

学位論文題名

カテコールアミン心筋症における  
心筋アポトーシスに関するシグナル伝達系に関する考察

学位論文内容の要旨

心臓に圧負荷や容量負荷などのさまざまな負荷が加わると交感神経系やレニン・アンギオテンシン系などの代償機構が働き心機能を維持するように適応していくが、その適応破綻による機能不全状態が心不全である。しかし交感神経系の持続的な亢進は心筋障害を起こしうる。ノルエピネフリンやイソプロテレノール(ISO)の投与による心筋障害が報告され、カテコールアミンの過剰投与、過剰分泌により心筋障害をきたしたものをカテコールアミン心筋症と呼ぶようになった。

アポトーシスは多細胞生物に備わった細胞死の一つの様式である。近年心不全患者および各種実験動物モデルにおいて心筋細胞におけるアポトーシスの報告が相次いでいる。 $\beta$ アドレナリン受容体刺激による心筋細胞アポトーシスについては *in vivo* では Shizukuda らが ISO を持続投与したラットにおいて初めて報告した。最近 Saito らが  $\beta$ アドレナリン受容体刺激による心筋細胞アポトーシスには  $Ca^{2+}$ -カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼであるカルシニューリンが重要な役割を果たしていることを報告した。心筋においてカルシニューリンは心筋細胞内  $Ca^{2+}$ の上昇により活性化され、細胞質内にリン酸化されて存在する NF-AT3 を脱リン酸化し活性化し核内へ移行させる。核内へ移行した NF-AT3 は GATA4 と結合し BNP,  $\beta$  MHC 等の転写を亢進させ心筋細胞肥大へとつながると考えられている。Saito らはカルシニューリン阻害剤の FK506 によって ISO 持続投与によるアポトーシスが抑制されることを報告した。これらの報告からカテコールアミンによる心筋障害の要因にアポトーシスが含まれる可能性が示唆される。しかし心筋アポトーシスに関するシグナル伝達系についてはまだ未解明の部分が多い。Shizukuda らや Saito らの系では浸透圧ポンプにより一定量の ISO を持続投与しているが、心不全患者では症状の増悪と緩解を繰り返しながら心不全が進行し、血中カテコールアミン濃度についても一定の値が持続するのではなく一過性の上昇と低下を繰り返すことが知られている。今回我々は比較的高用量の ISO を間歇的に投与したラットモデルを用い、カテコールアミン心筋症における心筋アポトーシスに関するシグナル伝達系について考察した。

実験動物として 19 週齢の Wistar 系ラット (オス, 450g-510g) を使用した。ラットを以下の 4 グループに分けて検討した(各群 3 匹)。ISO 群: ISO 25mg/kg/day をラット背部に 14 日間連続皮下注投与した。CONTROL 群: 0.01N 規定 HCl をラット背部に 1 日 1 回皮下注, 14 日間連続投与した。FK+ISO 群: カルシニューリン阻害剤である FK506 を 17 日間連続筋注投与し (1mg/kg/day), FK506 投与開始 4 日目から 17 日目までの 14 日間, ISO 25mg/kg/day の皮下注を併用した。FK 群: FK506 1mg/kg/day を 17 日間連続筋注投与した。プロトコール終了後 pentobarbital 麻酔下にラット心を摘出した。

我々はアポトーシスの誘導の確認のため、まずアポトーシス実行因子である Caspase の活性化に対し亢進的に働く Bax と抑制的に働く Bcl-2 を Western blot 法により検討した。ISO

投与によりラット心筋における Bax 蛋白発現量の有意な増加と、 Bcl-2 蛋白発現量の有意な減少を認め、 Bax /Bcl-2 ratio は増加していたが、 FK506 投与によってもこの変化を抑制することができなかつた。 さらに Caspase ファミリーの中で最下流に属する Caspase-3 の活性化を、 Western blot 法により検討した。 コントロール群および FK506 単独群では p20 subunits (active form) は検出できなかったが、 ISO 投与群および ISO に FK506 を併用した群において active form が検出された。 次にアポトーシスによる DNA 断片化 (DNA laddering) を検出するために、 ラットから抽出したゲノム DNA の断端に TdT を用いて <sup>32</sup>P-dCTP を付加し、 アガロースゲル電気泳動、 サザンブロット、 オートラジオグラフィーを行った。 ISO 投与により明らかな DNA 断片化が認められたが FK506 は ISO 投与による DNA 断片化を抑制できなかった。 以上の結果から、 ISO 間けつ投与により心筋細胞のアポトーシスは誘導されるが FK506 はこの変化を抑制できないことが示された。

ISO は比較的高用量を間けつ的に投与した場合、  $\beta$  2 刺激作用による血圧低下を引き起こす事が知られている。 我々の系でも ISO (25mg/kg) 皮下注により平均血圧値は 1 分以内に 20% 低下したがその後漸増し皮下注 2 時間後に前値に回復した。 一方  $\beta$  1 刺激による心拍数増加は投与後 24 時間の時点でも認められた。 この結果から ISO による血圧低下に対して、 内因性カテコールアミン、 レニンなどの分泌亢進が生じ血圧の低下が代償されているものと推定される。 よって本研究で使用した ISO 間けつ投与モデルでは  $\beta$  受容体刺激のみではなく  $\alpha$  受容体やアンジオテンシン II 受容体などの Gq を介した系の活性化も引き起こしていると予想される。 in vitro で  $\alpha$  受容体刺激薬である phenylephrine は 2-deoxyglucose により誘導される心筋細胞アポトーシスを抑制する作用があるが、 カルシニューリン阻害剤である CsA の併用投与がこの作用を抑制することが報告されている。 またアンジオテンシン II 刺激は in vitro でアポトーシスを誘導することが報告されている。 一方 G $\alpha$ q を過剰発現するトランスジェニックマウスの心臓では、 アポトーシスが亢進している事が報告されている。 以上のように、 Gq を介する情報伝達経路は全体としてアポトーシスを誘導する方向に働いている可能性がある。

