



Title	Involvement of NF- κ B 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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	ひろ たに しん いち 廣 谷 信 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 8 5 0 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- κ B 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- κ B 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十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- κ B 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- κ B 活性化は、 κ B 依存性リソフェラーゼ活性および抗 I κ B α 抗体を用いたウェスタンブロット法により評価した I κ B α 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、 $[^3\text{H}]$ 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 $\pm$ 4.2%)、エンドセリン-1 (45 $\pm$ 3.5%)、フェ

ニレフリン ($43 \pm 2.8\%$) であった。

2. GPCR アゴニストによる NF- κ B の活性化

GPCR アゴニストによって容量依存性に κ B 依存性ルシフェラーゼ活性の増加および I κ B α の分解が認められた。これら NF- κ B 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- κ B の心肥大への影響の検討

I κ B α 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 (AdI κ B α 32/36A) 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- κ B 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- Δ N の心筋細胞への感染により κ B 依存性ルシフェラーゼ活性の増大並びに I κ B α 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- κ B の活性化は著明に抑制された。AdASK- Δ N 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- Δ N による心筋細胞肥大は AdI κ B α 32/36A 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- κ B 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- κ B 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- κ B の活性化が惹起されること、そして、この NF- κ B 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- κ B 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- κ B 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。