様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　21　年　6　月　5　日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19590838
研究課題名（和文）心筋再潅流障害におけるジストロフィンの役割に関する研究

研究課題名（英文）　The role of dystrophin in the pathogenesis of myocardial reperfusion injury

研究代表者
大谷　肇(OTANI HAJIME)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60168979

研究成果の概要：
心筋を短時間の虚血で前処置することによって誘導される ischemic preconditioning(IPC)の虚血、再潅流障害に対する心筋保護効果は、ミトコンドリアの保護と密接に関係していることが知られている。我々は、その心筋保護効果がミトコンドリアの機能温存に伴う再潅流時 ATP 産生の増加とジストロフィンの細胞膜への再分布促進と関連していることを明らかにした。この成績は、虚血、再潅流時にジストロフィンが細胞膜から遊離し、細胞骨格分画へと局在変化する機序がミトコンドリアの機能消失に伴う細胞内 ATP の低下に起因しているという仮説を支持している。そこで、細胞内 ATP 低下に伴うジストロフィンの局在変化の分子機序を明らかにし、その再潅流障害における役割を明確にすることがまず必要であると考えられた。我々はまた、IPC の心筋保護効果は再潅流直後に心筋の収縮性を一過性に抑制することによって著明に増強されることも明らかにした。このことから、心筋保護的処置によってミトコンドリアが保護された心筋においては、再潅流時にミトコンドリアによる ATP の産生増加に伴ってジストロフィンが細胞膜に再分布するまで心筋収縮力を抑制することが有効な再潅流障害の予防法になりうると考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
平成１９年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成２０年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学
キーワード：①心臓，②虚血，③再潅流，④ジストロフィン，⑤ミトコンドリア

１．研究開始当初の背景
分子生物学、細胞生物学の進歩に伴い低酸素や各種ストレスによって引き起こされる細胞死に関する研究は格段の進歩を遂げた。し

かし、心筋虚血、再潅流障害の機序が十分に解明されているとは言い難く、心筋細胞特異的心筋保護法は確立されていない。その原因は虚血、再潅流によって惹起される心筋に特異的な病態生理を十分に解明できなかった点にあると考えられる。虚血や再潅流に伴う心筋細胞死の機序がその他の細胞死と大きく異なる点は、心筋細胞では再潅流後早期に筋原線維の収縮に伴って細胞膜が破綻し、壊死（一次的な細胞膜透過性の亢進によるoncosis）に陥ることである。この現象は病理学的には収縮帯壊死と定義され、虚血のみによって起こる凝固壊死とは区別されてきた。本研究の代表研究者はこの点に着目し、心筋細胞には収縮に伴う機械的ストレスから細胞膜を保護するために他の細胞には存在しない重要なタンパクが発現し、そのタンパクの性質や局在が虚血、再潅流に際して大きな影響を受けると考えた。

アクチン-ミオシンの相互反応によって発生する収縮力はZ-バンドを介して細胞膜に伝達される。したがって、Z-バンドの細胞膜接合部は最も機械的ストレスのかかる部位である。この部位にはビンキュリン、タリンやパキシリンなど多くの細胞骨格タンパクが集合し、機械的ストレスから細胞膜や細胞骨格を保護していると考えられている。しかし、これまでに報告された多くの研究結果からは、心筋再潅流障害に一次的に関与しうるタンパクは同定できなかった。

ジストロフィンは心筋細胞と骨格筋細胞にのみ存在する膜タンパクであり、α、β-ジストログリカンおよびサルコグリカンファミリー（α、β、γおよびδ-サルコグリカン）と連結し、ジストロフィン-グリコプロテイン複合体を形成して細胞膜と細胞骨格の強い物理的結合を提供している。ジストロフィンはそのカルボキシル末端において細胞膜の細胞質側でβ-ジストログリカンと結合し、アミノ末端は細胞内でZ-バンド上のアクチンに結合して、心筋細胞の収縮に伴いZ-バンドの細胞膜接合部で発生するshare stressから細胞膜を保護する役割を果たしている。進行性筋ジストロフィーはジストロフィンが欠損することによって進行性に骨格筋や心筋の壊死・変性を引き起こす遺伝性疾患である。また、ジストロフィンやサルコグリカンの遺伝子が欠損したマウスでは拡張型心筋症を発症することが知られている。最近、本研究課題の代表研究者はラットの摘出潅流心を用いた実験でジストロフィンが虚血中に細胞膜から細胞骨格分画に移動することを発見した。この変化は同様な働きをする他の膜タンパクや細胞骨格タンパクではみられず、ジストロフィンに特徴的な生化学的変化と考えられた。また、ラットの摘出潅流心をミトコンドリア呼吸鎖の脱共役剤であるジニトロフェノールまたはミトコンドリアF_1-F_0 ATPase抑制剤であるオリゴマイシンで処置することによっても虚血時と同様にジストロフィンの局在変化がみられた。このことから、ジストロフィンの局在変化は単にミトコンドリア膜電位の脱分極ではなく、ATPの産生低下そのものに起因していることが示唆された。

