



Title	Involvement of Reactive Oxygen Species-mediated NF- $\kappa$ B Activation in TNF- $\alpha$ -induced Cardiomyocyte Hypertrophy
Author(s)	樋口, 義治
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43886">https://hdl.handle.net/11094/43886</a>
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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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	樋口義治
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第17591号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Involvement of Reactive Oxygen Species-mediated NF- $\kappa$ B Activation in TNF- $\alpha$ -induced Cardiomyocyte Hypertrophy (TNF- $\alpha$ により誘導される心筋細胞肥大における、活性酸素種を介したNF- $\kappa$ B活性化の関与)
論文審査委員	(主査) 教授 堀正二 (副査) 教授 谷口直之 教授 祖父江憲治

### 論文内容の要旨

#### [目的]

腫瘍壞死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) は慢性心不全、虚血/再灌流障害、心筋炎等において細胞障害や細胞死に関わっている。一方で近年、TNF- $\alpha$ が心筋細胞肥大を惹起することが報告された。TNF- $\alpha$ は細胞内で活性酸素種 (ROS) 及び ROS 感受性転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化することが知られている。本研究では TNF- $\alpha$ による心筋細胞肥大の細胞内シグナル伝達経路における ROS 及び、NF- $\kappa$ B の関与を検討した。

#### [方法]

##### 1. 単離心筋細胞の調製

生直後のウイスターラットの心室筋よりコラゲナーゼ法にて心筋細胞を単離した。5%炭酸ガス、37度下にて、10%ウシ胎児血清含有のダルベッコ改変培地において24時間培養を行った後に、無血清培地に交換し実験に供用した。

##### 2. NF- $\kappa$ B活性化の測定

ルシフェラーゼレポータージーンアッセイ： $\kappa$ B依存性のルシフェラーゼ発現ベクターを心筋細胞へ、リポフェクション法を用いて導入した。TNF- $\alpha$ 負荷48時間後にルシフェラーゼ活性をルミノメーターにて測定した。

ゲルシフトアッセイ：TNF- $\alpha$ 刺激1時間後に心筋細胞より核蛋白質分画を抽出した。これとラジオアイソトープラベルした NF- $\kappa$ B 結合コンセンサス配列を含むオリゴヌクレオチドを混し、電気泳動後に核蛋白質-オリゴヌクレオチド複合体形成をオートラジオグラフィーにて評価した。

##### 3. 心筋細胞肥大の評価

$[^3\text{H}]$ -ロイシンの細胞内取り込み：TNF- $\alpha$ 刺激後、 $[^3\text{H}]$ -ロイシンを添加した。48時間培養後に、 $[^3\text{H}]$ -ロイシンの取り込みを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

アクチンの染色：TNF- $\alpha$ 刺激48時間後に細胞を固定し、ローダミン蛍光色素により染色を行った。蛍光顕微鏡によりサルコメアの形成を評価し、細胞面積の測定を行った。

ANFの発現：TNF- $\alpha$ 刺激48時間後に細胞を固定し、ANFを一次抗体とし、fluorescein isothiocyanate (FITC) 共役二次抗体を用いて免疫染色を行った。ANFの発現を蛍光顕微鏡で評価した。

#### 4. ROS の測定

心筋細胞を ROS 感受性蛍光色素 2',7'-dichlorofluorescin diacetate 存在下に 30 分間培養した。蛍光光度変化をフルオロメーター (Absorption : 488 nm、Fluorescence Emission : 530 nm) を用いて測定した。また、倒立顕微鏡を用いて単一細胞像を観察した。

#### 5. 組換えアデノウィルス

NF- $\kappa$ B の内因性結合物質 I $\kappa$ B $\alpha$ について、アミノ酸残基 32、36 番目のセリンをアラニンに変異させ、NF- $\kappa$ B の核内移行を妨げる組み替えアデノウィルス AdI $\kappa$ B $\alpha$ 32/36A を作成した。心筋細胞へのウィルスの感染は multiplicity of infection=10 で行ない、24 時間後に実験に供用した。

