在を証明するため、以下のパラメータについて NHE トランスジェニックマウスと野生型とを比較するとともに、NHE1 特異的阻害剤(カリポライドなど)によりその違いが軽減するか観察した。

A) 個体レベルでの影響:

①個体の発達状況、生存率、心臓の繊維化などの観察、②心エコー、心電図計測などによる心機能解析、③EC-coupling および心肥大形成に重要なタンパク質(NHE, NCX, CaMKII, フォスフォランボン, MCIP など)およびそのリン酸化を Western blot により測定した。

B) 単離心筋細胞における各種イオンレベル、心機能の解析:

遺伝子改変マウス由来の単離心筋細胞はコラゲナーゼを用いたランゲンドルフの灌流法により単離した。またこれら単離心筋細胞を用い、①細胞内 pH、②細胞内 Na^+ 濃度、③心筋細胞を電気フィールド刺激した際の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化(Ca^{2+} トランジェント)などを、それぞれ BCECF-AM、SBFI-AM、Indo 1-AM などの蛍光色素を用いた蛍光法により測定した。また筋小胞体 Ca^{2+} ポンプ阻害剤(カフェインなど)を用いて筋小胞体内の Ca^{2+} 量も測定した。④ Ca^{2+} トランジェントに伴う心筋収縮力を、 Ca^{2+} 測光で得られた蛍光画像を画像解析することにより測定した。

C) 心筋細胞における calcineurin-NFAT および CaMKII-HDAC 経路の活性化:

新生児ラットおよび、WTまたはTGマウス由来の培養心筋細胞にGFP標識したNFATあるいはHDAC4をトランスフェクションし、GFPの局在パターンをconfocal顕微鏡で確認した。

3. 結果

NHE1の活性化だけで心肥大・心不全が引き起こされる

Tgマウス心筋ではNHE1のタンパク量が約5倍に上昇しており、その局在パターンは介在板や形質膜に集中していた。しかし、他のイオン制御タンパク質、例えばNa⁺/Ca²⁺ Exchanger(NCX1)、SR Ca²⁺ pump(SEARCA)、カルセクエストリン、Na⁺/K⁺ ATPaseなどの量はTgで変化は認められなかった。Tg心筋は図に示すように拡張型心筋症の様相を呈し、心筋繊維化や心不全マーカーである血清中のANPおよびTnI量の増加が認められた。心重量の解析からTgマウスでは生後20日目より心肥大が認められ、生後40日でWTと比べ最も顕著に差が認められたことより、以後の解析は全て生後約40日のもので行った。このような病態はNHE1の特異的阻害剤であるカリボライドの腹腔内投与により、NHE1の発現量を変えずに顕著に改善された。

心エコーによる解析から、Tg心筋では心機能の指標であるFractional shortening(FS)が顕著に減少していたが、カリボライド投与群ではかなり改善されていた。また生後90日におけるTgマウスでは不整脈も観察された。さらにTg群では生存率も低下していた。

NHE1活性化によるこのような病態のメカニズムを分子・細胞レベルで明らかにするため、以下、TgおよびWTマウスより急性単離した心筋細胞を用いて解析を行った。

Tgマウス心筋細胞では細胞内、pH、Na⁺およびCa²⁺濃度が上昇していた

Tgマウスより急性単離した心筋細胞はwhole heartの切片で認められたのと同様、WTに比べ大きく、また単離に伴う機械的刺激に非常に弱いことがわかった。これら心筋細胞を用いてまず細胞内pHを蛍光法によりモニターした。NHE活性の一つの指標としてNH₄Clにより細胞内を酸性化した後、pH-recoveryを測定したところ、Tg心筋ではrecovery rateが優位に高くなっていることがわかった。一方、

