

学位論文

心肥大モデルにおける細胞接着因子
ギセリン/CD146 の発現および
発現制御機構の解明

2020年

岩手医科大学 大学院薬学研究科
医療薬学専攻 分子病態解析学分野
小原 真美

目次

序論	3
ギセリン/CD146 について	6
第1章	
緒言	8
実験材料および実験方法	9
結果	14
考察	21
第2章	
緒言	23
実験材料および実験方法	24
結果	25
考察	28
第3章	
緒言	29
実験材料および実験方法	30
結果	32
考察	37
総合考察および結論	38
参考文献	42
謝辞	45

序論

ギセリン/ CD146 は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着因子であり、神経突起伸長因子 NOF (Neurite Outgrowth Factor) の受容体として同定された分子である[1]。ギセリン/ CD146 は、アミノ末端に存在する膜移行シグナルに続き、細胞外領域に 5 個の免疫グロブリン様構造を持ち、そのうちの最初の 2 個は V-set 様タイプ、残りの 3 個は C2-set 様タイプである[1]。それに続くカルボキシル末端側に一箇所の膜貫通部位をはさんで、短い細胞内領域を持つ。細胞内領域の短いものは S-ギセリン、長いものは L-ギセリンと名付けられている[1]。

ギセリン/ CD146 はホモフィリック結合による細胞凝集活性と、神経突起伸長因子であるラミニンファミリーに属する NOF へのヘテロフィリック結合活性を有する[2,3]。ギセリン/ CD146 は発達段階の神経系に豊富に発現し、神経突起の伸長と細胞遊走に関与していることが報告されている[4]。

ギセリン/ CD146 の発現調節機構については、神経成長因子 (NGF) に応答して神経突起を伸長するラット副腎髄質褐色細胞腫細胞 (PC12) を用いて検討されている。この結果から、ギセリン/ CD146 の mRNA 量は、cAMP によって調節されていることが明らかとなっている[2]。また、ギセリン/ CD146 遺伝子のプロモーター領域に存在する cAMP 応答配列 (CRE) に cAMP responsive element binding protein (CREB) が結合することによってギセリン/ CD146 遺伝子の発現が亢進することから、ギセリン/ CD146 の遺伝子発現にアドレナリ

ンβ受容体-cAMP-プロテインキナーゼAおよびMAPキナーゼ経路が関与していることが示唆されている。

ギセリン/ CD146 は神経系以外のさまざまな組織で発現しており、気管と腎臓の発生と再生、ならびに発癌や動脈硬化の形成にも関与している [5-8]。神経系の発達において、ギセリン/ CD146 は細胞分裂を伴わないニューロンの分化時期に発現しており、神経系の発達後、ギセリン/ CD146 の発現は消失する [1]。一方、発癌や動脈硬化において、ギセリン/ CD146 の発現は細胞の増殖時期と同時期に検出される [8]。また、平らはギセリン/ CD146 が成体ラットの心臓で発現していることを報告しており [5]、平らは、ギセリン/ CD146 が成体の心機能に何らかの役割を果たしているのではないかと推測している。哺乳動物では、心筋細胞は胎児期にのみ増殖能を有し、出生後にはその増殖能は速やかに消失する。そのため、成体においては細胞容積を増大することにより圧負荷などのストレスに対応する [9]。病的な心肥大においても、心筋細胞は増殖することなくその細胞の容積を増大させる。したがって、ギセリン/ CD146 の機能として心筋細胞の容積増大に関与している可能性が考えられる。

本研究では、心筋細胞の容積増大(肥大)の過程および出生後の心臓の生理学的な肥大におけるギセリン/ CD146 の発現とその制御機構について解析を行った。これらを検討するために、成体ラットの大動脈を狭窄 (Ascending Aortic Constriction : AAC、上行大動脈狭窄) することにより、心肥大モデルを作製した [10,11]。また、出生後の心臓におけるギセリン/ CD146 の発現を経時的に解析した。さらに、ラット心筋細胞由来株である H9c2 細胞に伸展刺激を加えることにより、in vitro での心肥大のモデルを作製した [12,13]。この心肥大モデルに、

MAP キナーゼ経路阻害剤を添加することにより[14-17]、心筋細胞におけるギセリン/ CD146 遺伝子の発現のメカニズムを解析した[2]。

ギセリン/ CD146 について

ギセリン/ CD146 は、神経突起伸展因子 NOF に対する受容体分子として同定された分子であり、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。NOF は、発生初期ニワトリ胚神経細胞での神経突起伸展を引き起こすラミニンファミリーに属する細胞外基質蛋白質である[1]。ニワトリ胚において毛様体神経節細胞は 10 日目胚までは NOF に反応して神経突起を伸展するが、それ以降、急速にその反応性が低下する[1]。この際に、NOF の発現量に変化は認められないことから、突起伸展能の低下として NOF 受容体の変化が推測される。

ギセリン/ CD146 は発生初期の神経系で発現が認められており、前述の毛様体神経節細胞の NOF に対する反応性の低下はギセリン/ CD146 の発現量の低下によるものであることが報告されている[1]。ギセリン/ CD146 は、アミノ末端に存在する膜移行シグナルに続き細胞外領域に 5 個の免疫グロブリン様構造を持つ (図 1)。免疫グロブリン様構造の最初の 2 個は V-set 様タイプ、残りの 3 個は C2-set 様タイプと呼ばれている。それに続くカルボキシル末端側に一箇所の膜貫通部位をはさんで、短い細胞内領域を持つ[1]。細胞内領域は短く、他の免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着因子と同様、キナーゼ等の特別な活性領域は持たないが、リン酸化可能部位が複数存在し、何らかの機能を有していると考えられる[1]。

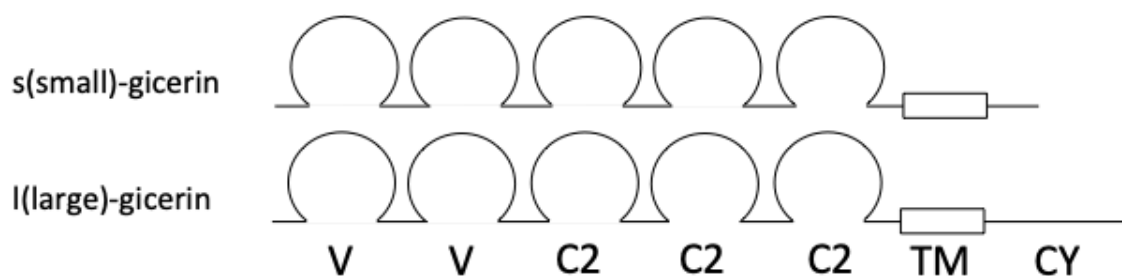


図1 ギセリン/ CD146 の構造

V:免疫グロブリン様構造V-set様タイプ

C2:免疫グロブリン様構造C2-set様タイプ

TM:膜貫通領域

CY:細胞内領域

ギセリン/ CD146 は、細胞外領域に 8 カ所の N-リンク型糖鎖結合可能部位を持ち、そのうちの数カ所は実際に糖鎖の付着が認められる。さらに多くの O-リンク型の糖鎖も結合しており、その修飾状況は種間で差異が見られる[1]。

ニワトリ砂囊のギセリン/ CD146 は、ウエスタンブロット法で 84kDa および 90kDa の位置に検出される。この 2 種類の分子量は mRNA の細胞内領域をコードする領域のスプライシングの差異により生じるものであり、細胞内領域の短いものは S-ギセリン、長いものは L-ギセリンと名付けられている (図1)。それぞれのサブタイプの発現は組織によって異なっていることがわかっている [1]。

第1章 緒言

ギセリン/ CD146 は、発達段階の神経系に強く発現し、神経突起の伸長と細胞遊走に関与していることが報告されている[4]。また、ギセリン/ CD146 は神経系以外のさまざまな組織でも発現しており、気管と腎臓の発生と再生、ならびに発癌や動脈硬化の形成にも関与している[5-8]。さらに、平らはギセリン/ CD146 が成体ラットの心臓で発現されることを報告しており[5]、ギセリン/ CD146 が成体の心機能に何らかの役割を果たしていることが推測される。

哺乳動物の心筋細胞は胎児期にのみ増殖能を有し、出生後はすぐに細胞周期が停止し最終分化の状態へ移行するため、その後心筋細胞は増殖することなく肥大するだけである[9]。一方、病的な心肥大においても、心筋細胞は分裂せずに、細胞の容積を増大させる。

本研究では、病的な心肥大の過程におけるギセリン/ CD146 の発現について確認するために、成体ラットの大動脈を狭窄（AAC、上行大動脈狭窄）することにより心肥大モデルを作製し[10,11]、心肥大時のギセリン/ CD146 の発現変動について確認した。また、ギセリン/ CD146 タンパク質の発現量について、心臓全体および部位別に確認した。

第 1 章 実験材料および実験方法

実験動物

本実験では、Japan Clea から購入した6週齢の SD 系雄性ラットを用いた。ラットは、岩手医科大学動物研究センターの管理下において、恒温 (23 ± 1 °C)、恒湿 ($55\pm 5\%$)、定時照明 (12 時間明所 7:00~19:00, 12 時間暗所 19:00~7:00) の条件で飼育し、飼料および水は定期的に与えた。本実験は、岩手医科大学動物実験委員会によって作成された実験動物の管理と使用に関するガイドラインの推奨事項に従って実施された。本実験のプロトコールは、岩手医科大学動物実験委員会によって承認されている (許可番号 : 28-005)。

ウシ胎児血清は、Gibco BRL (Thermo Fisher Scientific) から購入し、ウサギ抗血清は、New Zealand White Kitayama Labosから購入したNew Zealand White rabbitを用いて作製した[5,18]。

上行大動脈狭窄 (AAC:Ascending Aortic Constriction)

慢性的な圧力過負荷誘発性心肥大を作製するために、ラットの上行大動脈狭窄 (AAC) を行った。AAC 処置は、Gs ら[10]の方法に基づいて行った。6 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットに、ペントバルビタールナトリウム (30 mg / kg) を腹腔内注射し、麻酔した後、18 ゲージのポリエチレンカテーテルを気管に挿管した。ラットをげっ歯類人工呼吸器 (Harvard Apparatus) で換気し、イソフルラン (2~3%) で麻酔を維持した後、左第 2 肋間腔で胸部を開放した。上行大動脈の周りに 5-0 ナイロン縫合糸を通した後、16 ゲージの針を大動脈と共にナイロン縫合糸で結び、針を取り外し、大動脈を狭窄した。偽手術群 (シヤム) では、結紮を除いて同じ手順を行った。最後に、胸腔内を陰圧にして胸壁を閉じた。AAC 処置 3 日後、および 1、2、4 週間後のラットを二酸化炭素により安楽死させ、心臓を単離した。麻酔の濃度は、心拍数、胸骨、および四肢の動きを監視することによって 2~3%の間で調節した。

