

学位論文
Doctoral Thesis

小胞体ストレス誘導性 CHOP 経路の心臓虚血再灌流傷害形成における役割
(The role of ER stress-induced CHOP-mediated pathway in
development of myocardial ischemia/reperfusion injury)

宮崎 勇次

Yuji Miyazaki

指導教員

小川 久雄 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻循環器病態学

尾池 雄一 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子遺伝学

2011 年度

学 位 論 文

Doctoral Thesis

論文題名 : 小胞体ストレス誘導性 CHOP 経路の心臓虚血再灌流傷害形成における役割
(The role of ER stress-induced CHOP-mediated pathway in development
of myocardial ischemia/reperfusion injury)

著 者 名 : 宮 崎 勇 次
Yuji Miyazaki

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻循環器病態学 小川 久雄 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子遺伝学 尾池 雄一 教授

審査委員名 : 生体機能薬理学担当教授 光山 勝慶
微生物学担当教授 赤池 孝章
心臓血管外科学担当教授 川筋 道雄
代謝内科学担当教授 荒木 栄一

2011 年度

- 目次 -

要旨	3
発表論文リスト	5
謝辞	6
略語一覧	7
1, 研究の背景と目的	9
2, 実験方法	
2-1 実験動物	14
2-2 in vivo 心臓虚血再灌流モデル	14
2-3 虚血領域と傷害領域の評価	15
2-4 エダラボン投与実験	15
2-5 心臓超音波	16
2-6 新生仔マウス由来培養心筋細胞実験	16
2-7 逆転写 PCR 分析	17
2-8 免疫プロット分析	18
2-9 免疫組織化学染色	19
2-10 TUNEL 染色	19
2-11 DHE 染色	20
2-12 統計学的解析	20
3, 実験結果	
3-1 心臓虚血再灌流における ER ストレス応答、並びに CHOP 誘導	21
3-2 CHOP 欠損が虚血再灌流後の心筋傷害に与える影響	23
3-3 CHOP 欠損が虚血再灌流後の心筋細胞アポトーシスに与える影響	25
3-4 CHOP 欠損が虚血再灌流後の炎症反応に与える影響	28
3-5 CHOP 経路の向炎症性活性	31
3-6 虚血再灌流における CHOP 応答性 ER ストレス誘導機序	33
4, 考察	36
5, 結語	43
6, 参考文献	44

要旨

【背景】 急性冠症候群に対する早期再灌流療法が一般的となった現在、心臓虚血再灌流傷害への対応が更なる心筋保護の対象として注目されているが、再灌流傷害のメカニズムと考えられている活性酸素種の産生、細胞内カルシウム濃度の恒常性破綻、炎症は、いずれも細胞における小胞体ストレスの誘因と成り得るため、過剰な小胞体ストレスの結果誘導されるアポトーシスが、病態形成に重要な役割を果たしている可能性が推察される。

【目的】 本研究では、小胞体ストレス誘導性アポトーシスに中心的な役割を担っている転写因子CHOPのノックアウトマウスを用い、心筋虚血再灌流傷害における新たなメカニズムの解明と、再灌流傷害に対する新たな薬剤選択・創薬等を含めた治療戦略に繋がる可能性について検討する。

【方法・結果】 野生型、並びにCHOPノックアウトマウスの心臓を、腹腔麻酔・人工呼吸器管理下に左開胸にて剖出し、心筋虚血を左冠動脈結紮にて50分加えた後、再灌流を結紮解除にて行った。野生型の再灌流心筋では、CHOP mRNAの発現が早期に有意に増加していたが、これはXBP1 mRNAのスプライシングやeIF2 α のリン酸化で代表される小胞体ストレスの誘導を伴っていた。組織学的な心筋傷害サイズは、CHOPノックアウトマウスにおいて著明に抑制され、これはTUNEL陽性を示す心筋細胞数の減少を伴っていた。興味深いことに、CHOPノックアウトマウスの再灌流心筋では、炎症性サイトカイン・ケモカインのmRNAレベルや、再灌流領域への炎症細胞浸潤数で評価した組織炎症も抑制されていた。これに関しては、培養心筋細胞を用いた実験系でも確認した所、LPS刺激に対するIL-6 mRNA誘導は、小胞体ストレスの強力な誘導物質であるthapsigarginとの同時刺激で更に増強したが、これは野生型でのみ認められ、CHOPノックアウトでは認められなかった。最後に、野生型の再灌流心筋においてスーパーオキシドが産生される事、並びに、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンを再灌流直前に静脈内投与することで、有意にこのスーパーオキシドの過剰産生、その後のXBP-1 mRNAのスプライシングやCHOP mRNAの発現が抑制され、更には、組織学的な心筋傷害サイズが抑制される事を確認した。

【考察】 心臓虚血再灌流において、小胞体ストレス誘導性CHOP経路は、少なくとも過剰産生された活性酸素種によって活性化され、心筋細胞のアポトーシスと組織炎症を誘導する事により、心臓虚血再灌流傷害の病態形成に大きな役割を果たしている可能性が示唆された。また、CHOP経路は、特定の環境—炎症病態下—においては、特定の炎症性サイトカインの転写調節を介し、炎症増強作用を示す可能性がある。

【結論】 小胞体ストレス誘導性CHOP経路は、心臓虚血再灌流傷害に対する更なる心筋保護戦略の標的となり得ることが期待される。

Summary

Background: Various pathophysiological stimuli trigger endoplasmic reticulum (ER) stress, and excessive ER stress promotes apoptosis through activating the C/EBP-homologous protein (CHOP)-mediated pathway. However, the direct involvement of the CHOP-mediated pathway in myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury has not yet been demonstrated.