細胞内H⁺ buffering powerは各pHにおいてWTとTgではほとんど差は無く、それより得られたH⁺ EffluxのpH依存性カーブはTg心筋でかなりアルカリ側にシフトしているため、生理的pHではかなり高くなっていることが確認された。また、静止レベルにおける細胞内pHも、WTが7.23に対しTgが7.4と高くなっていた。これらの知見は、Tg心筋において確かにNHE活性が上昇していることを示している。

また細胞内Na⁺濃度を蛍光指示薬SBFIを用いたNull point法により求めたところ、WTが11.9 mMに対しTgが7.1 mMと約1.5倍に増加していることがわかった。

細胞内Na⁺濃度が上昇すると、NCX1の逆モードを介して細胞内にCa²⁺が流入する可能性がある。そこで次に、Indo-1を用いて細胞内Ca²⁺濃度をWTとTgとで比較した。心筋細胞を1 Hzで電気フィールド刺激したときのCa²⁺ transientを較べると、収縮期、弛緩期ともにTg心筋で細胞内Ca²⁺レベルが顕著に高くなっており、Ca²⁺ amplitudeも倍近くなっていることがわかった。またマウスの生理的心拍数により近い高頻度刺激の際には、特に弛緩期における細胞内Ca²⁺レベルがTgで上昇しており、*in vivo*の心臓では各グループ間でかなりの差が認められることが予測された。この上昇は、WTでは影響を与えない濃度(1 uM, 2 min)のカリボライド投与により軽減された。またカリボライド投与により細胞内Na⁺濃度もWTなみに減少した。以上の結果は、NHE1依存的に細胞内Ca²⁺が上昇したことを示している。

細胞内Ca濃度は、主に筋小胞体SRからのCa²⁺ releaseとSRへの取り込みにより制御されているため、SR内のCa²⁺量と深い関係がある。そこでcaffeineを用いてSR Ca²⁺量をTgとWT心筋で比較したところ、Tgで2倍近くあることがわかった。またSRのCa²⁺量はCa²⁺ポンプSERCAの活性に依存している。そこで、電気刺激により誘発したCa²⁺ transientのrelaxation rateを較べたところTg心筋でかなり速くなっていること、すなわちCa²⁺ポンプによるSRのCa²⁺取り込み活性が高くなっていることが示唆された。さらに、SERCAのregulatorであるフォスフォランバン(PLB)のリン酸化の度合いを確認したところ、CaMKII依存性のリン酸化(Thr17)がTgで顕著に亢進していた。一方PKAによるリン酸化(Ser16)は変わらないことがわかった。すなわちNHE1とNCX1のカップリングにより上昇した

細胞内 Ca^{2+} が CaMKII を活性化し、PLB のリン酸化を介して SERCA を活性化し、SR 内の Ca^{2+} 量を増加させ、結果的に細胞質内 Ca^{2+} 量をますます増加させていることがわかった。

また単離心筋細胞における cell shortening を細胞内 Ca^{2+} 濃度を測ったものと同一細胞で測定したところ、高速刺激時に cell shortening が減少すること (negative force-frequency relationship) が確認された。このことは、whole heart のみならず単一心筋細胞レベルでも機能不全が生じていることを示している。

Ca²⁺依存性の心肥大シグナルの活性化

次に、Ca²⁺ 依存性心肥大シグナル分子、CaMKII および calcineurin の活性化について検討したところ、Tg 心筋において CaMKII のリン酸化が増加し、また calcineurin 活性の指標である MCIP が増加していた。すなわち、CaMKII および calcineurin の両方が活性化されていたが、これらはカリポライド投与群で抑制されていた。それではその先の遺伝子発現についてはどうか検討してみた。Calcineurin が活性化されると転写因子である NFAT を脱リン酸化し NFAT が核内に移行すること⁸、一方、CaMKII が活性化されると核内に存在する HDAC がリン酸化され核外に出て、結果的に心肥大遺伝子発現を促進すること⁹が知られている。従って、NFAT および HDAC 分子の細胞内局在パターンを調べることで、calcineurin-NFAT 経路および CaMKII-HDAC 経路の活性化の有無が確認できる。例えば、新生児ラット培養心筋細胞に心肥大誘発試薬であるフェニレフリン (PE) を添加する系は実験的心肥大モデルとしてよく用いられるが、そのとき HDAC4 は核内から核外に移行することがはっきりと認められる。この実験モデルを用いて、PE のかわりに NHE を高発現させた場合どうなるか検討した。

