

Title	Smad1 Protects Cardiomyocytes From Ischemia-Reperfusion Injury
Author(s)	正木, 充
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/47519
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	まさ き 木 充
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20938 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Smad1 Protects Cardiomyocytes From Ischemia-Reperfusion Injury (Smad1 は心筋の虚血再灌流障害を保護する)
論文審査委員	(主査) 教授 川瀬 一郎 (副査) 教授 堀 正二 教授 澤 芳樹

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

TGF (transforming growth factor)- β スーパーファミリーメンバーの一つである BMP (bone morphogenetic protein)2 は、心臓特異的転写因子の発現に重要な役割を果たし、心筋細胞の分化に必須であることがこれまでに報告されている。また BMP2 は、心筋細胞の培養系において、血清を除去した時に誘導される apoptosis に対して、Smad1 経路を介して Bcl-xL を誘導し、心筋保護効果を示すことが報告されている。

しかしながら成体心での BMP2-Smad1 の機能的役割は未だ報告されていない。そこで Smad1 が虚血再灌流下の心臓において心筋傷害を予防するかどうかについて、培養心筋細胞、トランスジェニックマウスを用いて検討を行った。

[方法ならびに成績]

in vitro の実験：新生児ラットの心筋細胞の初代培養系を用い、低酸素処理後再酸素化（以下、H/R と略す）モデルを作成した。心筋細胞は、低酸素処理の前に BMP2 (80 ng/ml) で刺激を行った (BMP2 群)。一方、低酸素処理前にアデノウイルスを用い、Smad1 を導入 (以下、Ad-Smad1 と略す) したものを Ad-Smad1 群とした。両群 (BMP2 群、Ad-Smad1 群) の心筋細胞は、24 時間の低酸素後、5 時間の再酸素化を行った後に、それぞれ蛋白発現 (Western blotting)、心筋細胞生存活性 (MTS assay)、ミトコンドリア膜電位 (JC-1 蛍光 assay)、抗アポトーシス効果 (TUNEL stain、DNA ladder) について評価した。

BMP2 群では、BMP2 刺激をしてから 15 分後に一過性に Smad1 がリン酸化された。H/R によっても Smad1 のリン酸化が確認された。MTS assay では、BMP2 刺激により H/R 後の心筋細胞の生存活性は促進されていた。TUNEL stain、DNA ladder により検討した。H/R 後の心筋細胞のアポトーシスは、BMP2 により抑制された。次に、アポトーシス抑制のメカニズムとして、ミトコンドリア膜電位の変化に注目したところ、BMP2 刺激した心筋細胞は H/R 後のミトコンドリア膜脱分極を減少させた。また、Bcl-xL mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた MTS assay は、H/R 後の BMP2 群の生存活性の亢進を阻害した。Ad-Smad1 群も BMP2 群と同様の結果が得られた。従って、BMP2 は、H/R 後の心筋細胞において、Smad1 活性条件下で、ミトコンドリアの膜電位を低下させ、Bcl-xL を誘導することによりアポトーシスを抑制する事が示唆された。

in vivo の実験：心筋 α -myosin 重鎖遺伝子プロモーター領域に Smad1 を連結することで心筋特異的に Smad1 を過剰発現させたトランスジェニックマウス（以下、Smad1TG と略す）を作成した。12 週齢のマウスを用い、心臓の左冠動脈を 1 時間結紮した後、再灌流するモデル（以下、I/R と略す）を作成し、梗塞サイズ、各種 mRNA や蛋白発現、免疫染色、抗アポトーシス効果（TUNEL stain、DNA ladder）を検討した。

野生型マウス（以下、WT マウスと略す）の I/R では、虚血 1 時間後に一過性に Smad1 のリン酸化が見られ、再灌流時にも Smad1 のリン酸化が見られた。再灌流時は、Bcl-xL の発現も誘導された。I/R によるリスク領域は WT マウスと Smad1TG で差は認められなかった。しかしながら、I/R 後の梗塞領域は WT マウスに比べて Smad1TG では有意に縮小されていた。I/R 後の WT マウスは、TUNEL stain、DNA ladder により心筋細胞の apoptosis が観察されたが、Smad1TG では、著明に軽減されていた。Smad1TG の心筋では、Bcl-xL の mRNA レベルおよび蛋白レベルでの発現が有意に増加していた。Bcl-2 および Bad、Bax、caspase 8 の蛋白レベルでの発現は、WT マウスと Smad1TG で差は認められなかった。さらに、I/R 後の Smad1TG においては β -catenin の蛋白レベルが著明に増加していた。免疫染色では、Smad1TG の心筋の介在板に β -catenin の著しい集積が観察された。以上の結果より、Smad1TG では Wnt シグナルが心筋梗塞サイズの減少や apoptosis の減少に関与していると考えられた。

[総括]

Smad1 による心筋保護効果は、ミトコンドリア依存性のアポトーシスを抑制するだけでなく、Wnt シグナルが心筋梗塞サイズの減少や apoptosis の減少に何らかの役割を担っていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

BMP (bone morphogenetic protein)2 は、心臓特異的転写因子の発現に重要な役割を果たし、心筋細胞の分化に必須であることがこれまでに報告されている。また BMP2 は、心筋細胞の培養系において、血清を除去下で生じる apoptosis に対して、Smad1 経路を介して Bcl-xL を誘導し、心筋保護効果を示すことが報告されている。しかしながら成体心での BMP2-Smad1 の機能的役割は未だ報告されていない。

そこで Smad1 が虚血再灌流下の心臓において心筋傷害を予防するかどうかについて、培養心筋細胞、トランスジェニックマウスを用いて検討を行った。

その結果、BMP2-Smad1 経路が心筋保護に重要であることを見出した。Smad1 による心筋保護効果はミトコンドリア依存虚血再灌流傷害時のアポトーシスを抑制する。

また Smad1 過剰発現トランスジェニックマウスでは Wnt シグナルが心筋梗塞サイズの減少や apoptosis の減少に関与している可能性が示唆された。さらに、BMP2 が心筋肥大作用の少ない保護因子であることより、心不全に対する臨床応用への可能性も示唆された。よって本論文は、学位の授与に値すると考えられる。