



Heparin and Heparan sulfate inhibit extracellular signal-regulated kinase activation and myocardial cell hypertrophy induced by Endothelin-1

水谷, 和郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2001-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2339

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002339>

※ 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。



【115】

氏 名・(本 籍) 水谷 和朗 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博い第1353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13年3月8日

【学位論文題目】

Heparin and Heparan sulfate inhibit extracellular signal-regulated kinase activation and myocardial cell hypertrophy induced by Endothelin-1

ヘパリンとヘパラン硫酸はERK抑制を介してエンドセリン刺激による心筋細胞肥大を抑制する

審 査 委 員

主査 教授 伊藤 宏

教授 横山 光宏 教授 堀田 博

[緒言]

心肥大は心不全へ移行する可能性を有しており、致死的な独立した危険因子の一つである。それゆえに心肥大の進行を抑制することは重要な課題の一つである。心肥大は様々な要因、すなわち、機械的刺激、エンドセリン-1(ET-1)やアンギオテンシン II などの G 蛋白共役因子、cardiotropin-1 や Leukemia Inhibitory Factor などのサイトカインによって引き起こされる。しかしながら、心肥大の進行を抑制する内的因子に関しては現在のところ詳細は不明である。ヘパリン及び細胞外マトリックスの主要構成成分であるヘパラン硫酸は様々な細胞においてその増殖や遊走を抑制することが知られている。ヘパリン及びヘパラン硫酸はアンギオテンシン II による心肥大を抑制する可能性が示唆されているが、ヘパリン及びヘパラン硫酸が心肥大を抑制する機序、特に細胞内情報伝達系については全く不明である。

c-fos 遺伝子は最早期活性化遺伝子のひとつであり、あらゆる細胞において、刺激によりきわめて短時間に活性化することが知られている。心筋において、*c-fos* 遺伝子は肥大刺激、特に血行動態変化や G 蛋白共役因子で肥大を起こす際に、すみやかに発現がみられることが報告されている。G 蛋白共役因子の中でも、ET-1 は強力な心肥大誘発因子の一つである。また、心不全の状態では血漿中の ET-1 濃度は上昇しており、これは不全心筋細胞において ET-1 の産生が増加することによると考えられている。ラットにおいては ET-1 レセプター阻害剤による長期治療が心肥大を抑制し、慢性心不全の生存率を改善したという報告がある。本研究ではヘパリン及びヘパラン硫酸が ET-1 が惹起する心筋細胞肥大に対しどのような影響を及ぼすか、特に細胞内情報伝達系への効

果を検討した。我々は、ET-1 が心筋細胞肥大を生じる際に *c-fos* 遺伝子を活性化するが、これは *c-fos* promoter/enhancer 内に存在する serum response element(SRE)を活性化すること、ヘパリン及びヘパラン硫酸はこの過程を抑制することを明らかにした。特に *c-fos* の SRE の活性化では serum response factor (SRF)と ternary complex factor (TCF)の結合が重要であるが、ヘパリン及びヘパラン硫酸はこのうち TCF を抑制していること、この機序として、情報伝達分子の Elk-1 のリン酸化を抑制すること、さらにこの上流の ERK の活性化を抑制することによることを明らかにした。

[方法及び材料]

ラットの培養心筋細胞を用い、心筋細胞肥大の指標の一つである蛋白合成の亢進は³H]ロイシンを用いたアミノ酸の取り込みにより、*c-fos* mRNA の発現はノザンブロッティング法、*c-fos* promoter/enhancer の活性化の指標には luciferase assay、CAT assay 法を用い、また Elk-1 のリン酸化に関しては solid phase kinase assay、ERK の活性化には in gel kinase assay を用いて検討を行った。

[結果]

ET-1 により心筋細胞肥大が生じる際に蛋白合成が亢進することが知られている。これに対するヘパリン及びヘパラン硫酸の影響を検討するために³H]ロイシンの取り込みを検討した。ET-1 は³H]ロイシンの取り込みを亢進したが、ヘパリン及びヘパラン硫酸はともにこれに対して抑制作用を有していた。次に