Purpose: To investigate whether and how the CHOP-mediated pathway regulates myocardial I/R injury.

Methods and Results: Wild-type and *chop*-deficient mice were subjected to 50 minutes of left coronary artery occlusion followed by reperfusion. Together with activated ER stress response as assessed by splicing of *x-box binding protein-1* mRNA and phosphorylation of α -subunit of eukaryotic translocation initiation factor-2, expression of *chop* mRNA was rapidly and significantly increased in reperfused myocardium of wild-type mice. *Chop*-deficient mice exhibited markedly reduced injury size after reperfusion compared with wild-type mice, accompanied by a decreasing number of terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling-positive cardiomyocytes. Interestingly, myocardial inflammation, as assessed by expression of inflammatory cytokines and chemokines and numbers of infiltrated inflammatory cells, was also attenuated in *chop*-deficient mice. Moreover, in vitro analysis showed that expression of *interleukin-6* mRNA in response to lipopolysaccharide was further increased by simultaneous stimulation with thapsigargin, a potent ER stressor, in wild-type cardiomyocytes, but not in *chop*-deficient cardiomyocytes. Finally, we found that superoxide was produced in reperfused myocardium, and that intravenous administration of edaravone, a free radical scavenger, immediately before reperfusion significantly suppressed the superoxide overproduction and subsequent expression of spliced *x-box binding protein-1* and *chop* mRNA, followed by reduced injury size in wild-type mice.

Conclusions: The ER stress-induced, CHOP-mediated pathway, which is activated in part by superoxide overproduction after reperfusion, exacerbates myocardial I/R injury by inducing cardiomyocyte apoptosis and myocardial inflammation. This pathway could be a potential target for further cardioprotection against myocardial I/R injury.

発表論文リスト

参考論文

① 関連論文

1. Yuji Miyazaki, Koichi Kaikita, Motoyoshi Endo, Eiji Horio, Mitsutoshi Miura, Kenichi Tsujita, Seiji Hokimoto, Megumi Yamamuro, Takao Iwawaki, Tomomi Gotoh, Hisao Ogawa, Yuichi Oike
C/EBP Homologous Protein Deficiency Attenuates Myocardial Reperfusion Injury by Inhibiting Myocardial Apoptosis and Inflammation.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. Final version accepted on February 3, 2011. (in press)

② その他の論文

1. Y. Miyazaki, H. Kawano, T. Yoshida, S. Miyamoto, J. Hokamaki, Y. Nagayoshi, H. Yamabe, H. Nakamura, J. Yodoi and H. Ogawa
Pancreatic B-cell function is altered by oxidative stress induced by acute hyperglycaemia.
Diabet. Med. 24: 154–160, 2007.
2. Hiroaki Kawano, Toshiaki Yoshida, Yuji Miyao, Jun Hokamaki, Shinzo Miyamoto, Yuji Miyazaki, Yasuhiro Nagayoshi, Hiroshige Yamabe, Hisao Ogawa
The relationship between endothelial function in the brachial artery and intima plus media thickening of the coronary arteries in patients with chest pain syndrome.
Atherosclerosis 195: 361–366, 2007.
3. Kawano, Hiroaki MD, PhD; Nagayoshi, Yasuhiro MD, PhD; Soejima, Hirofumi MD, PhD; Tanaka, Yasuaki MD; Hokamaki, Jun MD, PhD; Miyamoto, Shinzo MD, PhD; Miyazaki, Yuji MD; Yamabe, Hiroshige MD, PhD; Ogawa, Hisao MD, PhD
B-type natriuretic peptide after hormone therapy in postmenopausal women with chest pain and normal coronary angiogram.
Menopause. 15: 352-356, 2008.
4. Mitsutoshi Miura; Koichi Kaikita; Masakazu Matsukawa; Kenji Soejima; Shunichiro Fuchigami; Yuji Miyazaki; Takamichi Ono; Takashi Uemura; Kenichi Tsujita; Seiji Hokimoto; Hitoshi Sumida; Seigo Sugiyama; Kunihiko Matsui; Hiroshige Yamabe; Hisao Ogawa
Prognostic value of plasma von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) antigen levels in patients with coronary artery disease.
Thromb Haemost 103: 623–629, 2010.

