

## 論文の内容の要旨

論文題目 ラットの心臓における間欠的低酸素に誘導される  
オートファジーに関する研究

氏名 前田 秀将

【背景・目的】睡眠時無呼吸症候群（Sleep apnea syndrome: SAS）とは睡眠時に 10 秒以上の呼吸停止（無呼吸）発作を繰り返す症候群であり、その低酸素発作が、心機能に関連していると考えられ、さらに、心臓突然死を誘発すると言われている。また、SAS に関連した突然死事例が法医学解剖に付されることもあり、SAS 患者の突然死メカニズムは重要な研究課題である。

一方、オートファジーは、栄養不足や様々なストレスなどの環境に応じて、細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの一つである。また、生命維持のためのエネルギー源として作用する。

オートファジーではまず、細胞質の一部が隔離膜によって取り囲まれ、オートファゴソームを形成する。次にオートファゴソームの外膜がリソソーム膜と融合し、内容物を分解する。様々な心臓病の中で誘導され、心臓に対し保護的に働くことが知られている。

そこで、本研究は SAS、オートファジー、そして心不全の間の関連を明確にすることを目的とし、Sprague Dawley (SD) ラットを用いて実験研究に取り組んだ。

間欠的低酸素 (intermittent hypoxia: IH) は SAS の病因に重要な役割を持つ。動物実験において、IH 曝露動物が SAS のモデルとして世界的に利用されている。本研究では IH によってオートファジーが亢進されるか否かを検討すべく、オートファゴソームに局在する light chain 3 (LC3)-II が発現するか否かをウエスタンブロッティングを用いて検討した。また、IH に曝露された際の心機能がオートファジーの阻害剤である chloroquine (CQ) および 3-methyladenine (3-MA) により、影響されるか否かを検討した。

### 【仮説および目的】

本研究では睡眠時無呼吸症候群の重要な病因である間欠的低酸素が心機能に対し、負の影響を及ぼし、それをオートファジーが補っているのではないかと仮説を立てた。また、オートファジーには様々なシグナルパスウェイで誘導されるが、ウエスタンブロッティングを用いて調べた。これらの仮説および証明のために、SD ラットを IH 曝露し、阻害剤投与下において、心エコー、血液生化学的変化、ウエスタンブロッティング等を用いて検討した。

### 【材料と方法】

7 週齢のオス SD ラットを酸素濃度が最低 4%、最高 21%、1 日 8 時間、20 サイクル/時間の環境条件に当教室で独自に開発した間欠的低酸素チャンバーを用いて曝露させた。また、常酸素呼吸できる同じ大きさのチャンバーをおき、これをコントロール(C)群とした。照明は 12 時間ごと

にオン-オフとした。また、オートファジー阻害剤群として CQ および 3-MA をそれぞれ、20mg/kg/day および、15mg/kg/day を腹腔内投与した。

心エコーは IH または阻害剤投与前日より、コントロール群も含め 3 週まで週 1 回 M モードを用いて検査した。心拍数、収縮および拡張期の左心室前壁および後壁の厚さ、内径を測定し、評価した。左室内径短縮率も評価した。

心筋サンプリングしたものをすぐに 1mm<sup>3</sup>にカットし、4°Cで 0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.4)、2.5% グルタルアルデヒドで 16 時間固定し、その後 1%四酸化オシmium緩衝液で固定した。エタノールで脱水後、ウラン酢酸とクエン酸鉛で 2 重染色後、電子顕微鏡で評価した。

またホモジネート後、ウェスタンブロッティング法を用いて蛋白分析を行った。

## 【結果】

### 血液生化学、体重および心重量に対するIHとオートファジー阻害剤の影響

C 群と比較して 3 週 IH 曝露ラット(IH)群は低酸素症に起因する赤血球増加およびヘモグロビン、ヘマトクリットの増加を示した。体重は 2 週までグループ間で差はなかったが、3 週目において IH 曝露群で減少した。心重量/体重においては差がなかった。阻害剤単独投与群では MA 群において心重量の低下が見られた。

### IHによるオートファジーの誘導

LC3 は細胞質で合成後、システインプロテアーゼである Atg4 により切断される。その結果生じた LC3-I は、細胞質に拡散し、ホスファチジルエタノールアミンに共有結合すると LC3-II となり、オートファゴソーム膜に繋ぎ止められる。したがって、LC3-II または LC3-II/LC3-I はオートファジーの信頼できるマーカーとして広く使われている。オートファジーを LC3-II を用いて評価すると IH 曝露によって、誘導されることがわかった。また、IH+CQ 群では LC3-II/LC3-I は増加したが、3-MA 群では低下した。電子顕微鏡では IH によってオートファゴソームの増加を確認した。

