

# 論文の内容の要旨

論文題目 圧負荷による心肥大形成における gp130 を介するシグナル伝達の重要性についてドミナントネガティブトランスジェニックマウスを用いた検討

指導教官 循環器内科 永井良三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 魚住博記

心肥大は、心疾患の罹病率および死亡率における独立したリスクファクターであり、肥大の形成の機序を明らかにして心肥大を予防することが重要である。心筋細胞に肥大をもたらすものとして、カテコラミン、アンジオテンシン II、エンドセリン -1、サイトカイン等による刺激が知られているが、血行力学的負荷による機械的伸展が、心肥大形成に重要であると考えられている。最近、多能性のマウス胚性幹細胞(ES 細胞)を *in vitro* で心筋細胞に分化させた際に向心筋因子が産生されるとの仮定のもとに、分化途上の細胞の培養上清より同定された cardiotrophin-1 は、心筋細胞に対して強力な肥大誘導作用を示した一方で、それまで心筋細胞の肥大誘導作用の報告されていなかった IL-6 ファミリーのサイトカイン群と構造上の相同性を有していた。CT-1 の他にも、IL-11、LIF、OSM といった IL-6 ファミリーにも心筋細胞の肥大誘導作用が認められること、gp130 がこれらのサイトカイン群のシグナル伝達に必須の役割を果たしている受容体コンポーネントであることが証明され、心筋細胞では IL-6 受容体の発現レベルは必ずしも高くないが gp130 は高い発現レベルを示すこと、gp130 を恒常的に活性化させたマウスが著明な心肥大を形成すること、gp130 の欠損マウスが心室の低形成と造血系の異常を示し全て胎生期に死亡することなどから、gp130 の活性化が心肥大を誘導すると考えられている。しかしながら、gp130 が実際の心肥大形成に関与しているかについては明らかにされていない。また、gp130 が心筋保護に重要であるという報告がある。本研究では、シグナル伝達をすることができない gp130 を心筋特異的に過剰発現させたマウスを作成し、その腹部大動脈を縮緊することで、圧負荷による心肥大形成における gp130 の役割を検討した。さらに、圧負荷時における心筋細胞の apoptosis の誘導の有無を解析し、gp130 を介する心筋保護作用についての検討も

加えた。

gp130 を介するシグナル伝達において、box3 領域を含む c 端が重要であることが知られている。そこで、702番目の cysteine を stop codon に置換することで box3 領域を欠損させた gp130 (ドミナントネガティブ gp130) を  $\alpha$ MHC のプロモーター領域と結合させたコンストラクトを作成し、BDF1 マウスの受精卵にインジェクションして、マウス胎生後期から心筋特異的に過剰発現させた。transgenic マウス(TG マウス)は正常の繁殖力を有しており、大動脈を縮緊していない状態では wild type マウス(WT マウス)との相違点は認めなかったことから、gp130 は胎生期以降の負荷のない心臓では機能していないと考えられた。

次に、圧負荷による心臓の肥大反応を検討するため、20週齢の雄の WT、TG 両マウスを、sodium pentobarbital の腹腔内注射により麻酔した後に開腹し、腹部大動脈を左腎動脈直上のレベルで、27ゲージ針を用いて縮緊した。4週間経過した後、右頸動脈より観血的に血圧を測定し、WT マウスと同様に TG マウスでも大動脈の縮緊により血圧が上昇していたことを確認した。経過中、WT、TG いずれのマウスにも特別な異常は認めなかった。しかしながら、Hewlett-Packard 社製エコー装置(10 MHz プローブ)を用いて M モード法心エコー図検査を施行したところ、WT マウスでは心室中隔および心室後壁の壁厚が58%増加していたのに対し、TG マウスでは23%と壁厚の増加が抑制されていた。さらに、心臓を摘出して心体重比を測定したところ、WT マウスでは心重量が $40\pm 4\%$ 増加していたのに対し、TG マウスでは $15\pm 3\%$ の増加にとどまっていた。これらは、hematoxylin-eosin にて染色した標本の細胞の横断面積(cross sectional areas)の計測から、心筋細胞の肥大が抑制されていたことによるものであったことが確認された。

心肥大の形成時に、brain natriuretic factor (BNP) 遺伝子の発現の増加、および sarcoplasmic endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase 2 (SERCA2) 遺伝子の発現の減少がみられることが知られている。そこで、摘出した左心室より total RNA を抽出し、ノーザンブロット法を用いてこれらの遺伝子の発現レベルを解析した。WT マウスでは圧負荷の2日後より BNP 遺伝子の発現が増加し始め、4週間後には著増していたのに対し、TG マウスではこの発現レベルの増加が減弱していた。また、SERCA2 遺伝子の発現レベルの減少も TG マウスでは減弱しており、心肥大形成の際にみられる遺伝子の発現変化が、TG マウスでは抑制されていたことが示された。

gp130 を介する細胞内のシグナル伝達には JAK-STAT3 pathway と Ras-ERK pathway が知られており、in vitro ではこれらのシグナル伝達の活性化が、それぞれ心筋細胞の肥大誘導作用および心筋保護作用を示すとされている。心臓にて gp130 を欠損させたマウスでは、心筋保護作用が減弱していたために、負荷により apoptosis が著明に誘導されて左心室の内腔が拡大し、一週間以内に死亡したとする報告がある。そこで、本研究では圧負荷時における心筋細胞の apoptosis の誘導の有無を TUNEL 法を用いて解析した。しかしながら、apoptosis の誘導は認められず、左心室の内腔の拡大や死亡例を認めなかったこととあわせ

ると、TG マウスでは心筋保護作用は障害されていないと考えられた。さらに、gp130 を介するシグナル伝達のうち、圧負荷時にいずれの pathway が重要かを検討した。STAT3 の活性を、抗 STAT3 抗体を用いた免疫沈降後に抗リン酸化チロシン抗体によるウエスタンブロット法を用いて解析したところ、WT マウスでは圧負荷により STAT3 が活性化されていたのに対し TG マウスでは活性化が認められず、TG マウスでは JAK-STAT3 pathway の活性化が抑制されていたことが示された。一方で、ERK の活性を、myelin basic protein を基質に用いた gel 内リン酸化反応にて解析したところ、WT マウスと同様に TG マウスでも活性化されており、gp130 以外の系が ERK pathway を活性化していたと考えられた。

本研究により、圧負荷による心肥大形成に、gp130 を介する JAK-STAT3 pathway の活性化が重要であると考えられ、これまで明らかにならなかった、gp130 の経路を抑制することが心肥大の治療につながる可能性が示された。