

|           |                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | かん だ ひろし<br>神 田 宏                                                                                                                                                                                                                                       |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                                                                               |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2389 号                                                                                                                                                                                                                                            |
| 学位授与の日付   | 平成 13 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    | A nuclear complex containing PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ is markedly downregulated in the hypertrophied rat left ventricular myocardium with normal systolic function.<br>(正常収縮能を有するラット左室肥大心筋における PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ 核内複合体の著明な downregulation) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 中 尾 一 和    教 授 米 田 正 始    教 授 篠 山 重 威                                                                                                                                                                                                      |

### 論 文 内 容 の 要 旨

肥大及び不全心筋に於いて脂肪酸代謝酵素の遺伝子発現が一様に低下していることを示す研究結果が数多く報告されているが、その分子学的機序については未だよく分かっていない。Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) は、脂質代謝関連遺伝子群の転写調節において中心的な役割を担う核内受容体である。PPAR は retinoid X receptor (RXR) と heterodimer を形成し、この複合体が peroxisome proliferator response element (PPRE) と呼ばれる特異的な DNA 配列を認識し結合することによって標的遺伝子の転写調節が行われる。この経路に於ける転写レベルでの調節が心肥大の病態に関与しているかどうかを調べる為、既知の functional PPRE を含む acyl-CoA synthetase (ACS) 遺伝子の C promoter を用いて reporter gene assay を行ったところ、phenylephrine により肥大を誘導した培養ラット心筋細胞ではこのプロモーター活性が著明に低下していることが分かった。次に、PPAR/RXR 複合体の in vivo での心肥大への関与を仮定し、同じく C-ACS promoter 中の PPRE 配列を用いて electrophoretic mobility-shift assay (EMSA) を行ったところ、12週齢雄 Wistar ラット左室心筋組織より抽出した核蛋白中にこの配列を特異的に認識する component が存在することが明らかとなり、更に supershift experiment の結果から、この component は抗 PRXR  $\alpha$  抗体及び抗 RXR  $\alpha$  抗体に immunoreactive であることも判明した。引き続き、この component が心肥大時に何らかの調節を受けている可能性を考え、代償性心肥大期にある11週齢雄食塩感受性 Dahl (DS) ラットと心肥大を来していない同週齢同性の食塩抵抗性 Dahl (DR) ラットから左室心筋核蛋白を抽出し同様に EMSA を行い比較したところ、DS では著明な downregulation を受けていることが明らかとなった。最後に、この downregulation がどのレベルで起きているかを調べる目的で、DS 及び DR の左室心筋組織より抽出した同じ核蛋白を用いて Western blotting を行ったが、PPAR $\alpha$ , RXR $\alpha$  各々の発現量に両者で差は認められなかった。これらの結果から、ラットの左室心筋には PPAR $\alpha$  及び RXR $\alpha$  を含む核内複合体が存在し、心肥大時に於いてはこの複合体の統合性が失われる為に PPAR 応答遺伝子群の転写活性が低下し、このことが脂肪酸代謝酵素遺伝子の発現量低下に結びついて行くのではないかと推察された。また、こうした event は心肥大の非代償期への移行に先行して起きていることから、PPAR が肥大心筋の脂質から糖質へのエネルギー基質スイッチ現象の初期の fundamental な調節機構に関与していることを示唆しているのではないかと考えられた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

肥大及び不全心筋に於ける脂肪酸代謝酵素遺伝子発現低下の分子学的機序については未だ不明の点が多い。本論文は核内受容体型転写因子 PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) がこの過程に関与していることを示す実験的根拠を与えるものである。第一に、脂肪酸代謝の key enzyme である acyl-CoA synthetase (ACS) の C promoter に reporter gene を付加した recombinant plasmid construct 及び control vector を培養心筋細胞に cotransfect し phenylephrine 肥大刺

激を与えると C-ACS promoter activity が低下することが示され、転写レベルの調節機序の存在していることが明らかにされた。第二に、正常ラット左室心筋組織より抽出した核蛋白中に PPAR 応答塩基配列 (PPRE) を特異的に認識する component があることが electrophoretic mobility-shift assay (EMSA) を用いて証明され、更にこの component には PPAR  $\alpha$  及びその heterodimeric partner である RXR (retinoid X receptor)  $\alpha$  が含まれていることも示された。第三に、心肥大のモデル動物である Dahl salt-sensitive (DS) rats 及びその control である Dahl salt-resistant (DR) rats より同様に抽出した核蛋白を用いて行われた EMSA の結果から代償性心肥大期にある DS rats の左室心筋に於いてこの核内複合体が著明に downregulate されていることが見い出された。加えて、この downregulation が PPAR $\alpha$  及び RXR $\alpha$  の翻訳後調節機序によって起きていることを示唆する実験結果も示されている。

以上の研究は心疾患の重要な危険因子である心肥大の病態の解明に貢献し医学の進展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13年2月26日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。