

氏名	かわむらてるひさ 川村晃久
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医博第2761号
学位授与の日付	平成16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	Expression of p300 protects cardiac myocytes from apoptosis <i>in vivo</i> (p300の発現は心筋細胞で、アポトーシスに対して抑制的に作用する)

論文調査委員 (主査) 教授 米田正始 教授 藤田潤 教授 北 徹

### 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し、出生と同時にその増殖能を喪失する。このため、病的な状態で心筋へ容量負荷あるいは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移行する。それ故、心筋細胞生死の調節を解明することは心不全治療の新たな展開をもたらす重要な課題のひとつである。そこで、アデノウイルス癌蛋白E1Aの標的の一つであり、転写因子コファクターとして機能し心臓の発生や分化に関する分子p300に着目した。心筋細胞にE1Aを発現させp300の機能を阻害するとアポトーシスが誘導されるのに対し、p300結合ドメインを欠損させた変異体E1Aにはアポトーシス誘導能がないことが報告されている。しかし、p300が心筋細胞において直接的に細胞生存に関与するか否かは依然不明である。そこで、心臓特異的p300過剰発現マウスを作成し、心臓におけるアポトーシス関連蛋白の発現変化や、ドキソルビシン(Dox)誘発心筋細胞アポトーシスが軽減されるか否かを検証した。

6kb  $\alpha$ -ミオシン重鎖遺伝子プロモーターにより統制された遺伝子は胎児期の心室筋には発現しないが成人の心室筋において特異的に発現する。そこでこのプロモーターの下流にp300 cDNAを組み込み、成人心筋に特異的にp300を発現させたトランスジェニックマウスを作成した。8週令では野生型(WT)とトランスジェニックマウス(TG)の心臓で、重量(心体重比)、組織学的所見、心エコーによる心機能に有意な差は見られなかった。8週令のWTおよびTGに、Dox(15mg/kg/day)を2日間、コントロールには生理食塩水(SS)を腹腔内注射(i.p.)した。初回i.p.72時間後の心臓(左室)のウェスタンブロットでは、WTにおけるp300の蛋白発現がDox群で約1/4に減少していた。一方、TG(SS群)のp300の発現はWT(SS群)の約9倍と過剰発現しており、Dox群においてもWT(SS群)の約5倍と高発現が維持されていた。次に左室の心筋細胞アポトーシスをDNA ladder assay, caspase-3活性, TUNEL染色で、アポトーシス関連蛋白の発現変化をウェスタンブロット法により検証したところ、TGでは野生型マウスと比べ心臓の抗アポトーシス分子bcl-2の発現が約6倍に亢進しており、ドキソルビシン誘発心筋細胞アポトーシスが軽減されていた。さらに、Dox誘発心筋症がTGで改善されているか否かを調べるため、生存率および、心エコーによる心機能解析を施行した。Dox i.p.後、6日目の生存率は、WTが22%でTGが75% (line 39), 67% (line 21)と、TGで有意な生存率の改善を認めた。死亡したマウスには肺うっ血と胸水の貯留を認め死因は心不全であることが示唆された。さらに、初回i.p.後5日目の心エコーを施行したところ、WTのみDox投与により有意な左室径の拡大と、著明な左室短縮率の低下を認め、TGではDoxによる心収縮不全が改善されていることが判明した。

以上より、p300は心筋細胞で、アポトーシスに対して抑制的に作用し、その過剰発現はドキソルビシン心筋障害モデルにおいて心収縮不全および生存率を改善することが示された。

## 論文審査の結果の要旨

アデノウイルス E1A 結合蛋白の一つ p300 は転写因子コファクターとして機能し、細胞特異的遺伝子発現を介して細胞の分化、増殖に関与する。一方、E1A を心筋細胞に発現させた p300 の機能阻害実験から、p300 が心筋細胞ではアポトーシス抑制に関与することが示唆される。しかし、in vivo において病態生理学的な刺激により誘導される心筋細胞アポトーシスを p300 が直接的に抑制するかどうかは不明である。この仮説を証明するため、心筋特異的に p300 を過剰発現するトランスジェニックマウス (TG) を作成した。このマウスは 8 週令では野生型 (WT) と比べ心臓に組織学および機能的な差を認めなかったが、抗腫瘍薬ドキソルビシン (DOX) 投与により誘発される心筋細胞アポトーシスは抑制されており、抗アポトーシス蛋白 bcl-2 の発現が亢進していた。さらに、p300 および心筋特異的収縮蛋白のひとつである cardiac- $\alpha$ -actin の発現が DOX 投与により WT で著明に低下するのに対して TG では発現が維持されていた。心エコーより認められる左室収縮不全と、それによる生存率の低下が TG では改善されており、DOX 誘発心筋症のモデルで p300 の発現を維持することが心不全憎悪の防止に重要であることが示唆された。

以上の研究は、心不全病態の解明に貢献し、核内転写調節を標的とした新たな治療の開拓に寄与することが多い。

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16年3月8日実施の論文内容とそれに関連した研究分野ならびに学識確認のための試問を受け合格と認められたものである。