また、大動脈狭窄の近位部分と遠位部分の間の大動脈圧を確認するために、圧力変換器が取り付けられたポリエチレンチューブを麻酔下で右頸動脈に挿入した。そのチューブを左心室までさらに挿入して、圧力差を測定した[19]。大動脈圧は、PowerLab システム (ADInstruments) を使用して記録した[20]。

RNA の分離

二酸化炭素によりラットを安楽死させた後、心臓を単離し、TRI 試薬 (Thermo Fisher Scientific) (1 ml / 50-100 mg 組織) を加えてポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジネートに、TRI 試薬 1 ml あたり 0.2 ml のクロロホルムを加え、得られた混合物を室温で 2~15 分間インキュベーションした後、15,000 rpm で 15 分間、4°C で遠心分離した。上部の水層を新しいチューブに移し、イソプロパノールと混合し、15,000 rpm、5 分間、4°C で遠心分離した。次に、Total RNA ペレットを 75% エタノールで洗浄し、15,000 rpm で 15 分間遠心分離した。エタノールを除去し、Total RNA ペレットを TE (Tris-EDTA Buffer) に溶解した。

リアルタイム PCR による mRNA の定量化

Total RNA の濃度は QubitTMRNA HS アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を使用して測定し、5 μ g の total RNA を鋳型に SuperScript®III First-Strand 合成システム (Invitrogen) を用いて cDNA に逆転写させた。定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) 分析は、Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を使用した ABI ステップ 1 リアルタイム PCR システムで行った[21]。GAPDH を対照として、ギセリン/ CD146 遺伝子の発現レベルを測定した。ギセリン/ CD146、 β -MHC (β -myosin heavy chain)、および GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) の増幅に使用するプライマーは、TAKARA から購入した。

ウエスタンブロット法とバンド強度の定量化

AAC 処置ラットから心臓およびその部位別（右房、右室、左房、左室）に単離した。単離された心臓を PBS 中でホモジナイズした。ホモジネートを 14,500 rpm、30 分間 4°C で遠心分離した。ペレットを 2 mM Tris /酢酸緩衝液 (pH 8.0)、0.2 M EDTA、および 10% NP40 で可溶化し、14,500 rpm、4°C で 30 分間遠心分離した。上清をウエスタンブロッティング法を用いて、ギセリン/ CD146 を検出した[5]。タンパク質濃度は、BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を使用して測定した。サンプルを還元条件下で SDS-PAGE (10% アクリルアミド) により分離し、PVDF メンブレン (Bio-Rad) に転写した。Bullet Blocking One (nacalai tesque) でブロットをブロッキングし、Can Get Signal Solution (TOYOBO) 中の抗ギセリン/ CD146 ウサギ血清 (1:1000) [5,18] とともに 4°C で一晩インキュベートした。次に、ブロットを TBS-T バッファー (0.05% Tween 20 を含む TBS) で 4 回洗浄し、Can Get Signal Solution (1 : 2000) でウサギ IgG に対する HRP 結合抗体と一緒に室温で 1~2 時間インキュベートした。その後、ブロットを再び TBS-T バッファーで 4 回洗浄した。ブロットは化学発光 (SuperSignal™ West Femto、Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて検出し、化学発光シグナルは Odyssey Fc Imaging System (LI-COR Biosciences) で撮影し、Odyssey Application ソフトウェア (Image Studio Lite v5.2) を用いて分析した。

統計分析

統計分析は、マン・ホイットニーU 検定を用いた。すべての数値データは平均±標準誤差で示した。95%の信頼度 ($p<0.05$) をもって有意とした。

第 1 章 結果

ギセリン/ CD146 は成体ラットの心臓で発現している。心筋細胞の肥大の過程でギセリン/ CD146 の発現が増加する可能性を検討するため、成体ラットに AAC 処置で心肥大を作製し、定量 PCR を用いてギセリン/ CD146 遺伝子の発現量を測定した。AAC 処置の効果は、大動脈圧 (図 2) と心臓/体重比 (表 1) を測定することで確認した。AAC 処置後のラットでは、狭窄部位の下流で大動脈圧が低下するとともに、心臓/体重比の上昇 (10.5%) が観察された。さらに、心肥大時に発現が上昇する β -MHC 遺伝子の発現量の増加により、心肥大を確認した。 β -MHC 遺伝子の発現レベルは、シャムラットと比較して、AAC 処置後 2 週間で約 2.5 倍、AAC 処置後 4 週間で 3 倍に増加した (図 3A)。ギセリン/ CD146 遺伝子の発現レベルについては、AAC 処置の 1 週間後までに上昇してピークに達し、その後徐々に減少し、4 週間後ではシャムラットと差が認められなかった (図 3B)。

また、ウエスタンブロット分析を行って、AAC 処置によるギセリン/ CD146 タンパク質の発現レベルについて確認した。ギセリン/ CD146 遺伝子の発現レベルは、AAC 処置後に上昇し、1 週間後にピークに達した。そこで、AAC 処置の 1 週間後における心臓のギセリン/ CD146 タンパク質について解析した。その結果、シャムラットと比較して AAC 処置 1 週間後の心臓ではギセリン/ CD146 タンパク質の増加が確認された (図 4A、B)。

