

Title	心筋細胞肥大におけるC/EBP β の機能解析
Author(s)	松田, 智子
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59985
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	まつ だ ちこ 松 田 智 子
博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)
学位記番号	第 25768 号
学位授与年月日	平成25年3月25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	心筋細胞肥大における C/EBPβ の機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 古郷 幹彦 (副査) 教授 上崎 善規 講師 森本 佳成 講師 波多 賢二

論文内容の要旨

【研究背景・目的】

わが国において高齢化の進行に伴い高血圧罹患患者数が増加しており、高血圧を合併している歯科疾患患者数は増加傾向にある。未治療の高血圧を含めた様々な心臓に対するストレスは病的な心肥大を促進し、終末像として心不全を惹起し歯科治療において大きなリスクとなる。病的な心肥大の制御機構として転写因子の関与が報告されているが、その全貌は未だ明らかではない。われわれは病的な心肥大に関与する新規の転写因子を同定する目的にて、種々の転写因子を発現するプラスミドと病的な心肥大の生化学的マーカーである心房性ナトリウム利尿因子 (atrial natriuretic factor, ANF) のプロモーター配列を挿入したルシフェラーゼリポーター発現プラスミドを HeLa 細胞に遺伝子導入し、ANF 転写活性を指標としたスクリーニングを行ったところ、CCAAT enhancer binding protein beta (C/EBPβ) の発現により ANF 転写活性の上昇を認めた。C/EBPβには炎症誘導・発癌・脂肪生成など多くの機能が報告されているが心筋細胞の病的肥大についての詳細な報告はない。本研究は病的な心肥大における C/EBPβの機能を検討することを目的とした。

【材料および方法】

ラット新生仔心筋細胞(neonatal rat cardiomyocytes : NRCM)の単離培養

生後 1-2 日齢の Wistar ラット新生仔より心臓を摘出し、コラゲナーゼを用いて細胞懸濁液を作成し、differential adhesion 法を用いて心筋細胞を単離した。単離心筋細胞は血清添加培地にて 24 時間培養後、無血清培地にて 24 時間培養し、実験に供した。

C/EBPβ過剰発現による ANF 転写活性への影響の評価

NRCM に、ラット ANF プロモーター配列(-3003)を挿入したルシフェラーゼリポーター発現プラスミドと C/EBPβ発現プラスミドをリポフェクション法にて遺伝子導入し、フェニレフリン(PE)による心肥大刺激を加え 48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。

C/EBPβ過剰発現とノックダウンによる病的な心肥大への影響の評価

野生型 C/EBPβ、および C/EBPβに対する shRNA 発現アデノウイルスベクターを作製した。NRCM へのウイルス感染 48 時間後に PE 負荷を行い、さらに 48 時間後に ³[H]-leucine の取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定し、心筋細胞肥大を評価した。

BNP プロモーター配列の欠失変異体ルシフェラーゼコンストラクトを用いた C/EBPβ cis 配列の検討

ラット ANF プロモーター配列の欠失変異体についてはプロモーター部分が-323 以下ではルシフェラーゼ活性が非常に弱くなり cis 配列の同定が困難であったため、ヒト脳性利尿ペプチド (brain natriuretic peptide, BNP) プロモーター配列の欠失変異体(-425,-145,-128,-102,-77,-25)のルシフェラーゼリポーターコンストラクトを作製し、PE 負荷による転写活性の変化を比較することで BNP プロモーターにおける C/EBPβに対する cis 配列を検討した。

野生型マウス (C57BL/6J) の圧負荷心肥大モデルの解析

10 週齢雄性 C57BL/6J に胸部横行大動脈縮窄術(thoracic transverse aortic constriction : TAC)による圧負荷病的な心肥大モデルを作製した。本モデルでは術後 1 週間に心機能低下を伴わない左室肥大が形成される。全心臓および核分画からのタンパク質抽出液を用いて、ウエスタンブロッティング法により C/EBPβの発現量を検討した。