### IHによって誘導されたオートファジーを抑制することで心筋収縮不全が惹起される

IH3 週目にて、心エコーで心筋収縮能の指標である左室内径短縮率 (left ventricular fractional shortening: FS) を評価すると、C 群、IH 群、CQ 群、MA 群では変化は見られなかったが、IH+CQ 群および IH+3MA 群では徐々に減少する結果が得られた。

### 心筋障害と細胞死

心臓リモデリングは収縮機能障害を引き起こすことが知られているが、心筋組織学検査においてすべての群において、心筋線維化や左室肥厚は見られなかった。しかし、血液生化学検査にお

いてトロポニン T および aspartate aminotransferase (AST)の上昇が見られた。

アポトーシスの指標である caspase-3 cleaved をウェスタンブロット法にて確認したところ、各群において有意な差は見られなかった。トロポニン T の上昇および心収縮力低下の原因としてアポトーシスは影響していないということが示唆された。

#### オートファジー誘導のシグナルパスウェイ

ウェスタンブロット分析によってオートファジー関連シグナリング分子を分析した。IH 群では3週目において p-Akt/Akt(Ser473)の低下が見られたが p-AMPK/AMPK(Thr172)は変化しなかった。また Akt 側にある mTOR(Ser2448)と mTOR(Ser2481)でリン酸化の低下が見られた。また、AMPK 側である mTOR(Thr2446)では変化が見られなかった。

#### ディスカッション

本研究は、SAS の動物モデルを使って、IH によってオートファジーが誘導されることについて書かれた最初の報告である。IH 曝露 3~4 週によって誘発されるオートファジーを抑制すると左室収縮不全が出現し、壊死が起こることが示唆された。

#### IHによるオートファジーの誘導

IH によって LC3II/LC3I は増加し、また、電子顕微鏡によりオートファゴソームが増加することより、IH がオートファジーを誘導されることを確認した。阻害剤 CQ および 3-MA を使用したが LC3II/LC3I が CQ 投与によって増加し、3-MA によって低下した。これは CQ によってオートファゴソーム-リソソームの融合が抑えられ、処理できないオートファゴソームが増加したと考えられる。また、3-MA 投与によってオートファゴソームの形成が阻害したことが考えられる。このことは阻害剤の期待効果と一致した。CQ および 3-MA の IH 曝露していない群において LC3II/LC3I の変化は見られなかった。

#### IHで誘導されたオートファジーを阻害すると心収縮機能は低下する

IH 単独曝露 3~4 週で心機能に影響は認められなかった。しかし、阻害剤投与によって誘導されたオートファジーを阻害すると徐々に FS の低下が認められた。これは誘導されたオートファジーが心臓に対し保護的に働いていると考えることが可能である。オートファジーを抑えた結果に起こる FS の低下の原因を見つけるために組織学的検査を行ったところ心筋の繊維化や肥大は見られなかった。しかし血液生化学検査においてトロポニン T の増加、および AST の軽度増加が見られた。このことから心筋壊死が起こっていることが示唆された。

#### IHで誘導されるオートファジーのシグナルパスウェイ

オートファジーの全般的なレセプターである mTOR にはその上流に AMPK および Akt がある。mTOR のレセプターは Akt 側には mTOR(Ser2448/2481)、AMPK 側には mTOR(Thr2446)があり、

ウエスタンブロット法を用い、評価したところ、mTOR(Ser2448/2481)は低下し、mTOR(Thr2446)は変化しなかった。これらの結果はmTORがAMPKではなくAktの抑制により、抑えられオートファジーが誘導されることが示唆される。

**【結論】** ラット心筋において、IHによってオートファジーが亢進されるかを、オートファゴソームに局在するLC3-IIが発現することで確認した。また、IHに曝露された際、オートファジー阻害剤であるCQおよび3-MAにより心収縮力低下が確認された。IHを介するオートファジーは心筋収縮を維持するが、オートファジーを阻害すると、それに反して、心収縮機能障害を起こすことが示された。また、mTORを中心にオートファジーのシグナルパスウェイをウエスタンブロッティングを用いて検討したところ、Aktの脱リン酸化によってmTORが不活化され、オートファジーが誘導されることが示された。これらの結果から、SASの重要な病因であるIHが心機能に影響を与え、オートファジーがこれを補っていることが確認できた。オートファジーはSASに関連する心臓突然死の重要な役割を担っている可能性がある。