

氏名（本籍）	<small>たむら しょうこ</small> 田村 昌子（静岡県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 293 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	（主査）教授 田野中 浩一 教授 高木 教夫 教授 平野 俊彦

論文内容の要旨

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、負荷に適応する。例えば、心筋梗塞後に容量負荷や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。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。我が国では、生活習慣の欧米化や急速な高齢化で、心不全の患者数が増加しており、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と考えられる。

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されると、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され、心筋リモデリングが進展する。Mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ経路の 1 つである Raf/MAPK/Erk kinase (Mek)/extracellular signal-regulated kinases (Erk) 経路は、細胞増殖、分化および細胞生存に寄与する。圧負荷で生じる肥大心では Erk1/2 の活性化が報告されていることから、心臓での Raf/Mek/Erk 経路は、心筋リモデリングの進展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。Hsp90 は、タンパク質の成熟した機能的な高次構造の形成・保持および不必要な凝集を抑制する役割

を担う。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。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 のタンパク質発現量が減少することが示されている。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 1 章 心筋細胞肥大への Hsp90 の関与

Figure 2 Change in contents of c-Raf, and Erk1/2 proteins and their phosphorylated forms in NRVMs treated with or without ET-1, 17-AAG and MG-132. (A) c-Raf contents, (B) ratio of p-c-Raf to c-Raf, and (C) 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, 17-AAG, and MG-132). Each value represents the mean \pm S.E.M. of 7 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. indicated values.

第 1 章ではラット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．まず，心筋細胞面積への Hsp90 阻

害薬 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) の効果を検討した．培養心筋細胞に 17-AAG を前処置し，endothelin-1 (ET-1) 刺激により心筋細胞肥大を誘発したところ，17-AAG により，心筋細胞面積の増大が抑制された (Figure 1A,B)．このことから，Hsp90 が

心筋細胞肥大の進展に寄与する可能性が示された．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 含量が減少し (Figure 2A)，ET-1 による c-Raf および Erk1/2 のリン酸化促進が抑制された (Figure 2B,C)．これらの結果から，Hsp90 が 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．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，プロテアソームでの分解へと導かれるとされる．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，培養心筋細胞にプロテアソーム阻害薬である MG-132 を作用

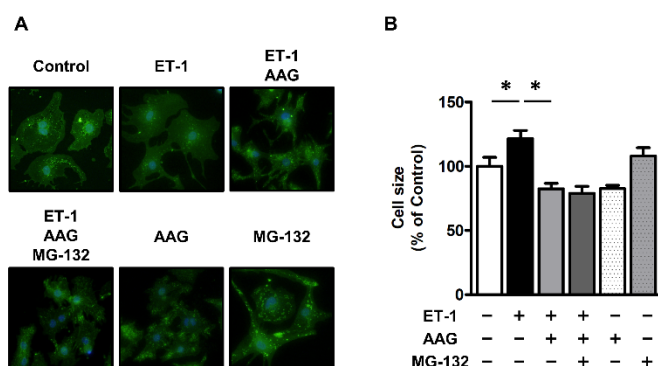
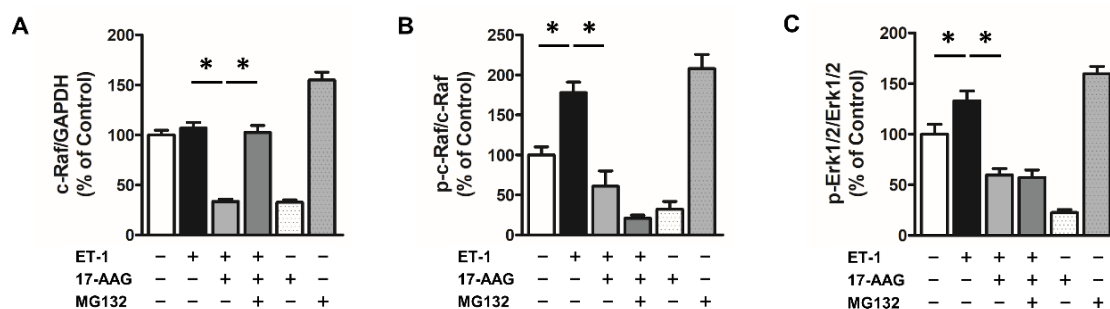


Figure 1 Change in cell size of neonatal rat ventricular myocytes (NRVMs). (A) Representative images of cell surface of NRVMs stained with WGA-FITC. The cells were pre-incubated with 17-AAG (1 μ M), and MG-132 (100 nM) followed by ET (1 nM) stimulation for 24 h. DAPI (blue) was used to counterstain for 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.



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 (Figure 2A)．し

Figure 2 Change in contents of c-Raf, and Erk1/2 proteins and their phosphorylated forms in NRVMs treated with or without ET-1, 17-AAG and MG-132. (A) c-Raf contents, (B) ratio of p-c-Raf to c-Raf, and (C) 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, 17-AAG, and MG-132). Each value represents the mean \pm S.E.M. of 7 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. indicated values.