さらに、心臓の各部位におけるギセリン/ CD146 タンパク質の発現を確認したところ、どの部位においても有意ではないものの発現の増加傾向が確認された

(图 4C、D)。

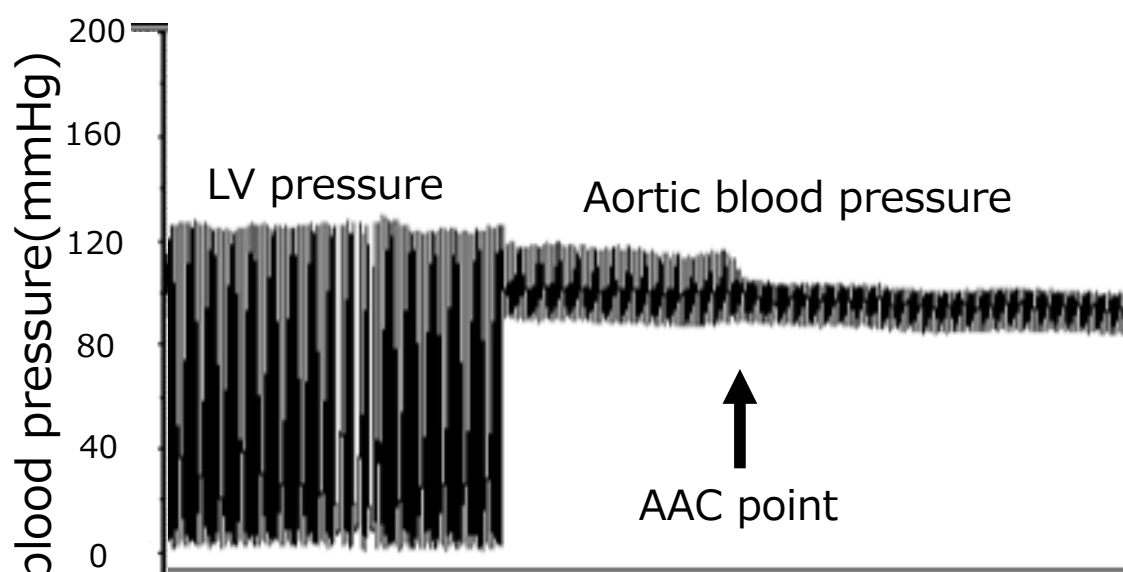


図2 左心室圧と大動脈圧

AAC : 上行大動脈狭窄

	heart/body weight(%)
AAC (-)	0.323 ± 0.028
AAC (+)	0.357 ± 0.027

表1 体重量あたりの心臓重量

AAC (-) : AAC 処置なし、AAC (+) : AAC 処置あり

AAC (-) は6匹、AAC (+) は8匹の平均値±標準誤差。

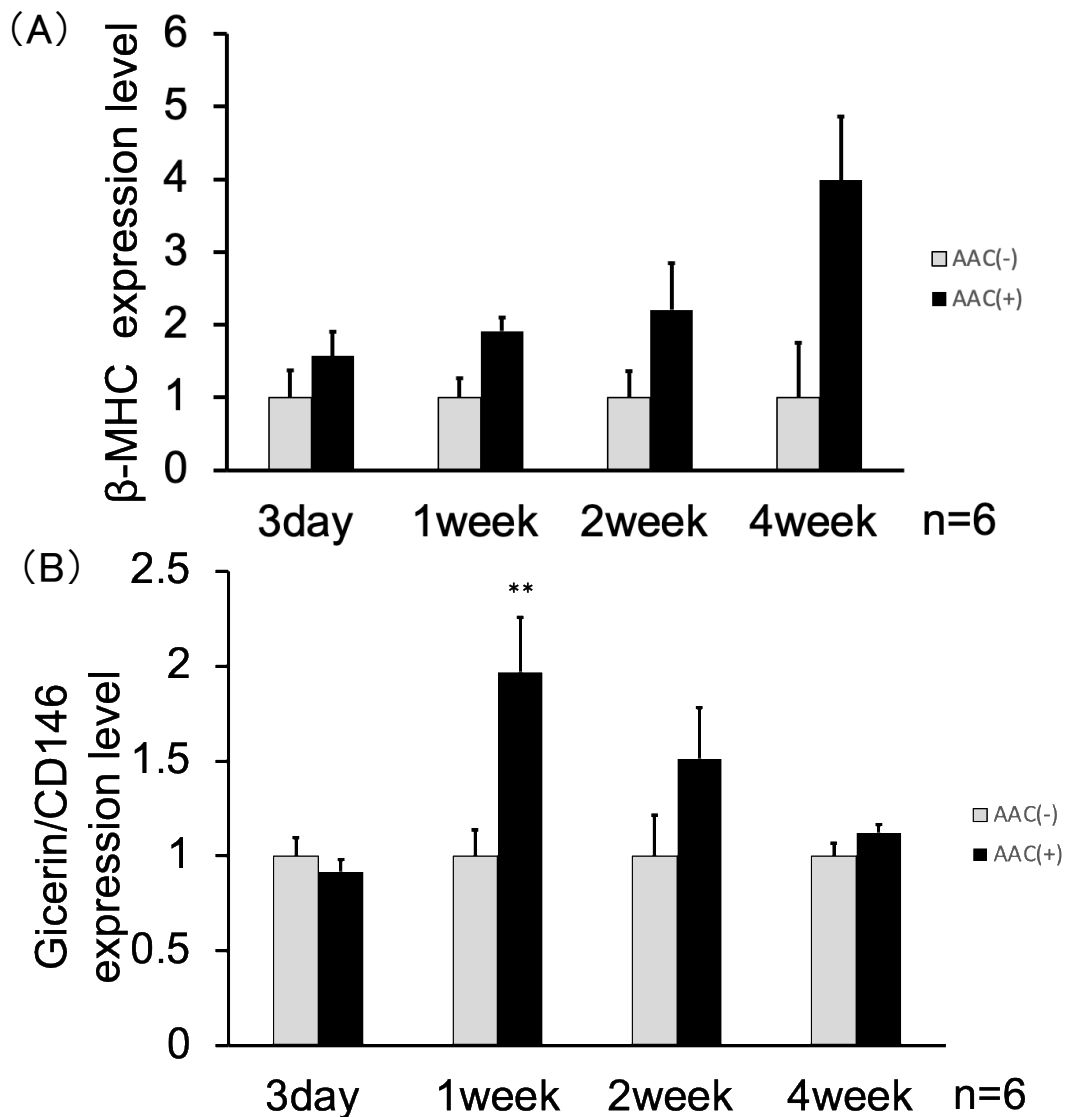


図3 AAC 処置後のギセリン/ CD146 および β -MHC 遺伝子の発現レベルの変化

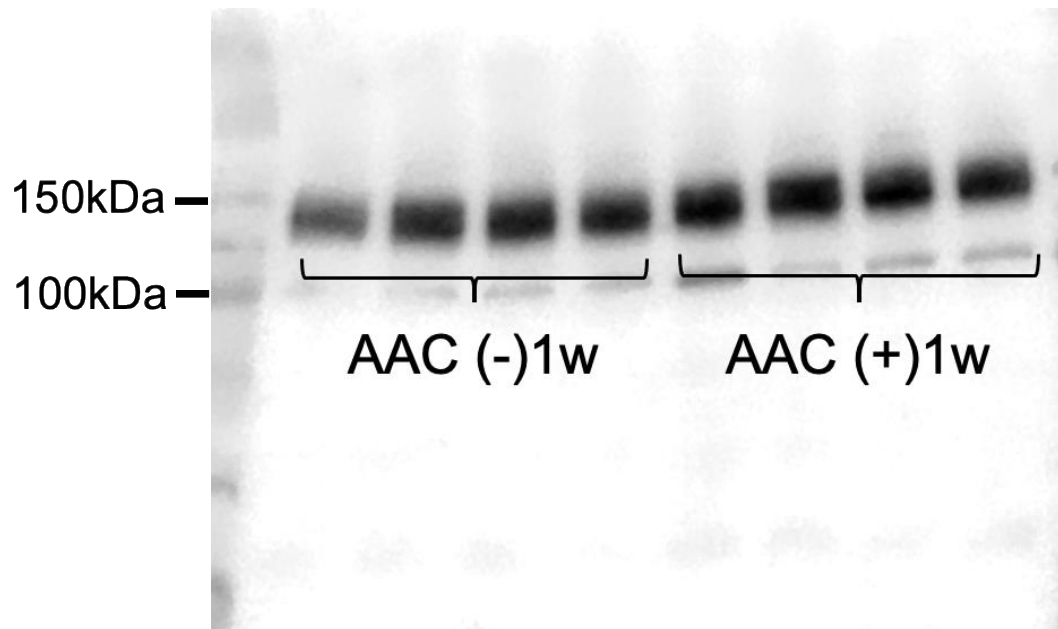
(A) AAC 処置後の β -MHC 遺伝子の発現レベル

(B) AAC 処置後のギセリン/ CD146 遺伝子の発現レベル

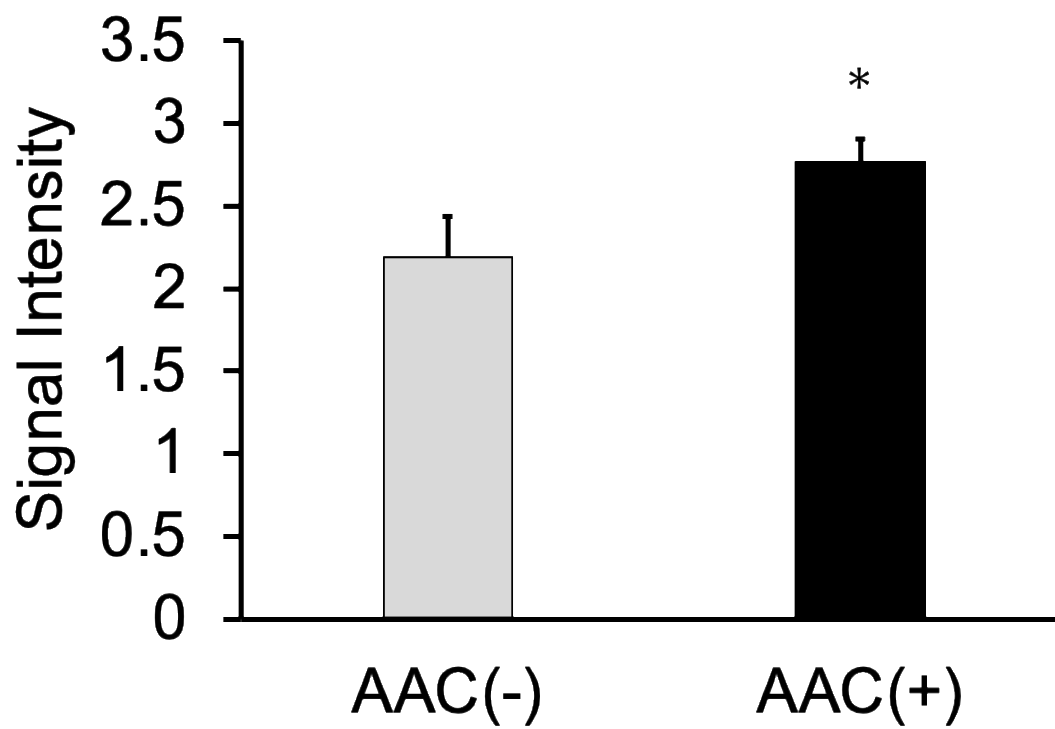
成熟ラットを AAC 処置し、処置の 3 日後、1 週間後、2 週間後、および 4 週間後に心臓を単離した。6 匹のラットから心臓を単離し、単離した心臓から TotalRNA を抽出し、 β -MHC およびギセリン/ CD146 遺伝子の発現レベルを確認した。発現レベルは、各週のシャム処置をしたラットと比較した。

各データは平均±標準誤差で示した。 ** $P < 0.01$

(A)



(B)



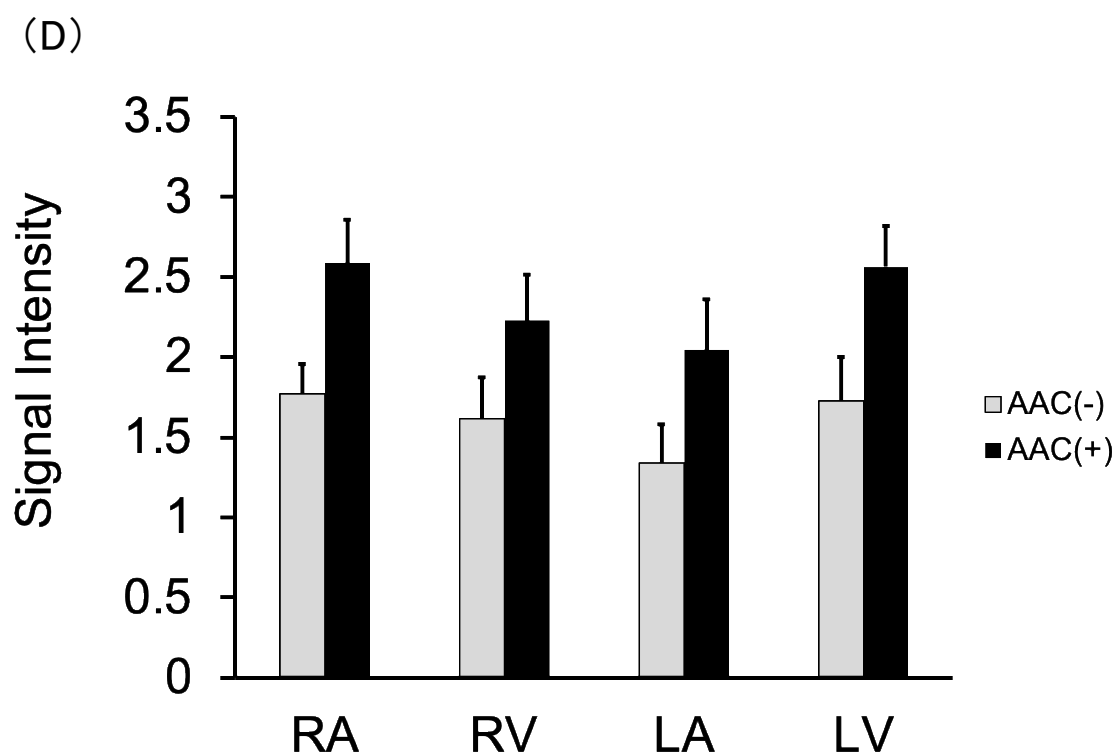
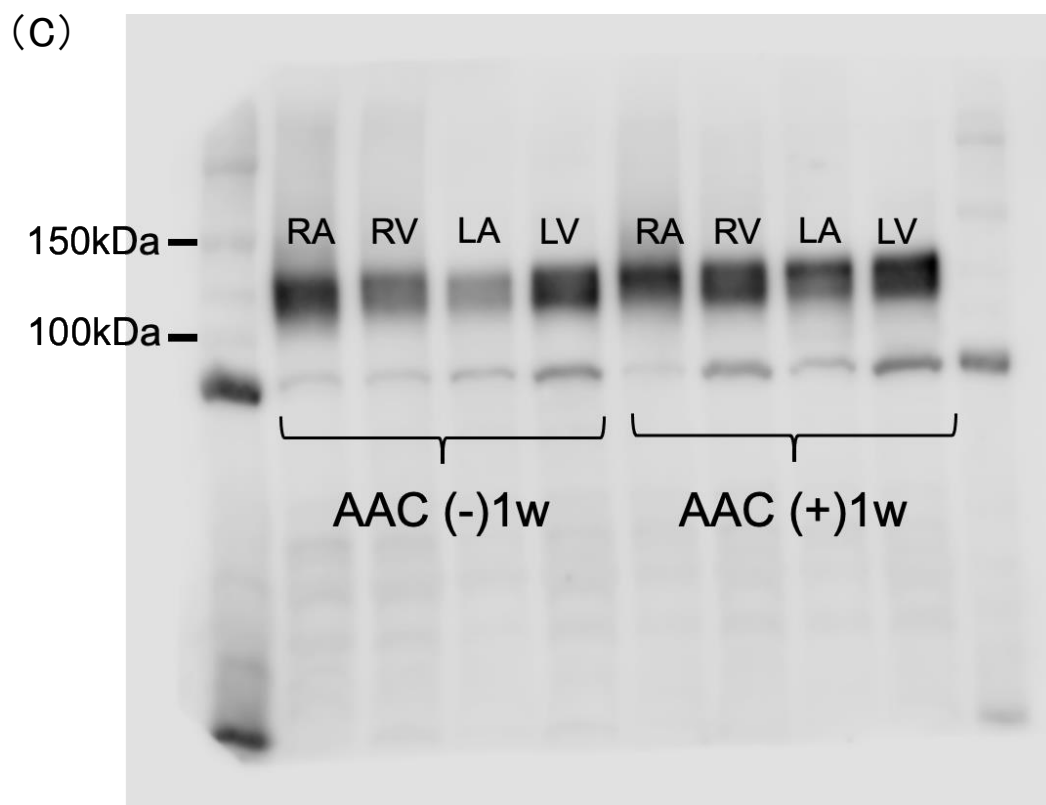