この実験では、生きた心筋細胞における HDAC4 の局在を見るため、まず全ての群に GFP 標識した HDAC4 を高発現させ、さらに NHE1 高発現群には外側に抗体認識部位を持つ NHE1-HA およびその必須サブユニットである CHP1 を共発現させ、生きたまま NHE1 高発現細胞を検出した。その結果、コントロール群では HDAC4 が核内にあったのに対し、NHE1 高発現群では核外に出ており、それは PE 添加の場合と同レベルであった。また興味深いことに、カリポライドを添加 (10 μM , 3 h) した後同じ細胞をフォ

ローすると、HDAC4 が再び核内に入ることが検出できた。

一方、NFATc の局在パターンは、HDAC4 とは逆に control 群では核外に、NHE1 高発現群では核内に局在し、これも PE 添加群とはほぼ同レベルであった。以上の結果は、NHE1 の活性化だけで、遺伝子発現を調節する CaMKII-HDAC 系ならびに calcineurin-NFAT 系の両方のシグナルが動き得ることを示している。

それでは、Tg マウスにおいて実際、このようなことが起きているのかについて検討した。培養マウス心筋細胞における HDAC4 の発現パターンは、ラットのモデル系と同様、WT で核内に入り、Tg で核外に出ていた。一方、NFATc については、WT では核外に、そして Tg では核内に局在していたものも一部認められたが、入らずに核外にとどまったものも多数存在し、平均では中間的な値を示した。このことは、Tg マウスにおいて、calcineurin-NFAT 系を制御する別のシグナルが関与していることを示唆する。

ところで心肥大関連シグナルのうち、ERK1/2、p38、Akt などが知られているが、Tg マウスにおいて特に p38 が顕著に活性化されており、これはカリポライド投与群で軽減されていた。p38 は calcineurin-NFAT シグナルを抑制する方向に働くことから、Tg マウスにおける calcineurin-NFAT 経路の部分的活性化は p38 活性化のためと考えられる。

以上の結果をまとめると、NHE1 活性化により心肥大・心不全が生じることがわかった。そのメカニズムとして、細胞内 Na^+ 濃度、引き続き細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が生じ、これは、CaMKII および calcineurin を活性化するが、Tg 心筋では p38 が特に活性化されているため、主に CaMKII-HDAC 経路を介して心肥大が導かれると考えられる。一方、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は、CaMKII による PLB のリン酸化、SERCA の活性化を介して SR の Ca^{2+} 量の増加させ、この positive feedback が細胞死を引き起こし、心不全へと導くと考えられる (図参照)。

4. 考 察

現在までに NHE1 が心肥大・心不全、心筋リモデリングなどの病態に関与することを示唆した報告はいくつもあったが、受容体刺激などを介さず NHE1 を直接活性化するだけでこれら心疾患を引き起こすことを示した研究は今回が初めてである。NHE1 はホルモン刺激やストレッチ刺激など様々な要因で活性化されることが知られているが、そ

これらのシグナルを NHE1 は NCX1 とのカップリングにより細胞内 Ca^{2+} シグナルに変換することにより、心疾患形成に大きく寄与しているのではないかと考えられる。