心筋を短時間の虚血で前処置することによって誘導される ischemic preconditioning(IPC)の虚血、再潅流障害に対する心筋保護効果は、ミトコンドリアの保護と密接に関係していることが知られている。我々は、その心筋保護効果がミトコンドリアの機能温存に伴う再潅流時ATP産生の増加とジストロフィンの細胞膜への再分布促進と関連していることを明らかにした。この成績は、虚血、再潅流時にジストロフィンが細胞膜から遊離し、細胞骨格分画へと局在変化する機序がミトコンドリアの機能消失に伴う細胞内ATPの低下に起因しているという仮説を支持している。そこで、細胞内ATP低下に伴うジストロフィンの局在変化の分子機序を明らかにし、その再潅流障害における役割を明確にすることがまず必要であると考えられた。我々はまた、IPC の心筋保護効果は再潅流直後に心筋の収縮性を一過性に抑制することによって著明に増強されることも明らかにした。このことから、心筋保護的処置によってミトコンドリアが保護された心筋においては、再潅流時にミトコンドリアによるATPの産生増加に伴ってジストロフィンが細胞膜に再分布するまで心筋収縮力を抑制することが有効な再潅流障害の予防法になりうると考えられた。

２．研究の目的

本研究の目的は、これまでの研究で導かれた作業仮説を証明するために、まず心筋細胞を用いた in vitro の実験系でジストロフィンの細胞膜局在における細胞内ATP濃度依存性を検討する。ジストロフィンは細胞膜結合領域とアクチン結合領域を有し、どちらかの結合領域を欠くジストロフィンは細胞膜強度保持作用がないことが予想される。そこで、心筋細胞にアクチン結合領域を欠くジストロフィンを強制発現させて心筋細胞膜の脆弱性が惹起されるか否かを検討する。次に、心筋細胞のジストロフィンがATP依存性に細胞膜に局在するタンパク領域を明らかにし、細胞内非移行性ジストロフィンを強制発現させて、低酸素下または前述のミトコンドリ

ア機能阻害剤を用いてATPが減少した心筋細胞において細胞膜の強度が維持されるか否かを検討する。

３．研究の方法

(1) 心筋虚血、再灌流時における dystrophin-glycoprotein complex (DGC)の変化に関する検討

心筋虚血、再灌流時における DGC の分布および量的な変化を検討した。S-D 系雄性ラット 250-300g の摘出心を Langendorff 灌流し、虚血前、常温虚血後 5 分、15 分、30 分および再灌流後 5 分、15 分、30 分で DGC を免疫組織化学染色してその分布および量的な変化を共焦点レーザー顕微鏡(当該研究機関に設置済み)にて観察し、免疫電気泳動法を用いて膜分画、細胞骨格分画および細胞質分画における DGC の分布変化を定量化した。

