

氏 名	お 小 川 え み こ が わ 恵 美 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2428 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	フイブロネクチンの心筋細胞肥大作用とその応答領域に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 米 田 正 始 教 授 月 田 承 一 郎 教 授 中 尾 一 和

論 文 内 容 の 要 旨

心筋細胞肥大, 線維芽細胞の増殖, およびフィブロネクチンやコラーゲンなどの細胞外マトリックスの増生は, 心肥大や心筋梗塞後に認められる心室リモデリングで, 常に観察される現象である。これまで, 心筋細胞肥大の原因として液性因子の関与が注目され, 多くの研究がなされてきたが, 細胞外マトリックスの増生は, 主として線維芽細胞の増殖に伴った受動的な現象とのみ捉えられており, 心筋細胞肥大への能動的な関与については全く解明されていなかった。しかし, 心筋細胞以外の多くの細胞系では, フィブロネクチンがインテグリンレセプターと結合して, 細胞外から細胞内へシグナルを伝達し細胞増殖に関与していることが数多く報告されている。この様な視点に立ち, 本研究の目的はフィブロネクチンの心筋細胞肥大への関与を明らかにし, その応答経路を解明することである。

1. フィブロネクチンの心筋細胞肥大に及ぼす効果

フィブロネクチンで表面をコーティングした培養皿を用いて, 単離したラット新生仔心室筋細胞を培養し, 心筋細胞肥大作用を検討した。コーティングを行った培養皿で培養した心筋細胞は, アクチンフィラメントの重合を伴い, 細胞面積は有意に増大した。また, 蛋白合成の増加, 心房性および脳性ナトリウム利尿ペプチド (ANP 及び BNP) の mRNA 発現及び細胞培養液中への分泌増加が認められ, フィブロネクチンの心筋細胞肥大作用が確認された。一方, フィブロネクチンとそのインテグリンレセプターとの結合を RGD ペプチド配列依存性に阻害する GRGDSP ペプチド, 或いは抗インテグリン抗体を添加することにより, これら細胞肥大は抑制された。更に, フィブロネクチンコーティングにより, 細胞膜周囲へのインテグリン $\beta 1$ とその裏打ち蛋白であるピンキュリンの局在が認められ, FAK のリン酸化が確認されたことにより, フィブロネクチンによる細胞肥大は, インテグリンレセプターを介していることが明らかになった。

2. フィブロネクチン応答経路の解明

フィブロネクチンの肥大反応にあずかる細胞内機序を明らかにする目的で, フィブロネクチンの BNP mRNA 発現亢進反応に注目してさらに検討を加えた。

BNP 遺伝子の基本転写は, これまでに報告されている転写活性化因子による正の調節に加え, 遺伝子転写調節領域 -550 から -530 塩基に存在する Nuron-Restrictive Silencer Element (NRSE) 類似配列により負の調節 (抑制) を受けていることが明らかにされた。NRSE にはサブレッサーである Neuron-Restrictive Silencer Factor (NRSF) が結合して, 転写を抑制することがグリア細胞等で報告されているが, 心筋細胞においても, ゲルシフトアッセイより, NRSF が BNP 遺伝子の NRSE 配列に結合していることが証明された。

フィブロネクチン刺激に対しても, レポーターアッセイの結果, NRSE 配列が転写活性の上昇に寄与していることが示された。また, NRSE のみを欠失した変異型レポーター遺伝子を用いることや, 優勢変異型 NRSF を同時添加することにより, フィブロネクチンによるレポーター活性の上昇は抑制され, ゲルシフトアッセイにても, フィブロネクチン刺激下で NRSE 配列と NRSF の結合が抑制されることが確認された。以上のことから, フィブロネクチン刺激では, BNP 遺伝子上

の NRSE 配列への NRSF の結合が抑制されることにより遺伝子転写抑制を解除され、BNP 遺伝子転写を亢進することが明らかになった。

本研究により心室リモデリングにおける細胞外マトリックスの増生が心筋細胞肥大に直接関与していることが証明され、フィブロネクチン刺激下では肥大反応における新たな調節機序である NRSE/NRSF 系の関与が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は心室リモデリングにおいて認められる心筋細胞肥大とフィブロネクチン増生に注目し、フィブロネクチンの心筋細胞肥大への関与とその応答経路を解明したものである。培養心筋細胞を用いて、フィブロネクチンがインテグリンを介して心筋細胞肥大を惹起し、同時に、肥大時に発現亢進する心筋特異的胎児型遺伝子の代表である BNP 遺伝子が発現亢進することを証明した。また、BNP 遺伝子の基本転写が 5' 転写調節領域に存在する Neuron-Restrictive Silencer Element (NRSE) 類似配列により負に調節（抑制）されていることを解明した。次に、フィブロネクチン刺激下では、NRSE 配列に結合してサプレッサーとして働く Neuron-Restrictive Silencer Factor (NRSF) の NRSE 類似配列への結合が抑制され、NRSE 類似配列依存性の転写抑制が解除されることにより BNP 遺伝子転写が亢進することを、優勢劣性型 NRSF 変異体を用いて証明した。フィブロネクチンは心室リモデリングにおいて受動的な存在と捉えられていたが、本研究により、フィブロネクチンが心筋細胞肥大に能動的に関与していること、さらに、その応答経路としての NRSE/NRSF 系を介した新たな経路が提唱された。

以上の研究はフィブロネクチンの心肥大への関与の解明に貢献し、今後の心室リモデリングの成因解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は、博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成14年1月9日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。