

機関番号: 24303

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2008~2010

課題番号: 20591284

研究課題名(和文) 先天性心疾患動物モデルにおけるアポトーシスシグナル伝達経路と幹細胞の解析

研究課題名(英文) Analysis of apoptosis signal and stem cells in congenital heart disease model rats.

研究代表者

問山 健太郎 (TOIYAMA KENTARO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号: 00433285

研究成果の概要(和文):

先天性心疾患児の循環動態上で特徴的な低酸素と容量負荷動物モデルを作成し、心筋組織の形態変化(心肥大、apoptosis)と生化学的変化(apoptosisのsignal pathway)について検討してきた。方法としては、それぞれの負荷終了後心筋組織を採取し、1)心筋apoptosisを評価する目的でTUNEL染色、2)アポトーシスのsignal pathwayを解析する目的で、FasL、casoase9、ASK1の心筋のウエスタンブロット、3)さらにその上流のsignalを解析する目的で、小胞体ストレスのマーカーであるCHOPのRT-PCRを施行した。結果は、1)低酸素負荷群のTUNEL陽性率($0.13 \pm 0.017\%$)は、無処置対照群($0.079 \pm 0.030\%$)と比較して有意に高値であり、容量負荷群のTUNEL陽性率($0.25 \pm 0.059\%$)は、シャムope群($0.075 \pm 0.014\%$)と比較して有意に高値だった。2)心筋を用いたウエスタンブロットでは、FasLについては無処置対照群と低酸素群、シャム群と容量負荷群とで有意差を認めなかった。しかしcaspase9およびASK1については無処置群よりも低酸素群、シャム群よりも容量負荷群でそれぞれ有意な亢進を認めた。3)CHOPのRT-PCRでは、無処置群と比較して低酸素群において有意な亢進を認めた。以上より、低酸素および容量負荷は心筋細胞においてASK1を介するapoptosisを誘導し、ASK1の上流のsignalについてその詳細は今後解析を進める予定だが、低酸素負荷については小胞体ストレスが関与していることが分かった。心筋apoptosisに関連した遺伝子の変動を検索する目的で、低酸素および容量負荷心筋組織を用いてDNAマイクロアレイによる遺伝子検索を施行したが、低酸素、容量負荷群でそれぞれ亢進している遺伝子(FOS gene)がみつかった。

研究成果の概要(英文):

A hypoxia and a volume overload rat model of congenital heart disease are made, and the morphological change of the cardiac muscle tissue and the biochemical changes have been examined. As the method, the cardiac muscle tissue after each load ended was gathered, and 1)TUNEL dye to evaluate cardiac muscle apoptosis, 2) to analyze signal pathway of apoptosis, westernblot of the cardiac muscle of FasL, casoase9, and ASK1 was done, and 3) to analyze the upstream signal of FasL, casoase9, and ASK1, RT-PCR of CHOP that is the marker of the endoplasmic reticulum stress was enforced. Result is that 1) hypoxia model rats were higher in TUNEL positive than sham rats. 2) in westernblot analysis in cardiomyosite, no remarkable change was observed in FasL among hypoxia group and volume overload group, sham group. But caspase9 and ASK1 were higher in hypoxia group. 3) CHOP analysis of RT-PCR, hypoxia group was higher than other groups. It was understood that the endoplasmic reticulum stress took part about a hypoxia loading, and the future signal of the upstream of ASK1 will be analysed. The gene that was accentuated in the hypoxia and the volume overload group respectively was found though the gene retrieval by DNA microarray, that was enforced by using the hypoxia and the volume overload cardiac muscle organization to retrieve the change of the gene related to cardiac muscle apoptosis.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:臨床医学小児循環器領域

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・小児科学

キーワード:先天性心疾患、アポトーシス、容量負荷、圧負荷、FasL、caspase9

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患の患者の血行動態を考える上で、低酸素負荷と容量負荷は避けて通ることができない課題である。しかしながら、乳児期、小児期の心筋細胞に関する研究、特にこれら低酸素負荷と容量負荷に対する反応については解明が進んでいないのが現状である。成人領域では心筋細胞内でのシグナル伝達の解明が進んでおり、小児にもこれらの研究を応用することで病態の解明が進むことが期待される。

2. 研究の目的

先天性心疾患の心不全の病態に apoptosis が関与するか否かを知る目的で、幼若 rat を用いた先天性心疾患動物モデル(低酸素および容量負荷)における心筋細胞の apoptosis の検討(シグナルパスウェイの解析を含めた)を行った。

3. 研究の方法

低酸素負荷モデルは、幼若 SD ラットを用いて作成した。生後 4 週目から 2 週間、FiO₂=10%の低酸素環境下で通常飼育をおこなった。生後 6 週時(低酸素負荷 2 週間経過時)に心エコー検査の後、検体を採取した。

容量負荷モデルは、幼若 SD ラットに生後 4 週の時点で腹部大動脈-下大静脈シャントを作成する。その後、4 週間通常飼育をおこなった後、生後 8 週時(容量負荷 4 週間経過時)に心エコーを行い、検体を採取した。

それぞれの負荷終了後心筋組織を採取し、

1)心筋 apoptosis を評価する目的で TUNEL 染色を施行した。評価は、主心室の全 30 視野の細胞数を計測、全体の心筋細胞に占める TUNEL 陽性細胞数を百分率で評価した。

2)左室心筋検体を凍結心筋パウダーにして後で、アポトーシスの signal pathway を解析する目的で、FasL、caspase9、ASK1 の心筋のウエスタンブロットをおこなった。

