

論文審査の要旨および担当者

学位申請者	亀島 聡 (3DV14001 獣医薬理学)
学位論文題目	カルモジュリン関連タンパク質による高血圧症およびその合併症の病態制御機構に関する研究：血管・心・腎・脳による臓器連関に着目した検討
担当者	主査 北里大学教授 佐々木 宣哉 副査 北里大学教授 上野 俊治 副査 北里大学准教授 久留主 志朗 副査 九州大学准教授 今村 拓也

論文審査の要旨 (3,000字以内)

高血圧症の病態には末梢血管における炎症性反応、壁構造変化(リモデリング)、収縮機能障害のみならず、交感神経活性の亢進や心拍出量の増大、腎レニン・アンジオテンシン系の活性亢進など脳神経系、心臓、腎臓といった様々な臓器の機能異常が関連している。また高血圧状態の持続は腎不全や心肥大などの合併症を誘導し、最悪の場合死に至る。高血圧症は原因によっても分類され、遺伝的素因や食塩高感受性などに起因する本態性高血圧症、脳圧亢進や腎障害などに続発する二次性高血圧症、そして肺循環に限局した肺高血圧症などが挙げられる。

当研究室ではカルモジュリン(CaM)関連タンパク質である histone deacetylase (HDAC)4、eukaryotic elongation factor 2

(eEF2) kinase (eEF2K)、death-associated protein kinase (DAPK)3 の 3 分子が自然発症高血圧ラット(SHR)の血管系において高発現していることを発見し、これらが血管炎症性反応および血管壁リモデリングの促進を介して本態性高血圧症の病態を進展することを初めて明らかにした。しかし、3 分子の「本態性高血圧症以外の高血圧症および合併症の病態」における役割、および「血管系以外の血圧調節臓器」における役割は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、(1)肺高血圧発症・進展における 3 分子の役割、(2)SHR の脳、心臓、腎臓組織における 3 分子の発現と局在、(3)心肥大モデル動物の心臓組織における eEF2K および eEF2 の発現と活性化、を明らかにすることを目的とした。

(1)モノクロタリン(MCT)誘発肺高血圧発症・進展における CaM 関連タンパク質の役割解明：肺高血圧症は遺伝的素因、左心不全、血栓塞栓など様々な原因により発症する進行性・致死性の疾患である。病態は主に小肺動脈の収縮機能障害、炎症性反応および壁リモデリングにより進展する。現在、肺高血圧発症・進展における CaM 関連タンパク質の役割は明らかになっていない。Wistar rats に植物アルカロイド MCT を投与し、肺高血圧を誘導した。同時に HDAC4 阻害薬 MC1568、eEF2K 阻害薬 A-484954、DAPK3 阻害薬 DAPK inhibitor (DI)の投与を開始した。2 週間後肺動脈圧を測定した後、摘出した肺組織を各解析に使用した。MCT 投与により対照(MCT 非投与)群と比較して有意に肺動脈圧が上昇した。MC1568 および DI はこれに影響を及ぼさなかったが、A-484954 は有意に抑制した。A-484954 は MCT による肺内肺動脈壁肥厚を有意に抑制した。また肺組織において A-484954 は MCT による eEF2K Ser500 残基のリン酸化を抑制した。

ン酸化亢進を有意に抑制した。加えて A-484954 は MCT による活性酸素種(ROS)産生亢進および主要 ROS 産生酵素 NADPH oxidase (NOX)-1 発現亢進を有意に抑制した。さらに A-484954 は MCT によるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-2 活性亢進および肺内肺動脈壁の線維化を有意に抑制した。以上の結果から、eEF2K は MCT 誘発肺高血圧症の病態において NOX-1/ROS/MMP-2 経路を介して線維化を含む肺動脈壁リモデリングを促進し、肺動脈圧上昇に関わることが初めて明らかになった。

