Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Isoproterenol-induced myocardial injury resulting in altered S100A4 and S100A11 protein expression in the rat

稲本，真也

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2000-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲2150
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002150

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

[110]

氏名・（本籍）	稲本真也（いなもとしんや）　（大阪府）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	博い第1293号
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
学位授与の日付	平成12年３月31日
学位論文題目	ISOPROTERENOL-INDUCED MYOCARDIAL INJURY RESULTED IN ALTERED S100A 4 AND S100A11 PROTEIN EXPRESSION IN THE RATS （ラット心におけるIsoproterenolによる心筋障害でのS100A４，S100A11蛋白の発現の変化）
審査委員	主査　教授　前田　盛 教授　横山光宏　　教授　大北　裕

論文内容の要旨

【緒　言】

S100蛋白は２つのEF hand を有するCa結合蛋白の１種であり，これまでに17種以上の存在が確認されている。心臓においても数種類の発現が確認されているが，個々の機能については断片的にしかしられておらず，特に病的変化に関わる役割については不明な点が多い。今回私達は心臓に発現するS100A４及びS100A11につき各々の抗体を作成し，Isoproterenolによる心筋障害モデルにおいて発現の変化を免疫組織学的に検討し，興味深い知見を得た。

【材料と方法】

ラットの心筋障害モデル

Meszarosらの方法に従い，８週令の雄Wister rat（250～300g）にisoproterenolを５mg/kg/dayの量で７日間連続して腹腔内に投与した。投与後１，７日目にエーテル麻酔下にて屠殺した。心臓を摘出後一部は10％ホルマリンにて固定し組織学的検索に用い，一部は液体窒素にて凍結しcDNA抽出とウェスタンブロットに供した。

抗体の作成

ヒトS100A４ cDNAをRT-PCRを用いて培養ヒト線維芽細胞より合成した。S100A11 cDNAはラットの心臓より抽出したcDNAをテンプレートとして，マウスの塩基配列を基にしたプライマーを用いて合成した。pBluescriptにRT-PCR産物を２次クローニングした後，Pin Point Xavector（Promega）に組み込み，大腸菌にfusion proteinを産生させた。これを家兎の皮下に３度免役して抗血清を得た。抗体の特異性は，心筋から抽出した蛋白及びCOS－７細胞に発現させた各々のS100のfusion proteinと抗体の反応性をウェスタンブロット法を用いて説明した。

【結　果】

抗ヒトS100A4抗体とラットS100A4蛋白の反応性

ヒトS100A4とラットS100A4はアミノ酸配列の相同性が91%である。抗ヒトS100A4抗体は心筋蛋白のうちラットS100A4蛋白の10kDaの部位に反応した。このバンドは抗ヒトS100A4抗体を過量のヒトS100A4　fusion proteinと反応させた後にウェスタンブロットを行うと消失した。

ラットS100A11のアミノ酸配列，抗体との反応性

ラットS100A11のアミノ酸配列はこれまで未知であったが，検討の結果，既知のマウスS100A11と94%の相同性を保っていた。抗体の特異性はS100A4と同様の方法で証明しえた。

正常心筋でのS100A4，S100A11の局在

正常心筋ではS100A4は主に介在板に一致した局在を示し，細胞質には殆ど発現は見られなかった。S100A11は心筋細胞では核に発現を認め，細胞質には発現を認めなかった。S100A11は小血管の平滑筋細胞と核と細胞質にも発現を認めた。

Isoproterenolによる心筋障害とS100A4，S100A11の発現の変化

ISP投与1日後に心内膜側の心筋の一部に壊死，間質浮腫，炎症細胞浸潤を認めた。周囲の心筋ではS100A4は発現が減弱し，S100A11は発現に変化を認めなかった。

Isoproterenol投与7日目では心重量／体重比が対照群に比べ約30%上昇した。組織学的には心内膜側を中心に多発性の線維化巣を認めた。線維化巣周囲の心筋では壊死像やアポトーシスは見られなかった。S100A4は線維化巣の周囲の心筋では正常対照と異なり細胞質に広範に発現していた。S100A11も線維化巣周囲の心筋では核以外に細胞質でも広範な発現を認めた。線維化巣よ離れた心筋では両者の発現は正常対照と違いはかなった。

【考　察】

S100蛋白ファミリーは2つのEF handを有するCa結合蛋白の1種で，細胞増殖，細胞周期の制御，細胞分化，腫瘍の転移，筋収縮など種々の細胞機能に関与している。S100A4，S100A11はS100A1と並んで心臓に発現する主要なS100蛋白である。S100A4は，培養細胞G1期からS期に入る際に発現する遺伝子の一つとして分離された。細胞増殖や形質転換など種々の細胞機能に関与し，最近では腫瘍の転移浸潤に関わる蛋白として注目されている。心臓でのmRNAレベルでの発現は非常に低いとされている。S100A11は鶏の砂嚢から分離された蛋白で，その後種々の臓器での発現が明らかにされている。

ISP投与は心筋の肥大と一部心筋細胞の壊死をもたらすことが知られている。カテコラミンによる心筋障害の機序として，直接の心筋毒性の他，急激な代謝の増加による相対的な虚血，カルシウムの過負荷，フリーラジカルの形成などが報告されている。これまでにいくつかの報告で病的心におけるS100蛋白の役割が強調されている。Remppisらはヒトの末期不全心でS100A1の発現低下を報告しており，最近ではJames N.らが心筋梗塞のモデルラットで梗塞巣近辺の心筋細胞質に，本来心筋に発現の見られないS100βが誘導されること，S100βがnorepinephrineによる心筋肥大に抑制的に作用することを明らかにした。

