

## 審査結果の要旨

氏名： 奚 航

本研究は近年筋 Dystrophy 症に関する研究によって明確にされた筋細胞骨格蛋白の Dystrophin 及び Dystrophin Associated Glycoprotein Complex (DAGC) は  $\beta$ -adrenergic の過剰刺激による急性心筋傷害が発生する時の役割と、病態について解明を試みたものであり、下記の結果を得た。

1. 特異抗体を使って、免疫染色及び Western blotting を行った結果、Dystrophin は  $\beta$ -agonist の Isoproterenol (10mg/Kg) 投与により早期 (4 時間) に分解し、心筋細胞膜の直下から細胞質に移行する事が示された。しかし、DAGC 中の  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -Sarcoglycans は依然細胞膜に保存された。これは心筋の dystrophin は  $\beta$ 刺激により他の細胞骨格蛋白より早く分解される事を示した。
2. Dystrophin の分解は時間依存性に特定の大きさに断片化された。認識部位の異なる三種類の抗体で Western blotting を行った結果、carboxyl terminal 抗体と amino terminal 抗体は共に 50kDa の band を染め、rod-domain に対する抗体は更に分子量の大きい band を染めた。これは Dystrophin が蛋白分解酵素により rod-domain を中心とし、両端が同時に切断される事を示した。更に、心筋を homogenize して、37°C で 4 時間を incubation する前に数種類の protease inhibitor を充分量で加えても、この酵素反応を抑制できなかった。これらの inhibitor の cocktail を使い、この反応は部分的に止められる事ができ、これは Dystrophin 分解酵素は心筋細胞の内因性に含まれ、複数存在する事を示している。

3. 蛍光色素 Evans blue を静注後に、二重蛍光染色により Dystrophin が崩壊した心筋の細胞質に Evans blue も見出された。更に連続切片と二重染色して、心筋細胞の apoptosis と Dystrophin 崩壊の時間変化と位置関係を確認した結果、Dystrophin の崩壊は apoptosis より先行し、且つ同一の細胞で起きた。この結果は Dystrophin の崩壊により膜の安定性が失われ、透過性が上昇し、終に心筋細胞の apoptosis が起きる事を示している。
4. Isoproterenol ( $10^{-5}$  M)は培養心筋細胞の Dystrophin も壊させた。Caffeine と Digitoxin は同じ現象を起こさなかった。これは Isoproterenol の直接刺激により、Dystrophin が活性化した酵素に分解された事を示す。この分解酵素の活性化経路は  $\beta$ -adrenergic signaling pathway の upstream にあり、収縮力の増強によるものではない事を示唆する。

以上、本論文は心筋 Dystrophin が  $\beta$ -adrenergic 刺激により、蛋白分解酵素によって分解され、細胞質に移行する事を明らかにした。また心筋細胞膜が破損された結果、apoptosis が発生した事も示した。本研究は  $\beta$ -adrenergic の刺激による急性心筋傷害の病因が Dystrophin の崩壊による事を示した。その mechanism には内因性の蛋白分解酵素が関与する事を解明したうえ、今後の治療開発に役立つと考えられ、学位の授与に値するものと判断する。