謝辞

本研究は、熊本大学大学院医学教育部循環器病態学 小川久雄教授、同分子遺伝学 尾池雄一教授の御指導の下に行いました。研究において多くの御指導を頂きました事にここに深く感謝致します。

研究全般に直接の御指導と御助言を頂きました熊本大学教育学部 後藤知己教授、熊本大学医学教育部循環器病態学 海北幸一講師、同分子遺伝学 遠藤元誉助手に深く感謝致します。

また、CHOP ノックアウトマウスを御提供頂きました大阪大学免疫学フロンティア研究センター 審良静男教授、並びに、多くの御助言・御協力を頂きました熊本大学医学教育部分子遺伝学教室員の皆様に、心より感謝致します。

略語一覧

本論文において以下の略語を用いた。

AAR: area at risk

AARE: amino-acid-regulatory element

AGPC: acid guanidium phenol chloroform

ASK: apoptosis signal-regulating kinase

ATF4: activating transcription factor-4

ATF6: activating transcription factor-6

Bax: Bcl-2-associated X protein

Bcl-2: B-cell lymphoma-2

BH: Bcl-2 homology domain

Bim: Bcl-2-interacting mediator of cell death

BiP: immunoglobulin-binding protein

BNP: brain natriuretic peptide

C/EBP: CCAAT/enhancer-binding protein

CHOP: C/EBP-homologous protein

CHOP^{-/-}: CHOP knockout

d: day(s)

DHE: dihydroethidium

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

(p-)eIF2 α : (phosphorylated) α -subunit of eukaryotic translation initiation factor-2

ER: endoplasmic reticulum

ERAD: ER-associated degradation

ERSE: ER stress response element

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HBSS: Hanks' balanced salt solution

HNE: 4-hydroxynonenal

h: hour(s)

HRP: horseradish peroxidase

Hsc: heat shock cognate protein

IA: injury area

IL: interleukin

IP3: inositol 1,4,5-triphosphate

I/R: ischemia/reperfusion
IRE1: inositol-requiring protein-1
IS: ischemic area
JNK: c-Jun N-terminal kinase
LPS: lipopolysaccharide
LV: left ventricle
LVEDD: LV end-diastolic dimension
LVESD: LV end-systolic dimension
Mac-1: macrophage antigen-1
MAPKKK: mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MCP: monocyte chemoattractant protein-1
MEM: minimum essential medium
MIP: macrophage inflammatory protein-2
NC: negative control(s)
NF- κ B: nuclear factor-kappa B
NI: nonischemic area
NS: no significant difference
PC: positive control(s)
PCR: polymerase chain reaction
PBS: phosphate-buffered saline
%FS: percent fractional shortening
PERK: protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase
ROS: reactive oxygen species
SDS: sodium dodecyl sulfate
SEM: standard error of the mean
SERCA: sarco-endoplasmic reticulum Ca-transporting ATPase
SOD: superoxide dismutase
TG: thapsigargin
TNF: tumor necrosis factor
TTC: triphenyltetrazolium chloride
TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
UPRE: unfolded protein response element
WT: wild-type
(s)XBP-1: (spliced) X-box binding protein-1

1, 研究の背景と目的

小胞体(ER)は、最大の細胞内小器官の1つであり、多くの分泌蛋白や膜蛋白の新規合成、折りたたみ、糖鎖付加やプロセッシング等の高次修飾が行われる主要な場である。様々な生理的病的刺激は、蛋白合成亢進、異常蛋白産生、或いは蛋白処理機能低下を来し、ER内に、折りたたみ不充分、あるいは、折りたたみ異常な蛋白の蓄積をもたらす。この状態をERストレスと呼ぶ。細胞は、このERストレスに対抗すべく、以下のERストレス応答と呼ばれる特定のシグナル経路を活性化する。第一の応答は、新規蛋白合成を抑制することでERへの作業負荷を軽減するための「翻訳抑制」、第二応答は、蛋白折り畳み容量を増強するための「ERシャペロンの転写誘導」、第三の応答は、異常蛋白分解機構の容量を増強するための「小胞体関連分解(ERAD)に関与する因子の転写誘導」であり、これらは何れも、ERにおける恒常性を回復し、細胞を生存させようと試みる、極めて合目的な初期応答である。しかしながら、これでも回復できない程の強い障害を受けた場合、細胞は、最終応答である「アポトーシス」を起こし、障害細胞自身を排除することで組織を保護しようとする。このERストレス誘導性アポトーシスを決定づけるシグナルの一つに、C/EBPファミリーに属する核内転写因子CHOPの誘導があり¹⁻³、これまで、糖尿病、神経変性疾患、脳虚血、更には幾つかの心血管疾患(冠動脈プラーク破綻、圧負荷誘発性心不全)を含めた様々な疾患にて、CHOP誘導性アポトーシスの関与が示されている³⁻⁵。

