

心筋細胞肥大および心線維芽細胞増殖での Heat-shock protein 90 の役割

The role of Heat-shock protein 90 on cardiomyocyte hypertrophy
and cardiac fibroblast proliferation

2019 年

田村 昌子

目次

緒言	1
第一章 心筋細胞肥大への Hsp90 の関与	3
1-1 実験材料・方法	4
1-1-1 実験動物	4
1-1-2 新生仔ラット心筋組織からの心筋細胞の単離	4
1-1-3 総細胞数に占める心筋細胞の割合の算出	5
1-1-4 培養心筋細胞への被験薬の投与	5
1-1-5 心筋細胞面積の測定	6
1-1-6 培養心筋細胞の western immunoblotting 用試料溶液の調製	6
1-1-7 心筋細胞培養液の western immunoblotting 用試料溶液の調製	6
1-1-8 Western immunoblotting	7
1-1-9 統計方法	8
1-2 結果	9
1-2-1 心筋組織から単離された総細胞数に占める心筋細胞の割合	9
1-2-2 培養心筋細胞の細胞面積に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 の効果	10
1-2-3 心筋細胞培養液中の ANP 量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 投与の効果	11
1-2-4 培養心筋細胞の Hsp90 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 の効果	12
1-2-5 培養心筋細胞の c-Raf および serine338 リン酸化 c-Raf 含量 に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 の効果	13
1-2-6 培養心筋細胞の Erk1/2 および threonine202/tyrosine204 リン酸 化 Erk1/2 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 の効果	15
1-2-7 培養心筋細胞の GATA4 および serine105 リン酸化 GATA4 含量 に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 の効果	17

1-2-8 培養心筋細胞の cleaved caspase-3 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 の効果	19
1-3 考察	20
第二章 心線維芽細胞増殖への Hsp90 の関与	23
2-1 実験材料・方法	24
2-1-1 実験動物	24
2-1-2 新生仔ラット心筋組織からの心線維芽細胞の単離	24
2-1-3 心線維芽細胞への被験薬の投与	24
2-1-4 心線維芽細胞増殖の検討	24
2-1-5 心線維芽細胞の western immunoblotting 用試料溶液の調製	24
2-1-6 Western immunoblotting	25
2-1-7 統計方法	25
2-2 結果	26
2-2-1 培養心線維芽細胞の細胞数に及ぼす 17-AAG の効果	26
2-2-2 培養心線維芽細胞の Hsp90 含量に及ぼす 17-AAG および MG-132 の効果	27
2-2-3 培養心線維芽細胞の c-Raf および serine338 リン酸化 c-Raf 含量 に及ぼす 17-AAG および MG-132 の効果	28
2-2-4 培養心線維芽細胞の Erk1/2 および threonine202/tyrosine204 リン酸化 Erk1/2 含量に及ぼす 17-AAG および MG-132 の効果 ..	30
2-3 考察	32
総括	34
謝辞	35
引用文献	36

略語表

本文中では以下の略語を用いる.

17-AAG	17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin
ANOVA	analysis of variance
ANP	atrial natriuretic peptide
Ara-C	cytosine- β -D-arabinoside
CF	cardiac fibroblasts
CM	conditioned medium
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	dithiothreitol
ECM	extracellular matrix
EGTA	ethyleneglycol-bis(2-aminoethyl ether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
ET-1	endothelin-1
Erk	extracellular signal-regulated kinases
FBS	fetal bovine serum
GA	geldanamycin
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
Hsp90	heat shock protein 90
ITS	insulin-transferrin-selenium
MAP kinase	mitogen-activated protein kinase
MKK	MAP kinase kinase
MKKK	MAP kinase kinase kinase
Mek	MAPK/Erk kinase
NRVMs	neonatal rat ventricular myocytes
PAGE	poly-acrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PVDF	polyvinylidene difluoride
S.E.M.	standard error of the mean
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
TGF- β	transforming growth factor- β
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol

WGA-FITC

fluorescein-conjugated wheat germ agglutinin

緒言

心臓は、虚血性心疾患や高血圧等の基礎疾患に起因する負荷が加わると、組織学的形態変化および心ポンプ機能の代償機構を働かせ、力学的および代謝的負荷に適応する¹⁾。例えば、心筋梗塞後に容量負荷あるいは圧負荷が持続すると、心筋梗塞を免れた生存心筋は心筋細胞肥大および心筋組織の線維化を介して、心機能を維持する。この心臓の組織学的な再構築は、心筋リモデリングと呼ばれる¹⁾。しかしながら、長期にわたり心臓への負荷が持続すると、心筋リモデリングが過度に進行し、心臓の代償機構は破綻する。代償機構の破綻に伴い、心臓は、収縮力低下による心ポンプ機能低下、すなわち心不全に陥る¹⁾。我が国では、生活習慣の欧米化と急速な高齢化で、心不全の患者数が増加しており²⁾、2016年の厚生労働省の死因に関する統計では、わが国の心疾患に起因する死亡者数 197,807 人のうち、約 37% の 73,508 人が心不全で死亡している。したがって、心不全に対する新たな治療薬の開発が期待されており、心機能の代償期から心不全に陥る過程での心臓の病態生理学的変化を把握することは、心不全の新たな治療法を開発するために重要な意義を持つ。

心筋リモデリングは、細胞内の様々な情報伝達経路により誘発される。機械的刺激および神経体液性刺激により、細胞膜上の受容体が活性化すると、細胞内情報伝達経路およびそれに引き続く転写因子が活性化される。その結果、タンパク質合成が亢進し、心筋リモデリングが進展する。細胞内情報伝達経路の 1 種である mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ経路は、心筋リモデリングの進展に重要な役割を果たすと考えられている。MAP キナーゼ経路は、MAP kinase kinase kinase (MKKK), MAP kinase kinase (MKK) および MAP kinase の 3 種のプロテインキナーゼにより構成され、これら 3 種のキナーゼの連続的な活性化を特徴とする³⁾。Raf/MAPK/Erk kinase (Mek)/extracellular signal-regulated kinases (Erk) 経路は、MAP キナーゼ経路の 1 つで、細胞増殖、分化および細胞生存に寄与する³⁾。MKKK の Raf は、低分子量 G タンパク質ファミリーおよび他のリン酸化酵素との相互作用で活性化される。Raf はセリン/スレオニンキナーゼで、その下流に位置する MKK の Mek1 および Mek2 をリン酸化する。リン酸化されることで活性化された Mek1 および Mek2 は、Erk1/2 をリン酸化反応を介して活性化する。この活性化された Erk1/2 は、最終的に核内の転写因子や他のプロテインキナーゼの活性化を制御する³⁾。培養心筋細胞では、Erk1/2 が受容体刺激あるいは伸展刺激で活性化される⁴⁾。加えて、圧負荷で生じる肥大心でも Erk1/2 の活性化が報告されている^{4,5)}。これらの知見から、心臓での Raf/Mek/Erk 経路は、心筋リモデリングに関与すると推測されている。

Heat shock protein 90 (Hsp90) は、非ストレス時にも細胞内に豊富に存在する主要な分子シャペロンであり、ストレス暴露でその発現量はさらに増大する⁶⁾。Hsp90

は、タンパク質の成熟した機能的・高次構造の形成・保持および不必要な凝集を抑制する役割を担う⁷⁾。Hsp90 の特徴の 1 つに、他の Hsp は多種多様なタンパク質と相互作用するのに対し、Hsp90 は特定のタンパク質とのみ相互作用することが知られている。この Hsp90 の標的となるタンパク質は、クライアントタンパク質と呼ばれる。Hsp90 のクライアントタンパク質には、種々の情報伝達因子が含まれており、そのほとんどはリン酸化酵素である⁸⁾。培養細胞株を用いた研究では、c-Raf が Hsp90 のクライアントタンパク質であり、Hsp90 阻害により c-Raf の発現量が減少することが示されている^{9,10)}。したがって、Hsp90 は、c-Raf の機能制御を介して Raf/Mek/Erk 経路を制御し、心筋リモデリングの進展に寄与すると推察されるが、心筋リモデリングでの Hsp90 の役割は、未だ明らかにされていない。前述したように、心筋リモデリングは心筋細胞肥大および間質の線維化を形態的な特徴としている。心線維化には、心線維芽細胞の増殖が寄与すると推察されることから、本研究では、ラット初代培養心筋細胞および培養心線維芽細胞を用い、心筋細胞肥大および心線維芽細胞増殖への Hsp90 の関与について検討した。

第一章では、初代培養心筋細胞を用い、心筋細胞肥大への Hsp90 の関与について検討した。その作用機序を解明するため、ET-1 で肥大が誘発された心筋細胞の Raf/Mek/Erk 経路に及ぼす Hsp90 阻害の効果について検討した。さらに、Erk1/2 の細胞内情報伝達系の下流因子として、転写因子 GATA4 に着目し、GATA4 活性化への Hsp90 阻害の効果についても検討した。

第二章では、ラット培養心線維芽細胞を用い、心線維芽細胞増殖への Hsp90 の関与について検討した。心筋細胞と同様に、Hsp90 阻害が Raf/Mek/Erk 経路に及ぼす効果について検討した。

第一章 心筋細胞肥大への Hsp90 の関与

心筋細胞は、分化過程の終末にある終末分化細胞で、出生後間もなく分裂能を喪失する¹¹⁾。そのため、心臓は障害を受けて一部の固有心筋細胞が失われても、細胞死を免れた生存心筋を増殖させる組織修復はできない。心臓では、心筋梗塞などの基礎疾患で固有心筋細胞の一部が失われると、生存した心筋細胞が肥大し、循環動態を維持する¹⁾。細胞レベルでは、心臓へ容量負荷および圧負荷が加わると、心筋細胞では、タンパク質合成が亢進し、新たなサルコメアが形成され、心筋細胞容積が増大する¹²⁾。加えて、心筋細胞の収縮タンパク質およびイオンチャネルなどの心筋発現遺伝子が胎児型に変化する形質転換をきたす¹²⁾。例えば、肥大心のミオシン重鎖および骨格筋アクチンでは、エネルギー効率のよい胎児型アイソフォームの発現量が増加する¹²⁾。初期の心肥大は、心臓に加わった種々のストレス負荷に適応するための代償機構と考えられているものの、その負荷が取り除かれなると心肥大は心不全へと進行する。したがって、心不全の前段階で生じる心肥大の抑制が、結果的に心不全の予防・治療につながると期待されている。

前述したように、Erk1/2 は、心肥大時に活性化することが知られており、Erk1/2 の細胞内情報伝達の上流因子である c-Raf は、Hsp90 のクライアントタンパク質であることが示されている。したがって、Hsp90 は、心筋リモデリング時に c-Raf の機能制御を介して心筋リモデリングの進展に寄与すると推察される。しかしながら、心筋細胞が肥大する過程での Hsp90 の役割は、未だ明らかにされていない。

初代培養細胞としての単離心筋細胞は、心臓生理学および薬理学研究のための *in vitro* での実験系として汎用されている¹³⁾。初代培養心筋細胞は、細胞株では再現不可能な生体内での細胞機能を保持しており、心筋細胞機能を *in vitro* 実験系で解析するために有用な研究手段となりうる。

そこで本章では、ラット初代培養心筋細胞を用い、ET-1 刺激により肥大を誘発した心筋細胞の Raf/Mek/Erk 経路に及ぼす Hsp90 阻害の効果について検討した。加えて、Erk1/2 の情報伝達系の下流に位置する GATA4 の活性化への Hsp90 阻害の効果についても検討した。

1-1 実験材料・方法

1-1-1 実験動物

本研究では、Wistar 系新生仔ラット（哺乳 2-3 日齢, Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan）を用いた。実験操作は、動物の保護および管理に関する法律（昭和 48 年法律第 105 号）および動物の飼育および保管等に関する基準（昭和 55 年総理府告示第 6 号）に従った。本実験計画は東京薬科大学動物実験委員会にて審査および認可後、実施された。