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。

細胞内で活性化された 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。転写因子 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 部位を直接リン酸化する。そこで、17-AAG 投与後の GATA4 のリン酸化について検討したところ、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 (Figure 3)。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。

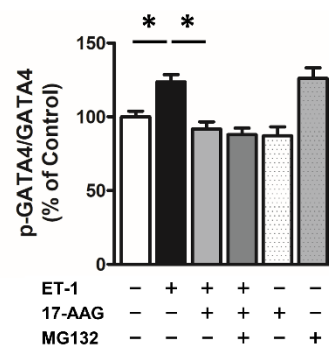


Figure 3 Change in ratio of p-GATA4 to GATA4 in NRVMs treated with or without ET-1, 17-AAG and MG-132. Values are expressed as percentages compared with the non-stimulated group (incubated in the absence of ET, 17-AAG, and MG-132). Each value represents the mean \pm S.E.M. of 7 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. indicated values.

第 2 章 心線維芽細胞増殖への Hsp90 の関与

第 1 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、心室リモデリングにより心筋細胞は肥大し、間質組織は線維化が進行する。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、ECM の産生には、心線維芽細胞が中心的な役割を担っている。したがって、心線維芽細胞の増殖は心線維化に寄与すると推察されるものの、心線維芽細胞増殖への Hsp90 の寄与は、未だ明らかにされていない。

そこで、第 2 章では、ラット培養線維芽細胞を用い、心線維芽細胞の増殖への Hsp90 の関与について検討した。まず、培養線維芽細胞の細胞数に及ぼす Hsp90 阻害薬 17-AAG の効果を検討したところ、心線維芽細胞への 17-AAG 投与により、線維芽細胞の細胞増加は抑制された (Figure 4)。この結果から、Hsp90 が心線維芽細胞の細胞増殖に寄与する可能性が示された。

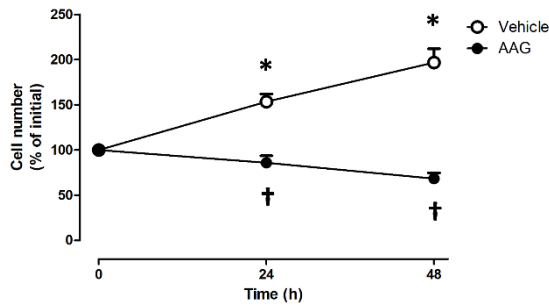


Figure 4 Change in cell number of cardiac fibroblasts (CF) treated with 17-AAG or Vehicle. The cells were incubated with 17-AAG for 24 or 48 h. Values are expressed as percentages compared with 0 h group. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. 0 h group.

次に、Hsp90 が線維芽細胞の増殖に寄与する機序について検討した。第一章と同様に Raf/Mek/Erk 経路に着目したところ、17-AAG 投与により、心線維芽細胞の c-Raf 含量は減少し (Figure 5A), c-Raf および Erk1/2 のリン酸化が抑制された (Figure 5B,D)。この結果から、Hsp90 は c-Raf の発現量の維持に寄与しており、c-Raf の機能的な高次構造の維持を介して Raf/Mek/Erk 経路の活性化を維持することが示された。

第 1 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 MG-132 を作用させた。その結果、心線維芽細胞での 17-AAG 投与による c-Raf 含量の減少は、MG-132 投与により軽減された (Figure 5A)。したがって、17-AAG 投与時の 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 (Figure 5B,D)。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、リン酸化され活性化するために Hsp90 との相互作用が必要である可能性が推察された。