図4 心臓全体および各部位の AAC 処置 1 週間後のギセリン/ CD146 ウェスタンブロット分析

すべてのレーンに $20\mu\text{g}$ の総タンパク質をロードした。

(A) AAC 処置 1 週間後の心臓全体におけるギセリン/ CD146 タンパク質の発現

AAC 処置をした 4 匹のラットの心臓の結果を示した。

(B) 心臓の AAC 処置 1 週間後のギセリン/ CD146 タンパク質発現レベルの比較

4 回のウエスタンブロット分析の平均を示した。縦軸はウエスタンブロットのシグナル強度を示している。

AAC (-) : AAC 処置なし、AAC (+) : AAC 処置あり。

各データは平均±標準誤差で示した。 * $P < 0.05$

(C) AAC 処置 1 週間後の心臓の各部位のギセリン/ CD146 タンパク質の発現
RA : 右心房、RV : 右心室、LA : 左心房、LV : 左心室

(D) AAC 処置 1 週間後の心臓の各部位のギセリン/ CD146 タンパク質発現レベルの比較

RA : 右心房、RV : 右心室、LA : 左心房、LV : 左心室

4 回のウエスタンブロット分析の平均で示した。縦軸はウエスタンブロットのシグナル強度を示している。

AAC (-) : AAC 処置なし、AAC (+) : AAC 処置あり。

各データは平均±標準誤差で示した。

第 1 章 考察

心肥大モデルを作製するために、ラットの大動脈起始部の狭窄 (AAC) を行った。ギセリン/ CD146 遺伝子の発現レベルは AAC 処置後上昇し、1 週間後にピークに達し、その後徐々に低下し、4 週間後にはシャムラットとの差は認められなかった(図 3B)。この結果から、ギセリン/ CD146 の発現が AAC 処置によって誘導されることが明らかとなった。AAC 処置 1 週間後の心臓におけるギセリン/ CD146 のタンパク質レベルについて、ウエスタンブロット分析で解析した結果、ギセリン/ CD146 がタンパク質レベルにおいても増加していた (図 4B)。さらに、心臓の各部位におけるウエスタンブロット分析の結果は、圧力負荷により心臓のすべての部位でギセリン/ CD146 が増加する傾向を示している(図 4D)。

心肥大のマーカーである β -MHC の発現は、AAC 処置後 4 週間で増加した(図 3A) [22]。一方で、ギセリン/ CD146 の発現増加のピークは、AAC 処置後 1 週間目であり、 β -MHC mRNA の発現増加が始まる前であった。この結果は、ギセリン/ CD146 発現が心筋肥大の初期段階に関与していることを示唆している。この実験において、AAC 処置後のラットと AAC 処置なしの心臓と体重量を比較したところ、重量比の差は約 10.5%であった。この心体重比のわずかな違いは、大動脈の狭窄の程度が弱いためと考えられる。しかし、本研究では、AAC 処置により心肥大のマーカーである β -MHC 遺伝子の発現の上昇が観察されたことや[22]、大動脈圧の測定により狭窄部より下流の血圧低下を観察することができたことから、今回の AAC 処置が有効に作用して、心肥大モデルが作製され

ており、肥大心ではギセリン/ CD146 遺伝子発現およびタンパク質レベルでの上昇が起こることが明らかとなった。

第2章 緒言

前章の実験においては、ラットの大動脈起始部の狭窄処置 (AAC) によりギセリン/ CD146 の発現レベルが上昇し、そのレベルは 1 週間後にピークに達し、その後 4 週目で対照群レベルまで低下した。一方、心肥大のマーカである β -MHC の発現は、ギセリン/ CD146 の発現がピークに達した後の AAC 処置後数週間で増加し続けることが報告されている [22]。このことから、ギセリン/ CD146 が心筋肥大の初期段階に関与することが示唆された。

哺乳類の心筋細胞は胎児期にのみ増殖し、出生後はその細胞容積を増大させるだけである [9]。また、慢性的な圧負荷などの状況で起こる病的な心肥大は、心筋細胞の分裂や増殖によるものではなく、個々の細胞が肥大することにより圧負荷に適応する。以上のことより、ギセリン/ CD146 は心筋細胞の容積増大に関与している可能性がある。

そこで、生理的に心筋細胞が肥大していく出生後のラットの心臓におけるギセリン/ CD146 の発現および、出生後に発現が入れ替わることが確認されている α -MHC および β -MHC の発現について検討を行った。

第2章 実験材料および実験方法

実験動物

本実験では、Japan Clea から購入した SD 系妊娠雌性ラットおよび、新生児ラットを用いた。ラットは第 1 章と同様の管理を行った。また、本実験は第 1 章と同様のプロトコールにより実施した。（岩手医科大学動物実験委員会許可番号：01-017）。

RNA の分離

新生児ラットを CO₂ による麻酔下で断頭後に心臓を単離し、第 1 章と同様の操作を実施した。

リアルタイム PCR による mRNA の定量化

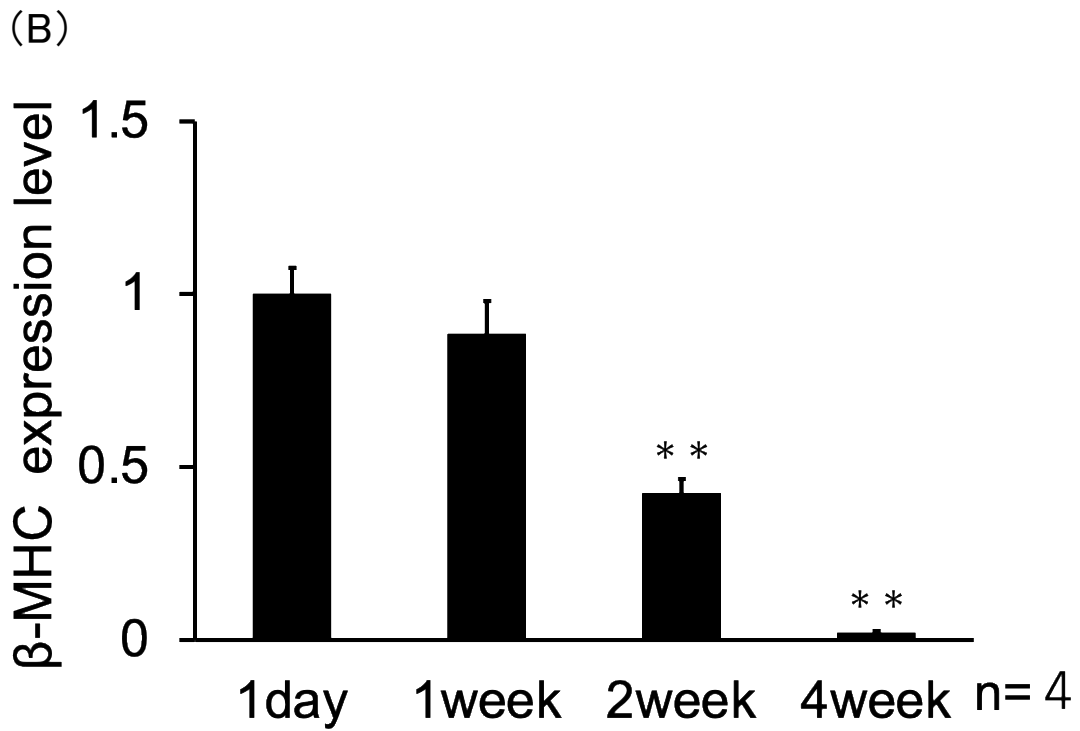
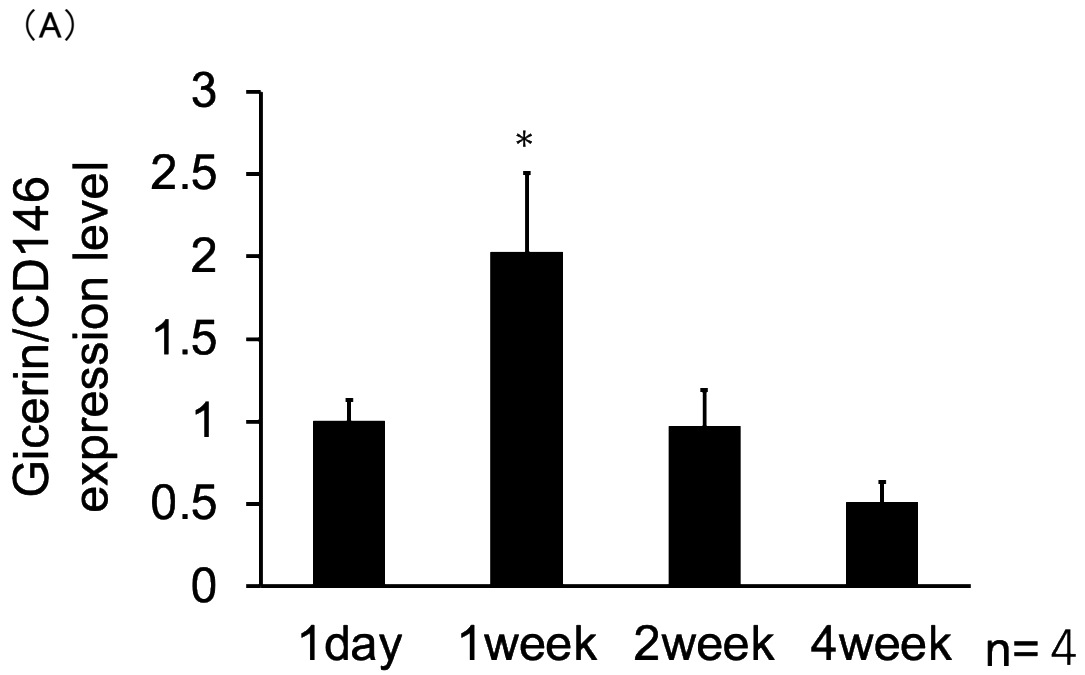
第 1 章と同様の操作を行った。ギセリン/ CD146、 β -MHC、 α -MHC (α -myosin heavy chain) および GAPDH の増幅に使用されるプライマーは、TAKARA から購入した。

