

Title	Downregulation of ferritin heavy chain increases labile iron pool, oxidative stress and cell death in cardiomyocytes
Author(s)	大宮, 茂幹
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49806
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	おおみや しげみき かんきよんし 大宮 茂 幹 (康景智)
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 2 2 7 4 5 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 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学位論文名	Downregulation of ferritin heavy chain increases labile iron pool, oxidative stress and cell death in cardiomyocytes (心筋細胞において Ferritin heavy chain の減少は遊離鉄および酸化ストレスの増加をもたらす細胞死を誘導する)
論文審査委員	(主査) 教授 金倉 譲 (副査) 教授 楽木 宏実 教授 岩井 一宏

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

心不全の発症および進展には、酸化ストレスの亢進が関与していると考えられている。遊離鉄は活性酸素種の発生を促進し、酸化ストレスの亢進に寄与する。Ferritinはferritin heavy chain (FHC) およびferritin light chainから成る鉄貯蔵蛋白質であり、各種臓器に発現する。Ferritin のサブユニットのうちFHCのみが鉄結合能を有し、遊離鉄を取り込み隔離することで、細胞内の鉄利用を制御している。心不全における酸化ストレスの亢進に対するFHCの役割は明らかではない。本研究では心不全の発症および進展におけるFHCの役割を検討する。

〔 方法ならびに成績 〕

8週令のC57BL/6Jマウスの左冠動脈を絹糸を用いて結索することにより、心筋梗塞を作成した。マウスは術後4週間には左室内腔の拡大および壁運動の低下を生じ、心不全状態を呈した。

まず、心筋梗塞後不全心におけるFHC蛋白質の発現レベルをウエスタンブロット法を用いて検討した。心筋梗塞群のFHC蛋白質発現レベルは、偽手術群に比し有意に減少していた。一方、脳、肺および主要な鉄貯蔵臓器である肝臓等におけるFHC蛋白質の発現は、両群間で有意な差を認めなかった。以上により、不全心においてはFHC蛋白質の発現が心臓特異的に減少しており、遊離鉄の制御能が低下している可能性が示唆された。

次に、心筋梗塞後不全心での遊離鉄をプルシアンブルー染色を用いて評価した。偽手術群に比し心筋梗塞群で、鉄陽性細胞数の有意な増加を認めた。

また余剰な遊離鉄は酸化ストレスの亢進に寄与し得ることから、心筋梗塞後不全心における酸化ストレスの程度を評価するため、酸化ストレスのマーカーである4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) に対する免疫染色を施行した。偽手術群に比し心筋梗塞群において、染色度の有意な増強を認め、酸化ストレスの亢進が示された。

以上より、心臓におけるFHCの減少は、遊離鉄の増加および酸化ストレスの亢進を介して心不全の発症および進展に寄与する可能性が考えられた。

FHC発現減少の機能的意義を検討するため、ラット新生仔より心筋細胞を単離培養し、FHCを標的とする低分子ヘアピン型RNA (shRNA) を発現するアデノウイルスベクターを感染させた。非特異的shRNAを発現するアデノウイルスベクターを対照群とし、FHC蛋白質減少と細胞死、鉄代謝および酸化ストレスとの関係を検討した。

ウイルス感染4日後にFHC蛋白質の有意な発現の低下を認めた。ウイルス感染6日後にCell titer blue assay kitを

用いて細胞死を検討した。FHC欠失細胞群では、対照群に比し生存細胞数の有意な減少を認めた。

ウイルス感染6日後にプルシアンブルー染色を施行し、遊離鉄を評価した。FHC欠失細胞群では鉄陽性細胞数の割合が、対照群に比し有意に増加した。ウイルス感染4日後に鉄キレート剤であるデフェロキサミン (0.5mM) を培養液中に添加すると、鉄陽性細胞数の割合が有意に減少した。

さらにFHC減少時の細胞死が遊離鉄依存性であるかを検証するため、デフェロキサミンの細胞死に与える影響を検討した。FHC欠失細胞群においてみられた生存細胞数の減少は、デフェロキサミン投与で有意に抑制された。すなわち、FHC減少による細胞死は、遊離鉄依存性であることが示唆された。

次にウイルス感染6日後に4-HNE染色を施行し、心筋細胞内酸化ストレスを評価した。FHC欠失細胞群では4-HNE陽性細胞数の割合が、対照群に比し有意に増加した。デフェロキサミンの添加により、4-HNE陽性細胞数の割合が有意に減少した。すなわち、FHC減少時の酸化ストレス増加は遊離鉄を介していると考えられた。また、ウイルス感染4日後における抗酸化剤であるN-アセチルシステイン (0.2mM) の添加は、4-HNE陽性細胞数の割合を有意に減少した。

FHC減少時の細胞死が酸化ストレス依存性であるかを検証するため、ウイルス感染4日後に添加した抗酸化剤である、N-アセチルシステイン (0.2mM) またはビタミンE (1mM) が、細胞死に与える影響を検討した。その結果、FHC欠失細胞群においてみられた生存細胞数の減少は、N-アセチルシステインまたはビタミンEの投与によって有意に抑制された。すなわち、FHC減少時の細胞死は酸化ストレス依存性であることが示された。

〔 総 括 〕

不全心で認められるFHCの発現低下は、遊離鉄および酸化ストレスの増加を介して心筋細胞死を誘導し、心不全の進展に寄与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

心不全の病態形成には酸化ストレスが重要な役割を果たしている。一方、ferritin heavy chain (FHC) は酸化ストレスの産生に重要である細胞内遊離鉄の利用を調節する。すなわちFHCを介した遊離鉄の調節が、心不全の病態に何らかの関与をしている可能性が考えられるが、その詳細は不明であった。

本研究は、心不全の発症および進展におけるFHCの役割を検討したものである。発表者は野生型マウスの心筋梗塞後心不全モデルでのFHC蛋白質の発現量をはじめ、遊離鉄および酸化ストレスについて検討した。結果、不全心においてFHC蛋白質の発現低下および遊離鉄の増加が見られることを初めて示し、酸化ストレスの増加との関連も示した。RNA干渉を用いて単離ラット心筋細胞においてFHC蛋白質を欠失させると、遊離鉄および酸化ストレス依存性に細胞死が誘導された。不全心で認められるFHC蛋白質の発現低下が遊離鉄および酸化ストレスの増加を介して心筋細胞死を誘導し、心不全の進展に寄与する可能性が示唆された。これらの知見は今後の新たな心不全治療の開発に有用であると考えられ、本研究は学位の授与に値すると考えられる。