

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	循環病態科学領域循環病態内科学教育分野 氏名 金城貴彦
<p>(論文題目)</p> <p>Enhanced p122RhoGAP/DLC-1 expression can be a cause of coronary spasm (p122RhoGAP/DLC-1 発現亢進は冠攣縮の原因となりうる)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【背景および目的】</p> <p>これまで我々は、冠攣縮性狭心症(CSA)患者より得られた培養皮膚線維芽細胞の Phospholipase C (PLC)-δ 1 活性は健常者と比較して有意に亢進しており、冠動脈の basal tone と正相関を示したこと¹⁾、PLC-δ 1 遺伝子のアミノ酸構造配列解析により 257 番目のアルギニンからヒスチジンへの変異 (R257H) を CSA 男性患者の 10%に見い出し、機能解析では R257H 亜型の PLC 活性は亢進していることを報告した²⁾。さらに我々は血管平滑筋特異的にヒト R257H PLC-δ 1 を過剰発現させた遺伝子改変マウス(PLC-TG)を作成し、エルゴメトリン投与により冠攣縮が誘発されることを証明した³⁾。これらの研究から変異型 PLC-δ 1 による PLC 活性の亢進が冠攣縮の原因となりうることを示した。しかし、大多数の CSA 患者においては PLC-δ 1 遺伝子変異以外の原因により PLC 活性が亢進していると考えられた。最近我々は、CSA 患者より得られた培養皮膚線維芽細胞において、ほぼ全例で PLC-δ 1 活性化因子である p122RhoGAP/DLC1 の発現が亢進し、アセチルコリン刺激に対する細胞内 Ca 濃度の反応性亢進と関連していることを報告した⁴⁾。しかし p122RhoGAP/DLC1 の発現亢進が冠攣縮の原因かどうかは不明であるため、本研究では p122RhoGAP/DLC1 が冠攣縮の原因となりうるかについて血管平滑筋過剰発現マウスを作製して検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>1) 過剰発現マウスの作製：血管平滑筋特異的分子である α-smooth muscle actin のプロモーターを用いて、血管平滑筋特異的に p122RhoGAP/DLC1 が発現する DNA フラグメントを作成し、過剰発現マウス (TG) を作製した。各臓器での p122RhoGAP/DLC1 発現はリアルタイム RT-PCR 法で、大動脈でのタンパク発現はウェスタンブロット法で、冠動脈での発現は免疫蛍光染色法で確認した。大動脈切片から explant 法で血管平滑筋細胞 (VSMC)を培養し、PLC 活性を測定した。</p> <p>2) TG の観察と冠攣縮誘発：意識下で tail-cuff 法により血圧を測定し、麻酔下で心臓超音波検査を施行した。冠攣縮の有無は、麻酔下にマウスの頸静脈を確保し、エルゴメトリン (50 mg/kg) 投与後の心電図変化により評価した。さらにランゲンドルフ灌流心において、エルゴメトリン (1 μmol/L) を灌流し冠動脈の灌流圧を測定した。ランゲンドルフに引き続いてマイクロフィル法により冠動脈に造影剤を注入し、冠動脈の撮影を行った。</p> <p>【結果】</p> <p>1) TG の観察：生後 30 週までの期間において TG の早期死亡は確認されなかった。TG の血圧、脈拍数、体重、および心臓超音波検査における収縮末期左室内径、左室中隔厚、</p>	

左室短縮率は野生型 (WT) と比較して有意差を認めなかった。

2) TG の p122RhoGAP/DLC1 発現：肺，大動脈，肝臓，腎臓，心臓において TG では WT に比較して p122RhoGAP/DLC1 の遺伝子発現が亢進していた。TG から採取した大動脈では，WT に比較して p122RhoGAP/DLC1 のタンパク発現が 4.4 倍亢進していた。マウス心臓切片の免疫蛍光染色では冠動脈平滑筋に一致して p122RhoGAP/DLC1 が染色され，冠動脈平滑筋細胞でも p122RhoGAP/DLC1 が発現していることが確認された。

3) TG の PLC 活性：TG から培養した VSMC では WT に比較して，膜分画では 1.43 倍，細胞全体では 2.38 倍，PLC 活性が亢進していた。

4) TG の冠攣縮誘発試験：エルゴメトリン投与により，TG ではより高頻度で ST 上昇が観察された (1 of 7 WT (14%), 6 of 7 heterozygous TG (84%), and 7 of 7 homozygous TG (100%) , $p < 0.05$, WT versus TGs)。ランゲンドルフ灌流心では，TG ではエルゴメトリンを灌流することにより灌流圧の上昇を認めたが，WT では認めなかった。マイクロフィルではエルゴメトリン灌流後の TG の冠動脈では局所の冠攣縮を認めたが，WT では認めなかった。

【考察】

冠攣縮とは心臓の表面を走行する比較的太い冠動脈が一過性に異常に収縮した状態と定義され，異型狭心症のみならず致死的心室性不整脈や急性心筋梗塞の原因となりうるということが報告されているが，その病態は十分には解明されていない。CSA 患者では冠動脈の basal tone が亢進しており，さらにアセチルコリン投与により冠攣縮が惹起される。冠攣縮はアセチルコリン以外にもエルゴメトリン，ドパミン，セロトニン，ヒスタミンなどにより惹起されることが報告されており，受容体以下の細胞内メカニズムが原因であると考えられる。

今回我々は CSA 患者で認められた p122RhoGAP/DLC1 の発現亢進が CSA の原因になりうるかを，血管平滑筋特異的に p122RhoGAP/DLC1 を発現させた TG を作成し検討した。TG から培養した VSMC の PLC 活性は亢進していた。また心電図変化，ランゲンドルフ灌流心，マイクロフィルの 3 つの手法により，TG ではエルゴメトリン刺激により冠攣縮が引き起こされることを明らかにした。本研究から p122RhoGAP/DLC1 の発現亢進は CSA 患者における冠攣縮発症の原因となりうることが示された。

【文献】

1. Okumura K, Osanai T, Kosugi T, et.al. Enhanced phospholipase C activity in the cultured skin fibroblast obtained from patients with coronary spastic angina: possible role for enhanced vasoconstrictor response. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36:1847–1852.
2. Nakano T, Osanai T, Tomita H, et.al. Enhanced activity of variant phospholipase C-delta1 protein (R257H) detected in patients with coronary artery spasm. *Circulation*. 2002; 105:2024–2029.
3. Shibutani S, Osanai T, Ashitate T, et.al. Coronary vasospasm induced in transgenic mouse with increased phospholipase C- δ 1 activity. *Circulation*. 2012; 125:1027–1036.
4. Murakami R, Osanai T, Tomita H, et.al. p122 protein enhances intracellular calcium increase to acetylcholine: its possible role in the pathogenesis of coronary spastic angina. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30:1968–1975.