1-1-2 新生仔ラット心筋組織からの心筋細胞の単離

心筋細胞の単離・培養は Maki らの方法¹⁴⁾ 従って行った。新生仔ラットを 70% エタノールで消毒後、心臓を摘出した。摘出心臓から心房を除去し、氷冷した Ads buffer (116 mM NaCl, 20 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid [HEPES], 5.36 mM KCl, 0.83 mM MgSO₄ · 7H₂O, 12.5 mM NaH₂PO₄ · 2 H₂O, 5.55 mM glucose, pH 7.40) 中にて眼科用ハサミで心室筋を細切した。細切された心室筋を 0.08% (w/v) collagenase type II (Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ, USA) を含む Ads buffer 中で 37℃, 6 分間インキュベートし、心筋細胞および非心筋細胞を分散させた。この行程は、細胞が分散し組織が原形を留めなくなる 6 回目まで行った。その後、細胞懸濁液に氷冷した fetal bovine serum (FBS; Biowest, Nuquillé, France) を加え、collagenase の反応を停止させた後、遠心分離 (1,000 rpm, for 5 min, at 25℃) を行い、細胞懸濁液から collagenase を除去した。次に、Percoll[®] 密度勾配遠心法にて心筋細胞と非心筋細胞を分離した。Ads buffer で希釈した 58.5% Percoll[®] (比重 1.082) (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK) 中に細胞を懸濁させた後、細胞懸濁液を 40.5% Percoll[®] (比重 1.060) の下に積層し、遠心分離 (3,000 rpm, for 30 min, at 25℃) した。この遠心分離により非心筋細胞は上層に、心筋細胞は下層に分離される（心筋細胞画分）。遠心後、得られた下層を回収した。細胞懸濁液に Ads buffer を加えた後、遠心分離 (1,000 rpm, for 5 min, at 25℃) を行い、Percoll[®] を洗浄した。この洗浄操作は 2 回行った。

次に、心筋細胞中に混入した非心筋細胞を除去するため、心筋細胞を 100 mm culture dish (Corning Inc., Corning, NY, USA) に播種し、30 分間 CO₂ インキュベータ (MCO-18AC-PJ, Panasonic, Osaka, Japan, 37℃, 95% air + 5% CO₂, 飽和水蒸気) 内に静置した。この dish の底面には接着因子のゼラチンがコーティングされていないので心筋細胞は接着できないが、非心筋細胞は dish 面に接着できる。そのため、培地中には dish 面に接着しなかった浮遊心筋細胞が存在しており、この培地を捕集することにより非心筋細胞が多数存在する細胞集団から容易に心筋細胞を回収できる。この操作を 2 回行った後、細胞計数盤 (Wakenbtech Co. LTD., Kyoto, Japan) を用いて得られた心筋細胞の細胞数を計測し、0.1% gelatin (Becton-Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA) でコーティングした 8 well Chamber slide (AGC Techno

Glass Co. LTD., Shizuoka, Japan), 35 mm dish (Corning Inc.) および 60 mm dish (Corning Inc.) にそれぞれ 4.0×10^4 cells/well, 4.5×10^5 cells/dish および 1.0×10^6 cells/dish となるように播種した。なお心筋細胞は CO₂ インキュベータ内にて 10% FBS を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (89% DMEM [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA], 10% FBS, 1% Penstrep[®] [penicillin; 10,000 単位/mL, streptomycin; 10,000 µg/mL, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA USA]) 中で培養した。さらに非心筋細胞を排除するため、心筋細胞単離後 24 時間目に 1µM cytosine-β-D-arabinoside (Ara-C; Sigma-Aldrich) を培地に添加し、48 時間インキュベートした。その後、培地交換により Ara-C を除去した。

1-1-3 総細胞数に占める心筋細胞の割合の算出

単離操作後の培養された総細胞数に占める心筋細胞の割合は、総細胞に対する α-actinin 陽性細胞の割合を算出することにより求めた。4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Thermo Fisher Scientific Inc.) による核染色陽性細胞を総細胞とし、筋細胞マーカーである α-actinin の免疫蛍光染色陽性細胞を心筋細胞とした。免疫蛍光染色には 0.1% gelatin でコーティングした 8 well Chamber Slide 上に播種した細胞を用いた。Ara-C 除去 6 時間後の心筋細胞を 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; 0.1M Na₂HPO₄, 0.1M KH₂PO₄, 0.1M NaCl) で洗浄後、2% paraformaldehyde (PFA) 中で室温、60 分間固定した。PFA を除去し、PBS で洗浄後、0.5% TritonX-100[®] 含有 PBS で室温、30 分間浸透化した。PBS で洗浄後、20% Blocking One Histo[®] (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) 含有 PBS で室温、30 分間ブロッキングを行った。その後、一次抗体として、mouse monoclonal anti-α-actinin (EA-53, Sigma-Aldrich) を 5% Blocking One Histo 含有 PBS で 100 倍に希釈し、4°C で一晩反応させた。反応終了後、PBS で洗浄し、二次抗体として、Alexa Fluor[®] 555 donkey anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific Inc.) を PBS で 100 倍に希釈し室温で 60 分間反応させた。核染色には 300 nM DAPI を用い、室温で 10 分間反応させた。染色操作終了後、PBS で洗浄し、DAKO fluorescent mounting medium (DAKO Co., Carpinteria, CA) を用いて封入し、落射式蛍光顕微鏡 (BX-52, Olympus, Tokyo, Japan) にて観察を行った。細胞数の測定は well 内の 5 視野を無作為に選択し、その細胞数の平均を 1 例とした。

1-1-4 培養心筋細胞への被験薬の投与

Ara-C 添加 48 時間後に 10% FBS を含む DMEM を血清を含まない DMEM (serum-free DMEM; 98% DMEM, 1% Insulin-Transferrin-Selenium [ITS, Insulin; 1 g/L, Transferrin; 0.55 g/L, Sodium Selenite; 0.67 mg/L, Thermo Fisher Scientific Inc.], 1% Penstrep) に交換した。6 時間後、Hsp90 阻害薬である 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG; LC Laboratories, Woburn, MA, USA) およびプロテ

アソーム阻害薬である MG-132 (Peptide Institute Inc., Osaka, Japan) をそれぞれ 1 μM および 0.1 μM となるように投与した。さらに 18 時間後、心筋細胞肥大を惹起するため、endothelin-1 (ET-1; Peptide Institute Inc.) を 1 nM となるように添加した。

1-1-5 心筋細胞面積の測定

心筋細胞面積は、細胞膜を染色した心筋細胞の細胞表面積を測定することにより算出した。心筋細胞は、0.1% gelatin でコーティングした 8 well Chamber Slide 上に播種した細胞を用いた。ET-1 添加 24 時間後の心筋細胞を PBS で洗浄後、2% PFA 中で室温、60 分間固定した。PFA を除去し、PBS で洗浄後、fluorescein-conjugated wheat germ agglutinin (WGA-FITC, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を 0.1% CaCl_2 含有 PBS で 200 倍に希釈し、室温で 60 分間反応させた。なお、WGA-FITC は、細胞膜を染色する。核染色には 300 nM DAPI を用い、室温で 10 分間反応させた。染色操作終了後、PBS で洗浄し、DAKO fluorescent mounting medium を用いて封入し、落射式蛍光顕微鏡にて観察を行った。撮影した画像の解析には、画像解析用ソフトウェア ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を使用した。心筋細胞面積は、各群の 150-210 cells の細胞面積を測定し、その平均を 1 例とした。

1-1-6 培養心筋細胞の western immunoblotting 用試料溶液の調製

ET-1 添加 24 時間後に氷上にて培地を除去し、氷冷した Homogenate buffer (20 mM HEPES, 0.25 M sucrose, 1 mM dithiothreitol [DTT], 1 mM ethylenglycol-bis(2-aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid [EGTA], protease inhibitor cocktail [cOmplete[®]; Roche, Mannheim, Germany], phosphatase inhibitor cocktail [PhosSTOP; Roche], pH 7.4, 4°C) を加え、cell scraper で細胞を回収した。ポッターホモジナイザー (Digital homogenizer, Iuchi, Osaka, Japan) でホモジナイズ (700 rpm, for 2 min, 2 strokes) 後、タンパク質量を Bradford 法で測定した。タンパク質の最終濃度が 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ となるように sample buffer (312.5 mM 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol [Tris]-HCl, 10% sodium dodecyl sulfate [SDS], 25% β -mercaptoethanol, 50% glycerol, 0.005% bromophenolblue, pH 6.8) を加え、沸騰水浴中で 5 分間、2 回インキュベートし western blotting 用のサンプルとした。

1-1-7 心筋細胞培養液の western immunoblotting 用試料溶液の調製

ET-1 添加 24 時間後に氷上にて培地を回収し、sample buffer を 4:1 (v/v) の割合で混合した。その後、沸騰水浴中で 5 分間、2 回インキュベートすることによりタンパク質を可溶化し、western blotting 用のサンプルとした。

1-1-8 Western immunoblotting

心筋細胞 c-Raf, Erk1/2, GATA4, Hsp90 および caspase-3 タンパク質含量, および心筋細胞培養液中の atrial natriuretic peptide (ANP) 量の変化を把握するため western immunoblot 法を用いた.

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で調製した各画分中のタンパク質を分離し, 転写装置 (KS-8460, Marysol, Tokyo, Japan) を用いて polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した. 転写後, PVDF 膜を Tris-buffered saline with Tween 20[®] (TBST) で 2 分間洗浄した後, 50% BlockingOne[®] (Nacalai Tesque, Inc.) 含有 TBST 溶液を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った. 5% Blocking One[®] 含有 TBST 溶液で 5 分間, 3 回洗浄した. その後, 一次抗体を 5% Blocking One[®] 含有 TBST 溶液で希釈して PVDF 膜に添加し, 低温室 4℃で一晩インキュベートした. 使用した一次抗体を Table 1 に示す.

Primary antibody	Clone number	Manufacture	Dilution	Secondary antibody
Rabbit polyclonal anti-ANP	-	Abcam, Cambridge, UK	1000	Rabbit
Mouse monoclonal anti-c-Raf	53/c-Raf-1	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	2000	Mouse
Rabbit monoclonal anti-p-c-Raf (Ser338)	56A6	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA	1000	Rabbit
Rabbit polyclonal anti-Erk1/2	-	Cell Signaling Technology, Inc.	2000	Rabbit
Rabbit polyclonal anti-p-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	-	Cell Signaling Technology, Inc.	1000	Rabbit
Rabbit monoclonal anti-GATA4	D3A3M	Cell Signaling Technology, Inc.	1000	Rabbit
Rabbit polyclonal anti-p-GATA4 (Ser105)	-	Abcam	1000	Rabbit
Mouse monoclonal anti-Hsp90	68/Hsp90	BD Biosciences	1000	Mouse
Rabbit monoclonal anti-cleaved caspase-3 (Asp175)	5A1E	Cell Signaling Technology, Inc.	1000	Rabbit
Mouse monoclonal anti-GAPDH	6C5	Millipore	10000	Mouse

Table 1 Details of the primary antibodies used for western immunoblotting.