心筋細胞特異的 C/EBPβ欠損マウスの作製と圧負荷モデルの解析

心筋細胞における C/EBPβの役割を解析するため、exon 1 の前後に loxP 配列を挿入した floxed *Cebpb* マウスを、心筋特異的プロモーターであるαミオシン重鎖プロモーター依存性に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと交配し、心筋細胞特異的 C/EBPβ欠損マウス(*Cebpb^{lox/lox} αMHC-Cre⁺*; CKO)を作製した。*Cebpb^{lox/lox} αMHC-Cre⁺*を対照群 (CTL) とした。本マウスに TAC を施行し、術後 1 週間に心重量などの解析、M モード心臓超音波検査による心機能の解析、ヘマトキシリンエオジン染色を用いた組織学的解析、定量 PCR 法を用いた心肥大のマーカー遺伝子 ANF・BNP・α-skeletal actin の mRNA 発現量の解析を行った。

【結果】

NRCM を用いたルシフェラーゼリポーターアッセイにおいて PE 刺激時の ANF の転写活性の上昇および心筋細胞肥大が、C/EBPβ過剰発現により有意に抑制された。すなわち C/EBPβは病的な心肥大を抑制する可能性が示唆された。しかし CEBPβノックダウンによる心筋細胞肥大反応の増強は認められなかった。

野生型マウスにおいて C/EBPβ発現量は TAC 術後 1 週に核分画において上昇した。CKO 出産数はメンデルの法則に従っており、10 週齢においては対照群と比し有意な心臓表現型を認めなかった。しかしながら CKO では CTL に比して TAC 術後 1 週において心重量(CKO 5.74 ± 0.09 mg/gBW, CTL 5.18 ± 0.06 mg/gBW, $p < 0.05$)、左室重量 (CKO 4.14 ± 0.06 mg/gBW, CTL 4.65 ± 0.08 mg/gBW, $p < 0.05$)、心筋細胞横断面積 (CKO $373.6 \pm 2.09 \mu\text{m}^2$, CTL $300.5 \pm 3.59 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$) の増加を認めた。また ANF/GAPDH (CKO 8.54 ± 0.77 , CTL 5.67 ± 0.83 , $p < 0.05$)、αSA/GAPDH (CKO 20.30 ± 1.29 , CTL 9.87 ± 1.13 , $p < 0.05$) の mRNA 発現上昇を認めた。以上より C/EBPβ欠損マウスは圧負荷後、対照群に比してより強い心肥大が誘導されることが明らかとなった。

BNP プロモーター配列の欠失変異体ルシフェラーゼリポーターコンストラクトを用いた解析により、BNP プロモーター領域-110 から-108 に C/EBPβに対する cis 配列が存在する事が示唆された。

【結論】

C/EBP β は心行力学的負荷に対して病的心肥大を抑制する因子であることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は病的心肥大における C/EBP β の機能解析を目的として、ラット新生仔心筋細胞 (neonatal rat cardiomyocytes:NRCM)における phenylephrine (PE)刺激時の、心房性ナトリウム利尿因子 (atrial natriuretic factor:ANF)転写活性およびタンパク質合成に C/EBP β が及ぼす影響を検討した。また心筋細胞特異的 C/EBP β 欠損マウス(CKO)を作製し胸部横行大動脈縮窄術 (thoracic transverse aortic constriction:TAC)による圧負荷病的心肥大モデルの解析を行った。また脳性ナトリウム利尿ペプチド (brain natriuretic peptide:BNP)欠失変異体を用いて C/EBP β cis 配列の解析を行った。

その結果、NRCM における C/EBP β 過剰発現において、PE 刺激時の ANF 転写活性の上昇およびタンパク質合成の亢進が有意に抑制された。また CKO では対照群に比して TAC 後 1 週において、心重量、心筋細胞横断面積の増加および心肥大マーカー mRNA の発現上昇をみとめた。以上より CKO ではより強い心肥大が誘導されることが示唆された。また BNP プロモーター上の-110 から-108 に C/EBP β cis 配列が存在することが示唆された。

以上の結果は、心行力学的負荷に対して病的心肥大を制御する因子を解明する上で重要な知見を与えるものである。

よって、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。