NHE1 の TG マウス心筋細胞では細胞内 pH および Na^+ 濃度の両方が顕著に上昇していたが、私たちは細胞内アルカリ化というよりはむしろ Na^+ 濃度上昇が心肥大などを引き起こす最初のシグナルになるのではないかと考えている。なぜならば、生理的条件下では炭酸イオンが存在するため Na-bicarbonate co-transporter のような NHE1 以外の pH 制御タンパク質が存在するため細胞内 pH は心疾患時でも正常のものあまり変わらないという報告がある一方¹⁰、細胞内 Na^+ 濃度は様々な心肥大・心不全モデル動物などで 1.4 - 2 倍と顕著に増加していることが報告されているからである^{11,12}。TG マウスでは NCX1 の発現量は変わらなかったが、このような Na^+ レベルの増加は NCX1 の driving force を変化させ、相対的に Na^+ しみ出しモード、すなわち Ca^{2+} 流入モードを増加させる。実際に TG 心筋では収縮期、弛緩期いずれも細胞内 Ca^{2+} 濃度が顕著に増加しており、生理的条件下により近い高頻度刺激の際には、さらに増加することが認められた。これは高頻度刺激に伴う細胞膜の脱分極により NCX1 の逆モードがさらに活性化されるためかもしれない。

また今回の研究で、TG 心筋細胞では SR の Ca^{2+} -handling が増加していることを見出した。すなわち NHE1 の活性化により、弛緩期の Ca^{2+} および SR の Ca^{2+} レベルの両方が増加することがわかった。弛緩期の Ca^{2+} 濃度上昇は多くの心不全モデルでも認められ、細胞死につながることを知られているが、SR の Ca^{2+} レベルは一般的にヒトの心不全などでは低いことが報告されている¹³。しかし NHE1 の TG の場合、恒常的に増加する細胞内 Ca^{2+} 濃度と SR の Ca^{2+} -pumping の二つの組み合わせにより最終的に SR の Ca^{2+} -overload が生じ、このこと自身、 Ca^{2+} 依存性プロテアーゼであるカルパインやカスパーゼなどを活性化し細胞死を引き起こすと考えられる¹⁴。すなわち弛緩期、SR の Ca^{2+} 濃度上昇の両方が心不全の原因となると考えられる。

さらに TG 心筋ではヒトの不全心筋で見られるのと同様、negative force-frequency relationship が認められた。すなわち高頻度刺激の際、細胞内 Ca^{2+} 濃度が高いにもかかわらず筋収縮力が低下していた。このことは、筋原繊維の

Ca^{2+} 感受性が低下していることを示唆している。このような例として、心疾患などの際、PKD が活性化され、これがトロポニン I をリン酸化することにより筋原繊維の Ca^{2+} 感受性が低下することが近年、報告されている^{15,16}。興味深いことに NHE1 の TG においてもトロポニン I のリン酸化が認められているため、類似したメカニズムが存在するかもしれない。このような結果は、*in vivo* の実験で fractional shortening が TG 心臓で減少しており、心機能が低下していたことと矛盾が無い。しかしながら *in vivo* heart の実験と単離心筋を用いた実験では、whole heart では死んだ細胞も含まれているのに対し、単離心筋では比較的強い細胞を対象としている点で、病的には前段階の細胞を反映している可能性に注意が必要である。

現在までに非常に多くのシグナル経路が病的な心肥大、心不全に関与していることが知られている。例えば calcineurin、CaMKII、PKC や MAP キナーゼ (ERK42/44、ERK5、p38、JNK)¹⁷ などである。今回、NHE1-TG マウス心筋において、 Ca^{2+} 依存性の心肥大シグナル分子である calcineurin、CaMKII の両方が活性化されており、カリポライド投与群では抑えられていることがわかった。このことは、NHE1 が NCX1 とのカップリングにより、心肥大シグナルの引き金となる Ca^{2+} ソースを提供していることを示す。さらに NHE1 の活性化はその下流の経路である calcineurin-NFAT 系および CaMKII-HDAC4 系の両方を活性化し得ることが新生児ラット培養心筋細胞を用いた系で明らかとなった。このことは心筋膜に存在する NHE1 の活性化の程度により遺伝子発現をも調節できるという新しい概念を示している。一方、TG 心筋細胞では CaMKII-HDAC4 系はフルに活性化されていたものの、calcineurin-NFAT 系は部分的であった。この原因として、calcineurin-NFAT 経路を抑制するいくつかの因子、例えば GSK3 β 、p38、JNK などのうち、特に p38 が TG 心筋で活性化されていることがそのメカニズムの一つとしてあげられる。p38 の活性化は TG 心筋において機械的刺激やストレスにより二次的に生じた可能性もある。以上の結果から、TG 心筋では主に CaMKII-HDAC4 経路の活性化により心肥大・心不全が生じていると考えられる。このことは、NHE1 依存性に心肥大が生じるとされている GC-A KO マウスにおいても CaMKII の活性化が主要なメカニズムと考えられていること⁴、および活性化 CaMKII を高発現するだけで心肥大・心不全や

