

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 武井 昭紘

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、細胞のエネルギー需要と平行するとされ、この変異は 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。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が、犬の心疾患については明らかにされていない。本論文は犬の心疾患における心筋組織の mt DNA、とくに D-loop に着目し検討したもので、緒論ならびに総括を除いた以下の 3 章から構成されている。

まず第二章では、ラット心筋培養細胞 (H9c2) 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検討している。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 Extraction CT Kit を用いて mt DNA を抽出した後、NCBI Entrez Nucleotide AC000022 に登録されたラット mt DNA D-loop の塩基配列に基づいて作成したプローブを用いて PCR 法で増幅した。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 の塩基配列は登録されたラット mt DNA D-loop の塩基配列と完全に一致した。一方、虚血条件下で培養した H9c2 細胞 273 クローンの塩基配列では一塩基置換が 54 クローン (19.8 %) と高頻度に認められた。また、活性酸素のトラップ剤である 5' 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMP0、88.37 μ M 添加) すると塩基置換などの変異は認められなかった。

ついで、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ている。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分離し、酸化 DNA ポリメラーゼ γ について検討した。また、抗ヒト DNA ポリメラーゼ γ 抗体を用いて免疫沈降による解析も加えた。多くのミトコンドリアタンパク質が酸化されていたが、免疫沈降させた結果から、虚血条件下で培養した H9c2 細胞の mt 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。また、DMP0 添加すると DNA ポリメラーゼ γ の酸化は有意に軽減した。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を明らかにしている。

ついで第三章では、心筋症モデル動物の一つであるゴールデンハムスター Bio 14.6 の心筋組織 mt DNA D-loop の変異について検討している。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、5 ヶ月齢を除く全ての月齢の心筋組織に一塩基置換 (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 D-loop に変異が存在することを明らかにしている。

さらに第四章では、心疾患の犬 66 症例の心筋組織 mt DNA D-loop を解析 (それぞれ 30 クローン) したところ、66 症例中 57 症例 (86.4 %) と高頻度 (3.6 bp/10,000 bp) に変異が認められた。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 D-loop の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にしている。

また以上のことから、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 γ 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と考えている。また、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推測している。

このように、本論文は未だ明らかにされていない犬の心疾患における心筋組織ミトコンドリア DNA D-loop の変異を明らかにしたものである。その内容は、獣医学の学術上貢献するものであり、よって、審査委員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。