The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress
Author(s)	中井, 敦子
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48894
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

【８】

氏　　名	中　井　敦　子（なか い あつ こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２１７９８　号
学位授与年月日	平成 20 年３月 25 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	The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress （心臓におけるオートファジーの役割の解明）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　堀　　正二 （副査） 教　授　金倉　　譲　　教　授　仲野　　徹

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

オートファジーは出芽酵母から高等動植物まで保存されている普遍的な細胞内分解系の一つであり、細胞内蛋白質の品質管理や飢餓時におけるエネルギー供給に重要な役割を果たしている。一方、神経変性疾患や筋疾患、肝疾患において細胞死と共にオートファジーの増加が観察され、細胞死との関連性が示唆されている。循環器領域においてもヒトやモデル動物の不全心においてオートファジーの増加が認められている。しかしながらオートファジーが臓器不全を惹起する原因なのか若しくは細胞生存の為の代償機構であるのか不明であった。本研究では心臓におけるオートファジーの生理学的・病理学的意義を検討した。

【方法ならびに成績】

まず野生型マウスに横行大動脈縮窄による圧負荷手術を施行し、心肥大、心不全期におけるオートファジーの変化を評価した。術後１週間の心肥大期にはオートファジーの分子マーカーである LC3-II レベルの減少、術後４週間の心不全期には LC3-II レベルの増加が認められ、心肥大期にはオートファジーが減少し心不全期には増加することを確認した。

オートファジー誘導に必須分子である *Atg5* の欠損マウスは生後１日以内に死亡する。従って成体心臓におけるオートファジー機能解析のため、時期特異的、心臓特異的 *Atg5* 欠損マウスを作製した。タモキシフェン誘導性にα-myosin heavy chain プロモーターを活性化することによって下流の Cre 組換え酵素が心臓特異的に発現するトランスジェニックマウスと Floxed *Atg5* マウスを交配した。このマウスでは、タモキシフェン投与開始１週間後に心臓特異的にオートファジーが抑制されていた。心臓超音波法を用いて心機能を評価したところ心拡大、心収縮力低下を示し、また心重量、肺重量の増加を認めた。電子顕微鏡による観察では、心筋細胞筋節構造の形成異常やミトコンドリアの配列異常が観察された。更にユビキチン化蛋白質の蓄積、小胞体ストレスの上昇、心筋細胞アポトーシスの増加が認められ、これら心筋細胞構造異常や細胞死増加が心機能低下の原因であると示唆された。

心肥大は S6 キナーゼの活性化を伴っておりオートファジー抑制によって能動的な心筋細胞肥大が惹起される可能

性が考えられた。そこで *Atg7* に対する RNAi を組み込んだアデノウイルスベクターを作製し、ラット新生仔心筋細胞に感染させた。*Atg7* RNAi アデノウイルスベクター感染により、Atg7 タンパク質の減少とオートファジーの抑制が認められた。細胞レベルでは心筋細胞肥大は細胞面積、サルコメア形成率、心房ナトリウム利尿ペプチド発現増加により規定される。*Atg7* RNAi 感染細胞はコントロール、non-specific RNAi 群に比しそれらのいずれもが有意に増加しており、オートファジーが心筋細胞肥大に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

オートファジー欠損心の表現型を確認するため胎生期より活性化される myosin light chain-2v プロモーター下流に Cre 組換え酵素を挿入したノックインマウスと floxed *Atg5* マウスを交配することにより心筋特異的 *Atg5* 欠損マウス（*Atg5*$^{-/-}$）を得た。10 週令時の心機能、心形態は正常に保たれておりコントロール群と有意差を認めなかった。そこで横行大動脈縮窄による圧負荷手術を施行したところ、コントロール群においては代償性肥大期として心機能が保たれている術後 1 週間において、*Atg5*$^{-/-}$ は著明な左心機能低下と心不全を呈した。またユビキチン化蛋白質の蓄積、小胞体ストレスの上昇、心筋細胞アポトーシスの増加が認められた。さらにβ受容体刺激であるイソプロテレノールを持続投与すると、投与 1 週間において *Atg5*$^{-/-}$ は有意な心機能低下を示した。また *Atg5*$^{-/-}$ より単離した心筋細胞はコントロール群に比しイソプロテレノールに対し脆弱性を示した。

【総括】

本研究により、基底状態におけるオートファジーは心筋細胞のサイズや心臓の構造、機能の維持に必須の機構であり、心臓恒常性維持に大きな役割を果たしていることが明らかとなった。また病的心不全形成過程において誘導されるオートファジーは、圧負荷やβ刺激などの致死的外的ストレスに対して細胞保護的な反応であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

オートファジーは細胞内分解系の一つであり、蛋白質の品質管理や飢餓時におけるエネルギー供給に重要な役割を果たしている。循環器領域においては形態学的研究により不全心でオートファジーの増加が認められていたが、その病態形成における意義は不明であった。

本研究は心臓におけるオートファジーの生理学的・病理学的意義を検討したものである。発表者はオートファジー必須分子である *Atg5* の心臓特異的欠損マウスを作製した。薬剤誘導性 *Atg5* 欠損マウスは、オートファジーの抑制と共に心不全を呈した。一方、胎生期初期より *Atg5* を欠損したマウスは心機能が維持されていた。そこで心臓に負荷を与えた結果、野生型マウスでは心機能が保たれている時期に *Atg5* 欠損マウスは心不全を呈することを明らかにした。以上により、心臓では基底状態におけるオートファジーが必須の機構であること、また病的心不全形成過程においてオートファジーはストレスに対する細胞保護的な反応であることを初めて報告し、オートファジーの制御が新規心不全治療に大きな意味を持つ可能性を示唆した。

以上より、本研究は今後、心不全の病態解明や治療開発への寄与が大きいと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。