

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 16 年度博士課程 進学

氏 名 武井 昭紘

指導教員 小野 憲一郎

論文題目

犬の心疾患における心筋組織ミトコンドリア DNA に関する研究

犬の心疾患は獣医臨床で遭遇する機会の多い疾患で、心臓の機能的障害による循環不全がその病態を形成する最も重大な要素である。犬の心疾患には先天性心疾患、弁膜疾患、心筋疾患、心膜の異常、不整脈、血管の疾患に併発するなど様々な心疾患が存在するが、いずれも結果として、心ポンプ機能の低下による心拍出量の減少、弁膜の異常などによる心室腔内への血液流入量減少、高血圧などの圧負荷の増大による心拍出量の減少、不整脈などによる不十分な心拍出量、あるいは心タンポナーデや心膜炎による心拍出量の低下といった循環不全を引き起こすこととなる。ミトコンドリア DNA (mt DNA) は約 16 kbp の環状 DNA で電子伝達系における好氣的 ATP 合成に必須で、細胞あたり数十から数千コピー存在しており、そのコピー数は細胞のエネルギー需要と平行するとされ、mt DNA の変異は ATP 合成の面から、細胞の生存と機能に重大な障害を及ぼすと考えられている。一方、ミトコンドリアの電子伝達系は細胞の酸素消費の 90 % 以上を占め、細胞内で最大の活性酸素発生源で、mt DNA は核 DNA よりも強い酸化傷害を受けると推測されている。しかしながら、mt DNA の塩基置換速度 (mt DNA 修復) は核 DNA に比較して 10 倍以上早く、mt DNA

の変異の蓄積は mt DNA の損傷頻度が著しく高いか、あるいはその修復能が低下しているか、あるいはその両者が起こることによると考えられているが、いまだ明確な結論は得られていない。近年、mt DNA の D ループ (D-loop) の変異が、心不全など様々な疾患や老齢動物で報告され、mt DNA の変異とその修復機構、その結果おこるミトコンドリア活性の低下と病態との関連が注目されてきている。とくに心不全では心筋組織の mt DNA の変異が報告され、心筋細胞自体の機能維持という観点から、病態の増悪因子としても重要視されている。しかしながら、犬の心疾患における心筋組織の mt DNA に関する研究は行われておらず、その実態も不明である。前述したごとく、犬の心疾患ではその結果として循環不全が生じており、心筋組織についても相対的な虚血状態にあると考えられる。

そこで本研究では mt DNA D-loop に着目し、まずラット心筋培養細胞を用いて虚血条件下における心筋細胞 mt DNA の変異とその修復機構について、ついで、心筋症モデル動物の一つであるシリアンハムスター Bio 14.6 の心筋組織 mt DNA の変異について、さらに、心疾患の犬の心筋組織 mt DNA の変異について検討し、心疾患時の犬の心筋組織における病態を解析した。

第二章では、まず虚血条件下におけるラット心筋培養細胞 mt DNA について検討した。すなわち、ラット心筋培養細胞である H9c2 を 2 度サブクローニングして細胞の性質を均一化した後、虚血条件 (グルコース非添加、2 % O₂、10 % CO₂、88 % N₂) 下で 14 日間培養した。なお対照として通常の培養条件 (グルコース添加、5 % CO₂、95 % air) 下で培養した H9c2、ならびに新生子ラット心室筋を用いた。mt DNA Extractor CT Kit を用いて mt DNA を抽出した後、NCBI Entrez Nucleotide AC_000022 に登録されたラット mt DNA に基づいて作成したプローブを用いて PCR 法で増幅した。心室筋、通常の培養条件ならびに虚血条件で培養した H9c2 細胞から得られた PCR 産物は、いずれも約 1000 kb に単一のバンドとして観察された。得られた PCR 産物を常法に従いクローニングし、その塩基配列を解析した。心室筋 (10 クローン) ならびに通常培養条件下の H9c2 細胞 (112 クローン) の mt DNA の塩基配列は全て NCBI Entrez Nucleotide AC_000022 に登録されたラット mt DNA の塩基配列と同一であった。一方、虚血条件下で培養した H9c2 細胞 273 クローン (同一条件で 3 回実施、それぞれ 81 クローン、96 クローン、96 クローン) の mt DNA の塩基配列

では一塩基置換が 54 クローン (19.8%) (それぞれ 13 クローン (16.0%)、23 クローン (24.0%)、18 クローン (18.8%)) に認められた。