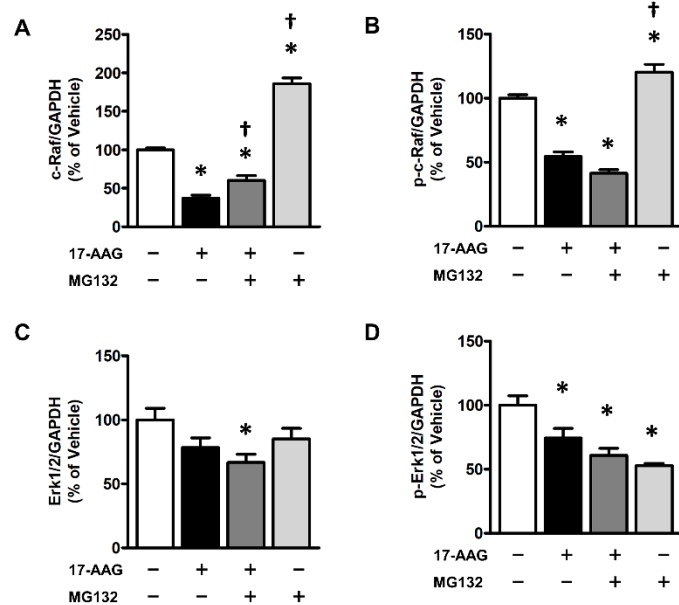


Figure 5 Change in contents of c-Raf, p-c-Raf, Erk1/2, and p-Erk1/2 in CF treated with or without 17-AAG or MG-132. (A) c-Raf contents, (B) p-c-Raf contents, (C) Erk1/2 contents, and (D) p-Erk1/2 contents in CF. Values are expressed as percentages compared with Vehicle group (incubated in the absence of 17-AAG, and MG-132). Each value represents the mean \pm S.E.M. of 4-6 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. Vehicle group. † $p < 0.05$ vs. 17-AAG group.

本研究の結果から、心筋細胞の Hsp90 が心筋細胞肥大の進展に寄与することが示された。その機序の一つに、Hsp90 が c-Raf の安定化を介して、Raf/Mek/Erk 経路およ

び Erk1/2 の情報伝達系の下流に位置する転写因子である GATA4 の活性化を維持することが考えられた。加えて、心線維芽細胞の 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し、細胞増殖の促進に寄与することが示された。さらに、17-AAG 投与後の心筋細胞および心線維芽細胞での c-Raf 含量の減少には、プロテアソームでの分解が関与すること推察された。

以上、本研究では、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関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。

【研究結果の掲載誌】

1) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **127**, 134–142 (2019)

論文審査の結果の要旨

心筋リモデリングは、心筋肥大および心線維化を指標とする組織の病態生理学的変化である。心筋肥大は固有心筋細胞の肥大により、心線維化は心線維芽細胞の増殖により誘発される。この心筋リモデリングの過度の進行は、心不全の誘因になると考えられており、心筋リモデリングの病態生理を把握することは、心不全の新たな治療法を開発することに有益な情報を提供すると期待されている。

Hsp90 は分子シャペロン的一种で、種々のタンパク質の合成および修復に関与する。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。心筋細胞肥大および心線維芽細胞増殖を促進させる細胞内情報伝達系として mitogen-activated protein (MAP) kinase 経路が注目されている。MAP kinase 経路の中で、Raf/Mek/ERK 経路は心筋リモデリングへの関与が推測されている。近年、c-Raf が Hsp90 のクライアントタンパク質となる可能性が示された。しかしながら、Hsp90 の心筋細胞肥大および心線維芽細胞増殖への役割については明らかにされていない。そこで本研究は、心筋リモデリングの要因となる心筋細胞肥大および心線維芽細胞増殖への Hsp90 の役割を把握するために企画された。

第 1 章では、ラット新生仔培養心筋細胞を用いて、Hsp90 の心筋細胞肥大への Hsp90 の役割について検討した。培養心筋細胞にエンドセリン-1 (ET-1) を暴露させると、心筋細胞肥大が生じた。心筋細胞肥大により誘導される心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) 遊離量も増大した。肥大した心筋細胞では、Raf のタンパク質量は ET-1 未処置の心筋細胞のそれと同様であったが、そのリン酸化レベルが上昇した。心筋細胞肥大の情報伝達系末端に位置する Erk1/2 のリン酸化レベルも上昇し、転写因子の GATA4 リン酸化レベルも上昇した。一方、Hsp90 活性を抑制する 17-AAG 存在下では、心筋細胞内の Raf が減少し、その情報伝達の下流に位置する Erk1/2 および GATA-4 のリン酸化レベルの上昇は観察されなかった。この 17-AAG による Raf の減少は、プロテアソーム阻害薬の MG-132 で軽減された。これらの結果から、Hsp90 は Raf をクライアントタンパク質とし、Raf/Mek/ERK 情報伝達系を制御していることが示された。Hsp90 が Raf を遊離すると、Raf はプロテアソームにより速やかに分解されることも示された。

第 2 章では、心線維芽細胞増殖への Hsp90 の関与について検討した。心線維芽細胞に 17-AAG を暴露させると、心線維芽細胞の増殖が阻止された。心線維芽細胞への 17-AAG 暴露は、Raf を減少させたが、Raf のリン酸化レベルは上昇させた。その一方で、17-AAG 処置群の Erk1/2 のリン酸化レベルは、上昇しなかったことから、Raf の減少が、Raf/Mek/ERK 情報伝達系の活性を低下させたと考えられた。

以上、本研究は心筋リモデリングでの病態生理学的条件下での心筋細胞肥大および心線維芽細胞増殖に Hsp90 が関与することを示した。心筋リモデリングを抑制することは、心不全発症およびその進展を阻止し、予後を改善すると考えられていることから、Hsp90 が新たな心不全治療薬の標的と成り得ることを提示した。したがって、本論文は、博士（薬学）学位申請論文として相応しいものと判断する。