今回我々はラットへ ISO を間けつ的に投与しアポトーシスの誘導したが、 FK506 はこれを抑制できなかった。 FK506 により  $\beta$  受容体刺激によるカルシニューリンの活性化を阻害しても、 カルシニューリン非依存性の (Gq を介した系など) 経路の活性化を FK506 が抑制できず、 その結果としてアポトーシスの誘導を抑制できなかったものと推察された。 本研究によりカテコールアミン心筋症における心筋アポトーシスには、 カルシニューリン非依存性のシグナル伝達系が関与している可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕  
副 査 教 授 川 口 秀 明  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

## カテコールアミン心筋症における

## 心筋アポトーシスに關与するシグナル伝達系に關する考察

申請者が提出した学位論文は、 $\beta$ 受容体アゴニストである Isoproterenol(ISO)をラットに投与し心筋アポトーシスを誘導し、さらにカルシニューリン阻害剤である FK506 を投与し、ISO による心筋アポトーシスに關与するシグナル伝達系に關する検討を加えたものである。最近、浸透圧ポンプによる ISO 投与マウスモデルなどを用いて、ISO による心筋細胞アポトーシスには  $Ca^{2+}$ -カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼであるカルシニューリンが重要な役割を果たしているという報告があった。申請者は Wistar rat に ISO を間欠的に投与したモデルを作成して、ラットを 4 つのグループに分けてアポトーシスについて検討した。CONTROL 群は 0.01N 規定 HCl 1 日 1 回の皮下注を 14 日間連続行った。ISO 群は ISO 25mg/kg/day の皮下注を 1 日 1 回 14 日間連続行った。FK 群はカルシニューリン活性を抑制するために FK506 1mg/kg/day を 1 日 1 回筋注 3 日間の前投与の後、0.01N 規定 HCl および FK506 を 14 日間連続投与した。FK+ISO 群は FK506 1mg/kg/day を 1 日 1 回筋注 3 日間の前投与の後、FK506 および ISO を 14 日間連続投与した。アポトーシスの主経路を制御する Bcl-2 ファミリーには、Bax、Bad などのアポトーシスに亢進的に働くグループと、Bcl-2 などの抑制的に働くグループがあるが、これらの蛋白発現量の変化を Western blot 法により示した。ISO を投与した群にて Bax の増加と Bcl-2 の減少を認めたがおよび Caspase の活性化を Western blot 法により示し、FK506 の併用投与がこれらの変化を抑制できないことを示した。さらにアガロースゲル電気泳動法によりアポトーシスに特徴的な現象である DNA 断片化を検討した。ISO 投与により明らかな DNA 断片化を認めたが、FK506 は ISO 投与による DNA 断片化を抑制できなかった。以上の結果から、ISO 間欠投与により心筋細胞のアポトーシスが誘導されるが FK506 はこの変化を抑制できないことを明らかにした。血行動態的には、ISO の単回皮下投与により血圧は一次的に著明に低下し、その後漸増し回復するが、心拍数の増加は投与 24 時間後まで持続していた。この結果から ISO の  $\beta_2$  作用による血圧低下に対して、反射性に内因性交感神経活性やレニン・アンジオテンシン系などが亢進し、血圧の低下が代償されているものと推定している。このことより、ISO 間欠投与モデルでは、カルシニューリンの系のみではなく、カルシニューリン非依存性のシグナル伝達系の活性化も生じていることが予想される。FK506 により ISO 投与によるアポトーシスを抑制できなかったが、このことは ISO によるアポトーシスがカルシニューリンの経路のみならず、カルシニューリン以外の経路によっても制御されていることを示している。よってカテコールアミン心筋傷害に際しての心筋細胞アポトーシスの抑制にあたっては、カルシニュー

ーリンだけではなく、同時に活性化される交感神経活性や液性因子に対しても考慮する必要性がある。

学位論文の発表に際し、副査の川口教授から ISO により誘導される心筋細胞アポトーシスにおいて考えられるカルシニューリン以外の経路についての質問があった。次いで副査の長嶋教授から心不全において誘導される心筋アポトーシスの意義や実験モデルの妥当性についての質問があり、最後に主査の北畠教授からカルシニューリン阻害による心肥大抑制効果について質問があった。申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識により、概ね適切に回答し得た。質疑応答の時間は約 15 分であった。

この論文は、分子生物学的解析手法を用いて、カテコールアミン刺激によるアポトーシスにおいて、カルシニューリン以外の経路の関与を明らかにし、今後の $\beta$ 受容体刺激によるアポトーシスのシグナル伝達経路についての検討に示唆と方向性を与えた点で高く評価される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。