

静水圧負荷による心筋細胞での前癌遺伝子の発現亢進

学位論文内容の要旨

背景：心筋細胞は終末分化した細胞であり、増殖刺激が加わっても分裂することはなく、細胞個々の容積の増大、即ち肥大を呈することが知られている。臨床的には、心肥大は冠動脈疾患・心室性頻脈性不整脈・心臓突然死等の独立した危険因子であり、現在においてもなお循環器領域の主要な課題である。循環動態上の過負荷が心肥大・心筋細胞肥大形成の主要な原因ではあるが、そのメカニズムはいまだ解明されていない。心筋細胞肥大の分子機構を明らかにするためには、生体が持つ様々な代償機構や二次的反應の影響を取り除いた *in vitro* 実験システムを構築する必要がある。培養心筋細胞に純粋な機械的刺激を加える負荷モデルとしては、培養細胞ストレッチモデルが広く用いられている。しかし、生体内における心筋細胞は、過伸展ばかりでなく隣接する細胞や細胞外基質による圧縮を受けているにも関わらず、この圧縮の過程の影響を検証するための *in vitro* 実験システムは未構築だった。今回、我々は培養心筋細胞に静水圧負荷を加え、肥大プログラムの誘導の有無と、それに関わる細胞内シグナル機構を検討した。

方法：静水圧負荷による培養液のガス組成の変化を予備的に検討したところ、負荷時間の増加とともに培養液の pH は上昇したが、15 分毎に培養液を交換することで既出の報告と同程度の変化に留められることを確認した。生後 0 日齢の新生仔ラットの心室を摘出、酵素法にて心筋細胞を単離した。密度勾配遠心分離法で心室筋細胞を分離し 37°C, 5% CO₂ 下で培養した。無血清下で 24 時間培養した後、加圧チャンバーに移し静水圧負荷を加えた。負荷終了後、細胞から total RNA またはタンパクを抽出し、半定量的 RT-PCR 法または Western blot 法により c-fos の発現を検討した。また、心筋細胞肥大に関与するシグナルの検討には Cyclosporine A (CsA)・Genistein・Nifedipine・PD98059・Rapamycin・SB203580・Staurosporine・Valsartan・Wortmannin を培養液に加えた後に静水圧負荷を加え、半定量的 RT-PCR 法により c-fos mRNA の発現量を検討した。

結果：160mmHg の静水圧負荷により c-fos mRNA 発現は 60 分(15 分×4 サイクル)後より無負荷のコントロールに比して有意に亢進した。80・100・120・140・160mmHg の異なる圧負荷を 60 分間加えたところ、c-fos mRNA 発現は 80mmHg 負荷の段階から亢進した。蛋白レベルの検討でも c-fos は負荷時間・負荷圧の増加によりコントロールに比して有意に発現が亢進していた。静水圧負荷が c-fos の発現亢進、即ち心筋細胞肥大を来す機序を検討するため、各種細胞膜受容体・イオンチャンネル拮抗薬または細胞内シグナリング阻害薬で心筋細胞を薬理的に処置した後に 160mmHg の静水圧負荷を 60 分(15 分×4 サイクル)間加えた。

