

氏 名	え はら なつ ひこ 江 原 夏 彦
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2837 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 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	Activators of PPAR γ antagonize protection of cardiac myocytes by endothelin-1 (PPAR γ の活性化はエンドセリン-1による心筋細胞の保護的効果に拮抗する) (主 査)
論文調査委員	教 授 米 田 正 始 教 授 野 間 昭 典 教 授 米 原 伸

論 文 内 容 の 要 旨

心筋細胞は、胎生時期には活発に分裂、増殖を続け高度に分化するが、出生と同時にその増殖能をほぼ失う。このため、病的な状態で心筋へ容量負荷や圧負荷が加わると心筋細胞は増殖ではなく肥大により代償する。この代償機構には限界があり、負荷の継続は心筋細胞アポトーシスによる細胞数の低下を招き、心機能は低下し非代償性心不全へと移行する。それ故、心筋細胞アポトーシスの調節の解明は心不全治療の新たな展開をもたらす重要な課題の一つである。

心筋細胞においては、エンドセリン-1 (ET-1) 刺激により、アポトーシスの抑制が起きる。これは ET-1 刺激に引き続いて起きる細胞内カルシウム濃度の上昇が、細胞質に存在するカルシニューリンを活性化し、活性型カルシニューリンは転写因子である nuclear factor of activated T lymphocyte (NFAT) と結合し、NFAT の核内移行を促進し、bcl-2 の発現を増加させるためであると報告されている。peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) はリガンド依存性に活性化される核内受容体型転写因子であり、脂肪や糖代謝において細胞の分化や増殖に関与している。T リンパ球において PPAR γ の活性化は NFATc の DNA 結合および転写活性を阻害することが報告されている。しかし、心筋細胞アポトーシスにおける PPAR γ の関与は十分に解明されていない。そこで、心筋細胞において PPAR γ の活性化が ET-1 依存性カルシニューリン/NFAT 経路を阻害し、bcl-2 蛋白の発現を介した ET-1 の抗アポトーシス効果を抑制するか否かを新生児マウス心筋細胞を用いて検証した。

アポトーシスに伴う DNA の二本鎖切断を検出する方法として TUNEL 染色を、アポトーシス早期に認められる細胞膜内面に存在する phosphatidylserine の細胞膜表面への露出を検出する方法として Annexin V 染色を用いて、まず、アポトーシスの形態学的検出を行った。活性酸素の一種である過酸化水素は心筋細胞のアポトーシスを誘導することが報告されているが、TUNEL 染色、Annexin V 染色のいずれにおいても過酸化水素により約40%の心筋細胞にアポトーシスが誘導され、ET-1 はこれを約20%にまで抑制したが、PPAR γ のリガンドである 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) とトログリタゾン¹は ET-1 による抗アポトーシス効果を打ち消した。ウエスタンブロッティングでは、ET-1 刺激により抗アポトーシス蛋白である bcl-2 蛋白の約2倍の発現亢進が認められたが、15d-PGJ₂ とトログリタゾンはその発現をコントロールレベルにまで抑制した。その他のアポトーシスに関与する蛋白である bax, bcl-xL, bad においては、15d-PGJ₂ とトログリタゾンはそれらの蛋白の発現に影響を及ぼさなかった。抗 NFATc 抗体を用いた免疫蛍光染色では、ET-1 刺激による内因性 NFATc の核内への移行はトログリタゾンにより阻害されなかったが、bcl-2 プロモーターの NFATc 結合部位を用いたゲルシフトアッセイにおいて、トログリタゾンは ET-1 による NFATc1 の bcl-2 プロモーターへの DNA 結合能亢進を阻害した。

以上より、新生児マウス心筋細胞において PPAR γ の活性化が ET-1 依存性カルシニューリン/NFAT 経路を阻害し、ET-1 の抗アポトーシス効果を抑制することが示された。

論文審査の結果の要旨

エンドセリン-1 (ET-1) 刺激に引き続く細胞内カルシウム濃度の上昇は、カルシニューリン活性化及びそれに続く NFAT の核内移行を促進し、抗アポトーシス蛋白である bcl-2 蛋白の発現を増加させ心筋細胞アポトーシスを抑制すると報告されているが、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) の心筋細胞アポトーシスへの関与は検討されていない。新生児マウス心筋細胞を用いて心筋細胞アポトーシスへの PPAR γ の関与を検討した。TUNEL 染色及び Annexin V 染色を用いた検討では PPAR γ のリガンドである 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) とトログリタゾンは ET-1 による抗アポトーシス効果を打ち消した。ET-1 により bcl-2 蛋白の発現亢進が認められたが、15d-PGJ₂ とトログリタゾンはその発現を抑制した。トログリタゾンは ET-1 による内因性 NFATc の核内への移行は阻害しなかったが、ET-1 による NFATc の bcl-2 プロモーターへの DNA 結合能亢進を阻害した。以上より、PPAR γ の活性化が ET-1 依存性カルシニューリン/NFAT 経路を阻害し、ET-1 による抗アポトーシス効果を抑制することが示された。本研究は心筋細胞アポトーシス機構の解明に貢献し、心不全の病態解明に寄与するところが多い。

従って、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17年2月8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。