ここで、ERストレス応答の分子機序につき、若干の説明を加える(図1)¹⁻³。哺乳動物細胞では、ER膜上に3つのストレスセンサー(RERK:リン酸化酵素、ATF6:転写因子、IRE1:RNase)がユビキタスに発現している。これらは何れも小胞体膜貫通型蛋白であり、小胞体内腔・細胞質側ドメインから構成されるが、小胞体内腔ドメインは、ERシャペロンであるBiPとの結合部位を有しており、通常状態では、この結合のため、PERK、IRE1のホモダイマー化、並びに、ATF6のゴルジ装置への輸送が抑制される。しかし、ERストレス環境では、BiPは、蓄積蛋白の折り畳みのため、小胞体内腔ドメインから遊離し、結果として、これらストレスセンサーが活性化される。活性化したPERKは、翻訳開始因子eIF2の α サブユニットをリン酸化し(p-eIF2 α)、第一応答である翻訳抑制を来す一方、逆説的ではあるが、転写因子ATF4をコードするmRNAの翻訳を来し、シス配列AAREを介して、ATF4標的遺伝子の転写を誘導する。BiPが外れたATF6は、ゴルジ装置へ移行し、ゴルジ局在のプロテアーゼ(Site-1 protease, Site-2 protease)によって、そのN末端の細胞質側ドメインが遊離すると、活性型の転写因子ATF6(N)となって核内移行し、シス配列ERSEを介して、第二応答であるERシャペロンの転写誘導、並びに前駆体型XBP-1 mRNAの誘導を来す。IRE1が活性化すると、その細胞質側ドメインに備わるRNase活性によって、前駆体型

XBP-1 mRNAのフレームスイッチ型スプライシングが起こり、活性型の転写因子sXBP-1が産生される。sXBP1はERSEを介して第二応答を来たす他、シス配列UPREを介して、第三応答であるERAD因子の転写を誘導すると考えられている。CHOPのプロモーター領域にも、ERSE, AAREは存在しており、ATF4, ATF6, sXBP-1は全て、CHOPの転写誘導を介し、最終応答であるアポトーシスを誘導する。実際、3つのストレスセンサー経路全てが活性化された場合、CHOP誘導が最大となる事が示されているが⁶、PERKノックアウト細胞や、eIF2(S51A)ノックイン細胞では、ERストレスによるCHOP誘導はほぼ完全に抑制されており^{7, 8}、各経路がCHOP誘導に及ぼす影響には違いがあるのかもしれない。

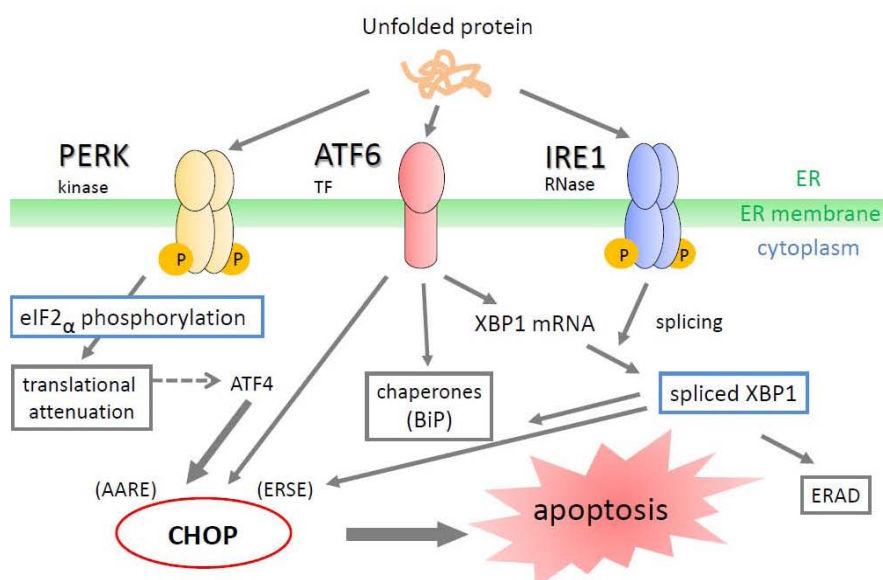


図1 ERストレス応答経路

CHOPは、単にアポトーシスを誘導するだけでなく、p-eIF2αの脱リン酸化に作用するgrowth arrest and DNA damage-inducible protein-34 (GADD34) や、ER内レドックス制御に作用するER oxidoreductin 1 (ERO1)を誘導することで、翻訳抑制の早期解除や、過剰な酸化修飾を来たし、結果として、ER内の蛋白蓄積促進、つまり、元々のERストレスを増悪させる側面も持ち併せており⁹、これらの誘導には、アポトーシス応答を不可逆的なものとする意図が感じられる。ただ、CHOP誘導性アポトーシスの機序については、少なくとも一部は、何らかのBcl-2阻害機構に続くミトコンドリア依存性アポトーシスと考えられているが(Bcl-2阻害機構の詳細は、結果・考察の項に譲る)^{5, 10-12}、この場合でさえ、CHOP誘導からBcl-2阻害に至る、途中のシグナル伝達機序については未だ不明のままである。

厚生労働省発表の「平成21年人口動態統計の概況」によると、心疾患(高血圧性を除く)は、本邦における死因のうち、悪性新生物に次いで第2位(18万745人, 15.8%)に位置し、このうち急性心筋梗塞は23.9%であった。医学の進歩により、急性心筋梗塞の救命率は上昇しているといえど、依然として高率であると言える。

