

氏 名	やな づめ てつ ひこ 築 詰 徹 彦
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2578 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	Rho/ROCK pathway contributes to the activation of extracellular signal-regulated kinase/GATA-4 during myocardial cell hypertro- phy (Rho/ROCK 経路は心筋細胞肥大において extracellular signal-regulated kinase/GATA-4の活性化に寄与する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 尾 一 和 教 授 野 間 昭 典 教 授 北 徹

論 文 内 容 の 要 旨

心筋細胞は胎生期には活発に増殖・分裂を繰り返すが、出生とともにその分裂能を失う。出生後心筋細胞は様々な刺激に対し肥大を起こすが、肥大は蛋白合成の量的な増加だけでなく、エンドセリン-1 (ET-1) の心室における発現など、心筋遺伝子発現の質的变化によって特徴づけられる。この過程は心筋機能不全と密接に関連し、この過程の解明は心不全の分子生物学レベルでの解明に有用である。低分子 GTPase である Rho は、心筋細胞において様々な細胞骨格依存性の細胞機能や、伸展・Gq 蛋白誘導性の肥大反応を仲介する。Rho のエフェクターの一つである ROCK が肥大反応を仲介することが示唆されてきたが、Rho/ROCK とその下流のシグナルの関係は知られていない。一方、心筋細胞肥大の核内情報伝達において GATA 転写因子が重要な役割を果たしていること、そのリン酸化に MAP kinase の一種である extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) が関与し、これが心肥大反応における ET-1 遺伝子の発現増加に必要であることが報告されたため、今回 Rho/ROCK シグナルが下流の GATA-4 に連結するか検討した。

この目的のために我々は ROCK の選択的阻害薬である Y-27632 を用いた。新生児 rat 培養心筋細胞を調整し、 α_1 -交感神経刺激剤である Phenylephrine (PE) または対照として生食を加えた。Y-27632 は 3-10 μ M の濃度で PE による心筋細胞横径の増大を有意に抑制した。ノーザンブロッティングによる検討では、Y-27632 は PE による心筋特異的な肥大マーカーである β -myosin heavy chain, atrial natriuretic factor 遺伝子の発現の誘導を有意に抑制した。心筋細胞を用いて transient transfection assay により ET-1 遺伝子のプロモーター活性を求めたところ、Y-27632 は PE による ET-1 プロモーター活性の増加を有意に抑制した。次に COS 細胞を用いて transient transfection assay により ET-1 遺伝子のプロモーター活性を求めたところ、GATA-4,5 の強制発現により ET-1 プロモーター活性は強く亢進した。また、同時に ROCK の dominant negative 変異体または active 変異体を強制発現させると、ET-1 プロモーター活性はそれぞれ有意に抑制、亢進した。PE 又は対照として生食を加えた NIH3T3 細胞および心筋細胞から核蛋白を回収しウエスタンブロット法を施行したところ、心筋細胞では Y-27632 は用量依存的に PE によって誘導される ERK1/2 のリン酸化を抑制したが、NIH3T3 細胞ではこの抑制はごくわずかに認められるにすぎなかった。心筋細胞において Y-27632 が GATA-4 の DNA 結合能を修飾するか確認するために核蛋白を抽出し ET-1 プロモーター上の GATA-4 結合部位を含むオリゴヌクレオチドをプローブとして electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を施行したところ、Y-27632 は PE によって誘導される心筋 GATA-4 の DNA 結合活性の増大を 3 μ M の濃度で有意に抑制したが、p53 の DNA 結合活性には影響を与えなかった。

近年、アクチンのトレッドミルが ROCK の基質の一つである LIM kinase を介して核へ到達するシグナルの収斂点であることが報告されたため、アクチンのダイナミクスが PE によって誘導される Rho/ROCK を介する ERK/GATA-4 の活性化に役割を果たすか検討した。PE または対照として生食を加えた心筋細胞から核蛋白を回収しウエスタンブロット法を施行したところ、アクチンの重合を抑制する Latrunculin B は用量依存的に PE によって誘導される ERK1/2 のリン酸化を

抑制した。また、PE 又は対照として生食を加えた心筋細胞から核蛋白を抽出し ET-1 プロモーター上の GATA-4 結合部位を含むオリゴヌクレオチドをプローブとして EMSA を施行したところ、Latrunculin B は PE によって誘導される心筋 GATA-4 の DNA 結合活性の増大を 100nM の濃度で有意に抑制したが、p53 の DNA 結合活性には影響を与えなかった。更に、Latrunculin B は PE によって誘導される心筋細胞横径の増大および筋原繊維構築を有意に抑制した。

以上より、 α_1 -交感神経刺激による心筋細胞肥大反応において、Rho/ROCK 経路は ERK1/2 を介して転写因子 GATA-4 の活性化に寄与すること、また Rho/ROCK 経路から下流のシグナルへ至る収斂点としてアクチンのダイナミクスが関与していることが示された。

論文審査の結果の要旨

心筋細胞内で低分子 GTPase Rho は ROCK を介して様々な肥大反応を仲介する。一方、心筋細胞肥大の核内情報伝達に GATA 転写因子が重要な役割を果たしており、そのリン酸化に extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) が関与し、これが肥大反応におけるエンドセリン-1 (ET-1) 遺伝子の発現増加に必要と判明した。そこで、Rho/ROCK シグナルが下流の ERK/GATA-4 に連結するか検討した。ROCK の選択的阻害薬 Y-27632 はフェニレフリン (PE) 刺激による心筋細胞径の増大、肥大マーカー遺伝子発現の誘導、ET-1 プロモーター活性の増加、ERK1/2 のリン酸化、及び心筋 GATA-4 の DNA 結合活性の増大を有意に抑制した。アクチン重合抑制剤 Latrunculin B は PE 刺激による ERK1/2 のリン酸化、心筋 GATA-4 の DNA 結合活性の増大、心筋細胞径の増大・筋原繊維構築を有意に抑制した。以上の結果から、 α_1 交感神経刺激による心筋細胞肥大反応において Rho/ROCK 経路は ERK1/2 を介して GATA-4 の活性化に寄与すること、また Rho/ROCK 経路から下流のシグナルへ至る収斂点としてアクチンのダイナミクスが関与していることが示された。以上の研究は心肥大の分子生物学レベルでの解明に貢献し、心肥大に対する新たな治療法の開発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15年2月4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。