

## 論文の内容の要旨

論文題目      Disruption and Translocation of Dystrophin in Cardiomyocytes by  
Isoproterenol Stimulation: Novel Scheme of Acute Heart Failure

和訳            イソプロテレノール過刺激後のジストロフィンの断片化と心筋細胞内  
への移行: 急性心不全進展に関する仮説

指導教官      豊岡 照彦 教授

東京大学大学院医学研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

内科学循環器専攻

氏名      奚 航

### [背景と目的]

心不全患者で血中カテコラミン濃度が著増している。β刺激薬の isoproterenol (I) は、心収縮力を増強するために強心剤として使われている。I により心収縮力は一過性に高まるが、続投により、β受容体のダウンレギュレーションし、また心筋障害を起こして、患者の予後は投与前より増悪する。反対に心不全の患者にβ遮断薬を投与すれば予後が改善する多くの報告が有る。

Dystrophin (D) 遺伝子異常による筋ジストロフィー症は心筋を含め、進行性に全身の筋肉が変性、脱落し、二十代前半に呼吸不全、或いは重症心不全の結果、殆ど死に至る。D は細胞膜の直下に存在し、巨大な細胞膜裏打蛋白である。amino 末端が細胞内の F-actin と結合し、carboxyl 末端が D-Associated Glycoprotein Complex (DAGC) と繋がっている。DAGC は心筋細胞中の張力を細胞外の matrix に伝える重要な役割の他に、筋収縮時筋細

胞膜が伸展されるが、DACG は膜の過剰な緊張を防止する機能がある、D が何らかの原因により切断されると、筋細胞内の張力を有効に細胞外に伝えられなく、また細胞膜保護作用が減弱して、DMD 様の心筋疾患になると予想される。心筋は生涯収縮、弛緩を繰り返すため、骨格筋以上に強靭さが要求される。今回は、 $\beta$ -adrenergic 刺激により心筋障害が起きた時の心筋細胞の D と DAGC 中の sarcoglycan (SG) の障害を検討する。また心筋細胞では $\beta$ 刺激薬によるアポトーシスが報告されたが、D の障害とアポトーシスとの関係を解析する。

#### [方法]

1. I (10mg/kg) をラットの腹腔内投与し、心筋障害のモデルを作製した。対照群には生理食塩水を投与した。
2. 各種の特異抗体を用い、D と関連蛋白の $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -SG の障害を免疫組織法と Western blotting (W) 法で確認した。
3. 心筋培養細胞を用い、単離心筋細胞に及ぼす I の作用を検討した。
4. D の分解について各種の Protease inhibitor を使い、抑制を検討した。
5. Evan Blue (EB) 静注法による細胞膜透過性を観察した。
6. TUNEL 法も用い、アポトーシスを示す細胞を確認し、その time course を追って、アポトーシスと D 崩壊の前後の関係を比べた。
7. 更に二重染色法を使って、同一切片の中で、D が障害された心筋細胞とアポトーシスが起きた細胞を確定した。

#### [結果]

1. HE 染色により、I 刺激後の心筋障害を確定した。刺激 18 時間後に、macrophage を含め多数の浸潤細胞が認められた。40 時間後には筋細胞の一部は完全に消失した。更に Azan 染色によって、心筋細胞が無くなった部分には fibroblast が増殖してきた。
2. D は対照群動物の心筋細胞膜が均一に認められた。I 注射後に、一部の心筋細胞では細胞膜のほかに、細胞質も濃染した。これは心筋細胞の障害により D が切断され、細胞膜から細胞質に移行した可能性を示した。
3.  $\delta$ -SG は細胞膜に存在しており、D を染めた連続切片では D が壊れたにも関わらず、刺激前と同様細胞膜に局在し続けた。刺激後、 $\alpha$ -,  $\gamma$ -SG は淡染された箇所があるが、依然細胞膜に局在する。
4. W の結果は上記所見を完全に支持した。対照群では D の全長が保存され、I 投与後時間依存性に、限定分解されて特定の大きさに断片化した。しかし、同一の membrane を使って、 $\delta$ -SG を染めた結果、全く壊れていなかった。
5. 認識部位の異なる三種の抗体を使って、投与 18 時間後に、carboxyl 末端の認識抗体と amino 末端の認識抗体は、共に 50kDa の band を認めた。D の rod domain の認識

抗体は 50kDa 以外の断片も染められた。D が切断された部位は rod-domain を中心とし、carboxyl 末端も、amino 末端も別々に且つほぼ同時に切断された。

6. I を投与後 *in vitro* で incubation したサンプルは、しなかった場合に比べて、D の断片は数も量も増え、D 分解が亢進した。Incubation する前に serine protease inhibitor, PMSF; cysteine protease inhibitor, E-64; papain protease inhibitor, anti-pain; metallo protease inhibitor, EDTA 或いは phosphatase inhibitor を十分量加えても、この切断酵素の働きは止まらなかった。しかし、これらの protease inhibitor の cocktail を投与すると、活性化された酵素反応は一部分抑制された。また標本を incubation 前に 100°C で加熱処理すると、完全に蛋白分解は阻止された。これは責任蛋白分解酵素が複数存在する事を示す。

7. 蛍光色素の EB をラットに静注し、I で 18 時間刺激した後に蛍光顕微鏡で観察した。D が濃染した個所は EB でも染色された。高倍率の観察結果 D は細胞膜下から細胞質に移行し、EB も細胞内に取り込まれた。これは、心筋細胞膜の通過性が増加することを示す。

8. ラット胎児心筋から単離した培養細胞を用い、 $10^{-5}M$  の I と 24 時間 incubation した場合、*in vivo* とは違って、約 200kDa の二本の band だけ示した。ところが、非adrenergic 系の強心剤 caffeine(PDE 阻害剤)と digitoxin は濃い濃度で同じく 24 時間 incubation が行われても、D を壊させなかった。これは D の崩壊は I 刺激により心筋細胞に直接作用する事と全ての分解過程を I の作用だけでない事共に示した。

9. TUNEL staining では、D の壊れた細胞とアポトーシスが起きた細胞の time course を追跡すると、4 時間の時点で TUNEL 陽性細胞は対照群に比べると、有意な変化とは見られない。8 時間後には TUNEL 陽性細胞が心内膜下に多数見られた。しかも、D の壊れた部位と一致した。

10. 更に二重染色を行った結果、投与 18 時間後、アポトーシスを起した心筋細胞は D が障害された細胞とは、完全に一致していた。

#### [結論]

心筋細胞の D は  $\beta$ -adrenergic stimulation の直接作用により活性化された複数の酵素により、加水分解された。しかし DAGC 中の SG は分解されなかった。分解された D は細胞質に移行し、細胞膜の通過性が増加した。D の崩壊はアポトーシスより先行し、且つ同一細胞で起こった。D の内因性蛋白分解酵素による分解は I による心筋障害とアポトーシス進展の重要な原因になる可能性を示す。今回の研究は難治性心不全の進展過程に重要な経路を示すと伴に、今後の治療開発に新たな展開が期待される。