統計分析

統計分析は、第 1 章と同様の方法とした。

第2章 結果

ギセリン/CD146 遺伝子の発現レベルは、出生後に上昇し、その後生後1週目でピークに達し、生後1日目の2倍量になった。その後生後4週目では、生後1日目の半分に低下した (図 5A)。これに対して、 β -MHC 遺伝子の発現レベルは生後1日目から生後4週目までに経時的に低下した。一方、 α -MHC 遺伝子の発現レベルは生後1週目から顕著に上昇した (図 5B、C)。以上の結果から、これまでの報告通り、新生児ラットの心臓においては、 β -MHC 遺伝子の発現レベルが低下するとともに α -MHC 遺伝子の発現レベルが上昇することが確認された。



(C)

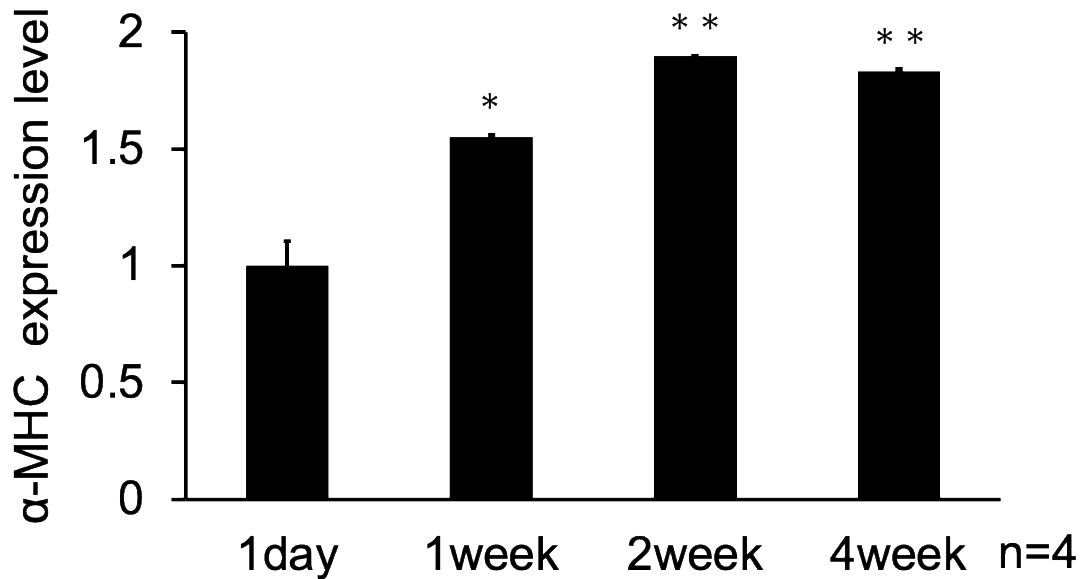


図5 新生児ラットにおける β -MHC、 α -MHC およびギセリン/ CD146 遺伝子の発現

(A) ギセリン/ CD146 遺伝子の発現レベル

(B) β -MHC 遺伝子の発現レベル

(C) α -MHC 遺伝子の発現レベル

生後1日、1週間、2週間、4週間に、ラット4匹から心臓を単離した。単離した心臓からRNAを抽出し、 β -MHC、 α -MHC、ギセリン/ CD146 遺伝子の発現を確認した。遺伝子の発現レベルは、生後1日目の発現量と比較した。

各データは、平均±標準誤差で示した。 ** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$

第2章 考察

新生児期の生理的な心臓の容積増大におけるギセリン/CD146の発現を調べた結果、生後1週間でピークに達し、その後低下した。生後4週目の発現レベルは生後1日目の発現レベルよりも低かった。一方、ラットの心室でのMHCの発現は、生後約5日で β -MHCから α -MHCに変わることが報告されている[23,24,25]。本研究では、生後約1週間で β -MHC遺伝子の発現量が低下するに伴い、 α -MHC遺伝子の発現量が上昇することから、これまでの報告と同様にMHCアイソフォームの遺伝子発現の変化が確認された。

ラット新生児の心臓では、ギセリン/CD146の発現は β -MHCの発現が低下してくる生後1週目でピークに達した。この時期は α -MHCの発現が上昇する前であり、MHCアイソフォームの発現が変化する短い期間に発現が変化している。これに対して、病的な心肥大においては、ギセリン/CD146の増加は β -MHC遺伝子の発現が増加する前であった。以上のことから、ギセリン/CD146の増加はMHCアイソフォームの発現の変化とは関連性がないと考えられた。

第3章 緒言

平らは、ギセリン/CD146が細胞の分化および腫瘍形成時の細胞増殖に関与していることを報告している[8]。しかし、ギセリン/CD146発現の増加が確認されている心肥大においては、心筋細胞は分裂せずに容積が増大することが報告されている[26]。また、心肥大と同様に、心筋細胞が分裂せずにその容積を増大させるラット新生児期において、生後早期にギセリン/CD146の発現が増加することから、ギセリン/CD146が心臓の容積増大に関与していることが考えられた。そこで、心肥大におけるギセリン/CD146の役割を *in vitro* において確認するために、心筋細胞由来株 H9c2 を用いて実験を行った。心筋細胞の容積増大は機械的ストレスに対する細胞の応答と考えられているため、H9c2 に伸展刺激を加えることで *in vitro* での心肥大のモデルを作製した[12,13]。

神経細胞では、NGF 刺激によりギセリン/CD146の発現が増強される[27]。また、ギセリン/CD146遺伝子のプロモーター領域には CRE 配列があり、ギセリン/CD146の発現にはMAPキナーゼ経路が関与していることが報告されている[28]。そこで、H9c2細胞にMAPキナーゼ経路酵素阻害剤を添加した上で伸展刺激を加えることにより、心筋細胞におけるギセリン/CD146発現のメカニズムの解明を行った。

第3章 実験材料および実験方法

細胞培養

ラット胚性心筋由来の H9c2 細胞 (ATCC) を、10%ウシ胎児血清と抗生物質を添加した Dulbecco's Modified Eagle 培地 (4.5 g / L グルコース) で、37°C、5% CO₂ の条件で培養した[29,30]。

機械的伸展刺激

H9c2 細胞は、コラーゲンでコーティングされた伸縮性シリコンチャンバー上で 2 日間培養した。培地を交換した後、細胞に 20%の伸長率および 60 往復/分の刺激頻度で 24 時間伸展刺激を加えた[31]。SB203580 (p38 MAP キナーゼ阻害剤) [15]および、PD98059 (MEK1 / 2 阻害剤) [16]は、伸展刺激の前に 20 μ M の濃度で添加した[32]。

RNA の分離

第 1 章と同様の操作により、回収した培養細胞から RNA を抽出した。

リアルタイム PCR による mRNA の定量化

第 1 章と同様の操作を行った。ギセリン / CD146、SB203580、PD98059 および GAPDH の増幅に使用されるプライマーは、TAKARA から購入した。

