

論文の内容の要旨

1 申請者

防衛医科大学校 鏡 和樹

2 論文題目

心筋細胞および血管平滑筋細胞における ERK1/2 欠損の心機能に対する役割の検討

3 論文の内容の要旨

(1) 背景・目的

細胞外シグナル制御キナーゼ (Extracellular signal-regulated kinase : ERK 1/2) は、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (Mitogen-activated Protein Kinase) シグナル伝達経路の下流分子で、細胞の増殖、分化、接着、移動および生存に関わる遺伝子の発現と制御に統合する。心筋細胞の ERK1/2 は、肥大とアポトーシスに関与するが、アイソフォームごとの機能の違いについては解明されていない。また、心臓を構成する他の細胞における ERK1/2 の心機能に対する役割については十分に検証されていない。心臓を構成する細胞には、心筋細胞の他に、線維芽細胞があり、これらの細胞を栄養する冠動脈を構成する内皮細胞や血管平滑筋細胞がある。特に、冠動脈は血流や炎症に関与するため、血管の構成細胞の ERK1/2 は心不全の病態に関与する。本研究では、心筋細胞および血管平滑筋細胞における *Erk1/2* 欠損の心機能に対する役割を検討した。

(2) 研究方法

(a) 心筋細胞の特異的プロモーターである MHC α -Cre マウスと *Erk2*^{flox/flox} マウ

スを交配させ、心筋細胞のみで *Erk2* が欠損する MHC α -*Erk2* knockout mice (MHC α -E2K0) を作成し、その表現型を評価し心筋細胞における *Erk2* 欠損の影響を検討した。

(b) 心筋細胞と血管平滑筋の特異的プロモーターである SM22 α -Cre マウスと *Erk2*^{flox/flox} マウスを交配させ、心筋細胞および血管平滑筋細胞で *Erk2* が欠損する SM22 α -*Erk2* knockout mice (SM22 α -E2K0) を作成し、その表現型を評価し心血管 *Erk2* 欠損の影響を検討した。

(c) 全身非特異的に *Erk1* をノックアウトさせたマウス (*Erk1*^{-/-}) の表現型を評価し、*Erk1* 欠損の影響を検討した。続いて心筋細胞および血管平滑筋細胞の *Erk2* 欠損下における *Erk1* 欠損の影響を検討するため、SM22 α -E2K0 と *Erk1*^{-/-} を交配して表現型を観察した。

(d) SM22 α -E2K0 の心機能低下に対して、抗炎症作用、抗酸化作用を有する水素ガスを曝露し、心機能の改善効果を検討した。

(3) 研究結果

(a) MHC α -E2K0 は、12-14 週齢では左室拡大や心肥大や心筋線維化を示さなかったが、軽度の左室収縮能の低下を示し、*Nppa* の mRNA の発現が高かった。30 週齢頃までは control と MHC α -E2K0 の外観はほぼ同じで死亡せず、36 週齢頃から MHC α -E2K0 の死亡数が増加した。最大 52 週齢まで観察すると、MHC α -E2K0 は control と比較し、有意に死亡率が高かった。

(b) SM22 α -E2K0 は、12-14 週齢で高度の心収縮能低下を伴う心肥大を呈し、早期に死亡した。SM22 α -E2K0 の心臓は炎症細胞の浸潤と血管周囲の線維化がみられ、RNA レベルでは心筋代謝の障害と酸化ストレスや炎症シグナルの亢進していた。心肥大や炎症のマーカーである、AKT や STAT3、p-38 のリン酸化の亢進を認めた。

(c) *Erk1*^{-/-}では、SM22 α -E2K0 でみられた心肥大や心収縮能低下、早期死亡はなかった。心筋細胞および血管平滑筋細胞で *Erk1* と *Erk2* を二重欠損させると、胎生致死であった (*Erk1*^{-/-} SM22 α -E2K0)。 *Erk1* ヘテロ欠損および *Erk2* 欠損マウスは出生するが (*ERK1*^{+/-} SM22 α -E2K0)、SM22 α -E2K0 と比較してより早期に死亡した。

(d) 炎症シグナルの亢進が観察されている SM22 α -E2K0 に水素ガス曝露を行ったところ、左室収縮能は改善した。また、炎症のマーカー遺伝子である *Tnf α* は、水素ガス非曝露群と比較し、曝露群で低値であった。また酸化ストレス指標である d-ROM は曝露群で低値であった。

(4) 考察

これまで収縮能の低下した心不全モデルにおいて、心筋細胞の障害についてはよく研究されてきたが、本研究では心筋 *Erk2* 欠損に加えて血管平滑筋 *Erk2* 欠損による血管機能異常が加わることで心不全が著明に増悪することを示したことが新規性を有する。心筋細胞単独の *Erk2* 欠損の MHC α -E2K0 では、軽度の左室収縮能低下であったが、血管平滑筋細胞の *Erk2* 欠損が追加された SM22 α -E2K0 は、血管機能不全と、血管周囲を主体とした炎症と線維化を伴う重度の心肥大、心収縮機能低下を呈し、早期に死亡した。このことから、血管平滑筋の *Erk2* 欠損が血管機能異常を介して心臓の表現型に影響を与えた可能性が示唆された。また、*Erk1* の欠損は、心臓に明らかな表現型を示さなかったが、重篤な心機能低下をきたす *Erk2* 欠損マウスに *Erk1* 欠損を合併させた検討においては、*Erk1* のホモ欠損の合併 (*Erk1*^{-/-} SM22 α -E2K0) では胎生致死をきたし、ヘテロ欠損の合併 (*Erk1*^{+/-} SM22 α -E2K0) では *Erk2* 単独欠損と比較し早期に死亡することがわかった。このことから、心筋細胞と血管平滑筋における ERK2 は、ERK1 とは異なる役割を持つことが確認された。さらに、水素ガスを曝露することで、SM22 α -E2K0 は曝露前と比較し、

心収縮能は改善した。水素ガス非曝露の SM22 α -E2K0 と比較し、水素ガス曝露の SM22 α -E2K0 は炎症マーカー、酸化ストレスマーカーが低かった。水素ガスによる抗炎症作用、抗酸化作用が心機能改善に寄与する可能性が示唆された。

(5) 結論

心筋細胞と血管平滑筋の *Erk2* 欠損は、重篤な心血管系の異常が誘発され、さらに *Erk1* 欠損が追加されることで、心臓の表現型がより重篤になることが示された。血管機能異常が心臓の炎症、肥大、収縮能低下に寄与し、それらの心機能低下に対して水素ガスによる抗炎症作用、抗酸化作用が有用である可能性が示唆された。

4 キーワード

「ERK」、「心不全」、「心筋細胞」、「血管平滑筋細胞」、「チロシンキナーゼ受容体阻害剤」