現在、急性心筋梗塞の臨床において、血栓溶解療法や経皮的冠動脈形成術による早期再灌流療法は、その後の梗塞サイズ縮小と臨床転帰改善に、絶大な効果をもたらす治療戦略として、本邦でも広く普及しているが¹³、1960年、Jenningsらが、再灌流後心筋における組織学的変化を報告して以降¹⁴、冠血流の回復が、逆に、更なる細胞障害—心臓虚血再灌流傷害(致命的再灌流傷害)—を来し(図2)、早期再灌流療法の効果を減弱している可能性が認識されるようになり、近年、その対策に注目が集まっている¹³。

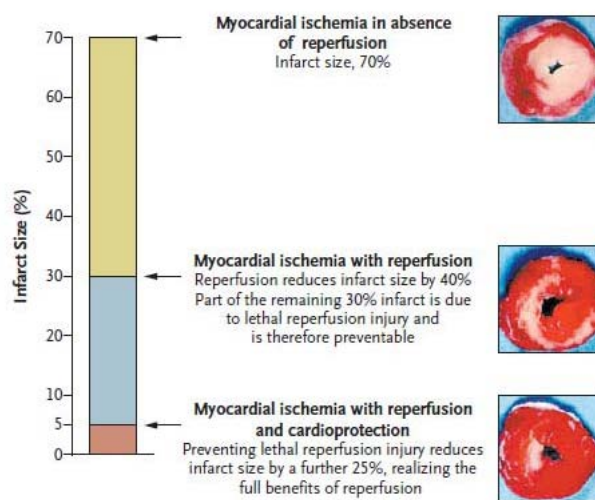


図2 虚血再灌流傷害の概念

虚血再灌流傷害の評価に際しては、これを虚血そのものによる傷害とは異なる独立した細胞障害性要因として捉える必要がある。ただ、心筋虚血から再灌流に至る過程における壊死進展の様子を直接検出することは不可能である。従って、再灌流開始時に追加した何らかの心保護操作により、更に心筋梗塞サイズが縮小する現象として検討するのが、現時点では最も信頼性の高い手段とされている。

心臓虚血再灌流傷害の形成に影響を及ぼしうる因子として、ROS産生、細胞内Ca濃度不均衡、急激なpH回復、及び炎症が挙げられている¹³(図3)。ROSは、ミトコンドリア電子伝達系再酸素化、(主に内皮細胞における)キサンチンオキシダーゼ活性化、これらに数時間遅れて、(主に好中球における)NADPHオキシダーゼ活性化によって産生され、ミトコンドリアPTP開口、筋小胞体機能障害とこれに続くCa過負荷、酵素不活化、脂質過酸化による細胞膜障害、DNA障害、好中球遊走によって心筋細胞死をもたらす。Ca過負荷は、筋線維鞘障害、ROSによる筋小胞体機能障害、Na(out)-Ca(in)交換輸送体によって起こり、ミトコンドリアPTP開口、筋過収縮を来し心筋細胞死をもたらす。急激なpH回復は、再灌流による乳酸洗い出し、Na(in)-H(out)交換輸送体・Na(in)-HCO₃(in)共輸送体によって起こり、ミトコンドリアPTP開口、筋過収縮を来し心筋細胞死をもたらす。好中球は、ROS・サイトカイン・補体等の遊走因子に反応して梗塞領域へ集族し、接着因子を介して心筋組織へ侵入後、微小血管閉塞、消化酵素分泌、NADPHオキシダーゼによるROS産生によって、心筋細胞死をもたらす。

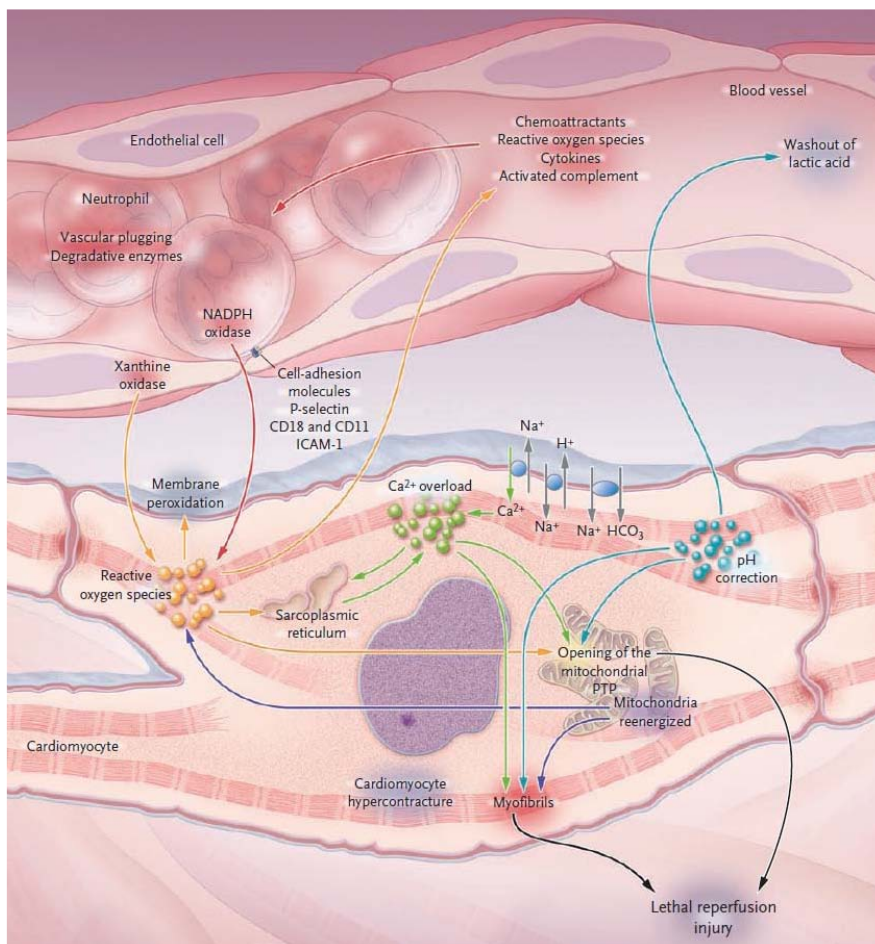


図3 虚血再灌流傷害の形成に影響を及ぼす因子と相互作用

以上の様に、これらの因子は相互作用して心筋細胞死を誘導する訳だが、このうちの幾つかは、上述したERストレスの誘因とも考えられている^{2, 3, 15-18}。実際、幾つかの研究にて、げっ歯類の心臓虚血再灌流モデルにおいて、ERストレス応答が活性化されている事が示されている¹⁹⁻²²。更に、ERストレスセンサー蛋白の一つであるATF6を過剰発現させると、CHOPを除く、多数のERストレス応答に関与する遺伝子が誘導された結果、再灌流障害に対する保護効果を示した¹⁹。また、prolyl hydroxylase (PHD) 阻害により、事前にERストレス応答を全体的に活性化しておく、再灌流後の心筋細胞アポトーシスが軽減したが、これは、CHOP発現レベルの低下を伴っていた²⁰。一方、 δ -protein kinase C (δ PKC) 阻害、またはグレリンにより、ERストレス応答を全体的に不活化した場合も、再灌流後の傷害サイズ、または心筋細胞アポトーシスは、それぞれ軽減した^{21, 22}。以上、ERストレスは、心臓虚血再灌流傷害を、軽減したり増悪したりと、その制御様式は不定であり、これは恐らくは、ERストレス応答のうち、生存応答と、CHOP誘導性アポトーシス応答のバランスによって、決定づけられるためであると予想されるが、現時点におけるER stressの問題点である、生存応答からアポトーシス応答への移行機序が未だ明らかとなっていない点、ERストレスによるアポトーシス誘導経路には、CHOP経路以外にも、複数存在する点を考慮した場合³、それぞれの経路が、どの程度、虚血再灌流傷害の病態完成に影響を与えているか明らかにする事は重要である。

本研究では、心臓虚血再灌流におけるERストレス応答につき、in vivo モデルを用いて詳細に検討した上で、特に、CHOP経路が、心臓虚血再灌流傷害の病態完成に与える影響と、その機序を、CHOP遺伝子欠損マウスを用いて、明らかにすることを目的とした。

2, 実験方法

2-1 実験動物

CHOP^{-/-}マウスは遺伝子改変法により作成され²³、C57BL/6J 系統と6回以上バッククロスが行われた。WT マウスは、日本 CLEA より購入した、遺伝子背景の同じマウス(C57BL/6J)を使用した。実験プロトコールは、熊本大学動物実験委員会の承認を受け、全ての手技は、日本学術会議が策定した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に則って行われた。実験に使用したマウスは全て8~12週齢の雄とした。

2-2 in vivo 心臓虚血再灌流モデル

マウスの麻酔は、ペントバルビタール(70mg/kg)腹腔内注射にて行った。気管内チューブを挿入し、げっ歯類用の従量式人工呼吸器(Shinano, Japan)にて陽圧換気を開始した。右側臥位左肋間開胸にて心臓を露出した後、8-0 プロリン糸を左房下縁のレベルで左冠動脈前下行枝の下を通過させ、心表面に置いたゴム製のチューブと共に結紮することで心筋虚血を加えた。心筋虚血の確認は、結紮部以遠の心筋色調変化(赤→白)、及び心電図上の持続性 ST 上昇にて行った。50分の虚血の後、結紮糸を緩め、左前下行枝の再灌流を得た。再灌流の確認は、虚血心筋の色調回復、及び心電図上のT波陰転化にて行った。肋間閉胸は6-0プロリン糸にて、皮膚縫合は5-0絹糸の連続縫合にて行った。自発呼吸の回復後、気管内チューブを抜去し、マウスが完全に覚醒するまで、37°C温熱パッド上で安静とした。sham ope 群では、左前下行枝の結紮以外は、同様の処置を行った。心筋サンプルの採取は、5% Evans blue 染色液静脈内投与後の視覚所見に基づき、虚血心筋・正常灌流心筋を区別して行った²⁴。

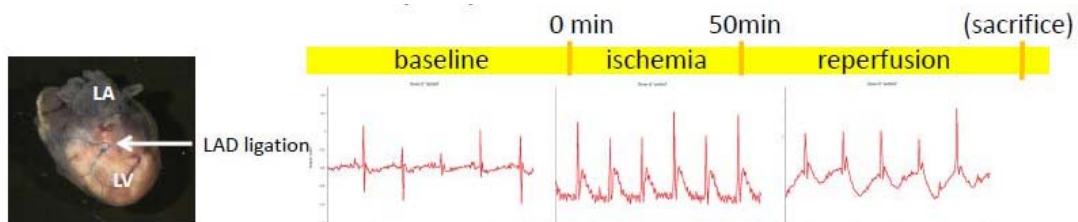


図4 左冠動脈結紮部、及び心電図変化

2-3 虚血領域と傷害領域の評価

再灌流終了時、ペントバルビタール(70mg/kg)腹腔内注射にて麻酔後、再開胸を行った。留置していた糸を再結紮後、5% Evans blue 染色液を眼窩静脈叢より注入し、心筋灌流させた。Evans blue 染色部は正常灌流領域に、非染色部は虚血領域(AAR)に相当する。心臓摘出後、LVを心尖部から心基部にかけて、短軸方向に5等分し、37°Cの1% TTC 染色液中で、10分間インキュベーションした。TTC 非染色部は傷害領域(IA)に相当する。最後に、全スライスをデジタルカメラ(Olympus, Camedia C-5060, Japan)で撮影し、各スライスの重量測定を行った。画像処理に際しては、まず、Image J(1.38x)を用いて、スライス毎にIA、AAR、LV各領域の面積を計測し、IA/LV比、AAR/LV比を算出後、スライス重量を乗じることで、1スライス当たりのIA重量、AAR重量を求めた。次に、各スライスのIA重量、AAR重量をそれぞれ加算し、総AAR重量に占める総IA重量の割合(IA/AAR)を傷害サイズと定義し、LV重量に占める総AAR重量(AAR/LV)を虚血サイズと定義した。

TTC/Evans blue staining :

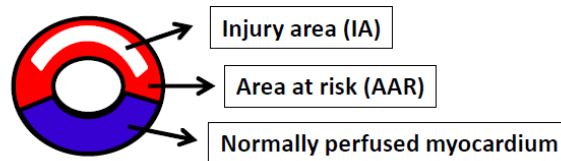


図5 傷害領域(IA)、虚血領域(AAR)、非虚血領域の判別

2-4 エダラボン投与実験

エダラボン(3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one)は、日本で、急性脳梗塞に対する治療適応を有し、広く臨床使用されている強力なフリーラジカルスカベンジャーであり²⁵、本研究における使用に際しては、三菱田辺製薬会社(Japan)から承認、並びに薬剤提供を受けた。エダラボンは、取扱指針に従って、1N水酸化ナトリウム溶液にて溶解後、蒸留水で希釈し、最終的に1N塩酸にてpH7.0に調整した。WTマウスをエダラボン投与群、生食投与群に無作為に割り付け、50分間の心筋虚血の後、再灌流を行った。再灌流5分前に、濃度調整後のエダラボン(1, 3, 5, 10mg/kgを0.1mL生食中に溶解)、または、これと等量の生食(0.1mL)を、眼窩静脈叢へポース投与した。sham ope群では、開胸45分後に生食(0.1mL)をポース投与した。

2-5 心臓超音波

術前の超音波計測は、高周波(12MHz)リニア式プローブ、Xario™ 超音波診断システム (Toshiba Medical Systems, Japan)を用いて行った。マウスの麻酔をペントバルビタール(30mg/kg)腹腔内注射にて行った後²⁶、体位を軽い左側臥位に固定し、温熱パッド上で正常体温(37°C)に維持した。左胸部の除毛は、機械的・化学的に行った。LVの傍胸骨長軸像、短軸像をプローブ操作にて観察後、短軸像の乳頭筋レベルにてMモード計測を行った。左室前壁厚・後壁厚、及び左室拡張末期径(LVEDD)・収縮末期径(LVESD)は、米国心エコー図学会が推奨する leading edge 法に則って測定した。左室内径短縮率(%FS)は、 $[(LVEDD - LVESD)/LVEDD] \times 100$ にて算出した²⁷。