一次抗体反応後, 5% Blocking One[®] 含有 TBST 溶液で 5 分間, 3 回洗浄した. 二次抗体に, c-Raf, Hsp90 および GAPDH を検出するため 3000 倍となるように 5% Blocking One[®] 含有 TBST 溶液で希釈した horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) を, ANP, p-c-Raf (Ser338), Erk1/2, p-Erk1/2 (Thr202/Tyr204), GATA4, p-GATA4 (Ser105) および cleaved caspase-3 (Asp175) には

3000 倍となるように 5% Blocking One[®] 含有 TBST 溶液で希釈した horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich) を用い、室温で 1 時間インキュベートした。二次抗体反応後、TBST 溶液で 5 分間、3 回洗浄し、検出には Chemi-Lumi One[®] (Nacalai Tesque, Inc.) を用いて分離したタンパク質を発光させ、ルミノ・イメージアナライザー (LAS3000, Fuji Photo Film Co. Ltd., Tokyo, Japan) により検出した。現像された PVDF 膜上のタンパク質は、ImageJ を用いて半定量化した。

1-1-9 統計方法

実験結果は、すべて平均値 \pm 標準誤差 (standard error of the mean; S.E.M.) で表した。統計学的検定法として、群間比較の解析および統計には 1-way analysis of variance (ANOVA) 法を用いた。ANOVA による有意差が認められた場合、多群間比較を行うため、*post-hoc test* として Tukey-Kramer 法を用いた。測定値の統計的比較には、95% の信頼度 ($p < 0.05$) をもって有意とみなした。統計処理には、StatView[®] (ver.5.0, SAS Institute. Inc., Tokyo, Japan) を用いた。

1-2 結果

1-2-1 心筋組織から単離された総細胞数に占める心筋細胞の割合

蛍光免疫染色により心筋細胞の総細胞数に占める割合を求めた。DAPI を用いた核染色像および筋細胞マーカーの α -actinin 染色像を Figure 1 に示す。DAPI 陽性細胞に対する α -actinin 陽性細胞の割合は $93.6 \pm 2.0\%$ ($n=4$) であった。

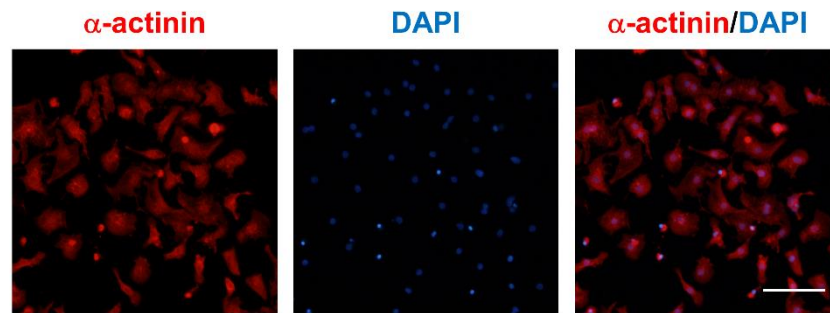


Figure 1 Ratio of cardiomyocytes to total cells. Representative photomicrographs of cells stained with α -actinin (red) and/or DAPI (blue). The ratio of α -actinin-positive cells for DAPI-positive cells was $93.6 \pm 2.0\%$. The value represents the mean \pm S.E.M. of 4 experiments. Scale bar shows 100 μ m.

1-2-2 培養心筋細胞の細胞面積に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 の効果

培養心筋細胞の細胞面積に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 投与の効果 Figure 2 に示す.

培養心筋細胞の細胞面積は, ET-1 投与により Control 群のその約 120% となり, ET-1 および 17-AAG 投与により Control 群のその約 80% となった. ET-1, 17-AAG および MG-132 投与では, ET-1 および 17-AAG 投与のそれと同様の値となった (Figure 2B).

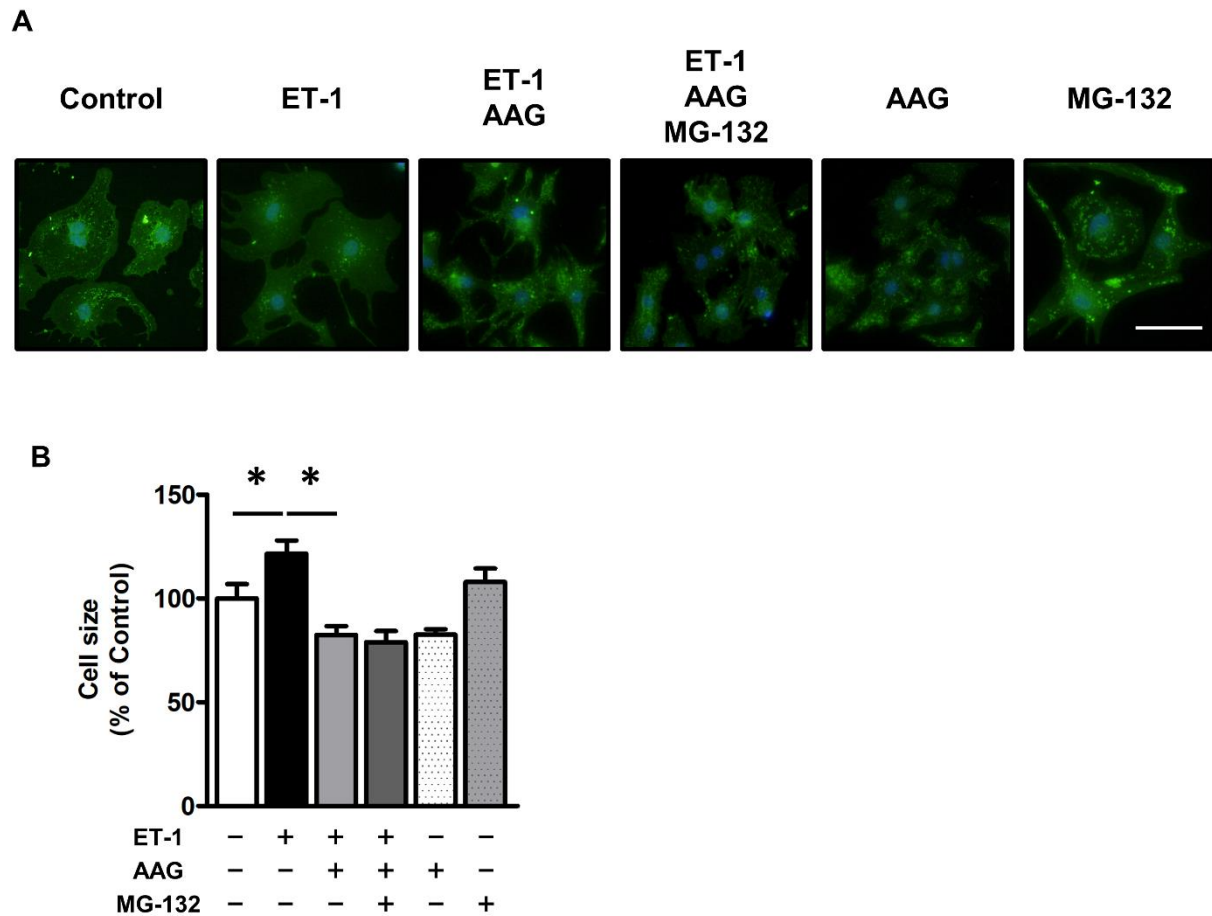


Figure 2 Change in cell size of neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs). (A) Representative images of cell surface of NRVMs stained with WGA-FITC. The cells were pre-incubated with 17-AAG (1 μ M), and MG-132 (100 nM) followed by ET (1 nM) stimulation for 24 h. DAPI (blue) was used to counterstain for visualization of nuclei. Scale bar represents 50 μ m. (B) Cell-surface area of NRVMs treated with and without ET in the presence and absence of 17-AAG or MG-132. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 4–5 independent experiments. * p < 0.05 vs. indicated values. (For interpretation of the references to colour in this figure legend)

1-2-3 心筋細胞培養液中の ANP 量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 投与の効果

心筋細胞培養液中の ANP 量，すなわち，心筋細胞から遊離された ANP 量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 投与の効果を Figure 3 に示す．

心筋細胞培養液中の ANP 量は，ET-1 投与により Control 群のその約 195% となり，ET-1 および 17-AAG 投与により Control 群のその約 65% となった．ET-1, 17-AAG および MG-132 投与では，Control 群のその約 15% となった (Figure 3B)．

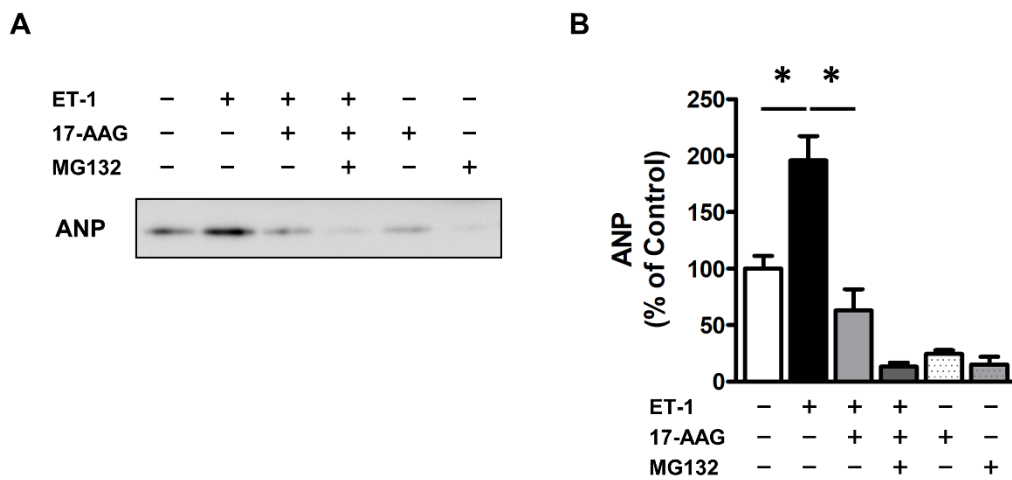


Figure 3 Change in contents of ANP protein released from NRVMs into conditioned medium (CM). (A,B) Western blot analysis of ANP proteins released from NRVMs into CM. The cells were pre-incubated with 17-AAG (1 μ M) and MG-132 (100 nM) followed by ET-1 (1 nM) stimulation for 24 h. Proteins were extracted from CM of NRVMs treated with or without ET-1, 17-AAG or MG-132. Values are expressed as percentages compared with the non-stimulated group (incubated in the absence of ET-1, 17-AAG, and MG-132). Each value represents the mean \pm S.E.M. of 4 independent experiments. * p < 0.05 vs. indicated values. (For interpretation of the references to colour in this figure legend)

1-2-4 培養心筋細胞の Hsp90 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 の効果

培養心筋細胞の Hsp90 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 投与の効果を図 4 に示す。

培養心筋細胞の Hsp90 含量は、ET-1 投与では Control 群のそれと同程度の値となった。ET-1 および 17-AAG 投与により Control 群のそれの約 180% に増加し、ET-1, 17-AAG および MG-132 投与では、Control 群のそれの約 235% まで増加した (Figure 4B)。

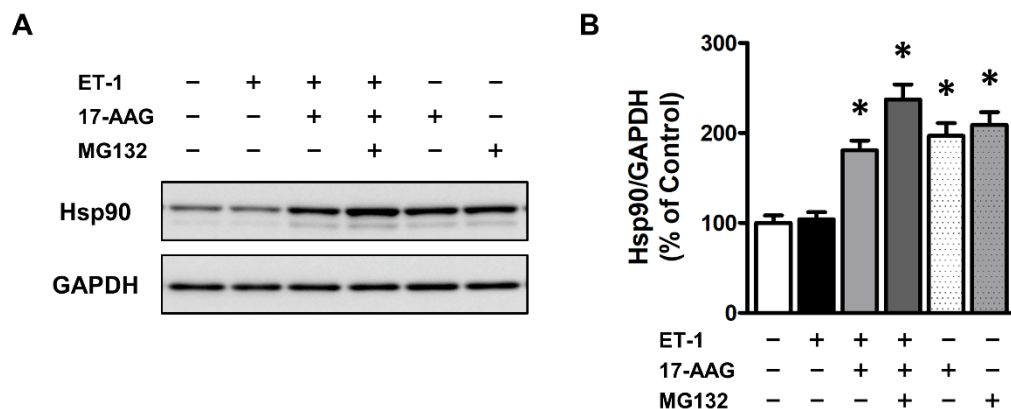


Figure 4 Change in Hsp90 contents of NRVMs treated with or without ET-1, 17-AAG or MG-132. (A,B) Western blot analysis of Hsp90 proteins. The cells were pre-incubated with 17-AAG (1 μ M) and MG-132 (100 nM) followed by ET-1 (1 nM) stimulation for 6 h. Values are expressed as percentages compared with the non-stimulated group (incubated in the absence of ET-1, 17-AAG, and MG-132). Each value represents the mean \pm S.E.M. of 7 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. Control group.

