



Title	Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice
Author(s)	塚本, 蔵
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46332
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	塚 本 蔵
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 20061 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	Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice (マウス圧負荷心臓モデルの心機能障害進展におけるプロテアソーム活性の低下)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 堀 正二 (副査) 教 授 辻本 賀英 教 授 荻原 俊男

論 文 内 容 の 要 旨

【背景と目的】

細胞内蛋白質の量は合成と分解のバランスで決定される。近年、細胞内蛋白質分解機構に関する研究の飛躍的進展により、蛋白質分解系が生命反応の制御や細胞の恒常性維持などの生命の基本的な働きに不可欠であるとの認識が広く普及した。特に細胞内の選択的蛋白分解を担うユビキチン・プロテアソーム系 (U/P 系) は、生物の様々な高次機能の制御 (細胞周期・DNA 修復・アポトーシス・代謝調節・免疫応答など) や環境ストレスに応答した恒常性の維持 (ストレス応答・蛋白質の品質管理など) に必須の役割を担っている。

慢性心不全において、不全心筋の心筋細胞では、ANP、BNP などの分泌蛋白質や構造蛋白質の過剰な蛋白質合成亢進が認められ、心不全の病態を修飾している。実際、我々は心筋細胞において過剰な蛋白合成が小胞体特異的なアポトーシスシグナルを誘導し、心筋細胞アポトーシスを引き起こすことを報告している (Circulation 2004)。しかしながら、これまで心不全の進展における細胞内蛋白分解系の役割についての検討は皆無であった。そこで、本研究では心不全の進展におけるユビキチン・プロテアソーム細胞内蛋白分解系の関与についての検討を行った。

【方法ならびに成績】

1) ヒト不全心を用いた検討

我々はヒト不全心の病態における U/P 系の関与について検討を行うため、ヒト心臓組織の免疫染色を行った。心筋サンプルは、拡張型心筋症による重症心不全 3 症例 (男 1 女 2 症例、平均年齢 46 歳、NYHA functional class III-IV) と健常心 (急性白血病の autopsy 1 症例) を用いた。不全心では、健常心と比較して心筋細胞の細胞内に著明なユビキチン化蛋白質の蓄積が認められた。このことから、ヒト不全心において U/P 系の異常が存在することが確認された。

2) マウスの代償性肥大大心・非代償性肥大大心 (不全心) モデルの心臓における U/P 系の検討

心不全の進展における U/P 系の役割を検討するため、マウスの大動脈を縮索し、圧負荷を加えることにより、代償性肥大大心から不全心への進展モデルを作成した。心・肺重量や心エコーの所見等の解析では、圧負荷後 1 週間から代

償性心肥大が認められるものの、TAC後2週間までは心機能は正常であった。しかしながら、圧負荷後4週間においては心機能低下（心不全）が認められた。

続いて、左心室でのユビキチン化蛋白質の蓄積を検討したところ、圧負荷後2週間よりユビキチン化蛋白質の心筋細胞内への蓄積が認められた。さらに左心室のプロテアソーム活性を測定したところ、圧負荷後2週間よりプロテアソーム活性の低下が認められた。

次に、U/P系の標的蛋白質であるアポトーシス関連蛋白質に着目し、代償性肥大心から不全心への移行に関与する心筋細胞アポトーシスとU/P系との関連を検討した。Proapoptotic蛋白であるp53とBaxのmRNAレベルは圧負荷後4週間の経過で有意な変化を認めなかったが、その蛋白レベルは圧負荷後2週間より増加を認めた。一方、antiapoptotic蛋白であるBcl-2、Bcl-XLは圧負荷後4週間でその蛋白レベルの低下を認めた。さらに圧負荷後4週の左心室においてcytochrome cの細胞質内流出、caspase 3の活性化、およびTUNEL陽性心筋細胞の増加を認めた。

以上の結果から、圧負荷心筋においてプロテアソーム活性低下に伴うproapoptotic蛋白の蓄積が心筋細胞アポトーシスの誘導に関与する事が示唆された。

3) ラット培養心筋細胞におけるU/P系とアポトーシスの関係についての検討

最後に、プロテアソーム活性低下が心筋細胞アポトーシスに及ぼす効果について培養心筋細胞を用いて検討した。特異的プロテアソーム阻害剤にて培養心筋細胞のプロテアソーム活性を低下させたところ、proapoptotic蛋白(p53、Bax)の増加とantiapoptotic蛋白(Bcl-2、Bcl-XL)の低下、cytochrome cの細胞質への流出、caspase 3の活性化が認められ、心筋細胞のアポトーシスが誘導された。さらに、proapoptotic蛋白であるp53あるいはBaxをRNAi法によりノックダウンしたところ、プロテアソーム阻害によるproapoptotic蛋白の増加を抑制し、心筋細胞アポトーシスを部分的に抑制した。以上より、プロテアソーム活性低下はproapoptotic蛋白とantiapoptotic蛋白の間の不均衡を生じ、心筋細胞アポトーシスを誘導することが確認された。

【総括】

1. ヒト不全心の心筋細胞においてユビキチン・プロテアソーム細胞内蛋白分解系の異常が存在する。
2. マウス圧負荷モデルにおいて、心リモデリング・心機能低下に先行してプロテアソーム活性低下とproapoptotic蛋白の蓄積が認められた。
3. 培養心筋細胞において、プロテアソーム阻害によるproapoptotic蛋白の蓄積が心筋細胞アポトーシスの誘導に関与していた。

以上の結果より、圧負荷による心不全への進展の際に認められる心筋細胞アポトーシスに、プロテアソーム活性低下に伴うアポトーシス関連蛋白質の不均衡が関与している可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

重症慢性心不全の予後は不良であり、その病態解明による新たな治療の開発は、循環器医療における重要な課題である。これまでの心不全の病態研究は、主に蛋白質合成系を中心に行われてきたが、本研究において、申請者は細胞内の選択的蛋白質分解を担うユビキチン・プロテアソーム系細胞内蛋白質分解システムに着目して、心不全の病態を検討した。

本研究にて、1)ヒト不全心の心筋細胞内にユビキチン化蛋白質が著明な蓄積が認められること、2)マウス圧負荷心臓において、心機能低下の出現する以前より、心筋プロテアソーム活性が低下し、心筋細胞内にユビキチン化蛋白質蓄積すること、3)プロテアソーム阻害による分解異常がアポトーシス関連蛋白質の量的不均衡を起こし、心筋細胞アポトーシスが誘導されること、が示された。すなわち、ヒトの心不全の病態に細胞内蛋白質分解系の異常が存在し、また、圧負荷後の心不全への進展の際に認められる心筋細胞アポトーシスに、プロテアソーム活性低下に伴うアポトーシス関連蛋白質の不均衡が関与することが示された。

この研究成果は、心不全への進展過程において、細胞内蛋白質分解システムであるユビキチン・プロテアソーム系の異常が関与するという、心不全の病態形成の新たな側面を示すもので、今後の心不全研究および治療に大変重要な意義を持つものであり、本研究は博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。