

論文内容の要旨

心筋における Bcl-2 associated athanogene 3 (BAG3) の役割の解明
(猪俣結衣)

I. 研究目的

ヒトの Bcl-2 associated athanogene (BAG) 3 は、哺乳類において主に心筋、骨格筋および平滑筋に強く発現が認められている。BAG3 の欠損変異あるいは点変異が原因と考えられる筋原線維性ミオパチー(MFM)などの疾患は多数報告されているが、BAG3 の生体内における詳細な役割については未だ不明な点が多い。本研究では、心筋特異的に BAG3 を過剰発現させたトランスジェニック (TG) マウスを作製し、心筋における BAG3 の役割について検討した。

II. 研究対象ならびに方法

第 1 章では、心筋症モデルマウスである α B-Crystallin Arg 120 Gly (CryAB R120G) TG マウス心筋での BAG3 タンパク質レベルを検討した。電気泳動法およびウエスタンブロット法を用いて、CryAB R120G TG マウスの心筋ミトコンドリアの BAG3 タンパク質レベルを検討した。第 2 章では、心筋特異的に BAG3 を過剰発現させた TG (BAG3 TG) マウスを作製し、その表現型解析を行なった。BAG3 TG マウスの体重および心重量ならびに心臓超音波を測定した。さらに、BAG3 TG マウスの心筋組織にマッソントリクローム染色および Hematoxylin-Eosin (H&E) 染色を施し、線維化の有無を検討した。BAG3 TG マウスの心筋低分子熱ショックタンパク質 (HSP) 群 (CryAB, HSPB1, HSPB8) および HSP70 の遺伝子発現レベルを real-time PCR 法にて検討し、タンパク質レベルを電気泳動法およびウエスタンブロット法を用いて検討した。第 3 章では、BAG3 TG マウスにプロテアソーム阻害剤 (Bortezomib) およびオートファジー阻害剤 (Chloroquine) を投与した時の心筋低分子 HSP および心筋オートファジーマーカータンパク質の変化を検討した。さらに Chloroquine を投与した BAG3 TG マウスの心筋組織内におけるリソソーム、オートファゴソームおよびオートリソソームの有無を透過型電子顕微鏡にて解析した。

III. 研究結果

第 1 章では、CryAB R120G TG マウスの心筋細胞質およびミトコンドリアの BAG3 タンパク質は、Non-Transgenic (NTG, 対照群) マウスおよび野生型 CryAB TG マウスと比較して有意に増加していることが認められた。第 2 章では、遺伝子導入により約 5 倍の BAG3 タンパク質増加が認められた BAG3 TG マウスにおいて、心筋ストレスマーカーである心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の増加および Fractional shortening (%FS) の低

下が認められた。一方、NTG マウスおよび BAG3 TG マウス間で、心体重比に差は認められず、心筋の線維化および心筋細胞内における凝集体の蓄積も認められなかった。BAG3 TG マウスにおいて、心筋 CryAB タンパク質および HSPB1 タンパク質の顕著な低下が認められた。心筋の HSP 遺伝子発現レベルは、対照群マウスと比較して大きな差は認められなかった。また、BAG3 TG マウスの心筋では、オートファジーマーカーのアップレギュレーションが認められた。Bortezomib あるいは Chloroquine を投与した BAG3 TG マウスの心筋組織において、CryAB および HSPB1 タンパク質の増加が認められた。さらに、Chloroquine を投与した BAG3 TG マウスの心筋組織内において、リソソーム、オートファゴソームおよびオートリソソームの存在が認められた。

IV. 結 語

BAG3 TG マウスの心筋では、心筋収縮力の低下とストレスマーカーの増加および CryAB, HSPB1 などの低分子 HSP の低下が認められた。さらに、オートファジーマーカーのアップレギュレーションが認められた。また、CryAB R120G TG マウスおよび点変異型 CryAB を過剰発現させた心筋細胞では、心筋 BAG3 の顕著な増加が示された。本研究結果は、BAG3 の過剰発現が、オートファジーを活性化させ、CryAB や HSPB1 などの低分子 HSP の分解を促進させる可能性があることを示した。オートファジー阻害剤 (Chloroquine) を投与した BAG3 TG マウス心筋組織において、オートファゴソームやオートリソソームならびにオートリソソーム内に存在するミトコンドリア様構造が認められた。BAG3 によるオートファジーおよびマイトファジーの活性化は、心機能の低下および低分子 HSP タンパク質レベルの顕著な低下に関わっていると考えられる。低分子 HSP は、タンパク質の恒常性を維持するため、生体内に一定量が必要とされている。したがって、BAG3 の過剰発現によるオートファジーの活性化は、心筋タンパク質の恒常性に必要な低分子 HSP のダウンレギュレーションを導き、これが成長過程および成長後の生体心筋にとってストレス対応能の低下を引き起こし、心機能の低下が起こったと考えられる。CryAB R120G TG マウスで認められた心筋 BAG3 の増加は、凝集体の蓄積に対する適応メカニズムの 1 つであると考えられる。BAG3 によるオートファジーの活性化およびそれに伴うタンパク質分解の詳細なメカニズムを検討することは、MFМ などタンパク質凝集体の蓄積が原因となる疾患に対する新規治療法の開発に繋がると考えられる。

論文審査の結果の要旨（博士課程）

審査担当者

主査 教授	那谷耕司（臨床医化学講座）
副査 教授	工藤賢三（臨床薬剤学講座）
副査 教授	奈良場博昭（薬学教育学科）

論文審査の結果の要旨

本研究は、心筋特異的に Bcl-2 associated athanogene (BAG) 3 を過剰発現するトランスジェニックマウスを用いて、心筋における BAG3 の役割を解明することを目的としている。本研究の結果から、BAG3 の過剰発現は、オートファジーの活性化を介して、心筋低分子 Heat Shock Protein の分解を促進し、その結果として心筋ストレスマーカーである心房性ナトリウム利尿ペプチドの増加と心筋収縮力の低下をきたす可能性が考えられた。また、筋原繊維性ミオパチーモデルマウス心筋で認められる BAG3 増加は、心筋におけるタンパク質凝集体蓄積に対する防御機構であることが示唆された。以上の知見から、心筋においては BAG3 が一定のレベルに維持されていることが必要であり、BAG3 が過剰または不足の状態に陥ることが心筋の障害につながることを示唆された。

本学位論文の研究内容は、心筋における BAG3 の役割を新規に明らかにしたものであり、審査担当者による協議の結果、大学院博士課程教育として望まれるテーマ設定と研究成果であることが評価できるとの結論になった。

学位論文については、総合考察の内容を整理し図を使ってわかりやすく記載すること、誤字・脱字の修正、記載様式の統一等が審査担当者から指摘されており、これらの指摘に従い学位論文を修正することが望まれる。

試験・試問の結果の要旨

最終試験におけるプレゼンテーションでは、適切な図を用いて研究内容の要点を的確にまとめて発表していた。また、発表後の質疑応答では、質問に対して誠実かつ的確に回答できており、試験・試問の結果としては合格と認められる。