3)さらにその上流の signal を解析する目的で、小

胞体ストレスのマーカーである CHOP の RT-PCR を施行した。

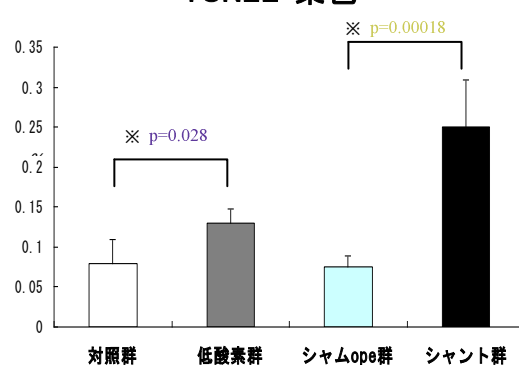
4)最後に心筋凍結パウダーを用いて RNA を抽出し、マイクロアレイをおこなった。

4. 研究成果

1)TUNEL 染色

低酸素負荷群の TUNEL 陽性率(0.13 ± 0.017%)は、無処置対照群(0.079 ± 0.030%)と比較して有意に高値であり、容量負荷群の TUNEL 陽性率(0.25 ± 0.059%)は、シャムope群(0.075 ± 0.014%)と比較して有意に高値だった。

TUNEL 染色

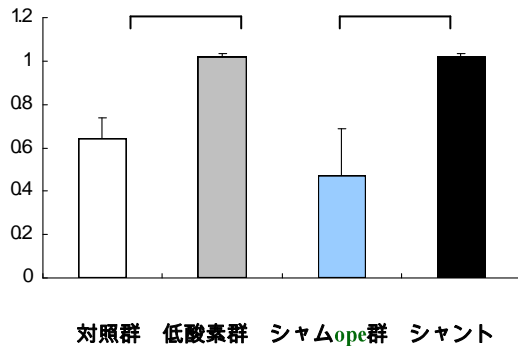


2)心筋を用いたウエスタンブロット

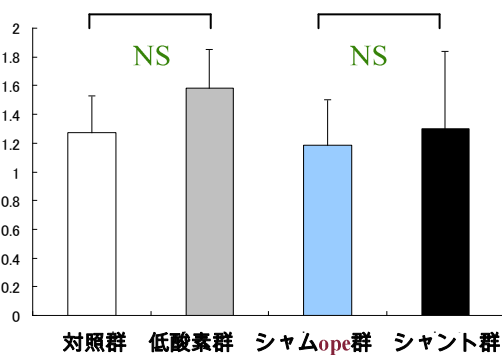
①FasL については無処置対照群と低酸素群、シャム群と容量負荷群とで有意差を認めなかった。

②しかし caspase9 および ASK1 については無処置群よりも低酸素群、シャム群よりも容量負荷群でそれぞれ有意な亢進を認めた。

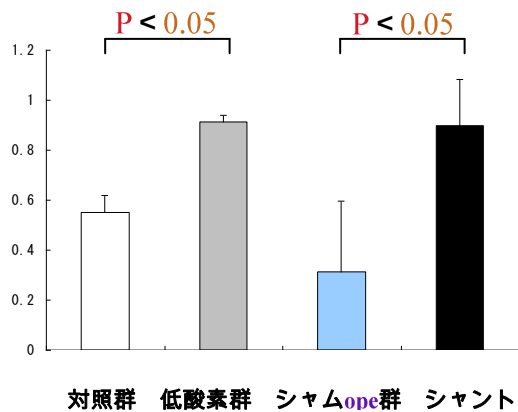
•caspase9



•FasL



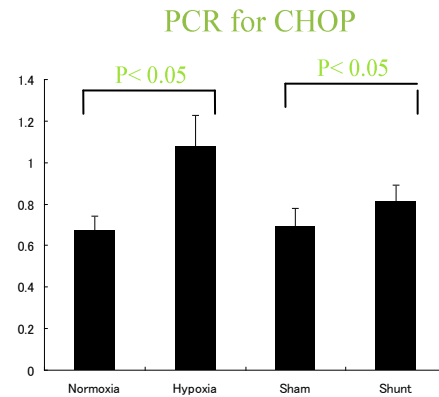
•ASK1



低酸素負荷及び容量負荷モデルにおいて、ASK 及び caspase9 が亢進していることから、両モデルにおける負荷に対する反応の経路としては、ASK1 を介するアポトーシスの signal が考えられた。

3)CHOP の RT-PCR では、無処置群と比較して

低酸素群において有意な亢進を認めた。



ASK1 を介する signal の上流については、4HNE の染色及び CHOP の PCR の結果から、低酸素負荷モデルにおいては酸化ストレス及び小胞体ストレスからの signal が、容量負荷モデルについては、小胞体ストレスからの signal の可能性が考えられた。

4)マイクロアレイ

マイクロアレイでは、低酸素負荷及び容量負荷モデルにおいて、FOS gene が亢進していることから、FOS の亢進が心筋 apoptosis 誘導に関与している可能性が考えられた。

先天性心疾患動物モデルにおいて低酸素および容量負荷によって心筋細胞の apoptosis が誘導された。

低酸素、および容量負荷によって誘導されるアポトーシスは、ASK1 を介する signal が考えられた。その上流については、低酸素については酸化ストレス及び小胞体ストレスが、容量負荷については小胞体ストレスが考えられた。

FOS gene を制御することで、心筋 apoptosis および hypertrophy を制御することが期待できると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

問山 健太郎 (TOIYAMA KENTRO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号:00433285

(2)研究分担者

河井 容子 (KAWAI YOUKO)
京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医
研究者番号:60405248

小澤 誠一郎 (OZAWA SEIICHIROU)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号:40405246

浜岡 建城 (HAMAOKA KENJI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号:60189602

(3)連携研究者

()

研究者番号: