

論文要旨

Down-regulation of Na⁺/Ca²⁺ exchanger by fluvastatin in rat cardiomyoblast H9c2 cells; involvement of RhoB in Na⁺/Ca²⁺ Exchanger mRNA stability

ラット心筋由来 H9c2 細胞の Na⁺/Ca²⁺ 交換体発現に対するフルバスタチンの抑制作用；低分子量 GTP 結合蛋白質 RhoB の Na⁺/Ca²⁺ 交換体 mRNA 安定化への関与

前田 佐知子

【序論と目的】

1 型 Na⁺/Ca²⁺ 交換輸送体(NCX1)は心筋細胞から Ca²⁺ を排出させる主要なトランスポーターである。NCX1 の mRNA や蛋白発現量は、大動脈閉塞や心不全などの病的心筋で変化することが知られている。また最近、マウスの心臓で NCX1 をノックアウトすると心筋の虚血再灌流障害が軽減され、過剰発現させると肥大型心筋症になることや、NCX1 を血管に過剰発現させると食塩感受性高血圧を発症することなどが報告された。これらは、NCX1 の発現量が心血管疾患と密接に関係することを示唆しているが、その機序は不明である。一方、高脂血症治療薬であるスタチン類には、心筋保護作用があることが知られているがその機序は明らかでない。私は本研究で、ラット心筋由来の H9c2 細胞を用いて、スタチンの 1 つであるフルバスタチン(Flv)が、NCX1 mRNA 発現量を用量及び時間依存的に減少させることを見出した。Flv は、HMG-CoA 還元酵素を阻害してメバロン酸(Mev)合成を抑制し、最終的にコレステロール合成を抑制する。Mev の代謝産物であるイソプレノイドのゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)やファルネシルピロリン酸(FPP)は、いろいろな低分子量 G 蛋白の活性化に必須であることが知られている。そこで、Flv の NCX1 mRNA 発現抑制に低分子量 G 蛋白が関与するか、関与する場合その低分子量 G 蛋白を同定し、NCX1 の発現調節機構を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

培養細胞は、ラット心筋由来 H9c2 細胞を用いた。H9c2 細胞を Flv、Mev、GGPP、FPP、Rho を活性化させるリガンドのリゾフォスファチジルコリン(LPC)、RNA 合成阻害薬 5,6-dichlorobenzimidazol riboside(DRB)のそれぞれの薬物存在下で培養し、RT-PCR 法、real-time PCR 法で NCX1、GAPDH、RhoA、RhoB の mRNA 発現量の変化を調べた。蛋白発現はウェスタンブロット法で、抗 NCX1 ラビットポリクローナル抗体、抗 RhoB ラビットポリクローナル抗体を用いて調べた。一部の実験に Rho の特異的阻害薬 C3 toxin、Ras と RhoA の constitutive active mutant (RasV12、RhoAV14)の cDNA を組み込んだ GFP 発現アデノウィルス、また RhoA、RhoB の siRNA を発現させた H9c2 細胞を用いた。また体重 107~123g の 6 週令雄ラットに、一日当たり 60mg/kg の Flv を一週間摂取させた後心臓を摘出し、NCX1 と GAPDH の mRNA 発現

量の変化を検討した。

【結果】

H9c2 細胞を 0.5、1、5 μM の Flv で 2-24 時間処理し NCX1 mRNA 及び蛋白発現量の変化を調べたところ、用量、時間依存的に発現量の抑制がみられた。次に H9c2 細胞に 5 μM Flv を 24 時間作用させた後、コレステロール生合成過程で HMG-CoA 還元酵素により生成される Mev、及びその代謝産物 GGPP 又は FPP を加え、24 時間経過後の NCX1 mRNA 発現量を調べた。その結果 Flv で減少した NCX1 mRNA は、Mev、GGPP 又は FPP で回復した。このことから NCX1 mRNA 発現に低分子量 G 蛋白 Rho、Ras 等の関与が示唆された。そこで、どの低分子量 G 蛋白が関与するか調べた。Rho の特異的阻害薬 C3、Ras と RhoA の constitutive active mutant (RasV12、RhoAV14) の cDNA を組込んだアデノウイルスを H9c2 細胞に感染させると、C3 のみが NCX1 mRNA 発現を抑制したことから Rho の関与が示唆された。RhoA、Ras は NCX1 mRNA 発現に関与しなかった。次に C3 を発現させた細胞とさせない細胞で、Rho を活性化する 5 μM LPC を 24 時間作用させ、NCX1 mRNA 発現量の変化を調べた。NCX1 mRNA 発現量は LPC で有意に増加し、その増加は C3 で抑制された。また NCX1 蛋白量も mRNA 量と同様に Flv で減少し、LPC で増加した。

Flv による NCX1 mRNA 発現抑制効果は GGPP、FPP で解除されたことから、その両方でイソプレニル化される RhoB が、NCX1 発現に関わる低分子量 G 蛋白の候補として考えられた。そこで H9c2 細胞に Flv と LPC を作用させ RhoB 蛋白量の変化を調べると、Flv により細胞質で増加、膜分画で減少し、LPC により細胞質で減少、膜分画で増加した。即ち、RhoB が NCX1 mRNA 発現に関わる低分子量 G 蛋白であることが示唆された。さらに確認のため、RhoA、RhoB の siRNA を H9c2 細胞に発現させると、NCX1 mRNA 発現量は RhoB のノックダウンで減少した。つまり RhoB が NCX1 mRNA 発現に関わる低分子量 G 蛋白であることがわかった。

最近 Rho が mRNA の安定性を変化させて、細胞の mRNA 量を調節することが報告されている。そこで Flv が Rho を介して NCX1 mRNA の安定性にどう影響するか調べるため、RNA 合成阻害薬 5,6-dichlorobenzimidazole (DRB) 存在下で、Flv 処理と非処理細胞の GAPDH と NCX1 mRNA を定量した。DRB で新たな mRNA 発現を抑制すると、GAPDH、NCX1 mRNA 量は共に時間に依存して減少したが、Flv はさらに DRB による NCX1 mRNA の減少を有意に促進した。即ち、Flv が NCX1 mRNA の分解を促進している事が示唆された。またラットに Flv を一週間経口摂取させた後、心臓の NCX1 mRNA 発現量の変化を調べた結果、Flv 投与群で心筋の NCX1 mRNA 発現量の抑制がみられた。

【結論】

以上の結果から、Flv は HMG-CoA 還元酵素を阻害し、その結果 Rho の活性化を抑制して NCX1 の mRNA 分解を促進させることにより、NCX1 発現を減少させることが示唆された。また RhoB が NCX1 mRNA 安定化に関わる低分子量 G 蛋白であることを同定した。つまり RhoB を活性化させると NCX1 は増加し、RhoB を抑制すると NCX1 は減少する。このように本研究で、RhoB を介したシグナル伝達系が NCX1 mRNA の安定性を制御し、心筋の NCX1 発現を調節していることが新しく分かった。

(Molecular Pharmacology, Vol. 68: 414-420, 2005 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1415 号	氏名	前田 佐知子
審査委員	主査	宮田 篤郎	
	副査	小澤 政之	丸山 征郎

Down-regulation of Na⁺/Ca²⁺ exchanger by fluvastatin in rat cardiomyoblast H9c2 cells: involvement of RhoB in Na⁺/Ca²⁺ exchanger mRNA stability

(ラット心筋由来 H9c2 細胞の Na⁺/Ca²⁺交換体発現に対するフルバスタチンの抑制作用：低分子量 GTP 結合蛋白質 RhoB の Na⁺/Ca²⁺交換体 mRNA 安定化への関与)

Na⁺/Ca²⁺交換輸送体(NCX)は、細胞内の Ca²⁺を 3Na⁺:1Ca²⁺の交換比で排出する主要なトランスポーターである。心筋にある 1 型 NCX (NCX1) の mRNA や蛋白の発現は、心血管病変で変化することが知られているが、その調節機序は不明である。また高脂血症治療薬であるフルバスタチン(Flv)は、HMG-CoA 還元酵素を阻害してメバロン酸合成を抑制し、コレステロール合成を抑制するが、最近コレステロール低下以外の心血管に対するスタチンの作用が注目されている。本研究は、フルバスタチン(Flv)が NCX1 mRNA 発現に及ぼす影響、およびその際のシグナル経路、特に低分子量 G 蛋白の関与の有無について検討したものである。標本は NCX1 を発現するラット心筋由来 H9c2 細胞を用い、mRNA 定量解析は、RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法で、蛋白発現解析はウェスタンブロット法により行った。

主な新知見は以下の通りである。

- ①Flv により NCX1 mRNA・蛋白発現量は減少し、逆に低分子量 G 蛋白 Rho を活性化するリゾリン脂質(LPC)により増加した。また Flv の NCX1 抑制作用はメバロン酸やその代謝産物のゲラニルゲラニルピロリン酸とファルネシルピロリン酸で解除されたことから、低分子量 G 蛋白の関与が示唆された。
- ②NCX1 発現に関与する Rho のサブタイプは、特異的阻害薬の効果や siRNA を用いたノックダウン実験により RhoB であると確認された。
- ③Flv は RhoB の膜移行を阻害し、逆に LPC は RhoB の膜移行を促進することから、Flv や LPC は、RhoB のアシル化に影響することが判明した。
- ④Flv は、RNA 合成阻害薬存在下で NCX1 mRNA の減少速度を有意に促進した。即ち、Flv は NCX1 mRNA の分解を促進した。

以上より、申請者は、Flv が低分子量 GTP 結合蛋白質 RhoB の抑制を介して NCX1 mRNA の安定性を減少させ、NCX1 蛋白の発現を抑制するということを明らかにした。本研究は RhoB を介したシグナル伝達系が NCX1 mRNA の安定性を制御するという、心筋 NCX1 遺伝子発現の新しい調節経路を示唆したものであり、心血管疾患における NCX1 の役割の更なる理解に貢献すると考えられる。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判断した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医論第 1415 号	氏名	前田 佐知子
審査委員	主査	宮田 篤郎	
	副査	小澤 政之	丸山 征郎
<p>主査および副査の3名は、平成17年11月30日、学位請求者 前田佐知子に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>【質問1】 NCX は心筋以外の組織に発現していますか？ その場合、スタチンは心筋以外の組織の NCX 発現にも影響を与えますか？</p> <p>(回答) NCX には 1-3 の型 (isoform) があり、心筋には 1 型、神経系には全ての型が発現しています。スタチンは全ての型の NCX 発現に影響を与える可能性があります。今回は 1 型のみを検討です。ただ、今回の実験で用いたフルバスタチンは高濃度であり、治療用量のスタチンでは NCX 発現抑制の可能性は低いと思います。</p> <p>【質問2】 NCX は細胞のどこに存在しますか？</p> <p>(回答) NCX は主に細胞膜に存在します。1 型 NCX (NCX1) は心筋細胞膜、特に T 管に多く発現しており、心筋の収縮時に Ca^{2+} チャンネルを介して流入した Ca^{2+} の排出を担っています。また、ミトコンドリアにも NCX があるという報告があります。</p> <p>【質問3】 スタチンの多面的作用 (pleiotropic effects) における心筋での作用は？</p> <p>(回答) RhoA の抑制を介する炎症性サイトカイン産生抑制や細胞内カルシウムの過負荷の抑制により心機能改善の効果があると考えられます。</p> <p>【質問4】 スタチンの Rho を介した発現調節は NCX1 に特異的ですか？他にも例がありますか？</p> <p>(回答) スタチンの Rho を介した発現調節は他にも報告があります。血管内皮の炎症反応において、炎症性サイトカイン TNFα は Rho を介して転写因子 NF-κB を活性化し、細胞内接着因子 E-selectin や VCAM-1 の mRNA 発現を活性化しますが、この系もスタチンにより抑制されると報告されています。</p> <p>【質問5】 その経路において、Rho の膜への移行は関係ありますか？</p> <p>(回答) 関係あります。Rho はイソプレニル基によってアシル化され、膜に移行することで活性型となります。その後、細胞骨格制御や細胞増殖など広範な作用を示します。その広範な作用の一つとして NCX1 mRNA の安定化があると考えられます。</p> <p>【質問6】 Rho のサブタイプは RhoA が一般的ですが、RhoB の特徴は？</p> <p>(回答) RhoB は細胞骨格維持以外に、細胞増殖など癌化へのシグナル伝達系に関与しています。RhoB は RhoA のようなゲラニルゲラニル化だけでなくファルネシル化されることでも調節されます。また活性化した RhoA が細胞膜に局在するのに対し、活性型 RhoB は細胞膜だけでなく小胞やゴルジ体に多く分布しています。</p>			

最終試験の結果の要旨

【質問 7】 RhoC については検討していますか？

(回答) RhoC は肺に多く発現しています。そのため今回実験で使用した心筋由来の H9c2 細胞での検討は行いませんでした。今後検討する予定です。

【質問 8】 LPC が Rho を活性化する機序はわかっていますか？

(回答) LPC は未同定の LPC 受容体に共役する三量体 G 蛋白 Gi/o を介し、イソプレニル転移酵素の活性化によって Rho を活性化すると考えられています。しかし Gi/o からどのようにしてイソプレニル転移酵素に情報が伝達されるか、また、イソプレニル化された Rho の活性化にどのような GEF (グアニンヌクレオチド交換因子) が関与するかなどは明らかではありません。

【質問 9】 Rho 阻害薬 C3 の阻害作用があまり強くない理由は？

(回答) C3 は同遺伝子を細胞にトランスフェクトして発現させましたが、発現効率は約 7 割でしたので、C3 の阻害を受けなかった細胞があり、このような結果になったと考えています。

【質問 10】 メバロン酸とゲラニルゲラニルピロリン酸などの使用濃度に差がありますが？

(回答) 予備実験で用量反応曲線を検討し、最大効果の得られた濃度で使用しました。細胞内でのメバロン酸の代謝動態については、現在検討中です。

【質問 11】 NCX1 の活性化において、LPC 受容体を介さない系はありますか？

(回答) 心筋では細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加や蛋白リン酸化、PKC activator、フリーラジカルなどが NCX1 活性化に関与することが知られています。また、ウシ腎糸球体細胞において、カフェインが NCX1 の Ca^{2+} の細胞外への排出を促進し、その活性化は p38 MAP キナーゼ (MAPK) を介してアンギオテンシン II によって抑制されるとの報告があります。

【質問 12】 NCX1 の発現にカルシニューリンやカルモデュリン依存性キナーゼは関与しますか？

(回答) NCX1 の主な役割は、心筋の興奮に伴って細胞内に流入した Ca^{2+} の排出であり、カルモデュリンが NCX1 の Ca^{2+} 依存的な活性化に関与するとの報告があります。しかし、カルシニューリンやカルモデュリン依存性キナーゼの関与は今のところ不明です。

【質問 13】 NCX1 の発現に関する他の報告はありますか？

(回答) 心筋 NCX1 のノックアウトマウスで、心筋の虚血再灌流障害が軽減され、逆に過剰発現で肥大型心筋症になることや、NCX1 を血管に過剰発現させると食塩感受性高血圧を発症するという報告があります。

【質問 14】 NCX1 に mRNA 不安定化に関与すると言われる 3' 末端の AU-rich 配列はありますか？

(回答) AU-rich 配列があります。そのため、Rho による NCX1 mRNA 安定化作用は、p38 MAPK を介した 3' 末端の deadenylation の抑制が関与している可能性があります。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。