



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | タウリンの心臓における病態生理学的意義の解明 : タウリントランスポーターの機能及び発現制御機構の解析                                                                                                                                                                                                                  |
| Author(s)    | 伊藤, 崇志                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Citation     | 大阪大学, 2005, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/45684">https://hdl.handle.net/11094/45684</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;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           | い 藤 崇 志<br>い 藤 崇 志                                       |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (臨床薬学)                                               |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 9 4 3 8 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<br>薬学研究科応用医療薬科学専攻                       |
| 学 位 論 文 名     | タウリンの心臓における病態生理学的意義の解明—タウリントランスポーターの機能及び発現制御機構の解析—       |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 東 純一<br>(副査)<br>教 授 前田 正知 教 授 馬場 明道 教 授 岡部 勝 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

含硫アミノ酸であるタウリンは、生体内に広く分布する物質で、組織中には血中濃度に比べ 10-100 倍程度存在し、特に心臓には高濃度に存在する。タウリン合成能がほとんどないネコをタウリン欠乏食で飼育すると心筋症を発症することが報告され、組織中タウリンの欠乏が心筋症発症の一因である可能性が示唆されている。また、タウリン投与により慢性心不全患者の症状が改善することが報告され、現在臨床応用されている。作用機序に関しては、カルシウムハンドリングの恒常性の維持やイオン動態の調節、抗アポトーシスなどの作用が報告されているが、明確な結論には至っていない。さらに、心臓組織中のタウリン含量は種々の心疾患により変動することから、生体防御機構としてタウリン動態の制御機構が心筋細胞に備わっていることが示唆されているが、詳細な検討はこれまでにない。また、この組織と血漿の濃度勾配の維持には、 $\text{Na}^+$  シンポートによりタウリンを細胞内へ輸送するタウリントランスポーター (TauT) が大きく関与する。TauT は様々な組織で同定されており、各臓器のタウリン含量の維持に寄与しているものと考えられる。

本研究では、心臓におけるタウリンの保護機構について分子メカニズムを明らかにすることが、新しい心不全治療戦略開発の一助となるものと考え、タウリンの分子病態学的意義を解明することを目的とし、心臓における TauT の病態生理学的役割およびその発現制御機構の解析を行った。

まず、浸透圧ストレスに対する TauT の発現変動について、制御機構の解析を行った。これまでに TauT は高浸透圧負荷により遺伝子レベルで発現増加することが種々の細胞で明らかにされているが、その制御機構は不明であった。本研究でまず、TauT のプロモーター領域を解析した結果、転写開始部位から -110~-100 bp 上流に Tonicity-response element (以下、TonE) のコンセンサス配列 (TGGAANNYNY) を見出した。この領域の転写調節への関与を検討するため、レポータージーンアッセイを行った。その結果、TonE を含むレポータープラスミドでは高浸透圧負荷によりレポーター活性が上昇したのに対して、TonE を欠落もしくは変異させたプラスミドではレポーター活性の上昇が見られなかった。また、TonE 結合蛋白 (以下、TonEBP) の発現プラスミドにより等張時におけるレポーター活性が上昇し、一方で TonEBP のドミナントネガティブ体発現プラスミドにより高浸透圧負荷によるレポーター活性上昇が抑制された。以上から、TauT の遺伝子発現制御に TonEBP/TonE 経路が必要不可欠であることが示された。

次に、心疾患時のタウリン含量変動について制御機構の解析を行った。まず、心不全時の心臓中タウリン含量変動の制御機構を、心不全を発症する Dahl 食塩感受性ラットを用いて解析した。これまでに心不全患者や心不全動物モデルにて心臓中のタウリン含量の増加が報告されていたが、これらの報告と同様、本検討における心不全ラットの心臓でもタウリン含量の増加が認められた。同時に、TauT の発現増加が認められ、不全心におけるタウリン含量の変動には TauT 発現量の増加が関与すると示唆された。さらに、TonEBP の標的遺伝子である sodium/myo-inositol transporter (SMIT) や TonEBP の遺伝子発現の増加が不全心において見られたことから、不全心において TonEBP 活性が増加することが示唆された。

