



Title	Dad1はインテグリンのN型糖鎖修飾を制御することで細胞接着障害性心筋細胞死を抑制する
Author(s)	森, 翔太
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/101939
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (森 翔太)	
論文題名	Dad1はインテグリンのN型糖鎖修飾を制御することで細胞接着障害性心筋細胞死を抑制する
論文内容の要旨	
<p>心不全は世界的に主要な死因の1つであることから、心不全に対する新規治療法の開発が求められる。心筋細胞は生後間もなく増殖能力を失うため、心筋梗塞などにより心筋細胞死が誘導されると、心筋細胞はほとんど再生せず心不全へと発展する。本研究では、心筋細胞死を抑制することは新規心不全治療戦略になりうると考え、新規細胞死抑制遺伝子を探査した。</p> <p>まず、健常マウスの心臓を用いたcDNAマイクロアレイ解析により、anti-apoptosisのtermを有する遺伝子群を選択し、心臓での発現量が多い順に候補遺伝子を抽出した。その中で、心臓での報告が少ない4種類の遺伝子を選択し、新生仔ラット心筋細胞 (neonatal rat cardiomyocytes : NRCM) にsiRNAを導入する事でノックダウンを行い、心筋細胞死が誘導されるかをスクリーニングした。その結果、Defender against cell death 1 (Dad1) の発現抑制が心筋細胞死を誘導した。また、Dad1発現抑制時にはcleaved caspase3の発現量が増加したことから、Dad1発現抑制による心筋細胞死はアポトーシスであることが明らかになった。一方、他の細胞においてDad1は小胞体ストレス誘導性アポトーシスを抑制することが報告されていたが、Dad1発現抑制によって小胞体ストレスマーカーGRP78の発現量は変化しなかったことから、小胞体ストレスとは異なるメカニズムにより誘導されるアポトーシスであることが示唆された。また、Dad1発現抑制時の心筋細胞は、integrin β 1欠損心筋細胞で見られる筋原線維形成喪失の表現型が確認されたことから、細胞接着との関連性が示唆された。</p> <p>Dad1はタンパク質のN型糖鎖修飾を担うオリゴ糖転移酵素 (oligosaccharyltransferase : OST) 複合体のサブユニットの1つであり、OST複合体の安定化に寄与している。また、N型糖鎖修飾は細胞接着タンパク質の重要な翻訳後修飾であり、細胞・基底膜間の接着障害はアノイキス (anoikis) と呼ばれる特殊なアポトーシスを誘導する事が知られている。そこで、心筋細胞で高発現するインテグリンであるintegrin β 1、integrin α 5、integrin α 1に対するDad1の影響を調べた。その結果、Dad1の発現抑制は、不完全なN型糖鎖修飾に由来するintegrin β 1およびintegrin α 5の分子量低下が確認された。また、Dad1発現抑制により、インテグリンなどからシグナルを伝達するキナーゼタンパク質であるfocal adhesion kinase (FAK) の不活性化と、FAKからのシグナルを伝達するアダプタータンパク質であるpaxillinの減少が確認された。</p> <p>Dad1発現抑制による心筋細胞死が細胞接着障害に由来するものであるかを詳細に確認するため、細胞接着促進剤adhesamineを添加し、心筋細胞死の改善効果を評価した。その結果、Dad1発現抑制によるFAKの不活性化とアポトーシスの誘導はadhesamine添加によって改善された。また、基底膜を構成する主要なタンパク質であるfibronectinやcollagen type IVを培養プレートにコートすることによっても同様にDad1発現抑制によるアポトーシスを改善した。fibronectinやcollagen type IVによる生存細胞数の増加は、Dad1発現抑制による心筋細胞死が誘導されない細胞播種24時間後では変化しなかったことから、fibronectinやcollagen type IVによる保護効果は細胞接着の強化によるものであることが示された。一方で、これらの細胞接着の促進はintegrin β 1の分子量低下を改善しなかったことから、細胞接着の強化はインテグリンのN型糖鎖修飾を改善しないまま細胞・基底膜間の解離を抑制した結果、Dad1発現抑制による心筋細胞死を改善させることが示唆された。</p> <p>Staurosporine and temperature sensitive 3A (Stt3A) はOST複合体の触媒サブユニットの1つとして知られている。Dad1発現抑制がN型糖鎖修飾を抑制するメカニズムを調べるため、OST複合体の触媒サブユニットであるStt3Aの発現を調べたところ、Dad1発現抑制によりStt3Aの発現量がタンパク質レベルで減少した。そこで、siRNAを用いてStt3Aの発現を抑制した結果、Stt3Aの発現抑制によってもカスパーゼの活性化を伴う心筋細胞死が誘導された。また、Stt3Aの発現抑制においてもDad1のタンパク質発現量が減少した。一方で、Dad1とStt3Aの両者を同時に発現</p>	

