



Ral gdp dissociation stimulator and ral gtpase are involved in myocardial hypertrophy

河合, 美樹

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-09-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2885

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002885>

※ 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。



【 1 3 5 】

氏 名 ・(本 籍) 河合 美樹 (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1530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15年9月30日

【 学位論文題目 】

Ral GDP Dissociation Stimulator and Ral GTPase are
involved in myocardial hypertrophy
(Ral GDP Dissociation Stimulator と Ral GTPase は
心肥大に関与する)

審 査 委 員

主 査 教 授 横山 光宏

 教 授 中村 俊一

 教 授 大北 裕

緒言

心臓は様々な心血管疾患により起こるストレスに対し、肥大することで適応する。しかしながら、過度の肥大は心臓の適応状態を破綻させ、心不全への移行につながると考えられている。心肥大とは個々の心筋細胞が大きくなることであり、その細胞内情報伝達を解明することは、心疾患の病態解明や治療開発に繋がる大きな意義がある。

small G 蛋白の一つである Ras は、肥大の過程で重要な役割を果たしている。Ras の主なエフェクター分子は Raf、PI3 kinase、Ral-GEF であり、前二者については心肥大における様々な役割が報告されているが、Ral-GEF を介する経路については今だ明らかな報告はない。

本研究の目的は、心肥大において、Ral-GEF の一つである Ral GDP Dissociation Stimulator (Ral-GDS) とその下流のエフェクター分子である Ral GTPase (Ral) がどのように心肥大の情報伝達に関与するかを解明することである。

方法

新生児ラット培養心筋細胞を使用し以下の実験を行った。遺伝子の転写活性は Ral-GDS と活性型 Ral (RalG23V)、不活性型 Ral (RalS28N)、活性型 Ras (RasG12V)発現ベクターおよび *c-fos*、骨格筋 α アクチン(α -SkA)、 β ミオシン重鎖(β -MHC)のルシフェラーゼ遺伝子を心筋細胞にリン酸カルシウム法で導入し、4 8時間後に細胞を回収しルシフェラーゼ活性を測定し評価した。また同じ方法で RalG23V を導入し蛍光免疫染色法で導入あるいは非導入心筋細胞の細胞表面積を評価した。心筋細胞刺激後の Ral-GDS 発現は mRNA

量をノーザンブロット法で評価した。Ral 活性は活性型 Ral のみに接着する蛋白を作成し、pull down 法で細胞溶解液中の活性型 Ral を回収し、ウエスタンブロット法で評価した。生体内での心肥大時に Ral が活性化されているか検討するためラット圧負荷心肥大モデルを作成した。8 週齢ラットに腹部大動脈縮窄術あるいは偽手術を行い1週間後心臓を摘出し Ral の活性等を検討した。

結果

1. 心筋細胞で Ral-GDS と活性型 Ral が *c-fos*、 α -SkA、 β -MHC の転写活性を亢進する。

心筋細胞は肥大する際、特異的遺伝子の転写活性亢進(癌原遺伝子の *c-fos* や胎児型遺伝子の α -SkA、 β -MHC)を認める。Ral-GDS や Ral が肥大に関与するかルシフェラーゼ法で検討した。Ral-GDS および RalG23V 発現ベクターを心筋細胞に導入すると、転写活性は上昇した。これに RasG12V を共導入すると、相乗的な活性の上昇を認めた。

2. 活性型 Ral を導入した心筋細胞は肥大する。

次に活性型 Ral が心筋細胞を肥大させるか、RalG23V を心筋細胞に導入し、蛍光免疫染色法で検討した。RalG23V 導入心筋細胞の細胞表面積は非導入細胞やコントロールベクター導入細胞に比べて増大していた (2.1 倍)。

3. CT-1 は Ral-GDS の mRNA の発現を亢進し Ral を活性化

する。
次に種々の肥大刺激で Ral-GDS 発現は上昇するか検討した。生理的濃度のフェニレフリン、アンジオテンシン II、カルジオトロピン-1 (CT-1)で心筋細胞を刺激し mRNA 発現

を評価した。CT-1 においてのみ Ral-GDS の mRNA 発現は増加し、濃度依存性の発現上昇を認めた。また CT-1 刺激で Ral の活性化が起こることも認められた。CT-1 は IL-6 サイトカイン類の一つで JAK/STAT3 経路を介し心肥大を引き起こすと報告されている。Ral-GDS の mRNA の発現が STAT3 活性により制御を受けるか検討した。アデノウイルスにより不活性型の STAT3 を強発現させることで STAT3 のリン酸化を阻害すると、CT-1 刺激による Ral-GDS の mRNA の発現亢進は抑制された。しかし、Ras の活性化を阻害する FTI-277 で前処置を行っても、CT-1 刺激による Ral-GDS の mRNA の発現亢進は抑制されなかった。

4. 圧負荷心肥大の心臓で Ral の活性は上昇する。

生体で心肥大時に Ral の活性が上昇するか、8 週齢ラットに腹部大動脈縮窄術（心肥大群）あるいは検討するため偽手術（コントロール群）を施行し、1 週間後に心臓を摘出し Ral 活性を測定した。Ral 活性は心肥大群で亢進し、コントロール群に比較し 2.1 倍の上昇を認めた。また心肥大群では CT-1 の発現亢進と STAT3 のリン酸化の亢進を認めた。