(2) 心筋虚血、再灌流障害の病態生理における DGC の役割に関する検討

DGC の分布および量的な変化が再灌流後の心筋収縮再開に伴い生ずる心筋細胞障害と関連があるか否かを検討した。ラットの摘出心を 15 分の可逆性虚血または 30 分の重篤な虚血後心筋収縮抑制剤である 2,3-butanedione monoxime (BDM)を用いて 5 分または 30 分再灌流した後 BDM を含まない Krebs-Henseleit 重炭酸緩衝液を用いて灌流した。BDM 再灌流後細胞膜 DGC の減少程度と Krebs-Henseleit 重炭酸緩衝液に交換し収縮再開後の心筋細胞障害程度との相関を検討した。心筋収縮力は当該施設に設置済みの心機能測定用システムを用いて測定し、心筋細胞障害程度は冠静脈洞中への creatine kinase (CK)の遊離と再灌流 2 時間後に triphenyltetrazolium chloride 染色法により求めた梗塞サイズから評価した。再灌流後細胞膜 DGC の減少が、他の細胞膜構成タンパク(wheat germ agglutinin 反応性糖タンパク)や細胞膜の安定性に関る細胞骨格タンパク(vinculin,、talin および desmin)の減少に先行して起こることを免疫組織化学的方法および免疫電気泳動法にて検討した。

(3) 虚血に伴う DGC の細胞内分布変化の機序に関する検討

DGC がリン酸化タンパクであり、細胞内高エネルギーリン酸化合物濃度とミトコンドリア機能依存性にその分布が変化するか否かを検討した。ラットの摘出潅流心を digitonin 処置し細胞膜を透過性にした後、アルカリフォスファターゼ処置して DGC の分布変化を観察する。また、digitonin 処置した心臓で潅流液 ATP 濃度と心筋 DGC の分布変化との関係を検討した。次に常温虚血後 5 分、15 分、30 分またはミトコンドリア脱共役剤である dinitrophenol 処置後 5 分、15 分、30 分で心筋高エネルギーリン酸化合物濃度を当該研究施設に設置済みの高速液体クロマトグラフィーにて測定し、DGC の分布変化と心筋高エネルギーリン酸化合物濃度との関係を検討した。

４．研究成果

Dystrophin は虚血中に細胞膜から細胞骨格分画に移動し、さらに再灌流時には分解され消失した。細胞膜を digitonin によって透過性にし、低濃度(2 mM)の ATP で心臓を潅流すると Dystrophin は細胞膜から細胞骨格分画に移行したことから Dystrophin の局在変化には細胞内ＡＴＰの減少が関与していると考えられた。この変化は同様な働きをする他の膜タンパクや細胞骨格タンパクにはみられず、Dystrophin に特徴的な生化学的変化と考えられた。再灌流時に Evans blue 色素を用いて同定した細胞壊死は細胞膜 Dystrophin が消失した心筋細胞において認められた。一方心筋壊死は再灌流時に心筋収縮抑制剤 2,3-butanedione monoxime (BDM) を用いることによって抑制されたが、BDM 除去後収縮再開によって細胞膜 Dystrophin が消失した心筋細胞において Evans blue の取り込みがみられた。次に、再灌流障害を抑制することが知られている ischemic preconditioning (IPC)を行うと再灌流時にミトコンドリアの機能温存と心筋ＡＴＰの増加に伴って Dystrophin の細胞膜への再分布が認められ、心筋壊死は有意に抑制された。また、IPC 施行心において再灌流時 BDM を用いて一過性に収縮を抑制すると IPC の心筋保護効果はさらに増強された。以上の結果から、細胞膜 Dystrophin の消失は再灌流障害の成因として重要であり、ミトコンドリアの機能温存をもたらす心筋保護的処置と再灌流時に一過性収縮抑制を併用することによって再灌流障害が著明に軽減されることが示唆された。

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　２　件）

1. Otani H. The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling. Antioxid Redox Signal 2009, in press.
2. Otani H. Ischemic preconditioning:

from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal 10: 207-248, 2008.

〔学会発表〕（計　1　件）

1. Ischemic preconditioning-mediated activation of RISK promotes restoration of sarcolemmal dystrophin.
Moriguchi A, Otani H, Yamashita K, Okazaki T, Sato D, Matsuhisa S, Akita Y, Enoki C, Imamura H, Iwasaka T.
American Heart Association Scientific Session 2009, 2009年１１月、米国ニューオリンズ

〔図書〕（計　　0件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　　0件）

○取得状況（計　0件）

〔その他〕
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
大谷　肇（OTANI HAJIME）
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60168979

(2)研究分担者
伊藤　文昭（ITO FUMIAKI）
摂南大学・薬学部・教授
研究者番号：80111764

(3)連携研究者
なし