拡張型心筋症になるという以前の報告¹⁸と矛盾が無い。

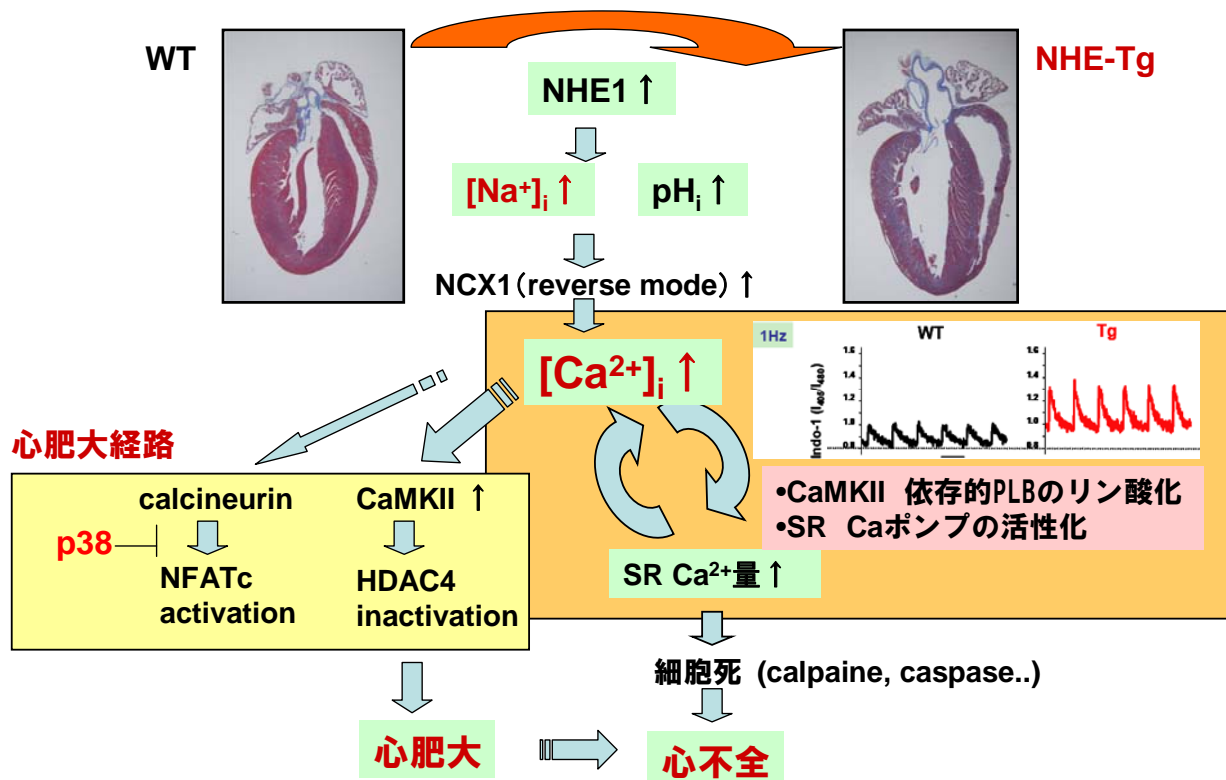
現在までに様々な *in vivo* および *in vivo* の心肥大・心不全モデルにおいて NHE1 活性が上昇しているという報告がある^{4, 5, 19}。また、NHE1 の阻害剤がこれら病態を改善するとの報告もあり²、NHE1 が心筋リモデリングに深い関わりがあることが示唆される。実際、本研究により、NHE1 の活性化だけで心肥大・心不全が引き起こされることが明らかとなった。

