



Title	Rubicon-regulated beta-1 adrenergic receptor recycling protects the heart from pressure overload
Author(s)	Akazawa, Yasuhiro
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/89467
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	赤澤 康裕
論文題名 Title	Rubicon-regulated beta-1 adrenergic receptor recycling protects the heart from pressure overload (不全心における $\beta 1$ アドレナリン受容体ダウンレギュレーション機構の解明)
<p>論文内容の要旨</p> <p>〔目 的(Purpose)〕</p> <p>心不全は先進国における主要な死因の一つであり、最新の治療を行っても予後は不良であるため、新規治療標的の探索が急務である。$\beta 1$アドレナリン受容体($\beta 1AR$)は心筋細胞表面に存在するG蛋白質共役受容体で、心筋細胞の陽性変力作用に寄与しており、$\beta 1AR$がダウンレギュレーションされることが不全心における心筋収縮力の低下の一因と考えられている。$\beta 1AR$のダウンレギュレーション機構において、刺激された$\beta 1AR$はエンドサイトーシスによりエンドソームに輸送された後、細胞表面にリサイクルされるか、リソソームで分解されることが報告されているが、その制御機構は不明である。一方、Rubiconは細胞内分解系の一つであるオートファジーを抑制すると同時にエンドソームとリソソームの融合を抑制し、エンドサイトーシス性分解を負に制御することが知られている。以上のことから、本研究では心筋細胞$\beta 1AR$のダウンレギュレーションにおけるRubiconの役割を明らかにすることを目的とした。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>まず、Cre-loxPシステムを用いて心筋細胞特異的Rubicon欠損マウス(ノックアウトマウス)を作製した。10週齢における定常状態では、コントロールマウスと比較して心機能や組織重量に差を認めなかった。横行大動脈縮窄術(transverse aortic constriction: TAC)による圧負荷誘導性心不全病態モデルを作製したところ、ノックアウトマウスでは1週後に心臓超音波法により測定した左室拡張末期径および左室収縮末期径が有意に拡大し、左室短縮率が有意に低下した。心重量及び左室重量はノックアウトマウス、コントロールマウスとも、TACにより有意に増加したが、両群間で有意差を認めなかった。一方で、肺重量はコントロールマウスと比較しノックアウトマウスで有意に増加しており、ノックアウトマウスは心機能低下に加えて心不全を呈したと考えられた。組織学的評価では、ヘマトキシリン-エオジン染色による心筋細胞横断面積、アザンマロリー染色による心臓線維化領域面積、免疫染色によるCD45陽性細胞数およびCD68陽性細胞数は、いずれの群でもTAC手術後に増加したが、両群間の有意差は認めず、ノックアウトマウスの心機能低下に肥大、線維化、炎症は関与していないと考えられた。TAC1週後の心臓における$\beta 1AR$の発現量を評価したところ、コントロールマウスと比較しノックアウトマウスで有意に減少していた。この時点でのオートファジー活性の指標であるLC3-IIの発現量には両群間に差を認めず、$\beta 1AR$の減少にオートファジー性分解は関与していないと考えられた。心不全による二次的な影響を避けるために、ノックアウトマウスが心不全を呈する前のTAC後3日時点での$\beta 1AR$発現量を検討したところ、ノックアウトマウス心では有意に減少しており、以後の実験はTAC3日後に行うこととした。経心尖部的にIFr ミラーカテーテルを挿入し左室内圧測定を行ったところ、コントロールマウスではドブタミンの経静脈投与により濃度依存的に心拍数及びmaximum dp/dtが有意に増加したのに対して、ノックアウトマウスでは増加せず、$\beta 1AR$の減少が陽性変力作用の低下に寄与していると考えられた。また、TAC後の心臓においてノックアウトマウスではコントロールマウスと比較し$\beta 1AR$シグナリングの下流に位置するホスホランバンのリン酸化が有意に減少しており、$\beta 1AR$シグナル伝達が低下していると考えられた。詳細なメカニズムを検討するため、初代培養新生仔ラット心筋細胞にRubiconに対するshort hairpin RNAを生成するアデノウイルスベクターを感染させ、Rubiconノックダウン細胞を作製した後に、イソプロテレノール刺激を加えたところ、コントロール細胞では$\beta 1AR$発現量に変化を認めなかったのに対して、ノックダウン細胞ではイソプロテレノール刺激24時間後に$\beta 1AR$の発現量が有意に減少した。$\beta 1AR$に対するリサイクリングアッセイを行ったところ、コントロール細胞に比してノックダウン細胞ではリサイクルされる$\beta 1AR$が有意に減少しており、Rubiconは$\beta 1AR$のリサイクリングを正に制御していると考えられた。その制御メカニズムの詳細については、新たな今後の検討課題である。</p> <p>〔総 括(Conclusion)〕</p> <p>Rubiconは心筋細胞$\beta 1AR$のリサイクルの維持により、$\beta 1AR$のダウンレギュレーションを抑制する。Rubiconは心不全に対する新規治療標的となる可能性があり、今後の臨床応用が期待される。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 赤澤 康裕			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	大阪大学教授	坂田 泰史
	副 査	大阪大学教授	宮川 繁
	副 査	大阪大学教授	渚阪 夢隆

論文審査の結果の要旨

不全心においては、 $\beta 1$ アドレナリン受容体 ($\beta 1AR$) のダウンレギュレーションが心筋収縮力低下の一因である。本研究では、オートファジーおよびエンドサイトーシス性分解を抑制するRubiconの、心筋細胞 $\beta 1AR$ のダウンレギュレーションにおける役割を検討した。心筋細胞特異的Rubiconノックアウトマウスは心臓圧負荷手術により心不全を呈したが、肥大、線維化、炎症、オートファジー活性は対照群と比し明らかな変化を認めなかった。一方、 $\beta 1AR$ の蛋白質量およびシグナル伝達の低下、 β 受容体刺激に対する陽性変力作用の低下を示した。Rubiconをノックダウンした初代培養心筋細胞においては、 $\beta 1AR$ の β 受容体刺激による蛋白質量の減少やリサイクルの低下を認めた。

本論文は、Rubiconが心筋細胞 $\beta 1AR$ のリサイクルの維持により、 $\beta 1AR$ のダウンレギュレーションを抑制することを明らかにし、心不全に対する新規治療標的となる可能性を示した点において、学位に値するものと認める。