一方、ドキシソルピシン心筋症時における心筋中タウリン量を解析した結果、ドキシソルピシン投与後に低下することが明らかになった。さらに、TauT mRNA 発現量はドキシソルピシン投与群で顕著に減少していた。次に、培養心筋細胞を用いてレポータージーンアッセイを行い、ドキシソルピシンによる TauT 発現減少のメカニズムを解析した。その結果、ドキシソルピシン処置による TauT 転写活性の低下には、TonE が関与することが示され、ドキシソルピシン処置により TonEBP 活性が低下することが示唆された。したがって、ドキシソルピシン心筋症時における心筋中タウリン含量の低下には TonEBP/TauT 経路の不活性化が関与する可能性が考えられた。また同時に、タウリン投与によりドキシソルピシン心筋症の発症が抑制されたことから、ドキシソルピシンによる心筋中タウリン量の低下が心筋症発症と関連する可能性が考えられた。

以上の心筋組織のタウリン動態制御の解析より、心疾患時のタウリン含量変動に TonEBP/TauT の活性変動が深く関与することが示唆された。これまでに TonEBP の機能は、浸透圧に対する細胞の適応反応に関与すること以外にほとんど報告がなく、特に心臓においても遺伝子発現調節に関与することは本研究で初めて明らかにした。今後心臓における TonEBP の機能や活性調節機構の解析が、タウリンの分子メカニズム解明への一助となると考えている。

次に、TauT<sup>-/-</sup>マウスを作製し、TauT の心臓における機能解析を行った。その結果、TauT<sup>-/-</sup>マウスでは心筋組織中のタウリンが欠乏していたことから、TauT がタウリンの高濃度維持に不可欠であることが明らかになった。また、TauT<sup>-/-</sup>マウスにおいて体重及び心重量の顕著な減少が認められ、心臓組織の構造維持にタウリンが重要である可能性が考えられた。しかし、本検討期間中（生後4ヶ月）までに死亡率の増加が見られなかったことや、心臓の組織学的解析から TauT<sup>-/-</sup>マウスと TauT<sup>+/+</sup>マウスとの間に変化が見られなかったことから、タウリン欠乏が心筋症発症に直接関与しない可能性が考えられた。この点については、今後の長期的な解析が必要である。さらに、生理的肥大を誘発するとされる運動負荷が TauT<sup>-/-</sup>マウスでは心筋破綻を引き起こすことを見出し、TauT によるタウリン動態制御機構が負荷に対する適応機構として重要であることが示唆された。以上より、TauT<sup>-/-</sup>マウスはタウリン欠乏と心不全との関連性を解析する上で有用なモデルであることが示された。今後、検討を重ね、タウリンの心臓における細胞保護機構の詳細を明らかにしたい。

## 論文審査の結果の要旨

タウリンは、様々な生理作用を有する物質であり、これまで特に心臓保護作用についての研究が盛んに行われているが、その分子メカニズムは不明である。申請者はタウリンの輸送体である taurine transporter (TauT) に着目し、病態時の発現調節機構及び TauT ノックアウトマウスの表現型を解析し、タウリンの病態生理学的意義の解明を試みた。

具体的には、TauT の転写調節領域に Tonicity response element (TonE) が存在することを見出し、TauT 遺伝子が TonE-binding protein (TonEBP) により発現調節されることを明らかにした。また、食塩感受性ラットを用いた検討から、不全心においてタウリン含量が増加すること、同時に TauT mRNA の発現上昇を認めた。さらに不全心において TonEBP 及び TonEBP のターゲット遺伝子である sodium/myo-inositol transporter の発現増加が認められ、不全心における TonEBP/TauT 経路の活性化がタウリン含量増加のメカニズムである可能性を見出した。一方、ドキシソルピシン心筋症においては心臓中タウリン含量の減少および TauT の発現低下を認めた。また、培養心筋細胞における検討から、ドキシソルピシンによる TauT 発現低下に TonEBP の不活性化が関与することを明らかにした。以上の

検討から、心臓におけるタウリン含量の調節機構に TonEBP/TauT 経路が関与することを見出した。

また、TauT ノックアウトマウスを作製し、その表現型の解析を行った。ノックアウトマウスでは心臓におけるタウリン含量の著しい低下及び体重、心重量の低下が認められ、TauT が心臓においてタウリンの高濃度維持に必要不可欠であること、さらにタウリンが心臓組織の恒常性の維持に寄与する可能性が示唆された。また、運動負荷により心筋組織の異常が見られ、タウリン欠乏が心不全の一因となりうることを見出した。今後このモデルを用いた検討から、タウリンの心保護効果に関する新たな知見が得られることが期待される。

以上、本研究はタウリンの心筋保護メカニズムを明らかにする上で興味深い事実を明らかにし、今後この事は心不全の病態を理解する上でも役立つことが期待されることから、学位に値するものと認める。