しかし、いくつかの点で私たちの実験モデルと他の研究とで違いが認められた。例えば、GC-A KO マウス心筋では心肥大は発症するものの、心不全は生じていない⁴。このことは、たぶん NHE1 の活性化の程度の違いによるものだと考えられる。なぜならば、GC-A KO マウス心筋では、NHE1 の活性化は認められるが、タンパク質の発現量は増加していない。一方、本実験モデルでは p38 の顕著な増加が認められるが、GC-A KO マウス心筋では認められて

いない。ところで p38 が活性化されている MKK3 または MKK6 の TG マウスでは、心肥大は生じないが心不全および拡張型心筋症を様相を呈している²⁰。このことから、心肥大と心不全の発症には、互いに独立したシグナル経路が存在するのではないかと考えられる。NHE1 の TG 心筋では、その両方の経路が活性化されているのかもしれない。

Conclusion として、NHE1 の活性化による細胞内 Na^+ -overload および Ca^{2+} -handling の変化は心肥大・心不全を誘発するのに充分であり、これは主に CaMKII-HDAC 経路を介することが明らかとなった。このような NHE1 の活性化が、一般的に心肥大の形成に必須のものなのかは現在のところ確かでない。しかし本研究により、NHE1 の活性化が心筋リモデリングを引き起こす最初のシグナルとなることは確かである。

NHE1活性化による心肥大・心不全発症のメカニズム



参考文献

1. Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J. Molecular physiology of vertebrate Na^+/H^+ exchangers. *Physiol Rev*. 1997; 77: 51-74.
2. Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusumoto K. The myocardial Na^+/H^+ exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res*. 1999; 85: 777-786.
3. Avkiran M, Marber MS. Na^+/H^+ exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39: 747-753.
4. Kilic A, Velic A, De Windt LJ, Fabritz L, Voss M, Mitko D, Zwiener M, Baba HA, van Eickels M, Schlatter E, Kuhn M. Enhanced activity of the myocardial Na^+/H^+ exchanger NHE-1 contributes to cardiac remodeling in atrial natriuretic peptide receptor-deficient mice. *Circulation*. 2005; 112: 2307-2317.
5. Engelhardt S, Hein L, Keller U, Klambt K, Lohse MJ. Inhibition of Na^+/H^+ exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta₁-adrenergic receptor transgenic mice. *Circ Res*. 2002; 90: 814-819.
6. Wakabayashi S, Ikeda T, Iwamoto T, Pouyssegur J, Shigekawa M. Calmodulin-binding autoinhibitory domain controls "pH-sensing" in the Na^+/H^+ exchanger NHE1 through sequence-specific interaction. *Biochemistry*. 1997; 36: 12854-12861.
7. Wakabayashi S, Bertrand B, Ikeda T, Pouyssegur J, Shigekawa M. Mutation of calmodulin-binding site renders the Na^+/H^+ exchanger (NHE1) highly H^+ -sensitive and Ca^{2+} regulation-defective. *J Biol Chem*. 1994; 269: 13710-13715.
8. Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*. 2002; 109 Suppl: S67-79.
9. Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 2006; 116: 1853-1864.
10. Kusuoka H, Marban E, Cingolani HE. Control of steady-state intracellular pH in intact perfused ferret hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1994; 26: 821-829.
11. Perez NG, de Hurtado MC, Cingolani HE. Reverse mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange after myocardial stretch: underlying mechanism of the slow force response. *Circ Res*. 2001; 88: 376-382.
12. Baartscheer A. Chronic inhibition of Na^+/H^+ -exchanger in the heart. *Curr Vasc Pharmacol*. 2006; 4:23-29.
13. Bers DM, Despa S, Bossuyt J. Regulation of Ca^{2+} and Na^+ in normal and failing cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1080: 165-177.
14. Chen X, Zhang X, Kubo H, Harris DM, Mills GD, Moyer J, Berretta R, Potts ST, Marsh JD, Houser SR. Ca^{2+} influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes. *Circ Res*. 2005; 97: 1009-1017.
15. Cuello F, Bardswell SC, Haworth RS, Yin X, Lutz S, Wieland T, Mayr M, Kentish JC, Avkiran M. Protein kinase D selectively targets cardiac troponin I and regulates myofilament Ca^{2+} sensitivity in ventricular myocytes. *Circ Res*. 2007; 100: 864-873.
16. Avkiran M, Rowland AJ, Cuello F, Haworth RS. Protein kinase d in the cardiovascular system: emerging roles in health and disease. *Circ Res*. 2008; 102: 157-163.
17. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7: 589-600.
18. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Jr., Bers DM, Brown JH. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*. 2003; 92: 912-919.
19. Yokoyama H, Gunasegaram S, Harding SE, Avkiran M. Sarcolemmal Na^+/H^+ exchanger activity and expression in human ventricular myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36: 534-540.
20. Liao P, Georgakopoulos D, Kovacs A, Zheng M, Lerner D, Pu H, Saffitz J, Chien K, Xiao RP, Kass DA, Wang Y. The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 12283-12288.