1-2-5 培養心筋細胞の c-Raf および serine338 リン酸化 c-Raf 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 の効果

培養心筋細胞の c-Raf 含量および Ser338 リン酸化 c-Raf 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 投与の効果を図 5 に示す。

培養心筋細胞の c-Raf 含量は、ET-1 投与では Control 群のそれと同程度であったものの、ET-1 および 17-AAG 投与により Control 群のそれの約 35% まで減少した。ET-1, 17-AAG および MG-132 投与では、Control 群のそれと同程度まで回復した (Figure 5B)。

培養心筋細胞の Ser338 リン酸化 c-Raf 含量は、ET-1 投与により Control 群のそれの約 190% となり、ET-1 および 17-AAG 投与により Control 群のそれの約 20% となった。ET-1, 17-AAG および MG-132 投与では、ET-1 および 17-AAG 投与のそれと同程度の値となった (Figure 5C)。

Ser338 リン酸化 c-Raf/c-Raf 比は、ET-1 投与により Control 群のそれの約 180% となり、ET-1 および 17-AAG 投与により Control 群のそれの約 60% となった。ET-1, 17-AAG および MG-132 投与では、Control 群のそれの約 20% となった (Figure 5D)。

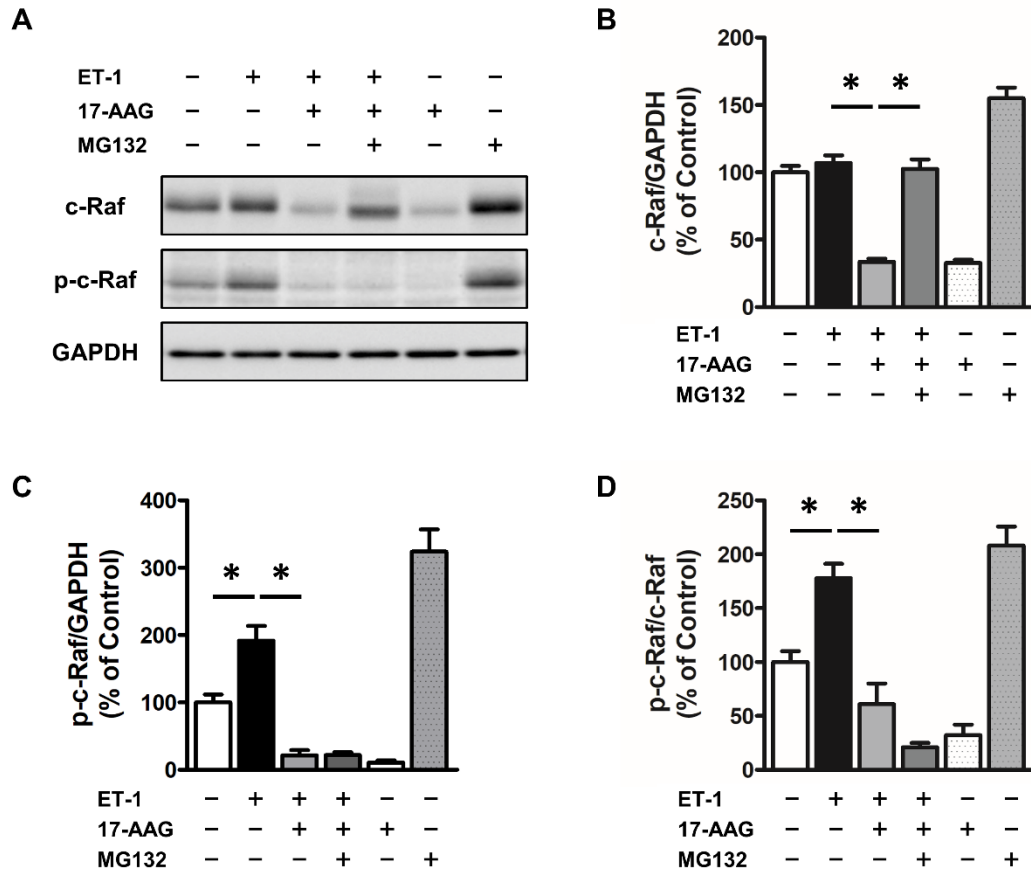


Figure 5 Change in contents of c-Raf and p-c-Raf in NRVMs treated with or without ET (1 nM), 17-AAG (1 μ M) or MG-132 (100 nM). (A) Western blot analysis of c-Raf and p-c-Raf proteins. The cells were pre-incubated with 17-AAG (1 μ M) and MG-132 (100 nM) followed by ET-1 (1 nM) stimulation for 6 h. Proteins were extracted from NRVMs treated with or without ET-1, 17-AAG or MG-132. (B) c-Raf contents, (C) p-c-Raf contents, (D) ratio of p-c-Raf to c-Raf in NRVMs. Values are expressed as percentages compared with the non-stimulated group (incubated in the absence of ET-1, 17-AAG, and MG-132). Each value represents the mean \pm S.E.M. of 7 independent experiments. * p < 0.05 vs. indicated values.

1-2-6 培養心筋細胞の Erk1/2 および threonine202/tyrosine204 リン酸化 Erk1/2 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 の効果

培養心筋細胞の Erk1/2 含量および Thr202/Tyr204 リン酸化 Erk1/2 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 投与の効果を図 6 に示す。

培養心筋細胞の Erk1/2 含量は、全群で同様の値となった (Figure 6B)。

培養心筋細胞の Thr202/Tyr204 リン酸化 Erk1/2 含量は、ET-1 投与により Control 群のその約 150% となり、ET-1 および 17-AAG 投与により Control 群のその約 80% となった。ET-1, 17-AAG および MG-132 投与では、ET-1 および 17-AAG 投与のそれと同程度の値となった (Figure 6C)。

Thr202/Tyr204 リン酸化 Erk1/2/Erk1/2 比は、ET-1 投与により Control 群のその約 135% となり、ET-1 および 17-AAG 投与により Control 群のその約 60% となった。ET-1, 17-AAG および MG-132 投与では、ET-1 および 17-AAG 投与のそれと同程度の値となった (Figure 6D)。

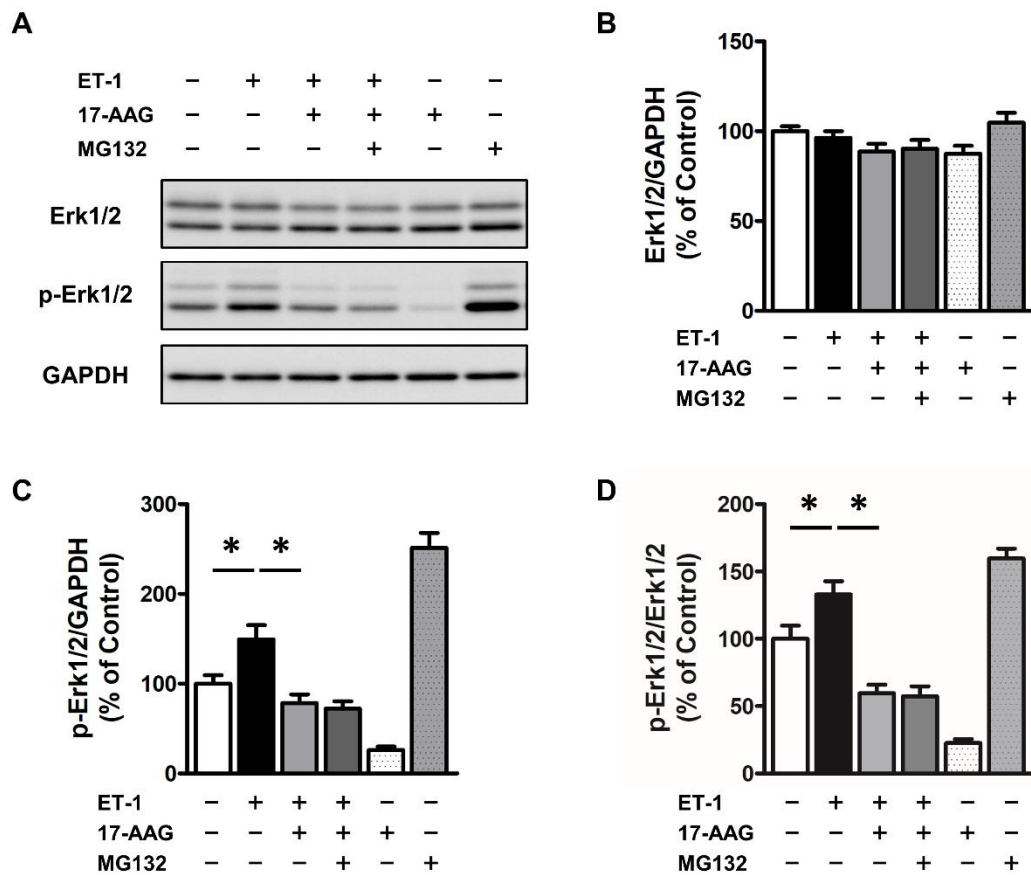


Figure 6 Change in contents of Erk1/2 and p-Erk1/2 in NRVMs treated with or without ET (1 nM), 17-AAG (1 μ M) or MG-132 (100 nM). (A) Western blot analysis of Erk1/2 and p-Erk1/2 proteins. The cells were pre-incubated with 17-AAG (1 μ M) and MG-132 (100 nM) followed by ET-1 (1 nM) stimulation for 6 h. Proteins were extracted from NRVMs treated with or without ET-1, 17-AAG or MG-132. (B) Erk1/2 contents, (C) p-Erk1/2 contents, (D) ratio of p-Erk1/2 to Erk1/2 in NRVMs. Values are expressed as percentages compared with the non-stimulated group (incubated in the absence of ET-1, 17-AAG, and MG-132). Each value represents the mean \pm S.E.M. of 7 independent experiments. * p < 0.05 vs. indicated values.

1-2-7 培養心筋細胞の GATA4 および serine105 リン酸化 GATA4 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 の効果

培養心筋細胞の GATA4 含量および Ser105 リン酸化 GATA4 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 投与の効果を図 7 に示す。

培養心筋細胞の GATA4 含量は、ET-1 投与では Control 群のそれと同程度となり、ET-1 および 17-AAG 投与により Control 群のそれの約 130% となった。ET-1, 17-AAG および MG-132 投与では、ET-1 および 17-AAG 投与のそれと同様の値となった (Figure 7B)。

培養心筋細胞の Ser105 リン酸化 GATA4 含量は、ET-1 投与により Control 群のそれの約 135% となり、ET-1 および 17-AAG 投与により Control 群のそれの約 115% となった。ET-1, 17-AAG および MG-132 投与では、ET-1 および 17-AAG 投与のそれと同様の値となった (Figure 7C)。

Ser105 リン酸化 GATA4/GATA4 比は、ET-1 投与により Control 群のそれの約 125% となり、ET-1 および 17-AAG 投与により Control 群のそれの約 90% となった。ET-1, 17-AAG および MG-132 投与では、ET-1 および 17-AAG 投与のそれと同程度の値となった (Figure 7D)。