心筋細胞肥大の指標の一つである *c-fos* 遺伝子発現に対するヘパリン及びヘパラン硫酸の影響を検討した。ET-1 により *c-fos* mRNA の発現は亢進したが、ヘパリンはこの *c-fos* mRNA の発現を 40% 抑制した。この機序として transfection assay により ET-1 による *c-fos* promoter/enhancer の活性化がヘパリン及びヘパラン硫酸によって抑制されることが明らかになった。すなわちヘパリン及びヘパラン硫酸は *c-fos* 遺伝子発現に対して、転写のレベルで抑制していることが示唆された。*c-fos* promoter/enhancer 内には SRE や cyclic AMP response element (CRE) などの cis-acting element が含まれている。そこで、我々はこの転写レベルでの抑制がこれらの element を介しているかどうかを検討した。この結果 ET-1 は SRE を活性化し、ヘパリン及びヘパラン硫酸はこの活性化を抑制することが明らかになった。SRE は Ets motif と SRF の結合部位を持っている。Ets motif は extracellular signal-regulated kinase (ERK) によってリン酸化される TCF との結合で知られている。我々はまず、*c-fos* SRE に変異を持つ SRE. L (SRF 結合部位は保たれるが TCF 結合部位は失活している) を用いて、SRF へのヘパリン及びヘパラン硫酸の効果を検討した。ET-1 により SRE. L は活性化されたが、ヘパリン及びヘパラン硫酸はこれに対する抑制効果を有していなかった。この結果より SRE に対する抑制効果は TCF を介していることが考えられた。次に TCF の一つで、*c-fos* SRE に SRF とともに結合することが知られている Elk-1 への作用を検討した。Solid phase kinase assay により ET-1 は Elk-1 をリン酸化し、ヘパリン及びヘパラン硫酸はこのリン酸化を抑制する事が明らかになった。また Elk-1 の上流の ERK への影響を in gel kinase assay により検討したところ、ET-1 により活性化される

ERK はヘパリン及びヘパラン硫酸にて抑制されることが判明した。以上より、ヘパリン及びヘパラン硫酸は ERK の活性化を抑制することにより、Elk-1 のリン酸化を抑制し、*c-fos* SRE の活性化を抑制することが考えられた。一方、CRE に対してはヘパリン及びヘパラン硫酸ともに特に作用を及ぼさなかった。*c-fos* 遺伝子産物である Fos 蛋白質は JUN と結合し、AP-1 を構成することが知られている。またこの AP-1 は TRE に結合し、種々の遺伝子発現を亢進することが報告されており、現在までに心肥大を生じる因子の多くの promoter/enhancer 内に TRE が含まれていることが知られている。我々は TRE に対する効果も検討したところ、ヘパリン及びヘパラン硫酸は TRE の活性化も抑制することが明らかとなった。詳細は不明であるが、*c-fos* 遺伝子産物である Fos 蛋白質の合成を抑制することがこの機序の一つと考えられた。

[考察]

c-fos promoter/enhancer 内の SRE は SRF 及び TCF によって調節されている。すなわち、*c-fos* SRE は TCF の Elk-1 及び SRF の結合によって活性化される。今回の検討でヘパリン及びヘパラン硫酸は TCF 結合サイト及び SRF 結合サイトを持つ *c-fos* SRE に対しては ET-1 による活性化を抑制したが、TCF 結合サイトに変異を導入し、SRF のみ結合する *c-fos* SRE.L に対しては抑制効果を示さなかった。この結果はヘパリン及びヘパラン硫酸が *c-fos* 遺伝子発現を抑制する機序として TCF を抑制することによることを示している。またこの結果はヘパリン及びヘパラン硫酸が非特異的に情報伝達系を抑制するのではないことも示している。実際、ヘパリン及びヘパラン硫酸は ET-1 刺激に伴う ERK の活

性化を抑制することにより、Elk-1 のリン酸化を抑制し、この結果 *c-fos* 遺伝子の発現を抑制する機序が明らかにされた。

以前の報告ではヘパリンによるアンギオテンシン II の刺激による心肥大に対する抑制効果は少なくともアンギオテンシンレセプターレベルでの作用ではないとしているが、それ以上の詳細な検討はなかった。我々はヘパリン及びヘパラン硫酸が ET-1 の ET-1 レセプターに対する結合に関して、抑制するかどうかの検討は行っていない。しかしながら、ヘパリン及びヘパラン硫酸は *c-fos* SRE、L の活性化及び CRE の活性化を抑制しなかった。この結果はヘパリン及びヘパラン硫酸は ET-1 と ET-1 レセプターの結合を阻害するものではないことを示唆している。

