

Title	MnSOD発現制御による心筋ストレス応答におけるIKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B経路の保護的役割
Author(s)	中野, 優子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/49774">http://hdl.handle.net/11094/49774</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名	中野優子
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第22825号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	MnSOD発現制御による心筋ストレス応答における IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B 経路の保護的役割
論文審査委員	(主査) 教授 古郷 幹彦 (副査) 教授 脇坂 聡 准教授 竹村 元秀 准教授 杉村 光隆

## 論文内容の要旨

【背景】 歯科疾患患者のうち、心不全を合併している患者は増加傾向にある。心不全の発症には、アポトーシスを始めとするストレス誘導性の心筋細胞死が重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細な分子機序は不明である。転写因子 Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)は、ストレス応答性遺伝子発現の制御において重要な働きをしている。NF- $\kappa$ B は inhibitor- $\kappa$ B kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ), IKK $\beta$ , NF- $\kappa$ B essential modifier (NEMO)からなる IKK 複合体により活性化されるが、そのうち IKK $\beta$ が NF- $\kappa$ B の活性化に必要なかつ十分な因子である。これまで IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B 経路は一般的に細胞保護的と考えられてきたが、最近になり細胞傷害に働くとの報告もなされており、その役割は細胞や刺激の違いによって異なる可能性がある。われわれは以前、培養ラット新生仔心筋細胞において G 蛋白質共役受容体作動薬によって惹起される心筋細胞肥大に NF- $\kappa$ B が関与していることを報告した。しかし、*in vivo* の心筋における NF- $\kappa$ B の役割については依然不明である。

本研究では、心筋ストレス応答における IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B 経路の *in vivo* での役割について検討した。

【方法】 10 週齢の野生型マウスを用いて横行胸部大動脈縮窄 (transverse thoracic aortic constriction (TAC))術による左室圧負荷モデルを作製した。圧負荷後の心筋から細胞質および核蛋白質分画を抽出し、IKK $\beta$ および NF- $\kappa$ B の活性化を、inhibitor- $\kappa$ B  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ )を用いた *in vitro* kinase assay および electrophoretic mobility shift assay (EMSA)により検討した。次に心筋特異的 IKK $\beta$ 欠損マウスを作製した。エキソンに隣接するイントロン領域に flox 配列を挿入した IKK $\beta$  flox マウスと myosin light chain 2V promoter 依存性に Cre recombinase を発現するマウスとの交配によって得られた IKK $\beta$ <sup>flox/flox</sup>; MLC2VCre(+)マウス

スを心筋特異的 IKK $\beta$ 欠損マウス(CKO)群とし、IKK $\beta^{\text{flox/flox}}$ ;MLC2VCre(-)マウスを control (CTRL)群とした。10 週齢時に TAC 術を施行し、その表現型を心臓超音波検査、in situ TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling (TUNEL)法、組織学的解析により評価した。また、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子 mRNA の発現を dot blot 法、蛋白質の発現を Western blot 法により評価した。マウス成獣から心筋細胞を単離し、isoproterenol 刺激に対する細胞死の程度を trypan blue 染色で評価した。

【結果】野生型マウスでは TAC 後 1 週間で心肥大を呈し、4 週間で心不全となる。IKK $\beta$ 、NF- $\kappa$ B は心肥大期、心不全期のいずれにおいても活性化されていた。その活性化の意義を CKO を用いて検討した。CKO 群の定常状態での心形態、心機能は CTRL 群と有意な差は見られなかった。そこで TAC による圧負荷モデルを作製し、その表現型を検討した。TAC1 週間後に心臓超音波法で評価したところ、CTRL 群では心肥大を呈するものの心収縮能、左室内腔径は保たれていたのに比し、CKO 群では心収縮能低下、左室内腔径拡大、肺うっ血を来しうっ血性心不全を発症していた。TAC1 週間後の心筋を用いて TUNEL assay で検討したところ、心筋細胞のアポトーシスは CKO 群で有意に亢進していた。次に NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の発現レベルを検討したところ、抗酸化酵素である Manganese superoxide dismutase (MnSOD) にのみ変化が認められた。TAC1 週間後における MnSOD の mRNA および蛋白質発現は、CTRL 群に比べて CKO 群において有意に低下していた。また、抗 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)抗体を用いた免疫組織染色で評価した心筋の酸化ストレスは、TAC1 週間後において CKO 群で有意に亢進していた。NF- $\kappa$ B 欠損細胞では刺激によって酸化ストレスが増加し、アポトーシス促進因子である c-Jun N-terminal kinase (JNK)の活性化が亢進することが報告されている。そこで TAC 後の心筋における JNK 活性化を検討したところ、CKO 群において CTRL 群と比べて有意に活性化が亢進していた。上記の MnSOD 減少および JNK 活性化亢進が細胞死に関与していることを確認するため、成獣マウスから心筋細胞を単離し、isoproterenol 誘導性細胞死に対する MnSOD 様物質および JNK 阻害剤の効果を検討した。isoproterenol 刺激により、CKO 群由来の心筋細胞において有意な細胞死の亢進が認められたが、その細胞死は MnSOD 様物質および JNK 阻害剤によって有意に抑制された。

【結論】 *in vivo* の心筋における IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B 経路は、MnSOD 発現調節を介し酸化ストレスおよび JNK 活性化を調節することにより、ストレスに対して保護的に作用していると考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、血行動態ストレス応答における IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B 経路の役割について検討したものである。IKK $\beta$ 欠損心筋細胞は圧負荷により酸化ストレスの増加とアポトー

シスが誘導され心不全をより起こしやすいことから、IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B 経路の心筋細胞への保護的機能が初めて示された。

以上より、歯科の臨床における重要な合併症である心疾患のメカニズムの一端を明らかにしたことで、本研究は学位(歯学)授与に値すると考えられる。