

審査の結果の要旨

氏名 鮎澤 信宏

本研究は、心疾患において重要な役割を果たすことが示唆されているミネラルコルチコイド受容体 (MR) の活性化に低分子 G 蛋白 Rac1 が寄与することを示すため、マウス圧負荷性心不全モデルにおいて Rac1 や MR の活性化につき検討するとともに、本モデルに対して Rac1 阻害薬や MR 拮抗薬、心筋特異的 Rac1 欠損による介入を行い、その効果の解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. C57BL/6J マウスに大動脈縮窄術を行い心臓に慢性圧負荷を加えたところ、7 週間後には高度の心肥大および心不全が起こることが示された。すなわち、心重量の増加、左室壁厚の増大、心筋断面積の増加、左室駆出率の低下が見られ、また病的な心肥大の指標遺伝子である ANP (atrial natriuretic peptide) 遺伝子や β -MHC (myosin heavy chain) 遺伝子の発現増加、心筋機能に關与する SERCA2 (sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 2) 遺伝子の発現低下が示された。
2. 同実験において、圧負荷により左室における総 Rac1 蛋白質量は変化しなかったが、活性化型 Rac1 蛋白質は増加することが GST pull down assay により示された。また、左室の核分画と細胞質分画の蛋白質を抽出し Western blot により MR 蛋白質量を評価したところ、圧負荷により細胞質分画の MR 蛋白質量は変化しなかったが、核分画の MR 蛋白質量は増加しており、MR の核内集積亢進が起こることが明らかとなった。さらに、心筋における MR 標的遺伝子である PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) 遺伝子および Serpina3n (serine or cysteine peptidase inhibitor, clade A, member 3N) 遺伝子の発現量を qRT-PCR にて検討したところ、左室におけるこれら遺伝子の発現量は圧負荷により増加していた。
3. 次に、同実験系において、Rac1 阻害薬 NSC23766 (NSC) および MR 拮抗薬 eplerenone (EPL) の投与が及ぼす効果について検討した。NSC により圧負荷による左室 Rac1 活性化は抑制され、また圧負荷による MR の核内集積亢進および MR 標的遺伝子の発現増加は NSC および EPL の両者により抑制された。そして、圧負荷により引き起こされる心肥大および心不全も NSC および EPL の両者により改善した。なお、MR リガンドであるアルドステロンの血中濃度は NSC 投与により変化しなかった。これらの結果から圧負荷により活性化された Rac1 が循環アルドステロン量の変化とは異なる機序により MR の活性化を引き起こし、心肥大・心不全に寄与することが示唆された。

4. 上記実験系において、圧負荷を受けた左室では NADPH oxidase (Nox) 4 遺伝子の発現量が著しく増加しており、また Nox 活性が増加していることが Lucigenin assay にて示された。さらに圧負荷により酸化ストレス産物である 4-HNE (4-Hydroxynonenal) が増加していることが Western blotting にて示された。これらの変化は NSC および EPL 投与の両者により抑制された。以上から、圧負荷による Rac1・MR 活性化から心肥大・心不全に至る経路には Nox4 活性化による酸化ストレスの亢進が関与している可能性が示唆された。
5. さらに、Cre・LoxP システムを用いて心筋特異的 Rac1-KO マウスを作成し解析を行った。ホモ接合型 KO マウスは胎生致死であったが、ヘテロ KO 接合型マウスは通常飼育条件では明らかな異常を示さず、野生型マウスとの比較において心筋細胞特異的に Rac1 発現が半減していることが確認された。このヘテロ KO マウスおよび野生型マウスに大動脈縮窄術を行ったところ、野生型では 7 週間後に高度の心肥大・心不全を示し、左室 Rac1 の活性化、MR の核内集積亢進、MR 標的遺伝子の発現増加、Nox4 遺伝子の発現量増加が見られたが、これらの変化はいずれもヘテロ KO マウスでは抑制された。なお循環アルドステロン濃度は野生型とヘテロ KO マウスで同等であった。以上の結果から、圧負荷性心不全では心筋細胞の Rac1 の活性化が MR の活性化を介した障害形成に重要であることが示された。

以上、本論文は圧負荷性心不全において心筋細胞の Rac1 の活性化が循環リガンドの変化とは異なる機序で MR 活性化を引き起こし、Nox4 活性化・酸化ストレスの亢進を介して障害形成に関与することを示した。昨今、心不全における MR の重要性は周知のところとなったが、その活性化機序には未だ不明な点が多く残っていた。本研究はその一端の解明に貢献するとともに、心不全に治療における MR 活性化への新たな介入戦略として Rac1 阻害の可能性を見出したものであり、学位の授与に値するものと考えられる。