ウェスタンブロット法とバンド強度の定量化

回収した細胞を PBS でホモジナイズし、ホモジネートを 14,500 rpm、30 分間、4℃で遠心分離後、第 1 章と同様の操作を実施した。

統計分析

統計分析は、第 1 章と同様の方法とした。

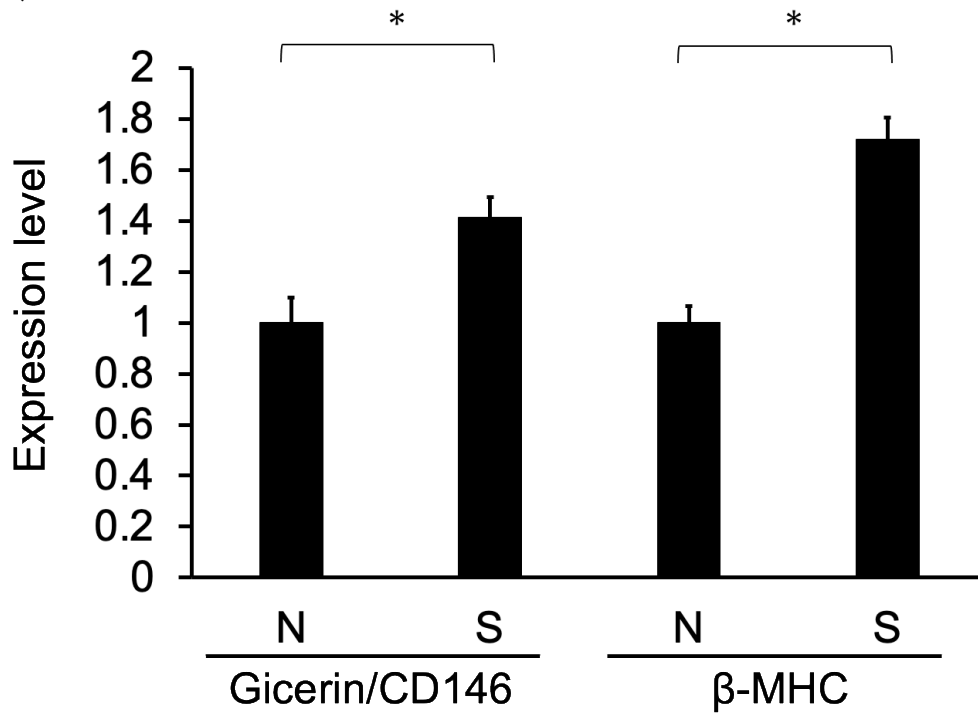
第3章 結果

心筋細胞の機械的刺激肥大モデルにおけるギセリン/ CD146 の発現の変化についても検討した。心筋細胞肥大の *in vitro* モデルとして、ラット心筋細胞由来株の H9c2 細胞に伸展刺激を加えることで心肥大モデルを作製した。その結果、伸展刺激を加えた細胞では、伸展刺激なしの細胞に比べてギセリン/ CD146 および β -MHC 遺伝子の発現量が増加していた (図 6A)。

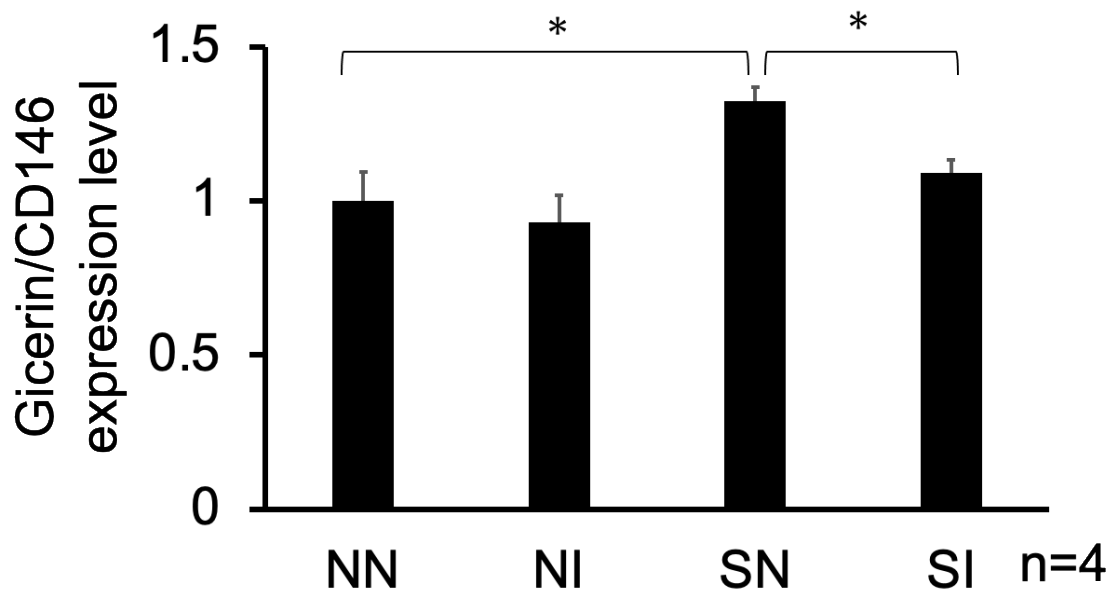
これまでの研究で cAMP 応答配列 (CRE) が PC12 細胞でのギセリン/ CD146 の発現に関与していること [1]、CRE 依存性遺伝子発現の調節に MAP キナーゼ経路が関与していることが報告されているため、MAP キナーゼ経路の阻害剤添加後に伸展刺激を行った [33]。伸展刺激によるギセリン/ CD146 遺伝子の発現増加は、p38 MAP キナーゼ阻害剤である SB203580 の添加により抑制されることがわかった (図 6B)。一方、MEK1/2 の阻害剤である PD98059 の添加では伸展刺激によるギセリン/ CD146 遺伝子の発現増加については、わずかに抑制傾向は見られたものの、有意ではなかった (図 6C)。

伸展刺激時のギセリン/ CD146 のタンパク質量については、伸展刺激を加えた細胞と伸展刺激を加えなかった細胞で差は見られなかった (図 6D、6E)

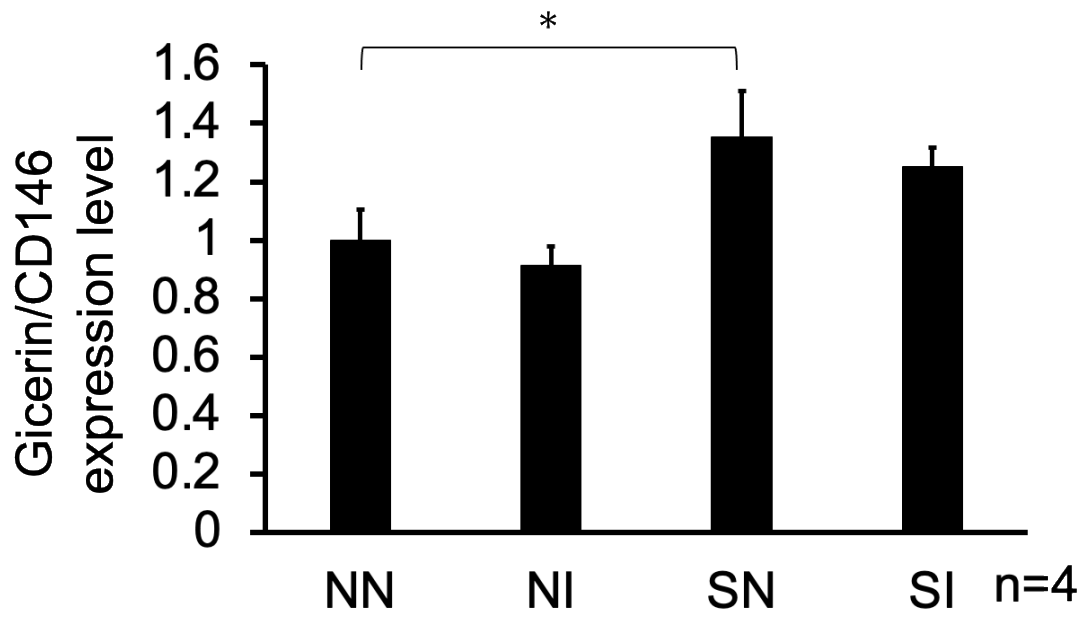
(A)



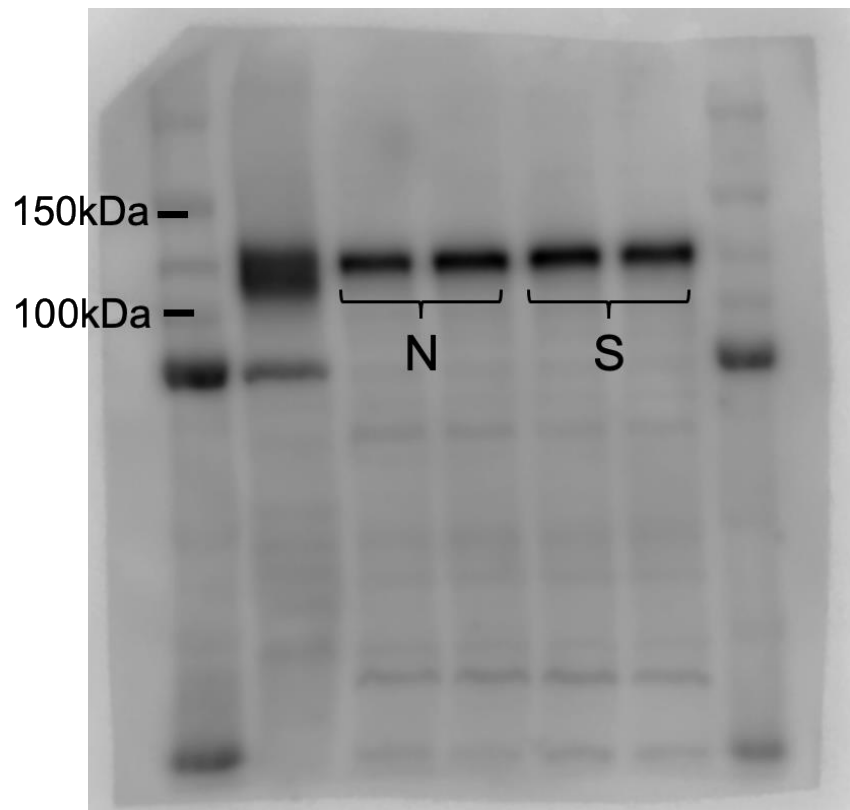
(B)



(C)



(D)