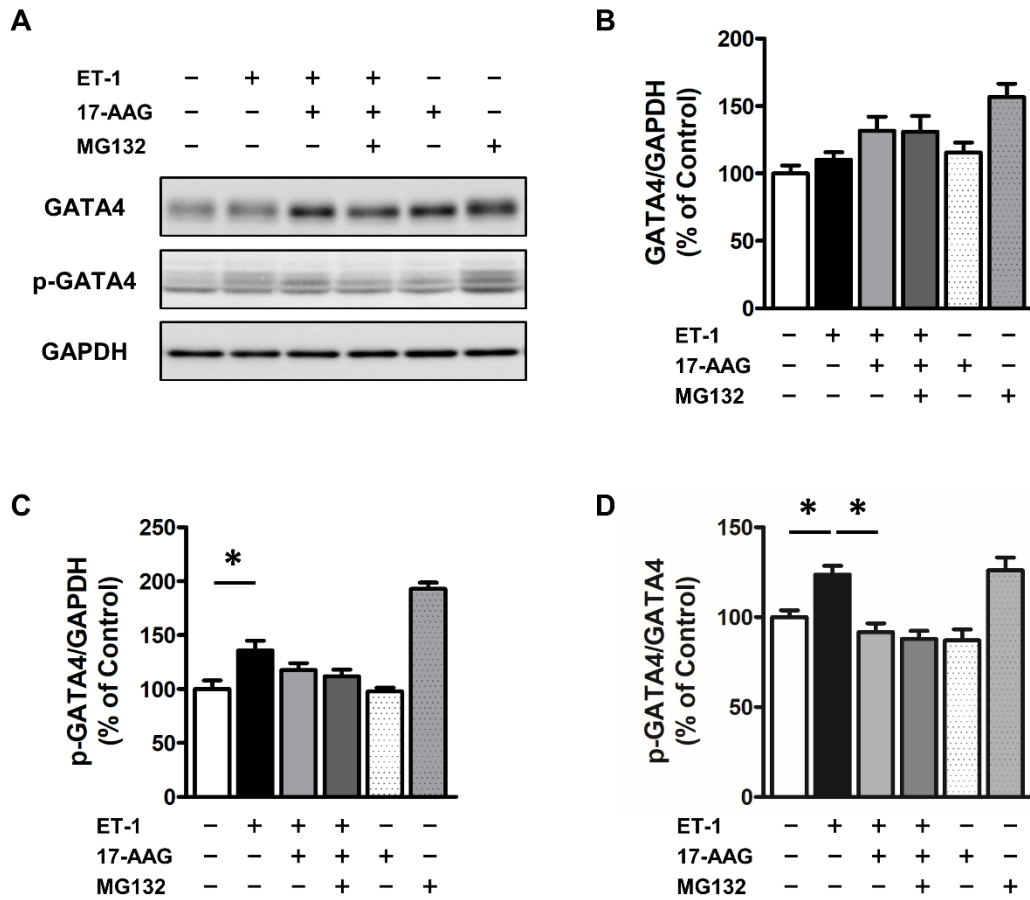


Figure 7 Change in contents of GATA4 and p-GATA4 in NRVMs treated with or without ET (1 nM), 17-AAG (1 μ M) or MG-132 (100 nM). (A) Western blot analysis of GATA4 and p-GATA4 proteins. The cells were pre-incubated with 17-AAG (1 μ M) and MG-132 (100 nM) followed by ET-1 (1 nM) stimulation for 6 h. Proteins were extracted from NRVMs treated with or without ET-1, 17-AAG or MG-132. (B) GATA4 contents, (C) p-GATA4 contents, (D) ratio of p-GATA4 to GATA4 in NRVMs. Values are expressed as percentages compared with the non-stimulated group (incubated in the absence of ET-1, 17-AAG, and MG-132). Each value represents the mean \pm S.E.M. of 7 independent experiments. * p < 0.05 vs. indicated values.

1-2-8 培養心筋細胞の cleaved caspase-3 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 の効果

培養心筋細胞の cleaved caspase-3 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 投与の効果を図 8 に示す。

培養心筋細胞の cleaved caspase-3 含量は、ET-1, 17-AAG および MG-132 投与で変化しなかった。

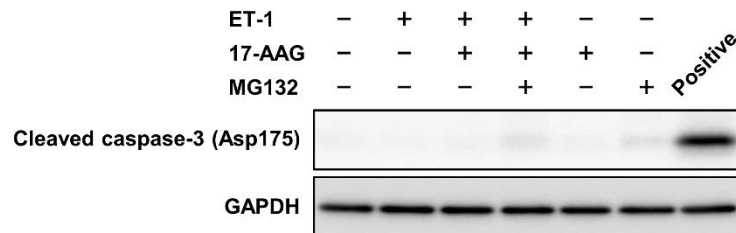


Figure 8 Change in contents of cleaved caspase-3 in NRVMs treated with or without ET (1 nM), 17-AAG (1 μ M) or MG-132 (100 nM). Western blot analysis of cleaved caspase-3 proteins. The cells were pre-incubated with 17-AAG (1 μ M) and MG-132 (100 nM) followed by ET-1 (1 nM) stimulation for 6 h. Proteins were extracted from NRVMs treated with or without ET-1, 17-AAG or MG-132. Positive control is prepared from NRVMs treated with 17-AAG (30 μ M) for 84 h.

1-3 考察

本章では、まず、心筋細胞面積への Hsp90 阻害薬 17-AAG の効果を検討した。17-AAG は、アンサマイシン系化合物である geldanamycin (GA) の誘導体で、GA の肝毒性を軽減しながら、GA とほぼ同等の Hsp90 阻害活性を発揮する誘導体とされる¹⁵⁾。17-AAG は、Hsp90 の ATP 結合ポケットで ATP と競合することで、Hsp90 のシャペロン機能を阻害する。本実験では、心筋細胞への 17-AAG 投与により、ET-1 が誘発した心筋細胞面積の増大および培養液中の肥大応答遺伝子産物の ANP 量の増加が抑制された。これらの結果から、Hsp90 が心筋細胞肥大の進展に寄与する可能性が示された。なお、17-AAG を投与した心筋細胞の細胞面積は、未処置心筋細胞のそれよりも減少したものの、17-AAG を投与した心筋細胞では caspase-3 が活性化されていないことを確認した。Caspase-3 は、切断されて活性化されると、細胞内のタンパク質を分解し、アポトーシスを実行するエフェクターカスパーゼである¹⁶⁾。したがって、本研究では 17-AAG 投与後の細胞面積の減少は、心筋細胞でのアポトーシス誘導によるものではないと考えられた。

次に、Hsp90 が心筋細胞肥大に寄与する機序について検討した。本研究では、細胞内情報伝達経路として、Raf/Mek/Erk 経路に着目した。Erk1/2 は、c-Raf の細胞内情報伝達系の下流に位置しており、c-Raf の活性化は Erk1/2 の活性化を導く。17-AAG 投与により、心筋細胞の c-Raf 含量は減少し、ET-1 による c-Raf および Erk1/2 のリン酸化の促進が抑制された。これらの結果から、Hsp90 は c-Raf の安定化に寄与しており、c-Raf の安定化を介して Raf/Mek/Erk 経路の活性化を維持することが示された。

活性化された Erk1/2 は、細胞質および核内の基質タンパク質をリン酸化する。GATA4 は、成体の心臓で恒常的に発現している転写因子であり、Erk1/2 によりリン酸化されることが示されている^{17,18)}。心肥大で発現が誘導される肥大応答遺伝子は、そのプロモーター領域に GATA4 結合部位を保持しており、心臓特異的に GATA4 を過剰発現させると心肥大を呈することから、GATA4 の活性化は、心肥大の進展に寄与すると考えられている¹⁹⁾。GATA4 の活性は、そのタンパク質発現および翻訳後修飾により制御される。GATA4 の Ser105 部位のリン酸化は、GATA4 の DNA 結合能および転写活性を上昇させると考えられており、Erk1/2 は、GATA4 の Ser105 部位をリン酸化する¹⁸⁾。本実験では、ET-1 が誘発した GATA4 の Ser105 部位のリン酸化の促進は、17-AAG 投与により抑制された。この結果から、Hsp90 は、c-Raf の安定化を介して Erk1/2 および、その情報伝達系の下流に位置する GATA4 の活性化を維持することが示された。

Hsp90 阻害薬により、Hsp90 とそのクライアントタンパク質の相互作用が阻害されると、クライアントタンパク質は正常な構造を形成できず、多くの場合はユビキチン・プロテアソーム系での分解へと導かれる。培養細胞を用いた研究では、プロテアソーム阻害薬の投与により、17-AAG が惹起した Hsp90 クライアントタン

パク質含量の減少が回復するが、リソソーム阻害薬、カスパーゼ阻害薬あるいはカルパイン阻害薬の投与で、クライアントタンパク質含量の減少は回復しないことが報告されている²⁰⁻²²⁾。加えて、17-AAG 投与により、ユビキチン化されたクライアントタンパク質が増加することも示されている^{21,22)}。そこで、17-AAG を投与された心筋細胞の c-Raf のプロテアソームでの分解について検討するため、心筋細胞にプロテアソーム阻害薬である MG-132 を作用させた。その結果、心筋細胞の c-Raf 含量は、MG-132 存在下で 17-AAG による減少が抑制された。したがって、17-AAG 投与後の心筋細胞での c-Raf 含量の減少には、プロテアソームでの分解が関与している可能性が示された。さらに、Hsp90 阻害薬の投与により、クライアントタンパク質のタンパク質含量は減少する一方で、それらの mRNA 含量は増加することが報告されていることから^{9,23)}、17-AAG 投与時の c-Raf 含量の低下は、c-Raf の合成抑制ではなく、分解促進に起因すると推察された。前述したように、c-Raf は、Hsp90 のクライアントタンパク質であり、適切なフォールディングによる機能的構造の維持に Hsp90 との結合を必要とする^{9,10)}。本実験では、MG-132 投与は、17-AAG が減少させた c-Raf 含量を回復させたが、c-Raf のリン酸化レベルは変化させなかった。加えて、MG-132 は 17-AAG が抑制した Erk1/2 および GATA4 のリン酸化と心筋細胞面積の増大には影響しなかった。これらの結果から、心筋細胞では c-Raf が機能するためには、Hsp90 との相互作用が必要であると考えられた。さらに、17-AAG 投与時には c-Raf と Hsp90 の相互作用が阻害された結果、c-Raf は機能的構造を形成できず、その細胞内情報伝達系の下流シグナルの活性化が抑制される可能性が推察された。

本研究では、心筋細胞肥大に寄与する細胞内情報伝達経路として、Raf/Mek/Erk 経路に着目したが、心筋細胞肥大には、心筋細胞内の種々の情報伝達経路が関与する。Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt 経路²⁴⁾ および nuclear factor- κ B 経路²⁵⁾ の活性化は、心肥大の進展に寄与するとされる。これらの情報伝達系の情報伝達因子である Akt および I κ B kinase (IKK) は、Hsp90 のクライアントタンパク質であることが知られている^{8,26)}。したがって、本実験での 17-AAG による心筋細胞肥大の抑制には、Raf/Mek/Erk 経路に加え、これらのリン酸化酵素が関与する情報伝達経路の活性化抑制が関与している可能性も推察された。

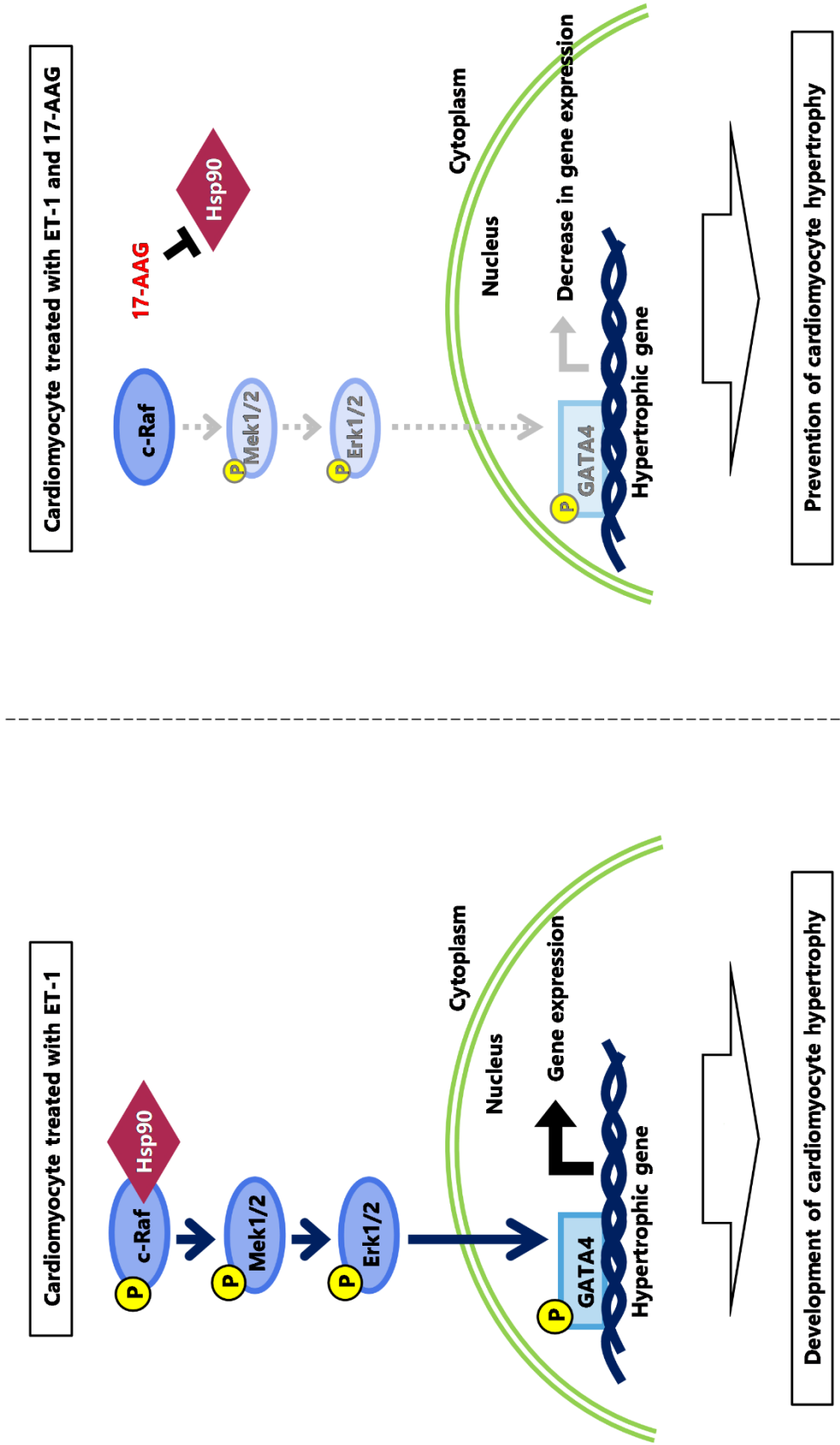


Figure 9 Effects of 17-Allylamino-17-Demethoxy- geldanamycin (17-AAG) treatment on Raf/Mek/Erk signaling pathway in NRVMs treated with ET-1.

