

Title	心筋アポトーシスに対するタウリンの防御機構に関する分子生物学的研究：虚血性心筋不全の新規治療戦略を目指して
Author(s)	高谷, 朋夏
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44797
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	高 谷 朋 夏
博士の専攻分野の名称	博 士 (臨床薬学)
学位記番号	第 18651 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	心筋アポトーシスに対するタウリンの防御機構に関する分子生物学的研究—虚血性心筋不全の新規治療戦略を目指して—
論文審査委員	(主査) 教授 東 純一 (副査) 教授 田中 慶一 教授 馬場 明道 教授 松田 敏夫

論文内容の要旨

あらゆる心疾患の終末像である心不全は5年生存率が50%以下と生命予後が極めて悪い。根本的な治療法の確立には、心不全の成因となる病態を把握し、有効な治療法を確立することが急務である。近年、心不全の発症と進行に心筋細胞のアポトーシスが関与しているとの報告が相次いだ。アポトーシス防御機序の解明は心不全の発症および進行を阻止できる可能性があり、病態を理解するだけでなく、心疾患の新しい治療戦略としてのアポトーシス制御を考える上で、極めて有用である。一方、心筋細胞は出生直後に分裂能を失う事から、本来アポトーシスに抵抗性を持つのではないかと考え、その細胞特性について着目した。心臓において最も高濃度に存在する遊離アミノ酸は非必須アミノ酸のタウリンである。タウリンは、浸透圧調節、カルシウム恒常性の維持、膜の安定化、抗酸化作用など様々な作用を持ち、細胞保護分子として重要な役割を担っている物質である。また、タウリンは、慢性心不全患者を対象に治療薬として認可されており、長期投与においても副作用はほとんど認められず、臨床的な有用性が報告されている。しかし、その作用機序や生理的意義には不明な点が多いため、使用頻度は低い。当研究室では、これまで、タウリンが虚血障害に有効で、アポトーシスを顕著に抑制することを見出し、タウリンの心筋保護作用を現象的にとらえ報告した。強心薬による心不全治療の多くは短期間内には血行動態を改善するが、長期間には予後を悪化させることから、近年、心筋保護薬の心不全治療における重要性が強く認識されるようになってきている。生体成分でもあり、心筋保護薬としてタウリンの細胞保護作用機序の解明は、心不全に対する新しい治療戦略の構築を期待させるものである。本研究では、心不全の代表的な基礎疾患である虚血性心筋不全治療の新たな展開のために、心筋アポトーシスの抑制が必須であると考え、虚血心筋のモデルとして *in vitro* 培養心筋細胞密封虚血モデルを用い、タウリンの心筋アポトーシスに対する防御機序について検討した。

今回、虚血心筋のモデルとして用いた *in vitro* 密封虚血モデルは、培養心筋細胞を密封培養することで灌流不全、圧負荷の要素を加味し、実際の病態に類似した細胞環境の悪化、細胞障害およびアポトーシス現象を再現することができる。アポトーシスの制御においては、ミトコンドリア経路が重要な役割を果たしていることが報告されている。本虚血モデルにおいても、cytochrome *c* の漏出に伴う caspase の活性化とアポトーシス関連タンパク質 Bcl-2、p53 の発現変動が示され、本モデルによるアポトーシスが、ミトコンドリア経路を介することが明らかとなった。本虚血モデルは、心筋細胞アポトーシスの機構解明の有力な手段となることが期待され、抗アポトーシス薬探索のスクリー

ニング系としても有用と考えられる。

これまでタウリンは、多様な生理作用を発揮することから広範な標的分子に作用していると考えられてきた。そのため、現象論がほとんどであり、タウリンの有効性に対する分子生物学的機序を明確にする研究は乏しかった。

しかし、今回、タウリンは虚血モデル誘発アポトーシスを抑制し、その作用機序には caspase-9、-3 の活性抑制が関与していることを明らかにした。さらに、その caspase 活性化抑制機序は、Apaf-1/caspase-9 apoptosome 形成抑制によることも明らかとした。Apaf-1 は、ミトコンドリアから細胞質に漏出した cytochrome *c* の存在下で構造変化を受け、procaspase-9 との結合能を獲得し、procaspase-9 と複合体を形成後、caspase-9 はプロセッシングされることが明らかにされている。タウリンにより apoptosome の形成が阻害された可能性として、Apaf-1 発現量、細胞質における cytochrome *c* 量あるいは細胞内 ATP 量の減少が想定されたが、虚血群とタウリン処置群とで差は認められなかった。これらのことから、タウリンは直接かつ特異的に Apaf-1 と caspase-9 との結合を阻害することが明らかとなった。また、タウリンによる apoptosome 形成抑制は、他の細胞系とは異なり Heat Shock Protein-70 (HSP-70) には依存しないことを確認した。

増殖能を持たない細胞の生存は、生存シグナル経路に依存していると考えられる。生存シグナル伝達経路の中でも、Akt 経路の活性化が必要かつ十分であるということが様々な細胞で示されてきた。Akt 活性化は、Bcl-2 ファミリーをターゲットとする cytochrome *c* 放出の前段階あるいは caspase-9 を直接リン酸化する cytochrome *c* 放出の後段階を介して抗アポトーシス作用を発揮することが知られている。今回、タウリンのアポトーシスに対する保護効果を Akt シグナル経路の側面から検討した結果、タウリンの抗アポトーシス作用は、Akt 生存シグナル経路に依存すること、その効果発現機序として Akt の活性化を介した caspase-9 活性抑制が関与することを明らかとした。タウリンは、アポトーシス関連分子を標的とした細胞内シグナル伝達経路に関与していることが明らかにされ、タウリンのアポトーシス抑制による新たな心筋保護効果メカニズムが解明された。

以上のことから、ここで示したデータは、アポトーシス抑制を介した心筋細胞保護による新規治療法の開発に向けて、タウリン研究の新天地を切り開いたものであると確信する。今後、タウリントランスポーター欠損マウスなどを用いた *in vivo* での解析が望まれ、今回明らかとしてきた効果発現機序を治療戦略として、タウリンの臨床応用の拡大を期待する。

論文審査の結果の要旨

出生直後増殖能を失う心筋細胞における虚血誘発アポトーシスの防御は、心不全治療の重要な課題となっている。また、慢性心不全患者を対象に、心臓において最も高濃度に存在する遊離アミノ酸のタウリンが、治療薬として認可されている。しかし、これまで、タウリンは、多様な生理作用を発揮する結果、広範な標的分子に作用していると考えられてきたため、現象論での報告がほとんどであり、タウリンの有効性に対する分子生物学的機序を明確にする研究は乏しかった。

本研究では、心筋虚血の *in vitro* 病態モデル系において、その細胞死がアポトーシスによることを明らかにした。さらに本病態モデル系においてタウリンが抗アポトーシス作用を示すこと、その作用が Apaf-1/caspase-9 apoptosome 形成抑制作用並びに Akt リン酸化促進作用によることを明らかにした。これらの成績から、タウリンの作用機序としてアポトーシス抑制による新たな心筋保護効果のメカニズムが解明された。

以上、タウリンの細胞内情報伝達系に対する作用を初めて分子レベルで明らかにしたことは高く評価される。また本成績は虚血性心疾患の病態とその治療法の開発に貢献するものであり、博士の学位を授与するに相応しいものと考えられる。