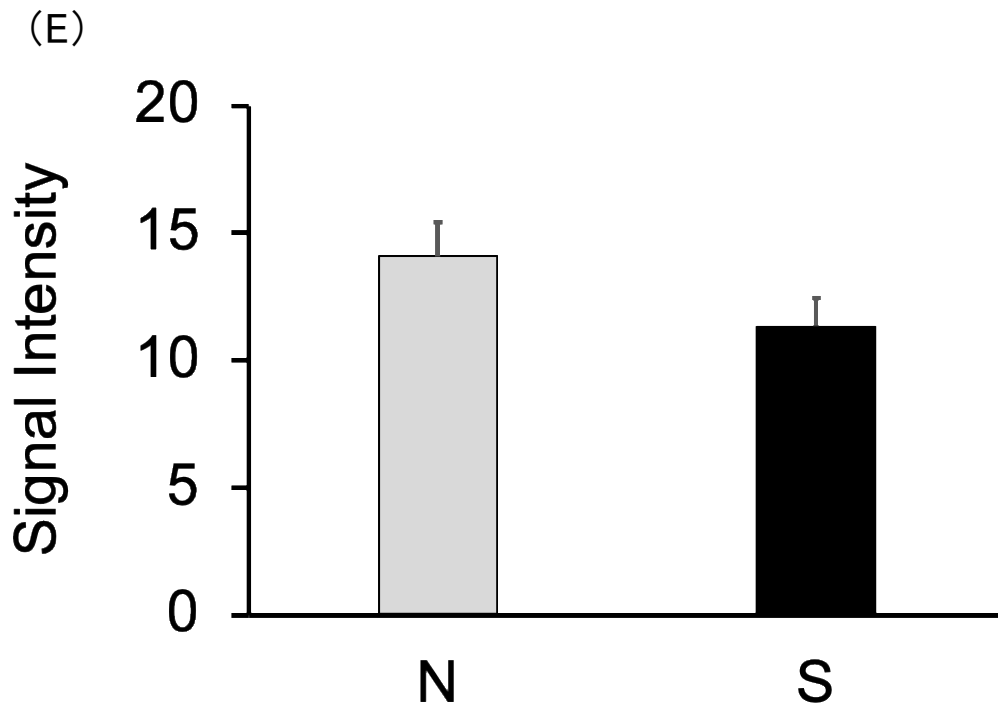


図6 H9c2細胞における伸展刺激時のギセリン/CD146遺伝子の発現レベル変化とウエスタンブロット分析

(A) H9c2細胞における伸展刺激時のギセリン/CD146遺伝子の発現レベル
 伸展刺激を加えていない場合(N)のギセリン/CD146遺伝子の発現レベルを1
 とし、伸展刺激を加えた場合(S)の発現レベルを示している。

(B) SB203580添加における伸展刺激時のギセリン/CD146遺伝子の発現レ
 ベル

NN: 展刺激なし、阻害剤なし、NI: 伸展刺激なし、阻害剤あり、

SN: 伸展刺激あり、阻害剤なし、SI: 伸展刺激あり、阻害剤あり

各データは平均±標準誤差で示している。 * $P < 0.05$

(C) PD98059 添加における伸展刺激時のギセリン/ CD146 遺伝子の発現レベル

伸展刺激および MAP キナーゼ経路阻害剤を加えていない場合のギセリン/ CD146 遺伝子の発現レベルを 1 として相対的な発現レベルを示している。

それぞれが 4 つの独立した実験の平均を表しており、各実験は 4 つのチャンバールで行われた。有意差は NN に対する比率である。

各データは平均±標準誤差で示している。 * $P < 0.05$

(D) H9c2 細胞における伸展刺激時のギセリン/ CD146 のウエスタンブロット分析

(E) H9c2 細胞における伸展刺激時のギセリン/ CD146 のタンパク質発現レベルの比較

すべてのレーンに 20 μ g の総タンパク質をロードした。

2 回のウエスタンブロット分析の結果の平均を示した。縦軸はウエスタンブロットのシグナル強度を示している。

N : 伸展刺激なし、S : 伸展刺激あり

各データは平均±標準誤差で示した。 * $P < 0.05$

第3章 考察

心肥大におけるギセリン/CD146の役割を確認するために、心筋由来の培養細胞であるH9c2細胞を用いた実験を行った。H9c2細胞に機械的ストレスとして伸展刺激を加えて、これに応答する細胞メカニズムの解析を行った。

最初に、H9c2細胞に加えた伸展刺激がギセリン/CD146の発現を増加させることを確認した。神経細胞においては、ギセリン/CD146の発現がNGF刺激によって増強されること、ギセリン/CD146遺伝子のプロモーター領域にはCRE配列が存在しており、NGF刺激によるギセリン/CD146の発現にはMAPキナーゼ経路が関与していることが報告されているので[27,33]、ギセリン/CD146遺伝子の発現におけるMAPキナーゼ経路酵素阻害剤の効果を調べた。今回の実験結果では、伸展刺激によって増加したギセリン/CD146遺伝子の発現は、MAPキナーゼ経路のp38 MAPキナーゼ阻害剤であるSB203580 [15]の添加によって抑制された。一方、MAPキナーゼ経路におけるMEK1/2の阻害剤であるPD98059[16]の添加では、抑制傾向は見られたものの、有意な差は認められなかった。これらの結果は、ギセリン/CD146の発現がp38 MAPキナーゼ経路を介して調節されていることを示唆している。

H9c2細胞については、ウエスタンブロット分析によりタンパク質レベルでのギセリン/CD146発現の変化を検討したが、変化は見られなかった。その原因として、伸展刺激が24時間のみであり、タンパク質の翻訳と翻訳されたタンパク質の膜局在化には、さらに時間がかかることが考えられた。

総合考察および結論

ギセリン/CD146 は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子である[2]。神経細胞においてギセリン/CD146 の発現は発達の初期段階でのみ観察され、ギセリン/CD146 は神経突起の伸長と神経細胞の移動を制御することにより、神経系の形成に関与していることが明らかになっている[17]。また、ギセリン/CD146 は発達中の神経系に加えて、肺、心臓、血管内皮などの組織にも豊富に発現しており[3,34,35]、平らはさらに、ギセリン/CD146 の発現が腫瘍組織でも増加し、腫瘍細胞の成長と転移を促進することを報告している[7]。

このように、これまでの研究ではギセリン/CD146 の発現が神経系の発達に関与しているだけでなく、腫瘍などの細胞の増殖にも関与していることが明らかとなっている[3,6,36]。しかしながら、心筋肥大のような細胞の分化や分裂を伴わない細胞の容積増大においては、ギセリン/CD146 の発現とその役割については不明であった。本研究では、肥大した成体ラットの心臓および新生児ラットの心臓におけるギセリン/CD146 の発現を確認した。大動脈起始部の狭窄(AAC)を行ったラットの心臓では、ギセリン/CD146 遺伝子の発現レベルはAAC処置により上昇し、1週間でピークに達し、その後初期レベルに低下した。一方、心肥大のマーカーである β -MHCの発現は、AAC処置後数週間において増加し続けた[23]。ギセリン/CD146 遺伝子の発現のピークは、 β -MHC 遺伝子の増加が始まる前であり、このことはギセリン/CD146 が心筋肥大の初期段階に関与していることを示唆している。

ラット新生児の心臓では、ギセリン/CD146 の発現は β -MHC の発現が低下し

てくる生後1週目でピークに達した。この時期は α -MHCの発現が上昇する前であった。これに対して、病的な心肥大においては、ギセリン/CD146の発現増加は β -MHC遺伝子発現の増加前であった。以上のことから、ギセリン/CD146の増加はMHCアイソフォームの発現変化とは関連性がないと考えられた。

また、伸展刺激をしたH9c2細胞にMAPキナーゼ経路酵素の阻害剤を添加したときのギセリン/CD146遺伝子の発現について解析を行った結果、伸展刺激によって増加したギセリン/CD146の発現は、p38 MAPキナーゼ阻害剤であるSB203580の添加によって抑制された。

これらの結果より、ギセリン/CD146が心筋肥大の初期段階に関与しており、その発現がp38 MAPキナーゼ経路を介して調節されていることが示唆された(図7)。また、MEK1/2の阻害剤であるPD98059を添加した際、ギセリン/CD146の発現は、統計的に有意な差はなかったが、抑制傾向が見られたことからMEK1/2の経路も心筋肥大に何らかの関与をしている可能性が考えられた。

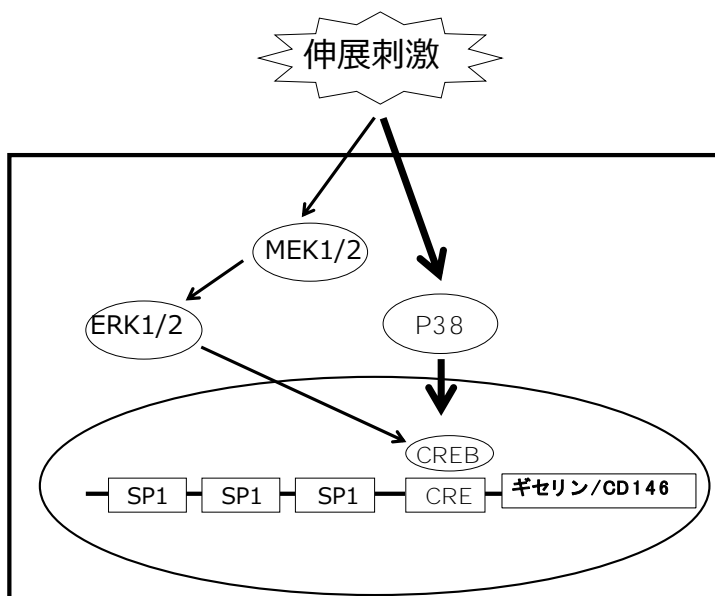


図7 伸展刺激により予測されるギセリン/CD146の発現経路

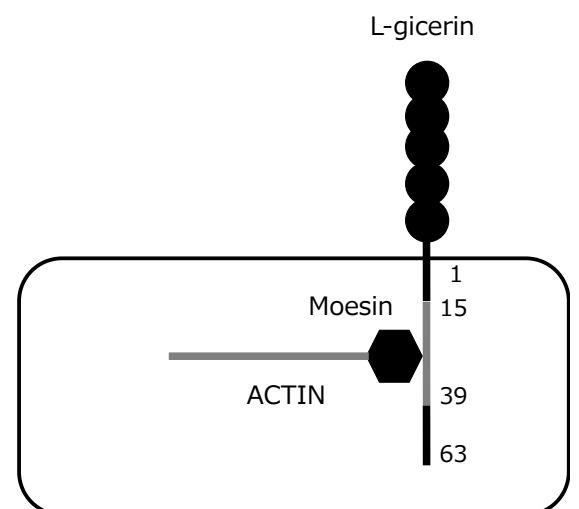


図8 微小突起におけるアクチン細胞骨格とギセリン/CD146

図 8 に示すようにギセリン/CD146 は、細胞表面の微小突起の伸展に関与しているとの報告がある [36]。また、微小突起はアクチン細胞骨格による支持を受けており、微小突起の伸展には、L-ギセリンの細胞内ドメインの 16 から 39 番目のアミノ酸配列と融合タンパク質であるモエシンの結合、それに続くアクチン細胞骨格との相互作用が必要であることが報告されている [36]。

