

氏 名	かぶら ぎ さと し 鎢 木 敏 志
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1747 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 2 項 該 当
学位論文題目	The role of endothelin-converting enzyme-1 in the development of $\alpha 1$ -adrenergic-stimulated hypertrophy in cultured neonatal rat cardiac myocytes (培養心筋細胞肥大におけるエンドセリン変換酵素の役割に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 尾 一 和 教 授 篠 山 重 威 教 授 野 間 昭 典

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】種々の血行動態的ストレスに対して心臓は肥大という形で代償機転を作用させる。しかし、ストレスの継続によりこの心肥大という代償機構は破綻をきたし、心臓は収縮機能不全に陥る。この心機能不全は種々の心疾患の共通最終像であり、この問題を解決することは臨床的に極めて重要であるが、代償から心不全へ至る詳細な分子機構は明らかではない。

エンドセリン-1 (ET-1) は培養内皮細胞より単離された血管収縮物質として発見されたがその後、局所における成長因子として代償性心肥大から心不全への移行に重要な役割を果たしている可能性が示唆され注目されている。一方、ビッグエンドセリン-1 (big ET-1) を ET-1 に変換するエンドセリン変換酵素 (ECE-1) は、正常時の心筋細胞ではその発現は認められていない。big ET-1 はその活性が(=)ET-1 の 1/100 と低いので、ECE-1 による変換は ET-1 の活性発現において重要なステップであると考えられる。今回、 $\alpha 1$ -交感神経刺激による心筋細胞の ET-1 産生亢進に ECE-1 が関与しているかどうかを、培養心筋細胞で検討した。

【方法】生後 1-2 日の新生 S-D ラットより心筋細胞を回収分離し、培養 24 時間後に、生食で刺激した群を control として、 10^{-4} M Phenylephrine (PE) で ET-1 産生を心筋細胞に刺激し、各種検討を行った。

【結果】 10^{-4} M PE 刺激後、抗 ET-1 抗体を用いて免疫染色を行ったところ PE により培養心筋細胞で ET-1 の発現が著明に誘発されていた。

培養液中の ET-1 濃度と big ET-1 濃度を酵素免疫法により定量したところ、培養液中の ET-1 濃度は PE により有意に上昇していたが、big ET-1 濃度は PE による上昇は認めなかった。

ECE-1 遺伝子の心筋細胞での発現を RT-PCR 法により半定量した。ECE-1 の発現は PE による刺激 3 時間後より control の 3.6 倍に上昇し、12 時間後も上昇した状態を維持し、48 時間後には control とほぼ同様のレベルになっていた。

ECE-1 が PE 刺激による蛋白合成増加に関与しているかどうかを検討する目的で ECE-1 の特異的阻害剤である FR901533 を用い、心筋細胞の蛋白合成能はフェニルアラニン取り込み率により定量した。control 群を 100% として比較すると、PE 投与群で取り込み率は 80% の増加を認め、FR901533 投与によりこの取り込み率の増大は 18% に抑制された。

心肥大の遺伝子レベルでの指標として PE による β -myosin heavy chain (β -MHC) 遺伝子と ANF 遺伝子のプロモーター活性の上昇に ECE-1 が関与しているかどうかを検討した。 β -MHC promoter を組み込んだルシフェラーゼ遺伝子と ANF promoter を組み込んだルシフェラーゼ遺伝子用心筋細胞内に transfection し、48 時間培養後にルシフェラーゼアッセイを行った。 β -MHC 活性は control 群と比較して PE により約 2 倍に増加し、FR901533 を加えることによりこの増加はほぼ完全に抑制された。ANF promoter 活性は control 群と比較して、PE により約 5 倍の増加を認めたが、FR901533 を加えてもこの上昇は抑制されなかった。

【総括】ECE-1 による big ET-1 から ET-1 への変換は心筋細胞肥大において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、心筋細胞肥大におけるエンドセリン-1 (ET-1) の産生亢進においてエンドセリン変換酵素 (ECE-1) が関与しているかどうかを、培養心筋細胞で検討した。新生 S-D ラットより心筋細胞を回収分離し培養24時間後に生食で刺激した群を control として、 10^{-4} M Phenylephrine (PE) で心筋細胞を刺激し、各種検討を行った。

培養液中 ET-1 濃度は PE により有意に上昇していたが、big ET-1 濃度は PE による上昇は認められず、PE により big ET-1 から ET-1 の変換が亢進していた。ECE-1 遺伝子の発現を RT-PCR 法により半定量したところ、ECE-1 は PE による刺激3時間後より上昇し、12時間後も上昇した状態を維持し、48時間後には control とほぼ同様のレベルになっていた。PE により心筋細胞の蛋白合成能は増加し、ECE-1 の特異的阻害剤である FR901533 投与により蛋白合成能の増大は抑制された。 β -MHC プロモーター活性は PE により有意に増加し、FR901533 投与によりこの増加はほぼ完全に抑制された。ANF プロモーター活性は PE により優位な増加を認めたが、FR901533 を加えてもこの上昇は抑制されなかった。以上の結果より ECE-1 による big ET-1 から ET-1 への変換は心筋細胞肥大において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

以上の研究は心肥大から心不全への進展機転に関するエンドセリン変換酵素の関与の解明に貢献し、心不全の病態の理解・治療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試問を受け、合格と認められたものである。