The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	心筋細胞肥大におけるC/EBPβ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、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

【5】

氏　　名	松　田　智　子（まつだ さとこ）
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/EBP βの機能解析
論文審査委員	（主査） 教　授　古郷　幹彦 （副査） 教　授　上﨑　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 construction：TAC)による圧負荷病的心肥大モデルを作製した。本モデルでは術後1週間にて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イング法により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*$^{flox/flox}$ *αMHC-Cre*$^{+}$：CKO)を作製した。*Cebpb*$^{flox/flox}$ *αMHC-Cre*$^{-}$を対照群（CTL）とした。本マウスにTACを施行し、術後1週間にて心重量などの解析、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(CKO5.74 ± 0.09 mg/gBW、CTL5.18 ± 0.06 mg/gBW、$p<0.05$）、左室重量（CKO4.14 ± 0.06 mg/gBW、CTL4.65 ± 0.08 mg/gBW、$p<0.05$）、心筋細胞横断面積（CKO373.6 ± 2.09μm^2、CTL300.5 ± 3.59μm^2、$p<0.05$）の増加を認めた。またANF/GAPDH（CKO8.54 ± 0.77、CTL5.67 ± 0.83、$p<0.05$）、αSA/GAPDH（CKO20.30 ± 1.29、CTL9.87 ± 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/EBPβは心血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/EBPβ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/EBPβが及ぼす影響を検討した。また心筋細胞特異的 C/EBPβ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/EBPβ cis 配列の解析を行った。

その結果、NRCM における C/EBPβ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/EBPβ cis 配列が存在することが示唆された。

以上の結果は、血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。