No. 0737

Pathological Role of the Na⁺/H⁺ Exchanger 1 on the Genesis of Cardiac Hypertrophy and Heart Failure

Tomoe Nishitani, Shigeo Wakabayashi, Yuko Iwata, Takashi Hisamitsu, Youseff Benamar

Department of Molecular Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute

Summary

Activation of the sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE1) is increasingly documented as a process involved in cardiac hypertrophy and heart failure (HF). However, whether NHE1 activation alone is sufficient to induce such remodeling remains unknown. We generated transgenic (Tg) mice that overexpress a constitutively active form of human NHE1 in hearts. The hearts of these mice developed cardiac hypertrophy, contractile dysfunction, and HF. In isolated Tg myocytes, in addition to elevated intracellular pH and Na⁺ concentration, both diastolic and systolic Ca²⁺ levels were significantly increased as a consequence of Na⁺-induced cytoplasmic Ca²⁺-overload; this was accompanied by enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-loading via CaMKII-dependent phosphorylation of phospholamban. Negative force-frequency dependency was observed with preservation of high Ca²⁺, suggesting a decrease in myofibril Ca²⁺-sensitivity. Furthermore, the Ca²⁺-dependent prohypertrophic molecules calcineurin and CaMKII were highly activated in Tg hearts. These effects observed *in vivo* and *in vitro* were largely prevented by administration of the NHE1-specific inhibitor cariporide. Interestingly, overexpression of NHE1 in neonatal rat ventricular myocytes induced cariporide-sensitive nuclear translocation of nuclear factor of activated T cells (NFATc) and nuclear export of histone deacetylase 4 (HDAC4), suggesting that increased cardiac Na⁺/H⁺ exchange activity alters hypertrophy-associated gene expression by activating Ca²⁺-dependent signaling pathways. However, in Tg myocytes, contrary to exclusive translocation of HDAC4, NFAT only partially translocated to nucleus, possibly due to marked activation of p38, a negative regulator of NFAT signaling. We conclude that activation of NHE1 is sufficient to initiate cardiac hypertrophy and HF mainly through activation of CaMKII-HDAC4 pathway.