

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	長 央 和 也
論文題目	Neural cell adhesion molecule is a cardioprotective factor up-regulated by metabolic stress (Neural cell adhesion molecule は代謝ストレスで誘導される心臓保護因子である)		
(論文内容の要旨)			
膜型蛋白や分泌蛋白には、薬剤が到達しやすい、血液中濃度を測定することでバイオマーカーとしての利用が期待できる、などの利点がある。こうした蛋白をスクリーニングする方法はシグナルシークエンストラップと呼ばれ、発生や分化に関わる様々な遺伝子が同定されてきた。 一方、近年、虚血性心疾患のみならず、高血圧や心筋症による不全心においても、細胞内エネルギー枯渇、すなわち代謝ストレスが病態の進行に大きく関わることが再認識されつつある。 そこで、H9C2 ラット心筋芽細胞に対し、ミトコンドリアATP産生阻害剤であるオリゴマイシンの刺激により、H9C2のATPレベルが減少し、代謝ストレスが惹起されることを確認した後、オリゴマイシンの刺激により誘導される膜蛋白、分泌蛋白をシグナルシークエンストラップ法を用いてスクリーニングし、NCAM (neural cell adhesion molecule, CD56) という膜蛋白を候補遺伝子として同定した。 H9C2におけるNCAMの発現の変化をリアルタイムPCR法、およびウエスタンブロッティング法を用いて確認したところ、オリゴマイシンの投与によって時間依存性に増加することが確認された。また、NCAMはマウス心筋梗塞モデルにおいて、梗塞領域と非梗塞領域の境界域に残存する心筋細胞において強い発現増加を認めた。さらに、心肥大から心不全に至る心臓リモデリングの過程におけるNCAMの発現変化を高食塩感受性ダールラットモデルを用いて調べた結果、肥大期から心不全期にかけて著しい発現増加を認めた。この発現増加は、肥大心における左室内腔に面した側の線維化領域周辺から始まり、心不全期では全域にわたって強い発現を認めることが確認された。 次に、心筋細胞におけるNCAMの働きを調べるためにNCAMに対するRNAiを作成し、H9C2の内因性NCAMをノックダウンした。その結果、H9C2の増殖がコントロールに比して低下することが観察され、またオリゴマイシン投与下では、NCAMをノックダウンしたグループで、生存率が有意に低下することが確認された。 初代ラット新生児心筋細胞においても、NCAMの発現はH9C2同様オリゴマイシン刺激により増加し、この増加反応はP38活性依存性であることが確認された。さらにオリゴマイシン投与下での生存率を確認したところNCAMをノックダウンしたグループでは有意に生存率の低下を認めた。			

以上のことから心筋細胞においてNCAMは、オリゴマイシン投与下で細胞生存に寄与することが確認された。

NCAMのホモフィリック結合を担うドメインを4量体で構成したペプチドP2dはNCAMに結合し刺激することでNCAMのシグナル伝達及び機能をmimicすることが知られている。そこでP2dで初代ラット新生児心筋細胞を刺激したところ、NCAMの下流シグナルであるAKTは濃度依存性に活性化を認めた。更にP2d存在下で、オリゴマシシン刺激を行ったところ細胞死は有意に抑制され、この効果はPI3K阻害薬投与及びAKTのドミナントネガティブ体の発現により打ち消された。

以上の結果から、NCAMは心筋細胞において、代謝ストレスにより誘導される膜蛋白であり、AKT経路に関与し、細胞保護的に働くことが示唆された。NCAMは、代謝ストレスの関わる広範の心臓病態における新たな治療ターゲットとなり得ると考えられる。

（論文審査結果の要旨）

H9C2ラット心筋芽細胞において、ミトコンドリアATP産生阻害剤であるオリゴマイシンの刺激により誘導される膜型蛋白や分泌蛋白をシグナルシークエンストラップ法によりスクリーニングし、そのひとつとしてNCAM (neural cell adhesion molecule) という膜型蛋白を同定した。NCAMはマウス心筋梗塞モデルにおける梗塞領域と非梗塞領域の境界域に残存する心筋細胞や、高食塩感受性ダールラットにおける心臓リモデリングの過程において著しい発現増加を認めた。NCAMに対するRNAiを用いて、H9C2の内因性NCAMをノックダウンすると細胞増殖が低下し、またオリゴマイシン投与下で生存率が低下することが確認された。さらに、NCAMをノックダウンした細胞ではオリゴマイシン投与下で有意に生存率が低下した。

NCAMのホモフィリック結合を担うドメインの4量体で構成されたペプチドP2dを用いて初代ラット新生仔心筋細胞を刺激したところ、NCAMの下流シグナルであるAKTの活性化を認め、更にオリゴマイシン刺激による細胞死をAKT依存性に抑制することが確認された。

以上の研究は心筋細胞におけるNCAMの機能の解明に貢献し新たな心不全治療戦略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22年2月1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。