Abbreviations: 17-AAG; 17-Allylamino-17-Demethoxy- geldanamycin, MAPK/Erk kinase; Mek, extracellular signal-regulated kinases; Erk, P; phosphate group

第二章 心線維芽細胞増殖への Hsp90 の関与

第一章では、Hsp90 が c-Raf の機能制御を介して心筋細胞肥大に寄与する知見を得た。前述したように、心室リモデリングの形態的な特徴は、心筋細胞肥大および間質組織の線維化である¹⁾。組織線維化は、細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) が組織に過剰に沈着した状態を主徴としており、傷害を受けた組織での創傷治癒の一過程であるものの、過度の線維化の進行は当該組織の機能障害を惹起する。心線維化は、心筋細胞の脱落を伴う修復性線維化 (reparative fibrosis) と、心筋細胞の脱落を伴わない病態で血管周囲から緩徐に進行する反応性線維化 (reactive fibrosis) とに大別され、心線維芽細胞は両者に関与する。過度の心線維化の進行は、左室拡張末期の stiffness を上昇させて左室拡張機能障害を誘発し、線維化に起因する伝導障害および酸素および栄養物の拡散障害は、左室収縮機能障害の誘因となる²⁷⁾。

心線維芽細胞は、ECM の主な産生細胞であり、心臓での主な ECM は I および III 型コラーゲンである。加えて、オステオポンチン、ペリオスチン、テネイシン C などの ECM は、ストレス後に発現が顕著に増大し、心筋組織の細胞の活性化、増殖・肥大および遊走能の惹起とそれらの促進に関与するとされる²⁸⁾。ECM の代謝回転には、ECM を分解する matrix metalloprotease (MMP) およびそれを阻害する tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP) の活性化も関与している²⁸⁾。心線維芽細胞はこれらの酵素の発現も制御することから²⁷⁾、心線維芽細胞は心線維化の中心的な役割を担っており、心線維芽細胞の増殖制御は、心線維化の軽減に有効であると推測される。

Interleukin-6 (IL-6), cardiotrophin-1 (CT-1), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) および ET-1 などの増殖因子は、心筋細胞肥大を誘導する¹²⁾。心線維芽細胞は、心筋組織を構成する細胞数では 60% 以上を占めており²⁹⁾、これらの増殖因子を合成することから、心線維芽細胞の心筋細胞肥大への寄与が推測されている²⁸⁾。しかしながら、心線維芽細胞増殖は心筋リモデリングの進展に関与することが推察されるものの、心線維芽細胞増殖への Hsp90 の寄与は不明である。そこで本章では、ラット培養心線維芽細胞を用い、心線維芽細胞増殖および細胞内情報伝達経路である Raf/Mek/Erk 経路に及ぼす Hsp90 阻害の効果について検討した。

2-1 実験材料・方法

2-1-1 実験動物

1-1-1 と同様に実験動物を使用した。

2-1-2 新生仔ラット心筋組織からの心線維芽細胞の単離

心線維芽細胞の単離・培養は、1-1-2 と同様の方法で行った。Percoll[®] 密度勾配遠心法にて分離した非心筋細胞は、遠心分離 (1,000 rpm, for 5 min, at 25°C) を行い Percoll[®] を洗浄した後、10% FBS (NICHIREI BIOSCIENCES INC., Tokyo, Japan) を含む DMEM で再懸濁した。非心筋細胞中に混入した心筋細胞を除去するため、100 mm culture dish に播種し、30 分間 CO₂ インキュベータ内に静置した。この dish の底面にはゼラチンがコーティングされていないので心筋細胞は接着できないが、非心筋細胞は接着できる。30 分後、培養皿を Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; Sigma-Aldrich) で洗浄し、新たな 10% FBS を含む DMEM を加えた後、CO₂ インキュベータ内で培養した。

2-1-3 心線維芽細胞への被験薬の投与

本実験には 2 継代目の培養心線維芽細胞を用いた。コンフルエント前の心線維芽細胞を HBSS で洗浄し、TrypLE[™] Express (Thermo Fisher Scientific Inc.) で培養皿から剥離させた後、10% FBS を含む DMEM を加えて反応を停止させた。回収した細胞を 1000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を除き、下層の細胞層を 10% FBS を含む DMEM で再懸濁した。細胞計数盤を用いて細胞数を計測し、60 mm culture dish に 3.5×10^6 cells/dish で播種し、CO₂ インキュベータ内で培養した。24 時間後、Hsp90 阻害薬である 17-AAG (LC Laboratories) およびプロテアソーム阻害薬である MG-132 (Peptide Institute Inc.) をそれぞれ 30 nM および 300 nM となるように投与した。

2-1-4 心線維芽細胞増殖の検討

17-AAG 投与時、投与 24 時間および 48 時間後に 2-1-3 と同様の手順で細胞を剥離・回収し、細胞計数盤を用いて細胞数を計測した。

2-1-5 心線維芽細胞の western immunoblotting 用試料溶液の調製

17-AAG および MG-132 投与 48 時間後に氷上にて培地を除去し、氷冷した Homogenate buffer を加え、cell scraper で細胞を回収した。ポッターホモジナイザー (Digital homogenizer, Iuchi) でホモジナイズ (700 rpm, for 2 min, 2 strokes) 後、タンパク質量を Bradford 法で測定した。タンパク質の最終濃度が 0.7 µg/µL となるように sample buffer を加え、沸騰水浴中で 5 分間、2 回インキュベートし western blotting 用のサンプルとした。

2-1-6 Western immunoblotting

1-1-8 と同様の方法で行った．

2-1-7 統計方法

実験結果は，すべて平均値±標準誤差（standard error of the mean; S.E.M.）で表した．統計学的検定法として，群間比較の解析および統計には 1-way analysis of variance (ANOVA) あるいは 2-way ANOVA 法を用いた．ANOVA による有意差が認められた場合，さらに多群間比較を行うため post-hoc test として Tukey-Kramer 法を用いた．測定値の統計的比較には，95% の信頼度 ($p < 0.05$) をもって有意とみなした．統計処理には，StatView[®] (ver.5.0, SAS Institute. Inc., Tokyo, Japan) を用いた．

2-2 結果

2-2-1 培養心線維芽細胞の細胞数に及ぼす 17-AAG の効果

培養心線維芽細胞の細胞数に及ぼす 17-AAG および MG-132 投与の効果を Figure 10 に示す.

17-AAG 投与後 24 時間目での培養心線維芽筋細胞の細胞数は, Vehicle 群では投与時のその約 155% に増加したものの, 17-AAG 群では投与時のその約 85% であった.

17-AAG 投与後 48 時間目での培養心線維芽筋細胞の細胞数は, Vehicle 群では投与時のその約 195% に増加したものの, 17-AAG 群では投与時のその約 70% であった.

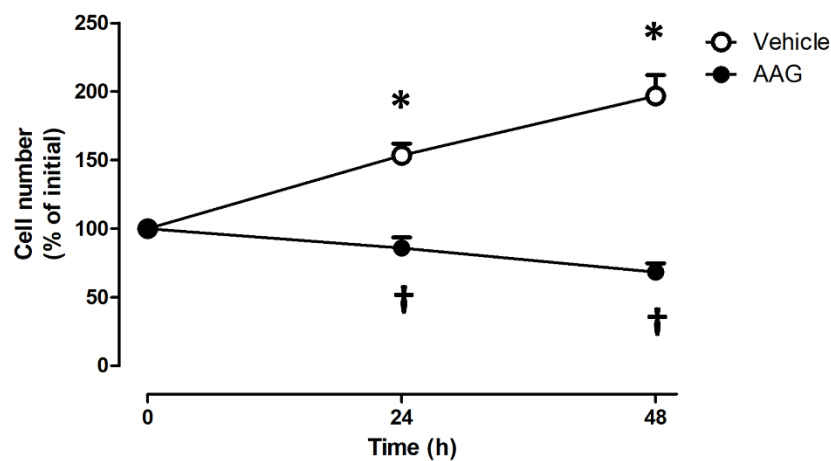


Figure 10 Change in cell number of cardiac fibroblasts (CF) treated with 17-AAG (closed symbols) or Vehicle (open symbols). The cells were incubated with 17-AAG (30 nM) for 24 or 48 h. Values are expressed as percentages compared with 0 h group. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. 0 h group. † $p < 0.05$ vs. corresponding Vehicle group.

2-2-2 培養心線維芽細胞の Hsp90 含量に及ぼす 17-AAG および MG-132 の効果

培養心線維芽細胞の Hsp90 含量に及ぼす 17-AAG および MG-132 投与の効果を図 11 に示す。

培養心線維芽細胞の Hsp90 含量は、17-AAG 投与により Vehicle 群のその約 185% に増加し、17-AAG および MG-132 投与では、Vehicle 群のその約 320% まで増加した (Figure 11B)。

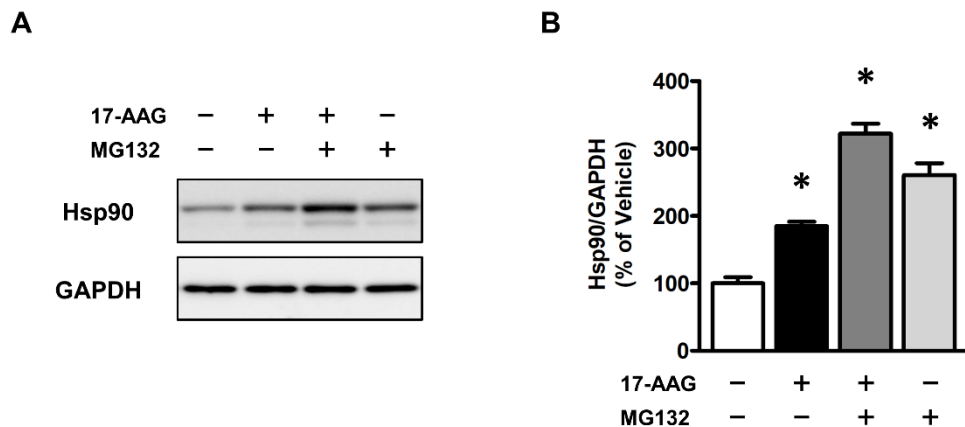


Figure 11 Change in Hsp90 contents of CF treated with or without 17-AAG or MG-132. (A,B) Western blot analysis of Hsp90 proteins. The cells were incubated with 17-AAG (30 nM) and MG-132 (300 nM) for 48 h. Values are expressed as percentages compared with the Vehicle group (incubated in the absence of 17-AAG and MG-132). Each value represents the mean \pm S.E.M. of 4 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. Vehicle group. (For interpretation of the references to colour in this figure legend)

2-2-3 培養心線維芽細胞の c-Raf および serine338 リン酸化 c-Raf 含量に及ぼす 17-AAG および MG-132 の効果

培養心線維芽細胞の c-Raf 含量および Ser338 リン酸化 c-Raf 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 投与の効果を Figure 12 に示す.

