

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 田中 真理子

本研究は、心不全の発症及び進展に重要な心筋細胞の肥大とアポトーシスに至るシグナル伝達経路について明らかにするため、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入細胞の手法を用いて、形態変化や遺伝子発現に重要と考えられている低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho-family (RhoA, Rac1, Cdc42) のそれぞれについての構成的活性化型および優先的抑制型変異遺伝子を培養心筋細胞に発現させた際の心筋細胞の形態変化およびアポトーシスの誘導についての解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

- 1) ラット新生仔心筋細胞の primary culture にて、アデノウイルスを用いて遺伝子導入したものは、培養心筋細胞の 95%以上に遺伝子が発現していることが X-gal 染色により確認され、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入が従来のリン酸カルシウム法による培養心筋細胞への遺伝子導入率（約 3%）に比べてより高率で有用な方法であることが確認された。
- 2) 液性因子刺激として PE 10^{-5} M および LIF 10^{-9} M を用いた心筋線維の形態の検討では、RhoA・Rac1・Cdc42 のそれぞれの活性化型遺伝子、RhoAV14・Rac1V12・Cdc42V12 を導入された心筋細胞では、いずれも液性因子の存在なしに横紋線維の重合が観察された。また、PE および LIF による横紋線維の重合はそれぞれの抑制型遺伝子である RhoAN19・Rac1N17・Cdc42N17 の導入によって阻害された。
- 3) LIF による特徴的な遠心性肥大型の細胞長の増加を細胞長/細胞幅比で評価したところ、Cdc42N17 の導入によって細胞長/細胞幅比の増大が有意に抑制され、逆に Cdc42V12 ではその比は有意に増大したが RhoA と Rac1 は影響を与えなかった。この結果から、Cdc42 が伸展方向の重合促進に重要である可能性が示唆された。これらの結果より、RhoA, Rac1, Cdc42 はいずれも心筋細胞繊維の重合を促進し、特に Cdc42 は伸展方向の重合促進ないし

並行方向の重合の抑制に重要であることが示唆された。

- 4) H_2O_2 により TUNEL 染色陽性細胞の割合は有意に増加し、それは Rac1N17 および Cdc42N17 の導入によって有意に抑制され RhoN19 では変化はなかった。 H_2O_2 を暴露しない細胞への RhoAV14、Rac1V12 および Cdc42V12 の導入では TUNEL 染色陽性細胞の割合は有意差は認められなかった。この結果より、Rac1 と Cdc42 は H_2O_2 による心筋細胞のアポトーシスに関与するが、単独ではアポトーシスを誘導するにはいたらず、また、RhoA は H_2O_2 による心筋細胞のアポトーシスに関与していないことが示唆された。

以上、本論文は培養心筋細胞を用いて、これまで求心性肥大との差が指摘されながらそのシグナル伝達経路が明らかでなかった遠心性の心肥大について、Cdc42 が重要である可能性を示唆した。加えて、Rac1 と Cdc42 アポトーシス

本研究は、これまで殆ど知られていなかった心筋細胞における Cdc42 の役割と、心筋における遠心性肥大およびアポトーシスのシグナル伝達経路の解明とに重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。