(2) SHR の脳、心臓、腎臓組織における CaM 関連タンパク質の発現および局在の解析： SHR より脳、左心室、腎臓を摘出し各組織における HDAC4、eEF2K、DAPK3 タンパク質の発現と局在を検討した。SHR の収縮期血圧および左心室重量/体重比(心肥大)が対照の Wistar Kyoto rats (WKY)と比較して有意に増加していることを確認した。ラット脳組織において HDAC4 および eEF2K タンパク質発現量は同程度であり、それに比べて DAPK3 発現量は低かった。加えて SHR 脳組織における HDAC4 発現量は、WKY と比較して有意に高かった。ラット左心室組織において eEF2K タンパク質発現量が最も高く、心筋細胞に局在しており、SHR 左心室心筋細胞の eEF2K 発現量は WKY と比較して有意に高かった。ラット腎臓組織において DAPK3 タンパク質発現量が最も高く、尿細管上皮細胞に局在していた。以上の結果から、SHR 脳組織における HDAC4 タンパク質発現亢進および左心室組織における eEF2K タンパク質発現亢進は高血圧症の病態進展に影響を及ぼす可能性が初めて示唆された。

(3) 心肥大モデル動物の左心室組織における eEF2K/eEF2 タンパク質発現と活性化の解析： C57BL/6NJcl マウスおよび Wistar rats に

横行大動脈狭窄術(TAC、2日間)および isoproterenol (ISO、7日間)処置をそれぞれ施し、心肥大モデルを作製した。(2)で使用した SHR を含め各心肥大モデル動物より摘出した左心室を解析に使用した。SHR 左心室組織において、WKY と比較し eEF2K Ser366 残基のリン酸化減少および eEF2 Thr56 残基のリン酸化亢進が認められた。TAC マウス左心室組織においても、偽手術群と比較し有意な eEF2K タンパク質発現亢進および Ser366 残基のリン酸化減少が認められた。加えて eEF2 Thr56 残基のリン酸化が有意に亢進していた。ISO ラット左心室組織においては、対照(ISO 非投与)群と比較し eEF2K Ser366 残基のリン酸化が有意に減少していた。一方、ウェスタンブロットティングによる解析では、eEF2K タンパク質発現および eEF2 Thr56 残基のリン酸化は変化なかった。ISO ラット左心室の組織切片をアザン染色し評価したところ、内腔側に広範囲な線維化が認められた。加えて抗 eEF2K 抗体および抗リン酸化 eEF2 (Thr56)抗体を使用した免疫組織化学染色を行ったところ、心筋細胞における eEF2K タンパク質発現および eEF2 リン酸化が亢進していた。したがって、eEF2K タンパク質発現亢進および Ser366 残基のリン酸化減少(活性化)、eEF2 Thr56 残基のリン酸化亢進(不活化)は、検討したすべての心肥大モデル動物左心室組織において共通して認められた。以上の結果から、eEF2K/eEF2 シグナルが心肥大の病態形成において重要な役割を担う可能性が示唆された。

本研究結果から eEF2K が MCT 誘発肺高血圧症の病態を進展することから、本態性高血圧以外の高血圧症の病態制御にも関与することが初めて明らかとなった。また、HDAC4、eEF2K、DAPK3 が血管系のみならず、脳、心臓、腎臓の機能制御を介して高血圧症およ

びその合併症の病態を制御する可能性が初めて示唆された。今後、高血圧症および高血圧合併症の病態における HDAC4、eEF2K、DAPK3 の役割についてそれぞれ脳、心臓、腎臓における機能制御に着目し、さらに詳細な解析を進めることで 3 分子のコントロールが臓器連関を考慮した循環器系疾患に対する新規治療戦略となることが大いに期待される。

【論文審査の結果】

本研究は、カルモジュリン関連タンパク質による高血圧症およびその合併症の病態制御機構を血管・心・腎・脳に着目し検討したものである。本研究で明らかとなった eEF2K 及び HDAC4 に関する新たな知見は、高血圧症及び心肥大をはじめとする合併症に対する新たな治療標的探索の基盤となることが期待できる。

本論文の著者は、在学 3 年間でこの成果をまとめて早期修了対象者として論文を提出した。審査員一同は、本論文が新規の知見を多く含み医学や獣医学の発展に寄与するものとの認識で一致した。更に、著者が真摯な研究態度と豊かな人間性を持ち、将来研究成果を社会に還元できる能力を有するものであり、博士（獣医学）の学位の授与に値すると判断した。