培養心線維芽細胞の c-Raf 含量は, 17-AAG 投与により Vehicle 群のその約 35% まで減少し, 17-AAG および MG-132 投与では, Vehicle 群のその約 60% まで回復した (Figure 12B).

培養心線維芽細胞の Ser338 リン酸化 c-Raf 含量は, 17-AAG 投与により Vehicle 群のその約 55% に減少した. 17-AAG および MG-132 投与では, Vehicle 群のその約 40% まで減少した (Figure 12C).

Ser338 リン酸化 c-Raf/c-Raf 比は, 17-AAG 投与により Vehicle 群のその約 150% となった. 17-AAG および MG-132 投与では, Vehicle 群のその約 70% となった (Figure 12D).

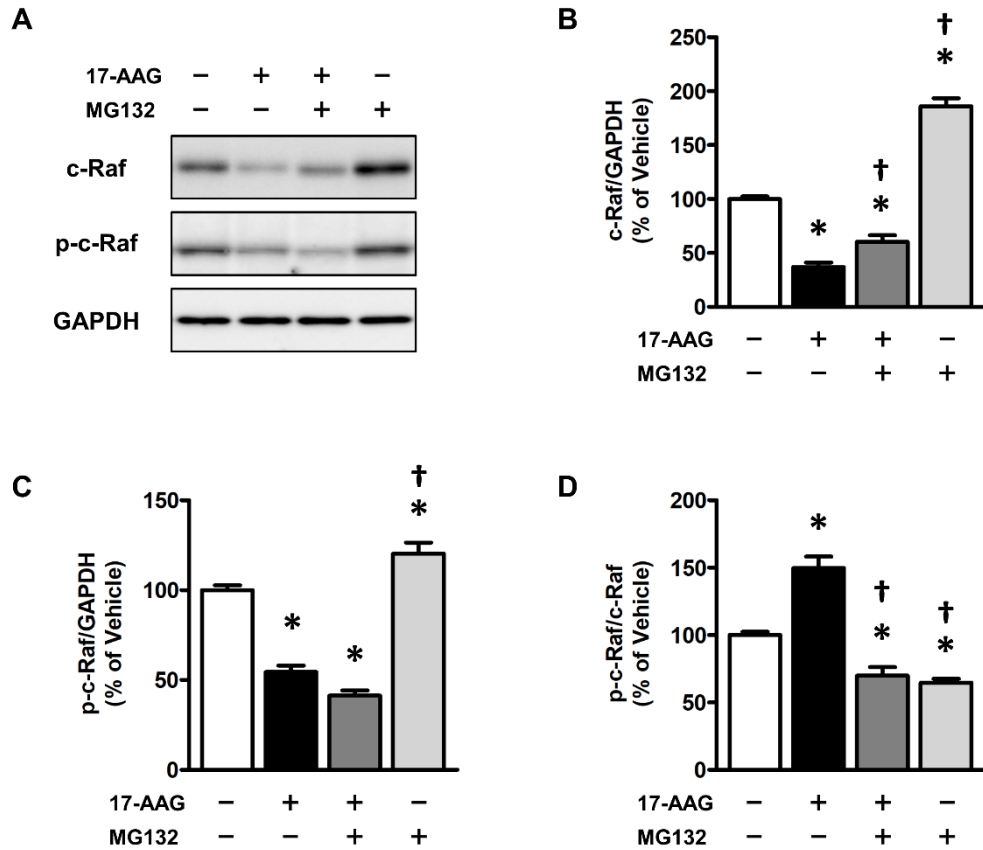


Figure 12 Change in contents of c-Raf and p-c-Raf in CF treated with or without 17-AAG (30 nM) or MG-132 (300 nM). (A) Western blot analysis of c-Raf and p-c-Raf proteins. The cells were incubated with 17-AAG (30 nM) and MG-132 (300 nM) for 48 h. Proteins were extracted from CF treated with or without 17-AAG or MG-132. (B) c-Raf contents, (C) p-c-Raf contents, (D) ratio of p-c-Raf to c-Raf in CF. Values are expressed as percentages compared with Vehicle group (incubated in the absence of 17-AAG, and MG-132). Each value represents the mean \pm S.E.M. of 4 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. Vehicle group. † $p < 0.05$ vs. 17-AAG group

2-2-4 培養心線維芽細胞の Erk1/2 および threonine202/tyrosine204 リン酸化 Erk1/2 含量に及ぼす 17-AAG および MG-132 の効果

培養心線維芽細胞の Erk1/2 含量および Thr202/Tyr204 リン酸化 Erk1/2 含量に及ぼす ET-1, 17-AAG および MG-132 投与の効果を図 13 に示す。

培養心線維芽細胞の Erk1/2 含量は、17-AAG 投与により Vehicle 群のその約 80% となった。17-AAG および MG-132 投与では、Vehicle 群のその約 65% となった (Figure 13B)。

培養心線維芽細胞の Thr202/Tyr204 リン酸化 Erk1/2 含量は、17-AAG 投与により Vehicle 群のその約 75% となり、17-AAG および MG-132 の投与により Vehicle 群のその約 60% となった (Figure 13C)。

Thr202/Tyr204 リン酸化 Erk1/2/Erk1/2 比は、17-AAG 投与により Vehicle 群のその約 95% となった。17-AAG および MG-132 の投与では、17-AAG 群のそれと同程度の値となった (Figure 13D)。

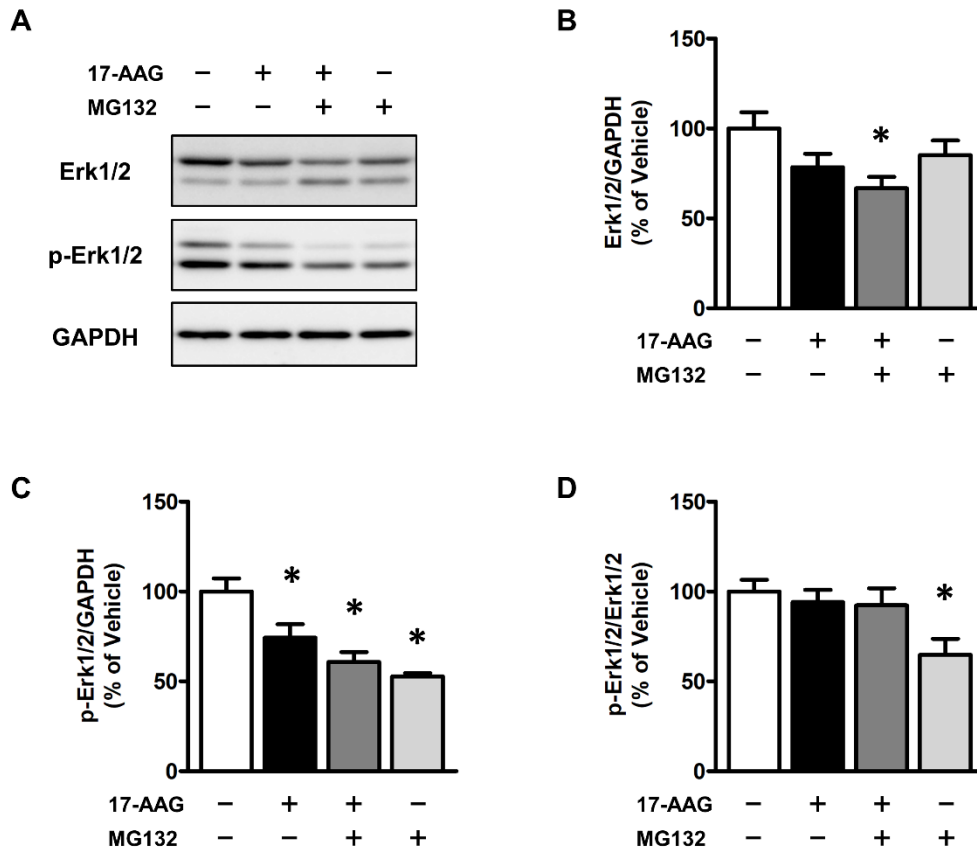


Figure 13 Change in contents of Erk1/2 and p-Erk1/2 in CF treated with or without 17-AAG (30 nM) or MG-132 (300 nM). (A) Western blot analysis of Erk1/2 and p-Erk1/2 proteins. The cells were incubated with 17-AAG (30 nM) and MG-132 (300 nM) for 48 h. Proteins were extracted from CF treated with or without 17-AAG or MG-132. (B) Erk1/2 contents, (C) p-Erk1/2 contents, (D) ratio of p-Erk1/2 to Erk1/2 in CF. Values are expressed as percentages compared with Vehicle group (incubated in the absence of 17-AAG, and MG-132). Each value represents the mean \pm S.E.M. of 6 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. Vehicle group.

2-3 考察

本実験では、新生仔ラットから単離した培養心線維芽細胞を用いた。心線維芽細胞の単離操作では、心筋細胞および内皮細胞が混入する可能性がある。心筋細胞は分裂・増殖能を持たないことから、本実験では培養細胞を2継代することで、その混入を排除した。血管内皮細胞は、内皮細胞増殖因子の非存在下では増殖し難い。したがって、本実験で用いた細胞はほとんどが心線維芽細胞であると考えられる。本研究では、前述した方法で単離・培養した非心筋細胞を心線維芽細胞とし、実験に使用した。

まず、心線維芽細胞の細胞数に及ぼす Hsp90 阻害薬 17-AAG の効果を検討した。心線維芽細胞への 17-AAG 投与により、心線維芽細胞の細胞増殖は抑制された。この結果から、Hsp90 の心線維芽細胞の細胞増殖への寄与が示された。

次に、Hsp90 の心線維芽細胞増殖へ寄与する機序について検討した。第一章と同様に、Raf/Mek/Erk 経路に着目した。その結果、17-AAG 投与により、心線維芽細胞の c-Raf 含量は減少し、かつ c-Raf および Erk1/2 のリン酸化が抑制された。つまり、Hsp90 は c-Raf の高次構造の維持に寄与しており、この c-Raf の安定化を介して Raf/Mek/Erk 経路の活性化を維持することが示された。

第一章では、17-AAG 投与後の心筋細胞の c-Raf 含量の減少には、プロテアソームでの分解が関与することが示された。そこで、心線維芽細胞での 17-AAG 投与後の c-Raf のプロテアソームによる分解について検討するため、心線維芽細胞へプロテアソーム阻害薬 MG-132 を作用させた。その結果、17-AAG 投与後の心線維芽細胞の c-Raf 含量減少は、MG-132 により軽減された。したがって、17-AAG 投与後の c-Raf 含量の減少には、プロテアソームでの分解の関与が示された。その一方で、MG-132 は 17-AAG により減少した c-Raf 含量を回復させたものの、c-Raf および Erk1/2 のリン酸化の抑制は軽減させなかった。これらの結果から、心筋細胞と同様に、心線維芽細胞でも c-Raf は、機能するために Hsp90 との相互作用が必要であると推察された。加えて、17-AAG 投与により c-Raf と Hsp90 の相互作用が阻害され、c-Raf が機能的構造を形成できなかった結果、c-Raf の下流シグナルの活性化が抑制されたと考えられた。

前述したように、リン酸化されることで活性化された Erk1/2 は、核内の転写因子の活性化を制御する。Fos, Jun および ATF family のヘテロ二量体で構成される activating protein-1 (AP-1) は、細胞増殖を促進させる転写因子である³⁰⁾。活性化された Erk1/2 は、核内に移行し Elk などの転写因子の活性化を介して Fos, Jun, Myc および Egr などのタンパク質発現を増加させることが示されている³⁰⁾。本実験では、17-AAG の投与により、心線維芽細胞の Erk1/2 のリン酸化が抑制された。したがって、17-AAG による心線維芽細胞の増殖抑制の機序の一つとして、心線維芽細胞でのこれら細胞増殖に寄与する転写因子の活性化抑制が考えられた。