#### [ 成績 ]

1. ルシフェラーゼレポータージーンアッセイでは TNF- $\alpha$  刺激により用量依存性に NF- $\kappa$ B の活性化が見られ、10 ng/ml 以上で有意であった。TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B 活性の上昇は AdI $\kappa$ B $\alpha$ 32/36A の感染により完全に阻害された。ゲルシフトアッセイを行ったところ、TNF- $\alpha$  刺激により核蛋白質-NF- $\kappa$ B 結合コンセンサスオリゴヌクレオチド複合体の形成が認められた。AdI $\kappa$ B $\alpha$ 32/36A の前感染により核蛋白質-オリゴヌクレオチド複合体形成が阻害された。
2. TNF- $\alpha$  刺激により用量依存性に細胞面積の増大が見られた。その用量依存性は NF- $\kappa$ B 活性化のそれと類似していた。TNF- $\alpha$  による細胞面積の増大は AdI $\kappa$ B $\alpha$ 32/36A の前感染により抑制された。 $[^3\text{H}]$ -ロイシンの細胞内取り込みは TNF- $\alpha$  刺激により増大し、同様に NF- $\kappa$ B 活性化阻害により抑制された。サルコメアの形成、ANF の発現も TNF- $\alpha$  刺激により増加し、同様に NF- $\kappa$ B 活性化阻害にて抑えられた。
3. フルオロメーターによる ROS の測定では TNF- $\alpha$  にて蛍光光度の経時的上昇が見られ 15 分後では 25% 程度上昇した。この上昇は抗酸化剤 N-アセチルシステイン (NAC) の前投与によって完全に抑制された。また、倒立顕微鏡による単一細胞の観察では TNF- $\alpha$  刺激後 1 分以内に細胞内 ROS の産生が検出された。
4. NAC の前投与により、レポータージーンアッセイ及びゲルシフトアッセイにて評価した TNF- $\alpha$  刺激による NF- $\kappa$ B 活性化は抑制された。TNF- $\alpha$  による心筋細胞肥大反応も、NAC の前投与により細胞面積の増大、 $[^3\text{H}]$ -ロイシンの細胞内取り込み、サルコメアの形成、ANF 発現細胞の増加の全てが抑制された。

#### [ 総括 ]

TNF- $\alpha$  による心筋細胞肥大の細胞内シグナル伝達について検討した。TNF- $\alpha$  刺激により心筋細胞内で ROS の産生が見られた。ROS はセカンドメッセンジャーとして働いていることが強く示唆される。さらに、ROS を介して転写因子 NF- $\kappa$ B が活性化され、心筋細胞肥大にいたる経路が証明された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究はサイトカインにより惹起される心筋細胞肥大に関して、その細胞内シグナル伝達機構を検討したものである。発表者は腫瘍壞死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) による心筋細胞肥大に関して細胞面積、蛋白質合成、サルコメア形成、心房性利尿ペプチドの産生について実験を行っており、詳細な検討のもとに心筋細胞肥大を定義している。TNF- $\alpha$  刺激により、速やかな活性酸素種の産生が証明されたのは初めてのことであり、心筋細胞内において活性酸素種がセカンドメッセンジャーの役割を果たしていることが強く示唆され、今後の細胞内シグナル伝達経路の解明に非常に有用なデータと思われる。さらに発表者らは酸化ストレスに関する転写因子 NF- $\kappa$ B に注目し、アデノウィルスによる遺伝子導入を用いて NF- $\kappa$ B の役割を検討した。NF- $\kappa$ B はサイトカインの産生、あるいは抗アポトーシス作用に関わることが報告されていたが、本研究にて心筋細胞肥大に関わる転写因子と同定された。さらに、心筋細胞内での活性酸素種の産生源は不明な点が多かったが、発表者らは初めて、低分子量 G タンパク質 Rac1 が深く関わることを明らかにした。Rac1 の下流には、細胞死や分化に関わる分子として知られていた apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) が存在し、NF- $\kappa$ B の活性化を介して心筋細胞肥大に関与することを明らかにした。

以上の知見は、心肥大の分子機構を解明する上で非常に重要な知見であり、本研究は学位の授与に値すると考えられる。