図 9 に示す様に、心臓の肥大時には、 α -MHC から β -MHC へと MHC アイソフォームを変換することにより、心筋収縮のエネルギー効率を上げることで負荷に対応する経路と、心筋細胞そのものを肥大して負荷に対応する経路が存在する [37]。今回の研究結果から、ギセリン/CD146 の発現は心肥大時における MHC アイソフォームの変換には関与していない可能性が考えられた。また、微小突起の伸展におけるギセリン/CD146 とアクチン細胞骨格との相互作用の報告から、心筋細胞においてもギセリン/CD146 とアクチン細胞骨格の相互作用が必要であり、肥大した心筋細胞において増加したアクチン細胞骨格に対応してギセリン/CD146 の発現が増大している可能性がある (図 9)。

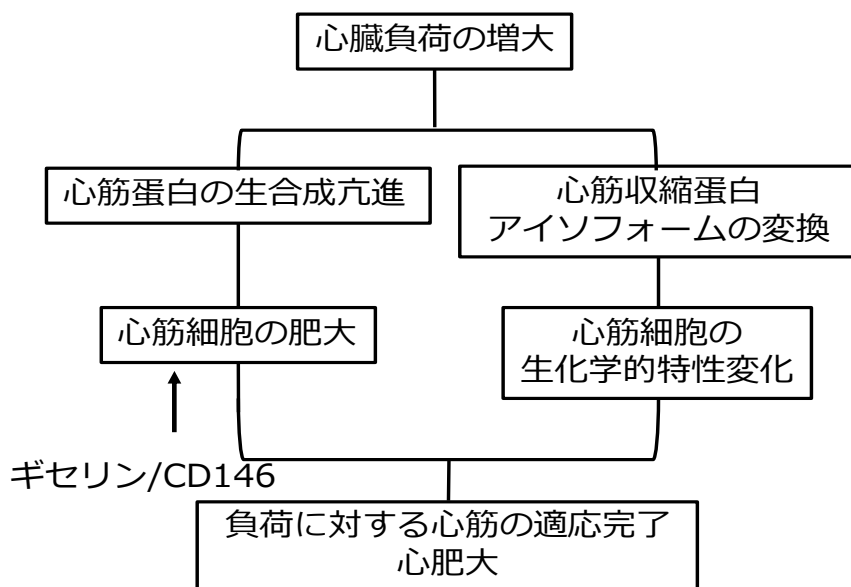


図 9 心臓負荷に対する適応機序

今後の研究では、心肥大時のギセリン/CD146 タンパク質の発現を免疫組織化学により解析することで、心肥大時のギセリン/CD146 の機能についての理解をさらに深めていくことを考えている。

参考文献

1. 平 英一, 細胞接着因子ギセリン/CD146 の神経系における機能, 岩手医誌 57 卷 2 号 109-104 頁
2. Kohama K, Tsukamoto Y, Furuya M, et al (2005) Molecular cloning and analysis of the mouse gicerin gene. *Neurochem. Int.* 46:465–470
3. Taira E, Takaha N, Taniura H, et al (1994) Molecular cloning and functional expression of gicerin, a novel cell adhesion molecule that binds to neurite outgrowth factor. *Neuron* 12:861–872.
4. Tsukamoto Y, Taira E, Kotani T, et al (1996) Involvement of gicerin, a cell adhesion molecule, in tracheal development and regeneration. *Cell Growth Differ* 7:1761–1767
5. Taira E, Kohama K, Tsukamoto Y, et al (2004) Characterization of Gicerin/MUC18/CD146 in the rat nervous system. *J Cell Physiol.* 198:377-87
6. Takaha N, Taira E, Taniura H, et al (1995) Expression of gicerin in development, oncogenesis and regeneration of the chick kidney. *Differentiation* 58:313–320
7. Tsukamoto Y, Matsumoto T, Kotani T, et al (1997) The expression of gicerin, a cell adhesion molecule, in regenerating process of collecting ducts and ureters of the chicken kidney following infection with a nephrotropic strain of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 26:245–255.
8. Tsukamoto Y, Matsumoto T, Taira E, et al (1998) Adhesive activity of gicerin, a cell-adhesion molecule, in kidneys and nephroblastomas of chickens. *Cell Tissue Res* 292:137–142.
9. Bersell K, Arab S, Haring B, Kühn B (2009) Neuregulin1/ErbB4 Signaling Induces Cardiomyocyte Proliferation and Repair of Heart Injury. *Cell* 138:257–270.
10. Gs AK, Raj B, Santhosh KS et al (2014) Ascending aortic constriction in rats for creation of pressure overload cardiac hypertrophy model. *J Vis Exp* e50983.
11. Matsushita N, Ishida N, Ibi M, et al (2018) Chronic pressure overload induces cardiac hypertrophy and fibrosis via increases in SGLT1 and IL-18 gene expression in mice. *Int Heart J* 59:1123–1133.
12. Komuro I, Katoh Y, Kaida T, et al (1991) Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation. *J Biol Chem* 266:1265–1268

13. Shyu KG, Wang BW, Wu GJ, et al (2013) Mechanical stretch via transforming growth factor- β 1 activates microRNA208a to regulate endoglin expression in cultured rat cardiac myoblasts. *Eur J Heart Fail* 15:36–45.
14. Yamazaki T, Tobe K, Hoh E, et al (1993) Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 268:12069–12076
15. Dokladda K, Green KA, Pan DA, Hardie DG (2005) PD98059 and U0126 activate AMP-activated protein kinase by increasing the cellular AMP:ATP ratio and not via inhibition of the MAP kinase pathway. *FEBS Lett* 579:236–240.
16. Sanit J, Prompant E, Adulyariththikul P, et al (2019) Combination of metformin and p38 MAPK inhibitor, SB203580, reduced myocardial ischemia/reperfusion injury in non- obese type 2 diabetic Goto- Kakizaki rats. *Exp Ther Med* 1701–1714.
17. Issei K, Toshikazu K, Yoshikazu S, et al (1990) Stretching CARDiac Myocytes Stimulate Protooncogene Expression* *J Biol Chem* 265:3595-3598
18. Taira E, Kohama K, Tsukamoto Y, et al (2005) Glycerin/CD146 is involved in neurite extension of NGF-treated PC12 cells. *J Cell Physiol* 204:632–637.
19. Yoshioka K, Otani H, Shimazu T, et al (2015) Sepiapterin prevents left ventricular hypertrophy and dilatory remodeling induced by pressure overload in rats. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 309:H1782–H1791.
20. Mukai K, Kuda Y, Shibamoto T, et al (2018) Renal response to anaphylaxis in anesthetized rats and isolated perfused rat kidneys: roles of nitric oxide. *J Physiol Sci* 68:689–697.
21. Sawa Y, Saito M, Ishida N, et al (2020) Pretreatment with KGA-2727, a selective SGLT1 inhibitor, is protective against myocardial infarction-induced ventricular remodeling and heart failure in mice. *J Pharmacol Sci* 142:16–25.
22. Kurabayashi M, Tsuchimochi H, Komuro I, et al (1988) Molecular cloning and characterization of human cardiac α - and β -form myosin heavy chain complementary DNA clones. Regulation of expression during development and pressure overload in human atrium. *J Clin Invest* 82:524–531.
23. Imamura SI, Matsuoka R, Hiratsuka E, et al (1991) Adaptational changes of MHC gene expression and isozyme transition in cardiac overloading. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 260:

24. Mercadier JJ, Lompre AM, Wisnewsky C (1981) Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ Res* 49:525–532.
25. Hang CT, Yang J, Han P, et al (2010) Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature* 466:62–67
26. Nakamura M, Sadoshima J (2018) Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol* 15:387–407.
27. Cho KO, Skarnes WC, Minsk B, et al (1989) Nerve growth factor regulates gene expression by several distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 9:135–143.
28. Chao JR, Ni YG, Bolaños CA, et al (2002) Characterization of the mouse adenylyl cyclase type VIII gene promoter: Regulation by cAMP and CREB. *Eur. J. Neurosci.* 16:1284–129
29. Witek P, Korga A, Burdan F, et al (2016) The effect of a number of H9C2 rat cardiomyocytes passage on repeatability of cytotoxicity study results. *Cytotechnology* 68:2407–2415.
30. Hescheler J, Meyer R, Plant S, et al (1991) Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ Res* 69:1476–1486.
31. Watkins SJ, Borthwick GM, Arthur HM (2011) The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* 47:125–131.
32. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, et al (1995) Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 96:438–446.
33. Della Fazia MA, Servillo G, Sassone-Corsi P (1997) Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: Regulation of CREB and CREM. *FEBS Lett.* 410:22–24
34. Taira E, Nagino T, Taniura H, et al (1995) Expression and functional analysis of a novel isoform of gicerin, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 270:28681–28687.
35. Tsukamoto Y, Taira E, Yamate J, et al (1997) Gicerin, a cell adhesion molecule, participates in the histogenesis of retina. *J. Neurobiol.* 33:769–780
36. Okumura S, Muraoka O, Tsukamoto Y, et al (2001) Involvement of gicerin in the extension of microvilli. *Exp Cell Res* 271:269–276
37. 今村 伸一郎 (1997) 心筋肥大の分子生物学 動物の循環器 第30巻2号 35-47

謝辞

本研究を行うにあたり、多くのご指導を受け賜りました、岩手医科大学医学部 平 英一教授、近藤 ゆき子講師、岩手医科大学薬学部 弘瀬 雅教教授、那谷 耕司教授に深く感謝致します。また、本研究を実施するにあたり、ご指導およびご助言をいただきました岩手医科大学医学部 研究助手の佐藤 幸子さん、高橋 公美さんには心より感謝申し上げます。

ラットの頸動脈の内圧測定にご協力いただいた、医療創生大学 丹治(斉藤)麻希先生、統計解析の方法などをご指導いただいた、北海道科学大学 千葉 健史先生にも心より感謝申し上げます。

また、主査をお引き受けいただいた岩手医科大学薬学部 三部 篤教授、副査をお引き受けいただいた岩手医科大学薬学部 工藤 賢三教授には、大変ご多忙の中、本研究についてたくさんのご助言をいただき感謝申し上げます。

そして、所属研究室に配属となり、研究の協力を行ってくれた岩手医科大学医学部学生に感謝致します。

最後に、仕事と研究の両立を行うにあたり、協力していただいた職場の薬剤師の先生方、つらいときに支えてくれた家族、友人に心より感謝致します。