

氏名(本籍)	香田雅彦(岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 538 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	Myocytes positive for <i>in situ</i> markers for DNA breaks in human hearts which are hypertrophic, but neither failed nor dilated: a manifestation of cardiac hypertrophy rather than failure
審査委員	(主査) 教授 藤原久義 (副査) 教授 高見剛 教授 廣瀬一

論文内容の要旨

ヒト不全心にみられる心筋細胞のDNA断片の意義については、それがアポトーシスを意味し、心不全の進行に寄与する可能性が示唆され得るものの、見解が一致していない。DNA断片の検出にはTUNEL法が汎用されているが、ヒト心不全においてTUNEL陽性心筋細胞の頻度は0.002%から35%まで報告によって大きな開きがある。しかも、報告されているこれら陽性心筋細胞の頻度の大半はこれらすべてをアポトーシスと考えたと臨床像と矛盾するほどに高い。以前我々はヒト拡張型心筋症におけるTUNEL陽性心筋細胞は死細胞ではなくDNA修復活性の亢進した生存細胞であると報告した。また、RNA合成の亢進した細胞ではTUNEL偽陽性を呈するという報告もある。これらのことは病的心における心筋細胞死を組織切片上で検出するために用いられるDNA断片マーカーの信頼性に深刻な懐疑を投げ、これらのマーカーが細胞死以外の何かを反映している可能性を示唆する。また、不全心は一般に心肥大を伴うため、DNA断片と心肥大、心不全との関係は複雑に重なり合っている。

そこでわれわれは、これら*in situ* DNA断片マーカー陽性反応が心筋細胞肥大の随伴現象の一つであるという仮説を立てた。

対象と方法

ヒト肥大型心筋症 (HCM), 高血圧心 (HHD), 拡張型心筋症 (DCM), 正常心の剖検心 (HCM 8例, HHD 4例, DCM 9例, 正常心7例), および心筋生検標本 (HCM 21例, HHD 11例, DCM 23例, 正常心13例) を対象に, TUNEL法, TUNEL法よりアポトーシスに特異的であるとされる *Taq* polymerase-based *in situ* ligation assay (*Taq*法), そしてネクロトーシスに特異的である *Pfu* polymerase-based *in situ* ligation assay (*Pfu*法) を行った。さらに, DNA修復/合成活性のマーカーであるPCNA, 転写活性のマーカーであるSC35, アポトーシス実行シグナルのマーカーである活性型caspase-3による免疫染色を行いDNA断片マーカーとの関係を調べた。

結果

剖検心におけるTUNEL陽性心筋細胞の頻度はHCM (1.85±1.30%), HHD (1.58±0.52%), DCM (1.16±0.88%) において同程度であり正常心 (0.03±0.05%) のそれよりも有意に高かった。*Taq*および*Pfu*陽性心筋細胞の頻度に関しても同様の傾向がみられたがその頻度はTUNELの約1/3から1/4であった。また, TUNEL, *Taq*, *Pfu*陽性心筋細胞頻度は互いに有意な相関を示した。さらに, TUNEL陽性心筋細胞頻度と心重量の間に有意な相関がみられた。一方, PCNAおよびSC35陽性心筋細胞の頻度についても正常心に対し各肥大心群で有意にかつ同程度に高く, これら陽性頻度と各DNA断片マーカー陽性頻度との間に有意な正相関がみられた。

心筋生検標本においてはHCM, HHD, DCM各疾患群のそれぞれ48%, 27%, 61%の切片にTUNEL陽性心

筋細胞を認め、陽性頻度はHCM (1.44±2.01%), HHD (0.95±1.73%), DCM (1.82±1.72%) において剖検心の場合と同じく同等であった。TaqおよびPfu陽性心筋細胞頻度もすべての肥大心群で同等にみられ、それぞれTUNEL陽性頻度に比し有意に小さかった。正常心においてこれらDNA断片マーカー陽性心筋細胞は検出されなかった。また、各DNA断片マーカー陽性心筋細胞頻度は互いに有意な相関を示した。さらに、TUNEL陽性頻度は左室心重量係数および心筋細胞径との間に有意な正相関を示したが、左室収縮期圧、左室拡張末期圧、駆出率、左室拡張末期径とは相関を示さなかった。

考察

心不全を有するヒトDCMのみならず、心不全状態にないHCMおよびHHDのような肥大心においてもTUNEL, Taq, PfuなどのDNA断片マーカー陽性心筋細胞がDCMと同等に認められ、しかもそれらの頻度が心肥大の程度と相関したことは、DNA断片マーカーに対する陽性反応が心不全に平行するものではなくむしろ肥大に伴う現象であることを顕している。

従来*in situ*でのDNA断片マーカー特にTUNEL陽性反応は一般にアポトーシスを意味すると考えられ、ヒト心不全におけるTUNEL陽性心筋細胞の存在が相次いで示されたことによってヒトの病的心におけるアポトーシスの関与すなわちアポトーシスによる心筋細胞脱落が心不全進行に寄与するという仮説が構築された。しかし、この仮説はDNA断片マーカーが間違いなくアポトーシスを表しているということを前提とするものである。最近、これらマーカー特にTUNEL法は単独で用いる場合アポトーシスの検出において信頼性に欠くという幾つかの証拠が持ちあがってきた。例えば、DNA修復活性の亢進した心筋細胞や転写活性の亢進した血管平滑筋におけるTUNEL偽陽性などである。本研究においてTUNEL, Taq, Pfu陽性心筋細胞の頻度が互いに相関し、かつTUNEL陽性頻度がつねにTaqおよびPfuのそれよりも小さかったことは、TUNEL法がヒト病的心における心筋細胞死を過剰評価していることを示唆する。

次に、本研究においてTUNELのみならずTaqおよびPfu陽性心筋細胞の頻度が、広範な心筋細胞脱落を伴わず、心不全状態にないHCMやHHDにおいてもDCMと同等に認められたことは、これらを死細胞と考えると実際の臨床像と大きく矛盾する。また、活性型caspase-3の発現を認めなかったことはcaspase依存性アポトーシスが無いことを示唆する。さらに、DNA断片マーカーとPCNAやSC35陽性心筋細胞頻度との間に有意な相関が認められたことより、DNA修復活性やRNA合成活性がTUNELの場合と同様にTaq, Pfu法の特異性の妨げになっている可能性が示唆される。

結論

ヒト肥大心の心筋細胞におけるDNA断片検出マーカー陽性反応はアポトーシスを反映するというよりはむしろ肥大に伴う現象である。

論文審査の結果の要旨

申請者 香田雅彦は、ヒト肥大心の心筋細胞におけるDNA断片マーカー陽性反応が必ずしもアポトーシスを意味せず、むしろ肥大に伴う現象であることを明らかにした。これは現在汎用されている方法論に懐疑を投げ、病的心におけるDNA断片化の意義に関する新たな可能性を示唆するものであり、今後の循環器病学の進歩に少なからず寄与するものと考えられる。

[主論文公表誌]

Myocytes positive for *in situ* markers for DNA breaks in human hearts which are hypertrophic, but neither nor dilated: manifestation of cardiac hypertrophy rather than failure.

Journal of Pathology 2003 ; 199 : 229-36