

論文内容の要旨

論文題目 **Analysis of molecular mechanisms for the adaptive response induced by hypoxic stress in cardiomyocytes (低酸素刺激ストレスに対する心筋細胞の応答機構の解明)**

氏名 村口尚志

研究の背景と目的

運動などの生理的状态や動脈硬化・心臓疾患などの病的状態、低酸素状態が生じ、それに心臓が応答する。低酸素刺激に対する心臓の応答機構を解明することは、運動の研究に役立ち、また、心筋梗塞、糖尿病などの生活習慣病の予防法(食習慣、運動習慣)や治療法の確立に繋がる。心筋細胞における低酸素研究では、長時間の低酸素刺激に対する心筋細胞の応答(細胞内情報伝達系)は数多く報告されている。しかし、短時間での低酸素刺激で変動するタンパク質や細胞内情報伝達は十分に解明されていない。本研究ではラット心筋由来株化細胞(H9c2細胞)を用いて、特に低酸素刺激の初期段階で発現が変化するタンパク質を同定し、細胞死および細胞死を抑制する機構の解明を目的として研究を行った。

実験方法

1 低酸素刺激がH9c2細胞へ及ぼす影響

H9c2細胞を10%FBS含有DMEMで培養し、実験に用いた。低酸素刺激に対する影響を解明するために、グローブバッグ内に窒素を充填した低酸素条件下に細胞を暴露し、15分後、3、6、12、24時間後に光学顕微鏡を用いて細胞形態の観察および細胞数、生存率をトリパンブルー法で測定した。さらに、apoptosisの指標になるcaspase-3の活性化とDNA断片化をwestern blot法とTUNEL法により検討した。

2 プロテオミクス解析

H9c2細胞を15分間の低酸素刺激を行った後、二次元電気泳動用のLysis bufferを添加して、細胞を回収した。細胞混濁液から遠心して、可溶性タンパク質を回収した。タンパク質400μgを用いて二次元電気泳動法を行い細胞内タンパク質の発現変動を検討した。変動のあったタンパク質スポットを切り出し、質量分析を行った。

3 prohibitin 過剰発現による低酸素刺激に対する効果

prohibitinのcDNAをRT-PCRで増幅し、pAcGFP発現ベクターに挿入した。このプラスミドコンストラクトをH9c2細胞に導入し、prohibitin-GFPを過剰発現させ、8時間、24時間低酸素に暴露させ、細胞数の変化について解析した。また、prohibitinの局在に関して、蛍光免疫染色法を行った。

4 prohibitinの生化学的機能解析

prohibitin-GFPを過剰発現させたH9c2細胞を用いて、低酸素に3時間暴露させ、ミトコンドリアの膜電位の変化について解析した。また、prohibitin-GFPを過剰発現させたH9c2細胞を用いて、低酸素に18時間暴露させ、ウェスタンブロット法によりCytochrome c、Bcl-2、Baxの変化を検討した。

実験結果

1 低酸素刺激による H9c2 細胞の細胞死

H9c2 細胞の形態は、低酸素刺激開始後 6 時間以降より明らかに細胞の大きさが縮小し、細胞数が 3 時間以降から優位な減少が認められた。長時間 (3 時間以上) の低酸素刺激によって、H9c2 細胞で細胞死が誘導される事が明らかになった。また、長時間の低酸素刺激では、caspase-3 の活性化と DNA の断片化が見られたことから、この細胞死はアポトーシスである事が判明した。一方、短時間 (15 分間) の低酸素刺激では、刺激前と比較して、細胞形態、細胞数で有意な変化は認められなかった。

2 プロテオミクス解析

タンパク質 400 μ g を用いて二次元電気泳動法を用いて細胞内タンパク質の発現変動を検討した。明確に変動のあったタンパク質スポットを切り出し、質量分析を行なった結果 prohibitin が同定された。

3 prohibitin 過剰発現による低酸素刺激に対する効果

低酸素刺激 15 分後、1、3、6 時間後による prohibitin の mRNA とタンパク質発現レベルを検討した。mRNA の変化は見られなかったが、タンパク質レベルで prohibitin の発現が経時的に減少していた。このことから、prohibitin は低酸素刺激によりタンパク分解を受けていると示唆された。次に、H9c2 細胞に prohibitin-GFP を過剰発現させた後、低酸素刺激を行うとコントロールに比べ細胞数が有意に高く ($P < 0.05$)、細胞死が抑制されていた。また、prohibitin はミトコンドリアに局在する事が蛍光免疫染色により明らかとなった。

4 prohibitin の生化学的機能解析

低酸素刺激 3 時間後のミトコンドリア膜電位を検討した。低酸素暴露により、膜電位が低下していることが明らかとなった。prohibitin-GFP を過剰発現させた H9c2 細胞ではコントロールに比べ膜電位の低下が有意に抑制されていた。次に、prohibitin-GFP 過剰発現 H9c2 細胞を低酸素刺激に 18 時間暴露後、Cytochrome *c* のミトコンドリアからの遊離が有意に抑制されていた。さらに、Bcl-2 の減少が抑制されていた。しかし、Bax のミトコンドリアへの移行には影響が見られなかった。

考察

本研究では、低酸素刺激によって H9c2 細胞はアポトーシスを誘導する事を示した。

本研究室では以前、低酸素刺激 15 分で、細胞生存シグナルが誘導されていると報告している。そこで、本研究では低酸素刺激 15 分で変化するタンパク質を同定するためプロテオーム解析を行ったところ、prohibitin の同定に成功した。prohibitin は低酸素刺激 15 分で減少し始め、長時間にわたり発現抑制が続いた。細胞死誘導とパラレルな発現抑制であった。そこで、prohibitin に細胞生存作用があるとの仮説をたてて、prohibitin の過剰発現実験を行った。prohibitin の過剰発現により細胞死が抑制され、仮説が実証された。prohibitin は、ミトコンドリアに局在し、膜電位の維持、アポトーシス誘導因子の Cytochrome *c* のミトコンドリアからの遊離抑制、細胞死の抑制が示されたことから、prohibitin の細胞生存作用機構の詳細な解析が可能となった。本研究で、prohibitin をターゲットとした心臓疾患の予防法や治療法の確立、また、生活習慣病の運動療法の確立に繋がる成果が得られた。