Osaka University Knowledge Archive

Title	Involvement of NF-κB and ASK1 in G-Protein Coupled Receptor Agonist-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy
Author(s)	廣谷, 信一
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43696
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏　　名	廣（ひろ）谷（たに）信（しん）一（いち）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16850　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学　位　論　文　名	Involvement of NF-κB and ASK1 in G-Protein Coupled Receptor Agonist-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy （G蛋白質共役受容体アゴニストによる心筋細胞肥大におけるNF-κBとASK1の関与）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　多田　道彦 （副査） 教　授　堀　　正二　　教　授　白倉　良太

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

心肥大は心臓疾患の独立した危険因子であり、心血管死の危険性を有意に上昇させることが疫学調査より明らかにされている。心肥大は、圧・容量負荷、アンジオテンシンII、エンドセリンやカテコラミンなどの神経体液性因子やサイトカインなどで惹起されることが知られているが、その機序については充分に明らかにされていない。近年、生体のストレス応答において活性酸素種が細胞内情報伝達分子として重要な役割を果たすことが明らかになってきた。アンジオテンシンIIによる心筋細胞肥大に活性酸素種が深く関与していることが報告されたが、その分子機構については、全く明らかにされていない。

本研究ではG蛋白質共役受容体（GPCR）アゴニストによる心筋肥大において、活性酸素種反応性が高い二つの因子、すなわち転写因子NF-κBとmitogen-activated protein kinase kinase kinaseであるapoptosis signal-regulating kinase 1（ASK1）の関与を検討した。

【方法】

酵素法を用いてラット新生仔心筋細胞を単離した。心筋細胞内の活性酸素種産生は活性酸素種感受性蛍光色素である2',7' dichlorofluorescein（DCF）を負荷し、蛍光強度を測定することにより評価した。NF-κB活性化は、κB依存性ルシフェラーゼ活性および抗IκBα抗体を用いたウエスタンブロット法により評価したIκBαの分解を指標とした。心筋細胞肥大はファロイジン染色下の細胞面積の測定とサルコメア形成の評価、[^{3}H] ロイシンの細胞内取り込み、心肥大の分子マーカーであるANFの免疫染色をもって評価した。アデノウイルスベクターはアゴニスト刺激24時間前に、心筋細胞に感染させた。ASK1活性はMKK6（mitogen-activated protein kinase kinase 6）を基質としたin vitro kinase assayにより測定した。

【結果】

1．GPCRアゴニストによる活性酸素種の産生

GPCRアゴニスト刺激により5分以内にDCFの蛍光強度の増加が検出され、時間経過と共に増加した。15分時点でのコントロールに対する蛍光強度の増加はアンジオテンシンII（20±4.2%）、エンドセリン-1（45±3.5%）、フェ

ニレフリン（43±2.8%）であった。

2．GPCR アゴニストによる NF-κB の活性化

GPCR アゴニストによって容量依存性にκB 依存性ルシフェラーゼ活性の増加およびIκBαの分解が認められた。これら NF-κB 活性化は抗酸化剤 N-acetyl cysteine（NAC）、N-mercaptopropionyl glycine、vitamin E の投与により抑制された。

3．NF-κB の心肥大への影響の検討

IκBαの分解抵抗性変異体（degradation resistant mutant）を組み込んだアデノウイルス（AdIκBα32/36A）の感染により GPCR アゴニストによる心筋細胞の細胞面積増大、サルコメア形成の亢進、ANF の発現、[^{3}H] ロイシンの取り込みは抑制された。

4．ASK1の GPCR アゴニストによる活性化

GPCR アゴニストにより 5 -10分でピークとなる ASK1活性化が認められた。この活性化は抗酸化剤 NAC の前処置により抑制された。

5．ASK1の NF-κB 活性化および心筋肥大への関与

ASK1の恒常活性体アデノウイルス AdASK-ΔN の心筋細胞への感染によりκB 依存性ルシフェラーゼ活性の増大並びにIκBαの分解が生じた。ASK1のドミナントネガティブ体アデノウイルス AdASK（KM）を心筋に感染させておくと GPCR アゴニストによる NF-κB の活性化は著明に抑制された。AdASK-ΔN は細胞面積の増大、サルコメアの形成亢進、ANF の産生、[^{3}H] ロイシンの取り込み亢進を惹起した。一方 AdASK（KM）の感染により GPCR アゴニストによる肥大反応が抑制された。AdASK-ΔN による心筋細胞肥大は AdIκBα32/36A を共感染することにより抑制された。

【総括】

心筋細胞においてアンジオテンシンⅡ、エンドセリン-1、フェニレフリンにより活性酸素依存性に ASK1および NF-κB が活性化されることが明らかとなった。さらにこれらアゴニストによる心筋細胞肥大にはこの ASK1を介した NF-κB の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

G蛋白質共役受容体（GPCR）アゴニストによる心筋細胞肥大に活性酸素種が重要な役割を果たしていることが報告されていたが、その細胞内情報伝達機構については全く明らかにされていなかった。

本研究は、ラット新生仔心筋細胞を用いて GPCR アゴニストであるアンジオテンシンⅡ、エンドセリン1、フェニレフリンによる心筋細胞肥大における活性酸素種を介する細胞内情報伝達機構について検討したものである。その結果、GPCR アゴニストにより活性酸素種依存性に NF-κB の活性化が惹起されること、そして、この NF-κB の活性化が心筋細胞肥大に重要な役割を果たしていることを明らかにした。NF-κB はサイトカインの産生あるいは細胞生存に関わることが報告されていたが、本研究ではじめて心筋細胞肥大に関わる転写因子の一つであることが明らかとなった。さらに、細胞死や分化に関わる分子として知られていた活性酸素種依存性 mitogen-activated protein kinase kinase kinase である apoptosis signal-regulating kinase 1（ASK1）が GPCR アゴニストにより活性酸素種を介して活性化され、ASK1を介する NF-κB の活性化が心筋細胞肥大に関与することも明らかとなった。

以上の知見は、心血管死の独立した危険因子である心肥大の発症機構を解明する上で極めて重要な知見であり、学位の授与に値すると考えられる。