

氏名(本籍)	早川健司(岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第525号
学位授与日付	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Sensitivity to Apoptosis Signal, Clearance Rate, and Ultrastructure of Fas Ligand-Induced Apoptosis in In Vivo Adult Cardiac Cells
審査委員	(主査) 教授 藤原久義 (副査) 教授 廣瀬 一 教授 國貞隆弘

### 論文内容の要旨

不全心、肥大心において動物あるいは人のin vivo成人心筋細胞ではFasの過発現、Bax/Bcl-2比の増加、ミトコンドリアからのチトクロームCの放出など多数の間接的なアポトーシスの証拠が呈示されるにも関わらず、アポトーシスそのものの頻度がひじょうに少ない。そのため我々は以下のような仮説を考えた。(1) 心筋細胞は他細胞に比べてアポトーシスシグナルに対して抵抗性があり、心筋細胞のアポトーシスは高い閾値を凌駕するシグナルが伝わった時のみ起こるのではないか。(2) アポトーシスを起こした心筋細胞は早くクリアランスされるため見つける事ができないのではないか? しかしながら今までそれらを確認するモデルが存在しなかった。さらにアポトーシスの頻度が少ないためin vivo成人心筋細胞の超微形態を正確に分析することができなかった。

本研究の目的はsoluble Fas Ligandを直接心筋内注射する方法を用いる事によりin vivoにおける心臓の成人心筋細胞及び間質細胞のアポトーシスシグナルに対する感受性、クリアランスレート、超微形態を肝臓の肝実質細胞及び間質細胞のそれらと比較し、明らかにする事である。

#### 対象と方法

Wister rat (体重240g-260g) を麻酔下にて挿管、人工呼吸器管理を行い、開胸後、soluble Fas Ligand(sFL)の心筋内直接注射を左室前壁に行い1-, 3-, 6-, 12-, 24-, 48時間後に屠殺した。投与薬によって以下の5群にわけた。すなわち、vehicle (Group C), sFL 0.5  $\mu$ g/mL (Group F0.5), sFL 2  $\mu$ g/mL (Group F2), sFL 5  $\mu$ g/mL (Group F5), sFL 5  $\mu$ g/mL+caspase阻害薬 (Boc-Asp-fmk)200  $\mu$ g/mL (Group BAF) の5群で、ラットは各群8匹を用いた。屠殺後心臓は迅速に摘出した。各々のグループのうち五つの心臓は2分割しそれぞれ(1) 10%ホルマリン固定、(2) 凍結保存を行った。すなわち(1) 10%ホルマリン固定標本はterminal dUTP nick end-labeling (TUNEL), TUNEL 及びalpha sarcomeric actinの免疫二重染色, Taq polymerase in situ ligation assay (2) 凍結保存標本はDNAラダー, caspase-3 colorimetric protease assay, にて分析した。残りの3つの心臓は2.5%グルタル・アルデヒドにて固定し電子顕微鏡にて分析した。肝臓に対しても心臓の実験とは別の個体を用いて同様の濃度のFsを投与し、3-, 6-, 12-, 24時間後に屠殺した。

#### 結果

Group F5では注射野にTUNEL陽性、in situ ligation陽性心筋細胞、間質細胞が認められた。心筋細胞、間質細胞のapoptotic indexは12時間でpeak (2.0  $\pm$  0.09 %, 3.2  $\pm$  0.11 %)を認め、以後速やかに減少し24時間後(0.10  $\pm$  0.008 %, 0.21  $\pm$  0.006 %)さらに48時間後両者とも0%となった。BAF投与群では12時間において心筋細胞のapoptotic indexが有意に低下していた (0.017  $\pm$  0.003 % p<0.05)。Group C, Group F0.5, Group F2ではTUNEL陽性細胞はごくわずかであった。Group F5の6時間、12時間にDNAラダーが認められたが、その他のグループでは認められなかった。肝実質細胞のアポトーシスはsFL注射後、3時間より起こりsFL濃度に関わらずapoptotic indexは20%前後であり、24時間後にはアポトーシス細胞は消失していた。肝臓の間質細胞では6時間にて最も高濃度のFas刺激においてapoptotic indexが有意に高かった (1.8  $\pm$  0.12 %)。しかしながら12時間後ではすべての濃度においてアポトーシスが誘導され、24時間後には消失していた。

Caspase-3の活性はGroup F5において12時間 (1083 ± 156 mOD/mg protein p<0.05) において他のグループと比べ有意に上昇していた。

Group F5では電子顕微鏡にて心筋細胞の細胞質の濃縮, 核クロマチンの凝集, 核の断片化, アポトーシス小体を捉えた。これらは肝細胞を含めて他細胞にみられるアポトーシスの超微形態の特徴と一致するが, 本モデルでは1) 高頻度の細胞膜の破綻, 2) ドーナツ状の核クロマチンの凝集, 3) ミトコンドリアの凝縮およびクリスタのねじれ, 4) 脂肪滴様構造の出現, 5) 筋原繊維の配列の乱れなど心筋細胞特有のアポトーシスの特徴が見出された。

## 考察

肝実質細胞及び肝間質細胞は低濃度のFas刺激にてアポトーシスを誘導できるが, 心臓においては心筋細胞ばかりではなく, 間質細胞までもが高濃度のFas刺激でないとアポトーシスを誘導できない。この事はFas刺激に対する抵抗性は心筋細胞ばかりでなく, 間質細胞にも存在することを示唆している。またCaspase-3が高濃度Fas刺激においてのみ活性化されている事, またそれがpancaspase inhibitorにより阻害されている事より, Fas刺激に対する抵抗性はCaspase-3より上流にて決定されている。

アポトーシスのDNA断片化はCaspase-3の活性を介してCaspase-3依存性DNaseのようなDNaseが活性化されて生じる。またアポトーシスに特徴的な形態学的変化はCaspase-3の活性化を介して, apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus ( Acinus )の活性化によって生じる。Fas刺激によるアポトーシスの出現は臓器, 細胞によって異なるが消失までの時間は短く, 心筋細胞, 肝細胞両者とも24時間以内であった。In vivo 成人心筋細胞の超微形態は古典的なアポトーシスの超微形態の特徴を備えている一方, 構造的にも機能的にも高度に分化した心筋細胞特有の形態の特徴も見出された。本研究によりin vivo 成人心筋細胞のアポトーシスシグナルに対する低い感受性が明らかになり, またその消失時間 (24時間) の迅速さも明らかになった。このアポトーシスに対する低い感受性は分裂等が全く, もしくは極めてまれな心筋細胞数を保持するための保護機構の一つと思われた。

## 結論

in vivo成人心筋細胞のアポトーシスに対する感受性は肝細胞のそれと比べて極めて低いが, その消失は肝細胞と同じく迅速に行われる。またその超微形態は心筋細胞特有なユニークなものであった。アポトーシスシグナルに対する心筋細胞の抵抗性は心筋の保護機構のひとつの可能性があると思われた。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 早川健司は, in vivo 成人心筋細胞のアポトーシスシグナルに対する抵抗性, クリアランスの速さ, また特徴的な超微形態を明らかにした。これらの知見は循環器病学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

---

### [主論文公表誌]

Sensitivity to Apoptosis Signal, Clearance Rate, and Ultrastructure of Fas Ligand-Induced Apoptosis in In Vivo Adult Cardiac Cells

Circulation. 2002 ; 105 : 3039~3045.