このように一部のS100蛋白が心臓の病的変化に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた一方，S100A4，S100A11共に心臓での役割は十分に解明されていない。S100A11は，中谷らに

よりISPの誘導体であるpropranololの細胞内の標的蛋白であることが明らかにされているが，S100A4は心機能に関わる役割については検索しえた限りは報告がない。本研究ではラットS100A11, cDNAをマウスとの相同性を利用して新たにクローニングし，その塩基配列及び予想されるアミノ酸配列を示し，さらにS100A4とS100A11蛋白が正常心とカテコラミンによる心筋障害心での発現の変化を明らかにした。この結果は両蛋白が心筋障害の修復過程において重要な生物学的役割を担っていることを強く示唆し，S100蛋白群の心筋における機能解析に新たな所見と展開を示す成果として注目に値する。

論文審査の結果の要旨

S100蛋白は2つのEF handを有するCa結合蛋白の1種であり，これまでに17種以上の存在が確認されている。心臓においても数種類の発現が確認されているが，個々の機能については断片的にしかしられておらず，特に病的変化に関わる役割については不明な点が多い。本研究者は心臓に発現するS100A4及びS100A11について各々の抗体を作成し，Isoproterenolによる心筋障害モデルにおいて発現の変化を免疫組織学的に検討し，興味深い知見を得た。

【材料と方法】

ラットの心筋障害モデル

Meszarosらの方法に従い，8週令の雄Wister rat（250～300g）にisoproterenolを5 mg/kg/dayの量で7日間連続して腹腔内に投与した。投与後1，7日目にエーテル麻酔下にて屠殺した。心臓を摘出後一部は10%ホルマリンにて固定し組織学的検索に用い，一部は液体窒素にて凍結しcDNA抽出とウェスタンブロットに供した。

抗体の作成

ヒトS100A4 cDNAをRT-PCRを用いて培養ヒト線維芽細胞より合成した。S100A11 cDNAはラットの心臓より抽出したcDNAをテンプレートとして，マウスの塩基配列を基にしたプライマーを用いて合成した。pBluescriptにRT-PCR産物を2次クローニングした後，Pin Point Xavector（Promega）に組み込み，大腸菌にfusion proteinを産生させた。これを家兎の皮下に3度免役して抗血清を得た。抗体の特異性は，心筋から抽出した蛋白及びCOS－7細胞に発現させた各々のS100のfusion proteinと抗体の反応性をウェスタンブロット法を用いて説明した。

【結　果】

抗ヒトS100A4抗体とラットS100A4蛋白の反応性

ヒトS100A4とラットS100A4はアミノ酸配列の相同性が91%である。抗ヒトS100A4抗体は心筋蛋白のうちラットS100A4蛋白の10kDaの部位に反応した。このバンドは抗ヒトS100A4抗体を過量のヒトS100A4 fusion proteinと反応させた後にウェスタンブロットを行うと消失した。

ラットS100A11のアミノ酸配列，抗体との反応性

ラットS100A11のアミノ酸配列はこれまで未知であったが，検討の結果，既知のマウスS100A11と94%の相同性を保っていた。抗体の特異性はS100A4と同様の方法で証明しえた。

正常心筋でのS100A4，S100A11の局在

正常心筋ではS100A4は主に介在板に一致した局在を示し，細胞質には殆ど発現は見られなかっ

た。S100A11は心筋細胞では核に発現を認め，細胞質には発現を認めなかった。S100A11は小血管の平滑筋細胞と核と細胞質にも発現を認めた。

Isoproterenol による心筋障害と S100A 4，S100A11の発現の変化

投与１日後に心内膜側の心筋の一部に壊死，間質浮腫，炎症細胞浸潤を認めた。周囲の心筋では S 100A 4 は発現が減弱し，S100A11は発現に変化を認めなかった。投与７日目では心重量／体重比が対照群に比べ約30％上昇した。組織学的には心内膜側を中心に多発性の線維化巣を認めた。線維化巣周囲の心筋では壊死像やアポトーシスは見られなかった。S100A 4 は線維化巣の周囲の心筋では正常対照と異なり細胞質に広範に発現していた。S100A11も線維化巣周囲の心筋では核以外に細胞質でも広範な発現を認めた。線維化巣よ離れた心筋では両者の発現は正常対照と違いはかなった。

【考　察】

S100蛋白ファミリーは２つの EF hand を有する Ca 結合蛋白の１種で，細胞増殖，細胞周期の制御，細胞分化，腫瘍の転移，筋収縮など種々の細胞機能に関与している。S100A 4，S100A11は S100A 1 と並んで心臓に発現する主要な S100蛋白である。S100A 4 は，培養細胞 G 1 期から S 期に入る際に発現する遺伝子の一つとして分離された。細胞増殖や形質転換など種々の細胞機能に関与し，最近では腫瘍の転移浸潤に関わる蛋白として注目されている。心臓発現は非常に低いとされている。S100A 11は鶏の砂嚢から分離された蛋白で，その後種々の臓器での発現が明らかにされている。

一部の S100蛋白が心臓の病的変化に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた一方，S 100A 4，S100A11共に心臓での役割は十分に解明されていない。

本研究は心臓における S100ファミリーの局在と役割について研究したものであるが，ラット *S 100 A 11* cDNA をマウスの相同性を利用して新たにクローニングし，その塩基配列及び予想されるアミノ酸配列を示し，さらに S100A 4 と S100A11蛋白が正常心とカテコラミンによる心筋障害心での発現の変化を明らかにした。この結果は，S100蛋白群の心筋における機能解析に新たな所見と展開を示す成果として価値ある集積であると認める。よって，本研究者は，博士（医学）の学位を得る資格があると認める。