



Title	Apoptosis signal-regulating kinase 1 is involved not only in apoptosis but also in non-apoptotic cardiomyocyte death
Author(s)	渡部, 徹也
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46137
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	渡 部 徹 也
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 20065 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 3 月 24 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	Apoptosis signal-regulating kinase 1 is involved not only in apoptosis but also in non-apoptotic cardiomyocyte death (ASK1 はアポトーシスだけでなく非アポトーシス型細胞死にも関与する)
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】

現在、急性心筋梗塞の治療には主に再灌流療法が行われている。一方、再灌流に伴い、急速に心筋障害が生じることが知られているが、その分子生物学的な機構についてはまだ明らかにされていない。

Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) は mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) の一つとして哺乳動物のさまざまな組織に発現しており、JNK 経路の MAPKK である MKK4 および MKK7、p38 経路の MAPKK である MKK3 および MKK6 を直接リン酸化・活性化し、両 MAPK 経路を活性化させる。近年、ASK1 は酸化ストレス、TNF、小胞体ストレスなどによるアポトーシスに必須の機能を持つことが明らかとなってきた。本研究では ASK1 の心筋虚血再灌流障害における役割を、そのノックアウトマウス (以下 ASK1^{-/-}) を用い検討した。

【方法ならびに成績】

ASK1^{-/-} の心筋の構造を肉眼的、組織学的に評価し、また機能を圧トランスデューサーを用いた血行力学的あるいは心臓超音波法により評価したところ、構造、機能ともに野生型マウス (wild type : 以下 WT) と比較し有意な変化を認めなかった。従って ASK1 は生理的条件下では心形成、心機能維持に必須の機能を有していないか、他のシグナリング分子によって代償されていると考えられた。

次に虚血再灌流における ASK1 の役割を研究するために、ASK1^{-/-} および WT を用いて虚血再灌流を行い、その表現型を検討した。ASK1^{-/-} および WT の左冠動脈を 30 分間閉塞し、その後 2 時間再灌流を行った。WT では虚血により ASK1 の活性化が認められ、再灌流後にさらに上昇を認めた。WT と ASK1^{-/-} において虚血領域はほぼ同等であったが、梗塞領域は ASK1^{-/-} で著明に抑制された。WT に比べ ASK1^{-/-} では、ASK1 の下流とされる p38 の活性化は虚血直後および再灌流直後に著明に抑制され、JNK の活性化は再灌流直後に著明に抑制された。虚血再灌流中におけるアポトーシスの関与について検討するために行った Tunel 染色では、虚血前、再灌流中および終了時において WT と ASK1^{-/-} 間で Tunel 陽性細胞数に差は認めなかった。また、WT と ASK1^{-/-} 共に虚血前、再灌流終了時において DNA 断片化は認められず、Caspase 3 の活性化も認められなかった。

虚血再灌流中に WT と ASK1^{-/-}間でアポトーシスの程度に差が認められなかったことから、細胞死について検討するため 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay を行った。WT と ASK1^{-/-}の新生仔心筋細胞を用いて H₂O₂ および Ionomycin による細胞死を観察したところ、WT に比し ASK1^{-/-}では有意に細胞死が抑制された。細胞死の形態について観察するため、ヘキスト染色および Propidium Iodide 染色を行った。ASK1^{-/-}に比し WT の心筋細胞では、ヘキスト染色において核の縮小化を伴ったネクローシスに特徴的な細胞死の形態を示す細胞が多く認められ、一部には核の断片化を伴うアポトーシスに特徴的な細胞死の形態を示す細胞も認められた。また、WT の心筋細胞では Propidium Iodide 染色で陽性となるネクローシスに特徴的な細胞死を示す細胞が認められた。ASK1^{-/-}では WT に比し、ネクローシスを示す細胞死、アポトーシスを示す細胞死共に抑制された。

【総括】

本研究では ASK1^{-/-}を用いて心臓の虚血再灌流時における ASK1 の役割について検討を行った。WT では虚血再灌流により ASK1 が活性化され、ASK1^{-/-}では梗塞領域も著明に抑制されたが、WT と ASK1^{-/-}共にアポトーシスによる細胞死を示す所見は認められなかった。また、心筋細胞による検討により WT では多く認められたネクローシス型細胞死が ASK1^{-/-}では抑制された。よって ASK1 は虚血再灌流心において主にネクローシスに関与すると考えられ、今後 ASK1 を阻害することにより虚血再灌流障害の治療に応用できる可能性があると考えられる。

論文審査の結果の要旨

現在、急性心筋梗塞の治療には主に再灌流療法が行われている。一方、再灌流に伴い急速に心筋障害が生じることも知られているが、その分子生物学的な機構についてはまだ明らかにされていない。

本研究は心臓における Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) の役割を検討したものである。申請者はこの論文の中で、野生型マウス (WT) の心臓虚血再灌流実験に伴い、ASK1 が活性化されることを報告し、ASK1 のノックアウトマウス (ASK1^{-/-}) を用いて実験を行っている。WT と ASK1^{-/-}において虚血領域はほぼ同等であったが、梗塞領域は ASK1^{-/-}で著明に抑制されていた。ASK1 はアポトーシスに重要な働きをしていることが知られているが、申請者は、Tunel 染色、DNA 断片化、Caspase 3 の活性化および新生仔心筋細胞を用いた細胞死の実験などにより、ASK1 は虚血再灌流心においては主にネクローシスに関与することを報告した。今後、ASK1 を阻害することにより虚血再灌流障害の治療に応用できる可能性があると考えられ、学位の授与に値すると考えられる。