

氏 名	吉 田 善 紀
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3160 号
学位授与の日付	平 成 19 年 11 月 26 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	CCN1 protects cardiomyocytes from oxidative stress via β 1 integrin-Akt pathway (CCN1 はインテグリン β 1-AKT 経路を介して酸化ストレスから心筋細胞を保護する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 間 昭 典 教 授 千 葉 勉 教 授 淀 井 淳 司

論 文 内 容 の 要 旨

現在の治療では十分な効果を得られない重症心血管系疾患の治療において効果的な再生治療の開発が強く望まれている。血管および心臓の再生作用を持つ因子を探索するため、マウス胎生期の心外膜細胞を培養する系を確立し、培養心外膜細胞の発現遺伝子の解析を行った。本研究においては解析された遺伝子のなかからヘパリン結合性細胞外マトリックスタンパクである CCN1 に着目した。

CCN1 は血管新生や細胞の生存にかかわる分泌タンパクである。CCN1 のマウス心臓における発現を *in situ hybridization* で確認すると、胎生中期には心外膜、および心筋に発現が見られるが、胎生後期には発現は弁膜にのみ局限され心筋には発現が認められない。心筋梗塞ラットにおいては心筋梗塞近傍部において CCN1 の発現が認められることがこれまでに報告されていた。ラット培養心筋細胞に過酸化水素刺激を行うと CCN1 の mRNA 発現が上昇することを確認した。CCN1 の心筋細胞に対する作用は知られていなかったため、本研究において CCN1 の心筋細胞に対する効果について検討した。バキュロウィルスにより昆虫細胞 Sf-9 の培養上清中に CCN1 タンパクを分泌させ、コンビナント CCN1 タンパクを精製した。このリコンビナント CCN1 を固相化させたプレートによる心筋細胞の固相化結合実験において CCN1 は心筋細胞と用量依存性に結合し、レンチウィルスにより心筋細胞の β 1 インテグリンをノックダウンすることによりこの結合は抑えられた。これらの結果により CCN1 は心筋細胞と β 1 インテグリンを介して結合することが示唆された。次にレンチウィルスによる RNAi をもちいて培養心筋細胞において内因性 CCN1 をノックダウンしたところ酸化ストレスに対して生存する細胞は減少した。逆にレンチウィルスにより CCN1 を培養心筋細胞において過剰発現させることで、過酸化水素による酸化ストレスに対して生存する細胞が増えた。またリコンビナント CCN1 を培養心筋細胞に $2 \mu\text{g/ml}$ の濃度で投与することにより、同様の細胞死抑制作用が認められた。TUNEL 染色においても TUNEL 陽性細胞は有意に減少しアポトーシスを抑制していることが確かめられた。これらの結果により CCN1 は培養心筋細胞の酸化ストレスによる細胞死を抑制することが示唆された。次にウェスタンブロット法によりリコンビナント CCN1 の投与により心筋細胞では Akt、FAK および ERK1/2 のリン酸化が誘導されることを確認した。 β 1 インテグリンをノックダウンすることにより AKT、ERK の CCN1 によるリン酸化は抑えられた。また内因性 CCN1 をレンチウィルスによる RNAi をもちいてノックダウンすることにより AKT のリン酸化は抑えられた。PI-3-kinase の阻害薬である Wortmannin および ERK の阻害薬である PD98059 の前処置をおこない CCN1 投与をおこなうと、過酸化水素による細胞死の抑制効果は PD98059 により部分的に抑えられ、Wortmannin により完全に抑えられた。これらの結果より CCN1 の心筋細胞における細胞保護効果は主に AKT を介していることが示された。本研究により培養心筋細胞において CCN1 は酸化ストレスによりその発現が誘導され、主にインテグリン β 1-Akt 経路を介して心筋細胞保護効果をもつことが示唆された。この CCN1 は血管新生作用を持つことが知られており、本研究により明らかにされた心筋細胞保護効果と合わせて心疾患に対する治療に有用である可能性がある。

論文審査の結果の要旨

ヘパリン結合性細胞外マトリックス蛋白である CCN1 はヒトおよびマウス、ラットにおいて心筋梗塞近傍部において発現が認められることが報告されているが、心筋細胞に対していかなる効果をもつのかは知られていなかった。本研究では、ラット培養心筋細胞に過酸化水素刺激を行うと CCN1 の mRNA 発現が上昇することを明らかにし、リコンビナント CCN1 を用いた固相化結合試験により CCN1 が心筋細胞と直接結合することを示した。培養心筋細胞に対するリコンビナント CCN1 の添加又はレンチウイルスによる CCN1 の過剰発現によって、酸化ストレスによる心筋細胞死及びアポトーシスが抑制され、逆に CCN1 の RNA 干渉によるノックダウンにより細胞死が増加した。これらの作用は、心筋細胞でのインテグリン β 1 のノックダウンにより消失した。また CCN1 の投与により心筋細胞において FAK、ERK、AKT のリン酸化が促進され、PI-3-kinase の阻害薬である Wortmannin の前処置によって CCN1 の過酸化水素による細胞死抑制効果は抑えられた。これらの結果より培養心筋細胞において CCN1 は酸化ストレスによりその発現が誘導され、主としてインテグリン β 1、AKT を介して細胞保護効果をもつことが示された。

以上の研究は心臓の病的状態における CCN1 の機能の解明に貢献するとともに、心疾患に対する治療への応用も期待されるものである。

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 19 年 10 月 5 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。