抑制した場合、一方のみを発現抑制した場合と比較して更なる細胞死は誘導されなかったことから、Dad1とStt3Aは相互依存的にOST複合体の機能を維持し、心筋細胞死を抑制していることが示された。最後に、Stt3A発現抑制時における細胞接着への影響を評価した。その結果、Stt3Aの発現抑制によって、integrin β 1及びintegrin α 5のN型糖鎖修飾異常に伴う分子量低下とFAKの不活性化が確認され、Stt3A発現抑制による心筋細胞死はDad1発現抑制と同じメカニズムであることが明らかになった。

Dad1はintegrin β 1やintegrin α 5のN型糖鎖修飾を介して細胞・基底膜間の接着を維持することで、FAKの活性化を介した心筋細胞生存に寄与することが明らかになった。また、Dad1とStt3Aは互いのタンパク質発現に関与しており、相互依存的にOST複合体のN型糖鎖修飾機能を制御することで、心筋細胞生存性を維持することが明らかになった。以上より、Dad1が心筋細胞死の抑制を機序とした心不全治療標的になりうる可能性を見出した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (森 翔太)	
	(職) 氏名
論文審査担当者	主査 教授 藤尾 慈
	副査 教授 橋本 均
	副査 教授 深田 宗一朗

論文審査の結果の要旨

心筋細胞死による心筋細胞数の減少は、心不全発症・進展の重大な原因となる。本論文の著者は、内因性の心筋保護メカニズムの理解と新規心不全治療法の開発を目指して、新たな心筋細胞保護機構の探索を行った。具体的には、著者が実施したcDNA microarrayにおいて心臓での高発現が確認できる遺伝子の中から、文献上細胞死への関与が報告されているもの心筋細胞での重要性が報告されていない4遺伝子を抽出した。次に、培養心筋細胞において、それら4遺伝子をそれぞれノックダウンし、心筋細胞の生存性が低下する遺伝子として、オリゴ糖転移酵素のサブユニットの一つであるDad1を選出した。以上の結果に基づき、本研究では、著者は、培養心筋細胞におけるDad1の機能を詳細に検討した。

著者は、Dad1をノックダウンすると、心筋細胞死が誘導されるとともに、心筋細胞のサルコメア構造が乱れること、また、細胞面積が減少することを見出した。このような表現型は、インテグリン β 1遺伝子欠損マウスの心筋細胞の表現型と酷似していることから、著者は、Dad1のノックダウンがインテグリンに与える影響を検討した。その結果、Dad1のノックダウンにより、不完全な糖鎖修飾を受けたインテグリン β 1、 α 5が出現し、あわせて、focal adhesion kinase (FAK)の活性化が抑制されることを見出した。これらのこととは、Dad1が、インテグリンのN型糖鎖修飾を介して、基質・細胞接着の維持に寄与することを示唆するものである。また、ファイプロネクチンあるいはタイプIVコラーゲンをコーティングした培養プレートでは、Dad1ノックダウンによる細胞死が抑制されたことから、インテグリンを介した細胞接着が、心筋細胞の生存に重要であることが裏付けされた。

また、著者は、作用機序として、Dad1のノックダウンがオリゴ糖転移酵素の酵素活性を有するサブユニットであるStt3Aの発現を低下させること、さらに、Stt3Aのノックダウンは、Dad1の発現を低下させるとともに、Dad1のノックダウンと同様の表現型を心筋細胞に惹起することを見出した。これらのこととは、Dad1がオリゴ糖転移酵素を安定化させ、N型糖鎖修飾を制御することを示している。

以上、本研究は、次の点において極めて新規性が高い研究であると言える：

1. オリゴ糖転移酵素による新たな心筋恒常性維持機構を解明するものであること
2. インテグリンのN型糖鎖修飾にオリゴ糖転移酵素が関与することを示した最初の報告であること
3. 心筋細胞において、インテグリンのN型糖鎖修飾に関わる研究はこれまでになく、循環器学において新たな研究領域を開拓するものであること

これらのことから、本論文は、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。