心線維芽細胞は、種々のサイトカインおよび増殖因子を産生し、オートクリンまたはパラクリンを介して分泌細胞自身およびその周囲の細胞の増殖を促進する³¹⁾。Transforming growth factor- β (TGF- β) は、線維芽細胞の増殖を促進するとされており³²⁾、心線維芽細胞は TGF- β を分泌することが報告されている³³⁾。TGF- β 受容体を介して活性化される細胞内情報伝達経路は多岐にわたり、それらの中には Raf/Mek/Erk 経路も含まれる³⁴⁾。すなわち、TGF- β 受容体の活性化に続いて Raf/Mek/Erk 経路が活性化されると考えられる。圧負荷心肥大モデル動物への 17-AAG 投与は、TGF- β 受容体の下流に位置する情報伝達経路の活性化を減弱させ、心線維化を抑制することが示されている³⁵⁾。これらの知見から、本実験での 17-AAG による Raf/Mek/Erk 経路の活性化抑制には、TGF- β 受容体を介するシグナルの減弱も寄与すると考えられた。

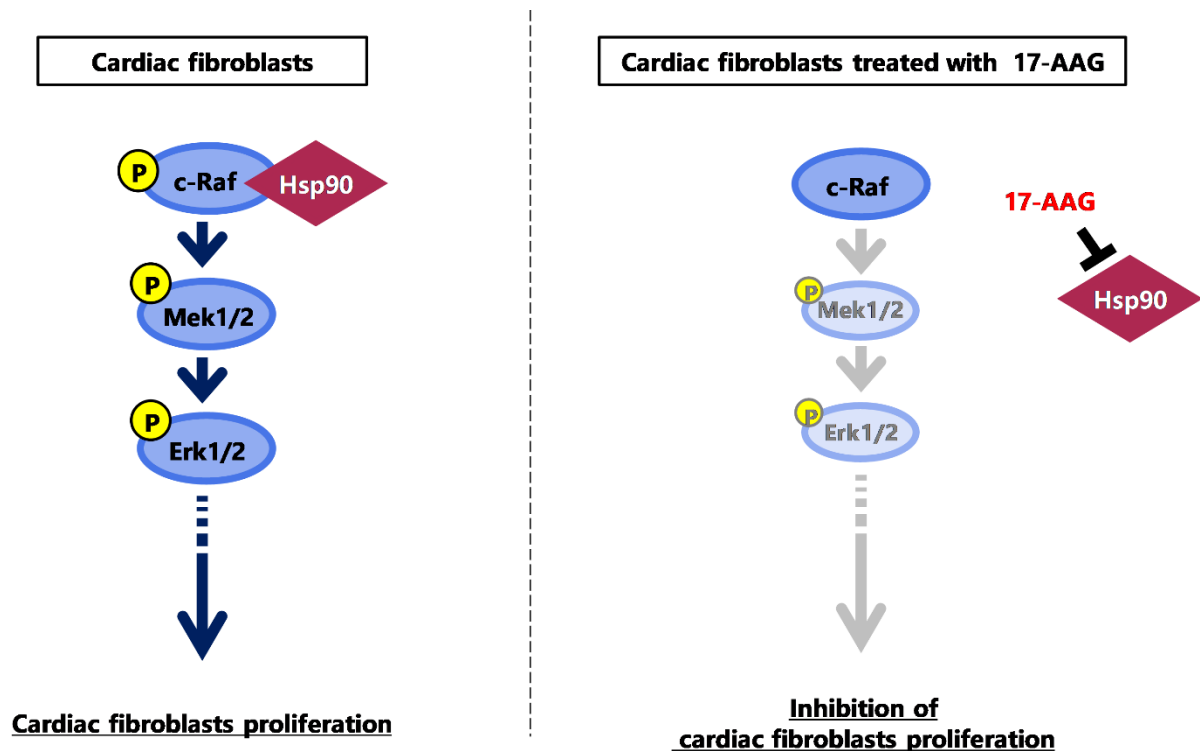


Figure 14 Effects of 17-Allylamino-17-Demethoxy- geldanamycin (17-AAG) treatment on Raf/Mek/Erk signaling pathway in CF.

Abbreviations: 17-AAG; 17-Allylamino-17-Demethoxy- geldanamycin, MAPK/Erk kinase; Mek, extracellular signal-regulated kinases; Erk, P; phosphate group

総括

ラット初代培養心筋細胞およびラット培養心線維芽細胞を用い、心筋細胞肥大および心線維芽細胞増殖への Hsp90 の関与について検討し、以下に示す知見を得た。

第一章では、ラット初代培養心筋細胞を用い、ET-1 刺激により細胞肥大を誘発した心筋細胞の Raf/Mek/Erk 経路および Erk1/2 の細胞内情報伝達系の下流に位置する GATA4 に及ぼす Hsp90 阻害の効果について検討した。その結果、心筋細胞の Hsp90 が心筋細胞肥大の進展に寄与すると示した。さらに、その作用機序の一つに、Hsp90 が c-Raf の安定化を介して、Raf/Mek/Erk 経路および転写因子である GATA4 の活性化を維持することを示した。Hsp90 阻害薬により Hsp90 とそのクライアントタンパク質の相互作用が阻害されると、クライアントタンパク質は正常な構造を形成できず、分解へと導かれる²⁰⁻²²⁾。そこで、17-AAG 投与後の心筋細胞 c-Raf 含量の減少が、プロテアソームでの分解に関与しているか検討するため、心筋細胞へプロテアソーム阻害薬 MG-132 を投与した。その結果、17-AAG 投与後の心筋細胞での c-Raf 含量の減少が軽減されたことから、c-Raf 含量の減少にはプロテアソームでの分解が関与することを示した。

第二章では、ラット培養心線維芽細胞を用い、心線維芽細胞の増殖および細胞内情報伝達経路である Raf/Mek/Erk 経路に及ぼす Hsp90 阻害の効果について検討した。その結果、心線維芽細胞の Hsp90 が細胞増殖の促進に寄与することを示した。その作用機序として、心筋細胞と同様に Hsp90 が c-Raf の機能制御を介して、Raf/Mek/Erk 経路の活性化を維持する可能性を示した。

以上、本論文は心筋細胞肥大および心線維芽細胞増殖への Raf/Mek/Erk 経路を介する Hsp90 の寄与について明らかにすることで、心筋リモデリングの進展に寄与する細胞内情報伝達経路について新たな知見を提示することができた。

謝 辞

本研究の実施にあたり，終始御懇篤なる御指導と御鞭撻，ならびに本論文の御校閲を戴きました恩師東京薬科大学分子細胞病態薬理学教室教授 田野中 浩一 先生に心からの感謝の意を表します．

また，本研究の遂行を通じて，終始懇切丁寧な御指導，御鞭撻を賜りました東京薬科大学分子細胞病態薬理学教室助教 丸ノ内 徹郎 先生に心から深く御礼申し上げます．

さらに，本研究に際して種々の御助言，御協力を戴きました東京薬科大学分子細胞病態薬理学教室助手 矢野 絵美 先生ならびに分子細胞病態薬理学教室の皆様方に深く御礼申し上げます．

引用文献

- 1) Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **35**, 569–582 (2000).
- 2) Okura Y, Ramadan MM, Ohno Y, Mitsuma W, Tanaka K, Ito M, Suzuki K, Tanabe N, Kodama M, Aizawa Y. Impending epidemic. *Circ. J.*, **72**, 489–491 (2008).
- 3) Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.*, **79**, 143–180 (1999).
- 4) Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ. Res.*, **91**, 776–781 (2002).
- 5) Rapacciuolo A, Esposito G, Caron K, Mao L, Thomas SA, Rockman HA. Important role of endogenous norepinephrine and epinephrine in the development of in vivo pressure-overload cardiac hypertrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **38**, 876–882 (2001).
- 6) Lai BT, Chin NW, Stanek AE, Keh W, Lanks KW. Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 2802–2810 (1984).
- 7) Picard D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1640–1648 (2002).
- 8) Citri A, Harari D, Shohat G, Ramakrishnan P, Gan J, Lavi S, Eisenstein M, Kimchi A, Wallach D, Pietrokovski S, Yarden Y. Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. *J. Biol. Chem.*, **281**, 14361–14369 (2006).
- 9) Schulte TW, Blagosklonny M V., Ingui C, Neckers L. Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association. *J. Biol. Chem.*, **270**, 24585–24588 (1995).
- 10) Soga S, Kozawa T, Narumi H, Akinaga S, Irie K, Matsumoto K, Sharma S V, Nakano H, Mizukami T, Hara M. Radicicol leads to selective depletion of Raf kinase and disrupts K-Ras-activated aberrant signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **273**, 822–828 (1998).
- 11) Soonpaa MH, Field LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circulation Research*, **83**, 15-26 (1998).
- 12) Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.*, **128**, 191–227 (2010).
- 13) Chlopčíková S, Psotová J, Miketová P, Chlopčíkova S, Psotova J, Miketova P.

- Neonatal rat cardiomyocytes - a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Biomed. Pap.*, **145**, 49–55 (2001).
- 14) Maki T, Kawahara Y, Tanonaka K, Yagi A, Takeo S. Effects of tanshinone VI on the hypertrophy of cardiac myocytes and fibrosis of cardiac fibroblasts of neonatal rats. *Planta Med.*, **68**, 1103–1107 (2002).
 - 15) Schulte TW, Neckers LM. The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **42**, 273–279 (1998).
 - 16) Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.*, **6**, 99–104 (1999).
 - 17) Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 2235–2246 (1993).
 - 18) Liang Q, Wiese RJ, Bueno OF, Dai YS, Markham BE, Molkentin JD. The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 7460–7469 (2001).
 - 19) Liang Q, De Windt LJ, Witt SA, Kimball TR, Markham BE, Molkentin JD. The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, **276**, 30245–30253 (2001).
 - 20) Dou F, Yuan L Di, Zhu JJ. Heat shock protein 90 indirectly regulates ERK activity by affecting Raf protein metabolism. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **37**, 501–505 (2005).
 - 21) Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tschlis P, Rosen N. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.*, **277**, 39858–39866 (2002).
 - 22) Grbovic OM, Basso AD, Sawai A, Ye Q, Friedlander P, Solit D, Rosen N. V600E B-Raf requires the Hsp90 chaperone for stability and is degraded in response to Hsp90 inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 57–62 (2006).
 - 23) Cao X, Bloomston M, Zhang T, Frankel WL, Jia G, Wang B, Hall NC, Koch RM, Cheng H, Knopp M V, Sun D. Synergistic antipancreatic tumor effect by simultaneously targeting hypoxic cancer cells with HSP90 inhibitor and glycolysis inhibitor. *Clin. Cancer Res.*, **14**, 1831–1839 (2008).
 - 24) Naga Prasad S V, Esposito G, Mao L, Koch WJ, Rockman HA. Gβγ-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload

- hypertrophy. *J. Biol. Chem.*, **275**, 4693–4698 (2000).
- 25) Purcell NH, Tang G, Yu C, Mercurio F, DiDonato JA, Lin A. Activation of NF- κ B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 6668–6673 (2001).
 - 26) Lee KH, Jang Y, Chung JH. Heat shock protein 90 regulates I κ B kinase complex and NF- κ B activation in angiotensin II-induced cardiac cell hypertrophy. *Exp. Mol. Med.*, **42**, 703 (2010).
 - 27) Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*, **5**, 15 (2012).
 - 28) Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis involvement in cardiac hypertrophy, *Circulation Research*, **91**, 12, 1103-1113 (2002).
 - 29) Zak R. Cell proliferation during cardiac growth. *Am. J. Cardiol.*, **31**, 211–219 (1973).
 - 30) Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, **20**, 2390–2400 (2001).
 - 31) Bouzeghrane F, Thibault G. Is angiotensin II a proliferative factor of cardiac fibroblasts? *Cardiovasc. Res.*, **53**, 304–312 (2002).
 - 32) Salazar KD, Lankford SM, Brody AR. Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF- β 1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, **297**, L1002–L1011 (2009).
 - 33) Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II Stimulated Expression of Transforming Growth Factor- β 1 in Cardiac Fibroblasts and Myofibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **29**, 1947–1958 (1997).
 - 34) Leask A, Abraham DJ. TGF- β signaling and the fibrotic response. *FASEB J.*, **18**, 816–827 (2004).
 - 35) Datta R, Bansal T, Rana S, Datta K, Chattopadhyay S, Chawla-Sarkar M, Sarkar S. Hsp90/Cdc37 assembly modulates TGF β receptor-II to act as a profibrotic regulator of TGF β signaling during cardiac hypertrophy. *Cell. Signal.*, **27**, 2410–2424 (2015).