心筋肥大の仕組みは未だ明らかにされていないことが多いが、現在のところ、Ras、Rho、Rac などの低分子量 G 蛋白質、PKC、STAT、PI3 kinase、ERK、calcineurin などの関与が報告されている。我々も以前に ET-1 による心筋肥大には ERK の活性化が重要で、ERK の活性化を完全に抑制することによって ET-1 刺激による肥大心筋のアミノ酸の取り込みを 50% 減少させることを報告した。この結果を考慮すると、本研究によりヘパリン及びヘパラン硫酸が ERK 活性を抑制する作用を介して、アミノ酸の取り込みを抑制し、心筋肥大を抑制したことが考えられる。しかしながら、今回の検討では ERK 以外の情報伝達系への関与に関しては不明である。今後ヘパリン及びヘパラン硫酸による心筋肥大抑制の機構をさらに明らかにしていく事が心肥大の治療への応用を考慮する上でも重要と考えられる。我々はまた、ヘパリン及びヘパラン硫酸は ET-1 による TRE の活性化を抑制することも示した。この結果は promoter/enhancer 内

に TRE を有する他の遺伝子の発現を抑制する可能性も示唆している。TRE の活性化により制御されている遺伝子発現の亢進は心筋肥大において重要な役割を果たしていることが示唆されており、ヘパリン及びヘパラン硫酸は *c-fos* SRE の活性化の抑制のみならず、TRE の活性化の抑制を通じて、心筋肥大を制御する可能性が示された。

[まとめ]

ヘパリン及びヘパラン硫酸は心筋細胞において、ET-1 刺激による ERK の活性化を抑制し、*c-fos* 遺伝子の発現を抑制した。ERK の阻害とそれに引き続き起こる *c-fos* 遺伝子発現の抑制はヘパリン及びヘパラン硫酸の阻害作用の一つであると考えられる。本研究によりはじめて、心筋細胞肥大の情報伝達系への影響が明らかにされ、ヘパリン及び生体内のヘパラン硫酸は心筋細胞肥大の負の調節機構として働く可能性が示された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1360 号	氏 名	水谷和郎
論文題目	Heparin and Heparan sulfate inhibit extracellular signal-regulated kinase activation and myocardial cell hypertrophy induced by Endothelin-1 ヘパリンとヘパラン硫酸は ERK 抑制を介してエンドセリン刺激による心筋細胞肥大を抑制する。		
審査委員	主 査 伊東 宏 副 査 横山 光宏 副 査 堀田 博		
審査終了日	平成 13 年 2 月 28 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

[緒言]

心肥大は心不全へ移行する可能性を有しており、致死的な独立した危険因子の一つである。それゆえに心肥大の進行を抑制することは重要な課題の一つである。心肥大は様々な要因、すなわち、機械的刺激、エンドセリン-1(ET-1)やアンギオテンシン II などの G 蛋白共役因子、cardiotropin-1 や Leukemia Inhibitory Factor などのサイトカインによって引き起こされる。しかしながら、心肥大の進行を抑制する内的因子に関しては現在のところ詳細は不明である。

[方法及び材料]

ラットの培養心筋細胞を用い、心筋細胞肥大の指標の一つである蛋白合成の亢進は $[^3\text{H}]$ ロイシンを用いたアミノ酸の取り込みにより、*c-fos* mRNA の発現はノザンブロットティング法、*c-fos* promoter/enhancer の活性化の指標には luciferase assay、CAT assay 法を用い、また Elk-1 のリン酸化に関しては solid phase kinase assay、ERK の活性化には in gel kinase assay を用いて検討を行った。

[結果]

ヘパリン及びヘパラン硫酸は心筋細胞において、ET-1 刺激による ERK の活性化を抑制し、*c-fos* 遺伝子の発現を抑制した。ERK の阻害とそれに引き続き起こる *c-fos* 遺伝子発現の抑制はヘパリン及びヘパラン硫酸の阻害作用の一つであると考えられる。本研究によりはじめて、心筋細胞肥大の情報伝達系への影響が明らかにされ、ヘパリン及び生体内のヘパラン硫酸は心筋細胞肥大の負の調節機構として働く可能性が示された。

本研究者は肥大心について *c-fos* mRNA の動態を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった *c-fos* 遺伝子の発現抑制について研究し、重要な知見を得たもの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ものと認める。