用いた9種の薬剤のうち CsA と Nifedipine のみが c-fos mRNA の発現を抑制した。

考察：出生後の心筋細胞は細胞周期が停止しており、各種の刺激に対して肥大を呈することが知られている。アドレナリン受容体刺激で培養心筋細胞に肥大が生じることが報告されて以来、種々の神経体液性因子や虚血等の刺激、圧負荷等の機械的刺激が *in vitro* で心筋細胞肥大を促すことが示されている。しかし、神経体液性因子の影響を排した条件下で、純粋な圧負荷刺激が心筋細胞をどのように変化させるかは知られていない。培養細胞に *in vitro* で機械的刺激を加える実験手法の一つに細胞ストレッチモデルがあるが、この技術を心筋細胞に応用した報告が1990年に成され、伸展刺激により心筋細胞内で c-fos mRNA 発現とアミノ酸取込の双方が亢進することが示された。しかし、生体内の拍動心で心筋細胞に加わる機械的刺激をこのモデルのみで説明することは困難で、*in vivo* の拍動心において心筋細胞が収縮期に曝されている圧縮刺激を正確に反映する *in vitro* の実験モデルは検討されていなかった。本研究において、我々は静水圧負荷を培養細胞に加える実験システムを初めて心筋細胞に応用した。本システムの利点として、被刺激細胞と圧縮物との直接の接触がなく細胞が変形しないこと、加わる負荷の大小が被刺激細胞と培養液との接触状態に依存しないこと、細胞質内と培養液との間の代謝産物転送に生理的な障害を来たさないことが挙げられている。チャンバー内の気圧上昇により培養液中の気体分圧が変化することが欠点だが、本実験ではチャンバー内圧を最大 160 mmHg に留め、15分毎の培養液の交換により培養液の pH 変化を既出の報告と同程度に抑えられることを見出した。よって、本実験システムは、心筋細胞が収縮期に受ける圧縮負荷の影響を、神経体液性因子の影響を排した純粋な *in vitro* の環境下で検討するモデルとして妥当なものと言える。今回、我々は静水圧負荷後の心筋細胞肥大の指標として c-fos の発現亢進の有無を検討した。半定量的 RT-PCR 法と Western blot 法により c-fos が mRNA レベルと蛋白レベルの双方で負荷時間・負荷圧の増加により発現亢進することが示された。この結果により、静水圧負荷が心筋細胞肥大プログラムを誘導することを明らかに出来た。ストレッチモデルを用いた検討によると、伸展刺激後の心筋細胞内では PKC, Tyk, Ras, Rho family, MAPK family, JAK/STAT family 等の多様なシグナル分子群の活性が亢進していることが示されている。本実験システムが心筋細胞を肥大させる機序を検討するため、負荷前から細胞に薬理的処置を加え、負荷後の c-fos mRNA 発現を半定量的 RT-PCR 法で評価した結果、Ca チャンネル拮抗薬と Calcineurin 阻害薬が c-fos 発現を抑制した。これにより、静水圧負荷による圧縮刺激が心筋細胞肥大を来すためには、細胞内 Ca の上昇と Calcineurin の活性亢進が必要であり、NFAT3 と GATA4 による転写の活性亢進により肥大マーカー遺伝子が発現することが推定された。ストレッチモデルでの検討からは、伸展刺激により開口するイオンチャンネルの存在が指摘されている。静水圧負荷によっても同様のイオンチャンネルが活性化し、その結果として L-type Ca チャンネルを介する細胞外 Ca の流入が亢進している可能性が推定され、今後の更なる検討を要する。

結語：本実験により、細胞の形態変化を及ぼさない純粋な圧負荷を心筋細胞に加えることで、心筋細胞肥大の指標である c-fos の発現が亢進することが初めて示された。また、各種薬剤のうち、カルシウムチャンネル拮抗薬と Calcineurin 阻害薬が c-fos 発現を抑制したこ

とから、この心筋細胞肥大モデルに関与する細胞内シグナリングとして Ca / Calcineurin / NFAT / GATA4 のカスケードが強く関与することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 島 顕

