



Title	心臓環境因子、メカニカルストレスによる培養心筋細胞の配列形成とコネキシン43の局在に関する研究：新規治療ターゲットとしての意義
Author(s)	松田, 貴久
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45682
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	まつ だ たか ひさ 松 田 貴 久
博士の専攻分野の名称	博 士 (臨床薬学)
学 位 記 番 号	第 19442 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 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	心臓環境因子、メカニカルストレスによる培養心筋細胞の配列形成と Connexin 43 の局在に関する研究—新規治療ターゲットとしての意義—
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 東 純一 (副査) 教 授 八木 清仁 教 授 松田 敏夫 教 授 土井 健史

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 年生存率が約 50% と極めて生命予後が悪く、有効な治療法を確立することが急務である。近年、心不全発症の原因として心筋細胞の配列構造の異常や心筋細胞間の介在板構造の異常が注目されている。介在板の Connexin (Cx)43 分子が心筋細胞の協調した興奮・収縮にとって重要な役割を果たす。特に、成熟心筋細胞では Cx43 分子が介在板から細胞膜全体に分散する分布異常が、心不全の発症・悪化につながるとされている。従って、Cx43 の細胞内局在を決定する制御機構の解明は重要な課題である。心不全治療の新たな展開には、配列構造や Cx43 分子の局在を制御する分子メカニズムの解明が重要であると考え、本研究ではそのシグナル伝達経路について検討した。

心筋細胞は、常にメカニカルストレス（特にストレッチ刺激）にさらされている。この心臓の環境要因により、成熟心筋細胞は細長いロッド形状になり、配列構造をとるとされる。そこで、*in vitro* でストレッチ刺激を再現し、心筋の配列構造が形成されるか検討した。新生仔ラット心臓から心筋細胞を調製し、シリコン膜製培養 dish に播種・培養し、ストレッチ刺激を負荷した。初代培養 3 時間後から刺激を開始し形態応答について検討した。刺激 24 時間後、心筋細胞は伸長・配向し、成熟動物の心室筋に似た配列構造が誘導された。次に、配列を形成した心筋細胞が介在板構造を有するかどうか検討する目的で、Cx43 と N-cadherin の細胞内分布について検討した。配列形成後、N-cadherin は細胞長軸の先端部に局在した。Cx43 の局在も観察され、介在板様構造の形成が示唆された。配列を形成した心筋細胞は、配列制御メカニズムの解析ならびに Cx43 局在の解析モデルとして有用であると考えられる。

次に、配列形成の制御に関する分子について検討した。播種 24 時間以降の細胞は、既に細胞間接着を形成している。この時、ストレッチ刺激を開始しても、配列応答は示さなかった。この配列性の相違は、細胞間接着分子に起因するのではないかと考え、心筋細胞間の主要接着分子 N-cadherin に着目した。まず、刺激開始時期の N-cadherin 発現量を検討した。培養 3 時間後の N-cadherin 発現量は、培養 24 時間後の発現量に比し低値であった。また、培養 3 時間での N-cadherin は細胞全体に分布したのに対し、培養 24 時間では細胞間の接着部位に限局していた。この事は、配列性の相違が N-cadherin による細胞接着の程度に依存していることを示唆している。次に、N-cadherin 機能の阻害効果を検討するため、ドミナントネガティブ体を発現するアデノウイルスベクター (Ad DN N-cadherin) を用いた。培養後 24 時間経過した心筋細胞に DN N-cadherin を導入し刺激を負荷すると配列形成を示した。以上の結

果より、N-cadherin はストレッチ刺激による心筋細胞の配列形成に関与することが示唆された。

また、Rho family 分子は細胞の形態形成の制御に関与しているとの報告がある。そこで、Rho family 分子が、心筋細胞のストレッチ刺激による配列形成に関与するか検討した。Rho family 分子には RhoA、Rac1、Cdc42 があり、それらの活性について検討を行った。その結果、Rac1 及び Cdc42 では、刺激前と比し活性の上昇が確認された。次に、活性上昇の意義を検討するため、ドミナントネガティブ型を発現するアデノウイルスベクター (Ad DN RhoA、Ad DN Rac1、Ad DN Cdc42) を作製した。その結果、DN Cdc42 導入群ではストレッチ刺激による配列形成が抑制された。以上のことから、Cdc42 がストレッチ刺激による心筋細胞の配列形成を制御していることが示唆された。

最後に、介在板への Cx43 局在メカニズムに関する検討を行った。Cx43 の局在には N-cadherin シグナルが関与しているという仮説が提唱されているため、その仮説を検証した。配列細胞に DN N-cadherin を導入し、Cx43 の局在分布の検討を行った結果、DN N-cadherin 導入群の Cx43 は、局在することなく細胞周囲に分散した。この事から、N-cadherin シグナルが Cx43 の局在に関与する事が示唆された。次に、N-cadherin の下流シグナルについて検討した。心筋細胞では N-cadherin 下流シグナルの詳細は不明である。MDCK 細胞等の検討では、カドヘリンが Rho family タンパクを活性化させる。この Rho family 分子が心筋細胞においても、N-cadherin の下流シグナルとして機能しているのではないかと考え、Rho family 分子の活性について検討した。その結果、Cx43 局在過程では RhoA 及び Rac1 の活性が上昇していた。また、DN N-cadherin の導入により、これらの活性が阻害された。さらに、Rho family 分子の活性阻害の効果の検討を行うため、全ての Rho family の活性化を阻害する Rho GDI のアデノウイルスベクター (Ad Rho GDI) を作製し実験に用いた。興味深いことに、Rho GDI 導入群は N-cadherin の局在に影響を及ぼさず、Cx43 の局在を阻害した。以上の結果より、心筋細胞の介在板への Cx43 局在は N-cadherin/Rho 経路によって制御されることが示唆された。

以上、細胞配列制御や Cx43 局在に関する新たな機構を見出し、心不全に対する治療薬の開発に向けた重要な知見を得た。これまでに、心不全の発症機序の研究は広範囲になされているが、未だ有効な標的分子が明かになっていない。今後、詳細なメカニズムの検討により、今回明らかとした制御機構が心不全治療薬開発の一助につながることを期待する。

論文審査の結果の要旨

心不全は生命予後が悪く、有効な治療法を確立することが望まれる。近年、心不全発症の原因として心筋細胞の配列構造の異常や Cx43 分子の局在異常が注目されているものの、それらの分子レベルでの解析はほとんどなされていない。

心筋細胞は、常にメカニカルストレスにさらされている。そこで、申請者は *in vitro* でストレッチ刺激を再現し、心筋の配列構造が形成されるか検討した。その結果、ストレッチ刺激により培養心筋細胞は刺激方向に配列し、さらに配列形成した細胞の長軸先端部に Cx43 や N-cadherin が局在し介在板構造が見られることを見出した。また、本モデルを応用し、配列に関連する因子を詳細に解析し、配列形成に N-cadherin 及び Cdc42 が関わっていることを示した。

心筋の Cx43 の局在を決定するメカニズムに関する検討は十分になされていない。その理由は、従来の培養では心筋に極性がなく、介在板構造が形成されず、Cx43 局在制御に関する分子レベルでの検討が不可能であったことにある。そこで申請者は、介在板構造を形成する配列心筋細胞を用いることで、この点が解決可能であると考え、本モデルを用い介在板への Cx43 局在メカニズムに関する検討を行った。その結果、介在板への Cx43 の局在に N-cadherin/Rho 経路が関わっていることを示した。これらの成績は将来的には心不全に対する新しい治療方法の開発に貢献するものであり、学位論文として高く評価される。