ついで mt DNA 修復能を低下させる、mt DNA 修復機構の鍵である DNA ポリメラーゼ γ の酸化について検討した。すなわち、虚血条件下で培養した H9c2 細胞からミトコンドリアを Qproteome™ Mitochondria Isolation Kit を用いて分離し、SDS で外・内膜を破壊した後、抗ヒト DNA ポリメラーゼ抗体ならびに OxyBlot™ protein oxidation detection Kit を用いたウエスタンブロット法で解析した。また、免疫沈降による解析も加えた。なお、抗ヒト DNA ポリメラーゼ γ 抗体の陽性対照としてヒト赤芽球様白血病細胞 (K562) を用いたところ、抗ヒトポリメラーゼ γ 抗体はラット DNA ポリメラーゼ γ を認識する抗体であった。虚血条件下で培養した H9c2 細胞のミトコンドリアタンパク質を OxyBlot で検討したところ、多くのミトコンドリアタンパク質が酸化されていたが、DNA ポリメラーゼ γ の移動度とほぼ同位置に酸化したタンパク質のバンドが認められた。また、免疫沈降した検体でも同様の結果が得られた。免疫沈降の過程で抗ヒト DNA ポリメラーゼ γ 抗体も酸化されるが、免疫沈降した検体を H_2O_2 で酸化すると DNA ポリメラーゼ γ の位置のバンドが増強し、虚血条件下で培養した H9c2 細胞の DNA ポリメラーゼ γ が酸化されていることが明らかとなった。さらに、活性酸素のトラップ剤である 5'5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) を最終濃度 88.37 μ M 添加時の DNA ポリメラーゼ γ の酸化について検討した。通常培養、虚血条件下ならびに DMPO 添加虚血条件下で培養した H9c2 細胞のミトコンドリアタンパク質を抗ヒト DNA ポリメラーゼ γ 抗体で免疫沈降した検体について OxyBlot で検討した。虚血条件下で酸化された DNA ポリメラーゼ γ のバンドは DMPO 添加により減弱し、またこのバンドをデンシトメトリーで数値化し統計処理したところ有意な低下が認められた。これらの結果、ラット培養心筋細胞は虚血条件下で mt DNA、D-loop に容易に変異が入り、その原因の一つは mt DNA 修復機構の鍵となる DNA ポリメラーゼ γ の活性酸素による酸化によって生じる mt DNA 修復能の低下によることが明らかとなった。

第三章では心筋症モデルとして用いられるゴールデンハムスター Bio 14.6 の心筋組織 mt DNA D-loop について検討した。すなわち、ラット、マウスならびにチャイニーズハムスターで報告されている mt DNA の配列からプライ

マーを作製し、Bio 14.6 の塩基配列を解析 (30 クローン) したところ、相同性高く (ラットとは 69.0 %、マウスとは 69.1 %、チャイニーズハムスターとは 77.6 %)、またげっ歯類に高度に保存される領域も良く保存されていた。ついで、2 ヶ月齢から 7 ヶ月齢の Bio 14.6 の心筋組織 mt DNA D-loop を解析したところ、5 ヶ月齢を除く全ての月齢の心筋組織 (2 ヶ月齢では 60 クローン、それ以外はそれぞれ 30 クローン) に一塩基置換 (2 ヶ月齢では 9 クローン (15 %)、3 ヶ月齢では 1 クローン (3.3 %)、4 ヶ月齢では 5 クローン (16.7 %)、6 ヶ月齢と 7 ヶ月齢ではそれぞれ 1 クローン (3.3 %)) が認められた。これらの結果、Bio 14.6 では 2-3 ヶ月齢で病理組織学的に心筋傷害が発生するとされる月齢から早期に mt DNA の変異が存在することが明らかとなった。

第四章では心疾患の犬の心筋組織 mt DNA D-loop について検討した。すなわち、まずホルマリン固定材料から mt DNA を抽出する方法を検討し、2 分割して増幅させることで mt DNA の抽出は可能であった。ついで、66 症例のホルマリン固定心筋組織について mt DNA D-loop を解析 (それぞれ 30 クローン) したところ、57 症例 (86.4 %) で一塩基置換から四塩基置換までが認められ、2 分割の 60 クローンあたり平均 10 クローン (16.7 %)、最大で 24 クローン (40.0 %) と高い頻度で変異が観察された。また、mt DNA 変異の発現頻度 (3.6 bp/10,000 bp) は拡張型心筋症マウス (DCM マウス) に認められる変異の頻度 (1.4 bp/10,000 bp) に比較して約 2.5 倍の発現頻度であった。しかしながら、心不全の罹病期間、心疾患の種類、あるいは代償作用として起こる心室拡張などと mt DNA 変異との間に有意な関連を認めることはできなかった。これらの結果、心疾患の犬の心筋組織 mt DNA D-loop には年齢、病変の重篤度にかかわらず、著しく高い頻度で mt DNA 変異の存在していることが明らかとなった。

以上のことから、犬の心疾患の心筋組織においては循環不全に基づくと考えられる活性酸素による DNA ポリメラーゼの酸化、またそれに引き続く mt DNA 修復能の低下により mt DNA D-loop の変異が高頻度に起こっていることが明らかとなった。したがって犬の心疾患では、これら心筋組織におけるミトコンドリア機能低下を考慮した治療法が必要であると考えられる。