考察

本研究で Ral-GDS/Ral を介する経路は心肥大の情報伝達に関与することが明らかとなった。Ral-GDS/Ral 経路の活性化は心肥大遺伝子の転写亢進を引き起こし、この場合、特に活性型 Ras と協調して働くことが示された。活性型 Ral を強制発現させると培養心筋細胞の細胞表面積は増大し、この経路の重要性が示された。また、サイトカインのカル

ジオトロピン-1 で Ral-GDS は発現が上昇し、Ral は活性化され、Ral-GDS 発現経路には STAT3 のリン酸化が必要であることが示された。ラットの心肥大モデルでは肥大時に報告 Ral-GDS/Ral 経路の活性化が起こることが示された。以上の結果から、Ral-GDS/Ral 経路は心肥大に関与することが示された。

まとめ

Ral-GDS/Ral 経路は心肥大の情報伝達に関わることを示した。Ral-GDS/Ral 経路は Ras の下流で遺伝子の転写活性を亢進し、サイトカインで発現や活性の調整を受け、生体の心肥大モデルでもこの経路が活性化されていることから、様々な心肥大刺激に関与する可能性が示された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1531号	氏名	河合 美樹
論文題目	Ral GDP Dissociation Stimulator and Ral GTPase are involved in myocardial hypertrophy Ral GDP Dissociation Stimulator と Ral GTPase は心肥大に関与する		
審査委員	主 査 伊山 光彦 副 査 中村 俊一 副 査 大井 裕		
審査終了日	平成 15 年 6 月 24 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

心臓は様々な心血管疾患により起こるストレスに対し、肥大することで適応する。しかしながら、過度の肥大は心臓の適応状態を破壊させ、心不全への移行につながると考えられている。心肥大の細胞内情報伝達を解明することは、心疾患の病態解明や治療開発に繋がりが大きな意義がある。

small G 蛋白質の一つである Ras は、肥大の過程で重要な役割を果たしている。Ras の主なエフェクター分子は Raf、PI3 kinase、Ral-GEF であり、前二者については心肥大における様々な役割が報告されているが、Ral-GEF を介する経路については今だ明らかな報告はない。

本研究の目的は、心肥大において、Ral-GEF の一つである Ral GDP Dissociation Stimulator (Ral-GDS) とその下流のエフェクター分子である Ral GTPase (Ral) がどのように心肥大の情報伝達に関与するかを解明することである。以下の結果を得た。

1. 心筋細胞は肥大する際、特異的遺伝子 [癌原遺伝子の *c-fos* や胎児型遺伝子の骨格筋型アクチン (α -SkA)、 β ミオシン重鎖 (β -MHC)] の転写活性亢進を認める。Ral-GDS や Ral が心肥大に関与するかどうかを新生児ラット培養心筋細胞を用いてルシフェラーゼ法で検討した。Ral-GDS および活性型 Ral(RalG23V)発現ベクターを心筋細胞に導入すると、特異的遺伝子の転写活性は上昇した。これに活性型 Ras(RasG12V)を共導入すると、相乗的な活性の上昇を認めた。

2. 次に活性型 Ral が心筋細胞を肥大させるかどうかを RalG23V を心筋細胞に導入し、蛍光免疫染色法で検討した。RalG23V 導入心筋細胞の細胞表面積は非導入細胞やコントロールベクター導入細胞に比べて増大していた (2.1 倍)。

3. 次に種々の肥大刺激で Ral-GDS 発現は上昇するかを検討した。生理的濃度のフェニレフリン、アンジオテンシン II、カルジオトロピン-1 (CT-1)で心筋細胞を刺激し mRNA 発現を評価した。CT-1 においてのみ Ral-GDS の mRNA 発現は増加し、濃度依存性の発現上昇を認

めた。また CT-1 刺激で Ral の活性化が起こることも認められた。CT-1 は IL-6 サイトカイン類の一つで JAK/STAT3 経路を介し心肥大を引き起こすと報告されている。Ral-GDS の mRNA の発現が STAT3 活性により制御を受けるか検討した。アデノウイルスにより不活性型の STAT3 を強発現させることで STAT3 のリン酸化を阻害すると、CT-1 刺激による Ral-GDS の mRNA の発現亢進は抑制された。しかし、Ras の活性化を阻害する FTI-277 で前処置を行っても、CT-1 刺激による Ral-GDS の mRNA の発現亢進は抑制されなかった。

4. 生体内で圧負荷心肥大時に Ral の活性が上昇するかを検討するため、8 週齢ラットに腹部大動脈縮窄術（心肥大群）あるいは偽手術（コントロール群）を施行し、1 週間後に心臓を摘出し Ral 活性を測定した。Ral 活性は心肥大群で亢進し、コントロール群に比較し 2.1 倍の上昇を認めた。また心肥大群では CT-1 の発現亢進と STAT3 のリン酸化の亢進を認めた。

本研究では心肥大に Ral-GDS/Ral を介する経路が関与するかどうか検討した。Ral-GDS/Ral 経路の活性化は心肥大遺伝子の転写亢進を引き起こし、この場合、特に活性型 Ras と協調して働くことが示された。活性型 Ral を強制発現させると培養心筋細胞の細胞表面積は増大し、この経路の心筋肥大における重要性が示された。また、サイトカインのカルジオトロピン-1 で Ral-GDS の発現が上昇し、Ral は活性化され、Ral-GDS 発現経路には STAT3 のリン酸化が必要であることが示された。ラットの心肥大モデルでは肥大時に Ral-GDS/Ral 経路の活性化が起こることが示された。以上の結果から、従来ほとんど行なわれなかった Ral-GDS/Ral 経路が心肥大に関与することが示され、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と認める。