副 査 教 授 川 口 秀 明

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

静水圧負荷による心筋細胞での前癌遺伝子の発現亢進

心筋細胞は終末分化した細胞で、増殖刺激下でも分裂せず、肥大を呈することが知られている。臨床的には、心肥大は冠動脈疾患・心室性頻脈性不整脈・心臓突然死等の独立した危険因子であり、現在においてもなお循環器領域の主要な課題とされている。循環動態上の過負荷が心肥大・心筋細胞肥大形成の主要な原因ではあるが、そのメカニズムはいまだ解明されていない。心筋細胞肥大の分子機構を検討するためには、生体が持つ様々な代償機構や二次的反応の影響を除いた *in vitro* の実験系を構築する必要がある。培養心筋細胞に純粋な機械的刺激を加える実験系として細胞ストレッチモデルが汎用されている。しかし、拍動心内の心筋細胞は過伸展ばかりでなく隣接する細胞や細胞外基質による圧縮を受けているにも関わらず、この圧縮の影響を検証するための *in vitro* の実験系は未構築だった。本研究では培養心筋細胞に静水圧負荷を加え、肥大プログラムの誘導の有無と、それに関わる細胞内シグナル機構を検討した。加圧用チャンバーを独自に作成し、窒素ガス充填により静水圧負荷を加えることとしたが、負荷に伴う培養液のガス組成の変化を予備的に検討したところ、負荷時間の増加とともに培養液の pH は上昇したものの、15分毎に培養液を交換することで既出の報告と同程度の変化に留められることを確認した。生後 0 日齢の新生仔ラットの心筋細胞を単離し 37°C・5% CO₂ 下で培養した。無血清下で 24 時間培養した後、加圧チャンバーに移し静水圧負荷を加えた。負荷終了後、細胞から total RNA またはタンパクを抽出し、半定量的 RT-PCR 法または Western blot 法により *c-fos* の発現を検討した。また、心筋細胞肥大に関与するシグナルの検討には Cyclosporine A・Genistein・Nifedipine・PD98059・Rapamycin・SB203580・Staurosporine・Valsartan・Wortmannin を培養液に加えた後に 160mmHg の静水圧負荷を 60 分間加え、半定量的 RT-PCR 法により *c-fos* mRNA の発現量を検討した。以上の方法での検討から、160mmHg の静水圧負荷により *c-fos* mRNA 発現が 60 分後よりコントロールに比して有意に亢進することを見出した。また、80・100・120・140・160mmHg の異なる圧負荷を 60 分間加えたところ、*c-fos* mRNA 発現は 80mmHg 負荷の段階から亢進していた。蛋白レベルの検討でも *c-fos* は負荷時間・負荷圧の増加によりコントロールに比して有意に発現が亢進していた。更に、先述の各種シグナリング阻害薬のうち、Cyclosporine A と Nifedipine のみが *c-fos* mRNA の発現を抑制した。本研究により、細胞の形態変化を及ぼ

さない純粋な圧負荷を心筋細胞に加えることで、心筋細胞肥大の代表的指標である c-fos の発現が亢進することが初めて示され、圧縮負荷が心筋細胞肥大プログラムを誘導する可能性が示唆された。また、各種薬剤のうち、カルシウムチャンネル拮抗薬と Calcineurin 阻害薬が c-fos 発現を抑制したことから、この心筋細胞肥大モデルに関与する細胞内シグナリングとして Calcineurin / NFAT3 / GATA4 のカスケードが強く関与することが示唆された。

口頭発表に際し、川口教授から加圧チャンバー内への窒素ガス充填に伴う細胞毒性の評価とアンジオテンシン II 1 型受容体遮断後の同 2 型受容体と心筋細胞肥大の関わりと培養液のアルカリ化による細胞への影響についての質問がなされた。次いで長嶋教授から培養心筋細胞の協調拍動の機序と肥大心筋細胞で c-fos が発現する機序についての質問がなされた。最後に北畠教授から培養心筋細胞が圧縮負荷を感知する機構についての質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果にもとづいて、或いは文献的知識により、概ね妥当な回答を行った。

この論文は心筋細胞への圧縮負荷を *in vitro* で検討するモデルを確立し、それが肥大プログラムを誘導することを示し、更に、その背景に Calcineurin / NFAT3 / GATA4 系が関与することを明らかにしたものとして意義のあるものと評価され、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取得単位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。