

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 林 同 文

本研究は心臓から分泌されるナトリウム利尿ペプチドが、二次的、すなわち血行動態的に心負荷の解除に作用することは知られるが、心筋細胞に対しての直接作用は未知の部分が多く、これらを明らかにするため、新生仔ラット培養心筋細胞の系を用いて、心肥大反応として重要な細胞内情報伝達経路を中心にその分子メカニズムを解明することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 心肥大を誘導する液性因子 AngiotensinII (AngII), Endothelin-1 (ET-1) による刺激によって、蛋白合成能は対照群と比較してそれぞれ約 1.5 倍、1.9 倍の増加を認めたが、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP; 10^{-7} M) の前処置により、それぞれ約 80%、60%の抑制が示された。また ANP の second messenger である cyclic GMP (cGMP) の analogue、8-Bromo-cyclic GMP (8-Bromo-cGMP) を用いて同様に前処置を行ったところ、それぞれ約 50%、45%の抑制が示された。さらに cGMP dependent protein kinase 阻害薬を同時に添加することで、ANP による抑制効果が低下し、cGMP 分解酵素阻害薬を同時に添加することで抑制効果は増強することが示された。
2. 心肥大時に発現が誘導されることが知られる *c-fos*・BNP・ANP 遺伝子について解析した。その結果、Ang II, ET-1 刺激によって各遺伝子の発現や転写活性の亢進が誘導されたが、ANP 及び 8-Bromo-cGMP の前処置において、その亢進した発現レベルや活性レベルは有意に抑制されることが示された。
3. 心肥大に重要なリン酸化酵素 ERK に対して、Basal level 活性を、ANP の処置濃度及び添加時間を追って検討した。この結果、ANP は 濃度 10^{-7} M より、また処置時間 60 分より有意に ERK の Basal level 活性の抑制を示した。また 8-Bromo-cGMP 処置では、濃度 10^{-3} M より、処置時間 60 分より同様に ERK 活性の低下が示された。さらに AngII, ET-1 によって活性化した ERK を ANP 及び 8-Bromo-cGMP の前処置において抑制することが示された。

4. ANP による ERK 抑制メカニズムを追求し、MAPK 系の抑制蛋白 MKP-1 (MAP Kinase Phosphatase-1) について検討した。その結果、ANP (10^{-7} M) 添加によって mRNA レベルでは 30 分、蛋白レベルでは 120 分をピークにその発現が亢進することが示された。
5. MKP-1 による心肥大抑制の機能を解析するため、MKP-1 遺伝子を Lipofection 法により心筋細胞に導入して過剰発現させ、Luciferase assay 法を用いて、心肥大時に発現が亢進する *c-fos*, β MHC 遺伝子の転写活性を解析した。AngII 刺激によってこれらの転写活性は約 2 倍の亢進を示したが、MKP-1 遺伝子を過剰発現させることによってその活性を有意に低下させることが示された。さらに MKP-1 遺伝子を過剰発現させた心筋細胞において、AngII 刺激による蛋白合成能の増加が有意に抑制されていることも示された。

まとめると、AngII, ET-1 といった液性因子により誘導される心筋肥大において、ANP は蛋白合成、遺伝子発現、リン酸化酵素活性を抑制した。また、ANP は MKP-1 遺伝子及び蛋白レベルの発現を誘導し、この MKP-1 の発現亢進によって リン酸化酵素活性、遺伝子発現、蛋白合成の抑制に関与することが示された。すなわち、ANP はナトリウム利尿作用、血管拡張作用、交感神経系抑制作用などから心臓への負荷を軽減し二次的に心肥大抑制に働くだけでなく、心筋細胞に対して直接的に肥大抑制作用を示し、さらにこれらのメカニズムには second messenger である cGMP が関与することが明らかになった。

以上、本論文は新生仔ラット培養心筋細胞において、細胞内情報伝達経路を中心とした解析から、ANP が心筋細胞に直接心肥大抑制的に働く分子メカニズムを明らかにした。本研究は ANP 静注薬の投与が急性心筋梗塞や心不全における心筋リモデリングを抑制し患者予後に影響を与える臨床効果の基礎的裏付けになり、臨床上も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。