2-6 新生仔マウス由来培養心筋細胞実験

心筋細胞培養は、以前の報告に若干の変更を加えて行った²⁸。生後3~4日の新生仔マウスを、頸椎脱臼にて安楽死させた。心臓を摘出し、心室のみとした上で、氷上、Ca/Mg free HBSS (Invitrogen)中で洗浄後、細切した。心室由来細胞の分散は、37°Cの 3mg/dL collagenase type II (Invitrogen)溶液中で、軽く振盪を加えつつ15分間インキュベーションし、更に、ピペッティング操作を加えることで行った。単離細胞を、1000rpm、5分間遠心にて回収後、非動化ウシ胎仔血清(最終濃度 10%)、ペニシリン(100U/mL)、ストレプトマイシン(100µg/mL)、MEM 非必須アミノ酸溶液(1%)、インスリン-トランスフェリン-セレンウム-X 溶液(1%)を添加した、DMEM/F12からなる培地に懸濁した(Invitrogen)。非心筋細胞の除去を、90分間の pre-plating 法にて行い、その後、心筋細胞を、上記と同じ方法で、回収、懸濁し、ゼラチンコート 35mm ディッシュ(Asahi glass, Japan)上に播種し、37°C、5% CO₂でインキュベーションを開始した。48時間後、培地を無血清培地に置換し、実験に使用するまで、更に24時間のインキュベーションを加えた。培養心筋細胞には、以下の何れかの刺激を加えた。(1)大腸菌由来 LPS 単独刺激(最終濃度 10µg/mL)、(2)TG 単独刺激(3µmol/L)、(3)LPS + TG 同時刺激(10µg/mL + 3µmol/L) (Sigma-Aldrich)。コントロールは、溶媒のみの添加とした。これらの刺激操作は全て、無血清培地を、各々の薬剤を含んだ培地に置換し、37°C、5% CO₂で4時間インキュベーションする事で行った。尚、薬剤の投与量、及び刺激時間は、各々、以前の報告^{29, 30}、及び、予備実験の結果—CHOP mRNA 発現レベルが有意に増加し、かつ、TNF-α mRNA 発現レベルがピークとなった時間—に基づき設定した。

2-7 逆転写 PCR 分析

再灌流終了時、心臓を摘出し、液体窒素にて速やかに凍結後、 -80°C で保存した。組織、及び培養細胞からの全RNA抽出は、TRIzol Reagent^R(Invitrogen)を用いた、所謂、チオシアン酸グアニジン-フェノール-クロロホルム法 (AGPC法)にて行い³¹、相補的DNA (cDNA)の合成は、PrimescriptTM RT reagent Kit (Takara Bio, Japan)を用いて、取扱指針に従って行った。リアルタイムPCRは、Thermal Cycler Dice^R Real Time System (Takara Bio, Japan)を用いてインターカレーション法にて行い、その際、SYBER^R Premix Ex TaqTM II (Takara Bio, Japan)と、CHOP・BNP・Bcl-2・Bax・TNF- α ・IL-1 β ・IL-6・MCP-1・MIP-2 mRNA、並びに18s rRNAの標的配列に対する、特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用した。各プライマー配列を表に示す(表1)。反応条件は、初期変性(95°C , 10秒)を1サイクル、シャトル(2ステップ)PCRは熱変性ステップ(95°C , 5秒)—アニーリング/伸長ステップ(60°C , 30秒)を40サイクルとし、最後にdissociation(融解曲線分析)を追加した。特異性は逆転写酵素、または鋳型cDNAを含まないサンプルにて確認した。対象遺伝子のmRNA発現レベルは、18s rRNAを内因性コントロールとして、標準化した。

XBP1 mRNAの発現分析に際しては、cDNAの合成は、ReverTra Ace- α ^R kit (Toyobo, Japan)を用いて、取扱指針に従って行った。PCRは、GeneAmp^R PCR System 9700 (Applied Biosystems, Japan)を用いて行い、その際、Ex Taq^R (Takara Bio, Japan)と、XBP1・GAPDH mRNAの標的配列に対する、特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用した。各プライマー配列を表に示す(表1)。反応条件は、初期変性(94°C , 5分)を1サイクル、PCRは熱変性ステップ(94°C , 30秒)—アニーリングステップ(55°C , 30秒)—伸長ステップ(72°C , 1分)を30サイクルとし、最後に伸長反応(72°C , 7分)を追加した。ERストレス下では、XBP1 mRNAは、ERストレスセンサーIRE1活性化によるスプライシングを受け、転写活性を示すsXBP1が翻訳される³²。XBP1 mRNAに対するプライマーは、理論上、629bpの非スプライス型と、603bpのスプライス型を共に産生するため、今回、この2者を明確に区別する目的で、PCR産物に制限酵素Pst1 (Takara Bio, Japan)を加え、 37°C で2時間インキュベーションした。非スプライス型は、スプライス領域とその後に続く活性領域の間に、Pst1作用部位を一つ有するため同酵素による切断を受けるが、スプライス型はPst1作用部位を含まないためPst1による切断を受けない³³(図6)。最終PCR産物を、1%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色にて紫外線下に可視化した。特異性は逆転写酵素、または鋳型cDNAを含まないサンプルにて確認した。発光強度の定量は、Image J (1.38x)を用いて、densitometry法にて行った。対象遺伝子のmRNA発現レベルは、GAPDH mRNAを内因性コントロールとして、標準化した。

Gene name	GenBank accession No.	Primer sequences (5'-3')		Product size (bp)
		Sense	Antisense	
CHOP	NM_007837	AGCTGGAAGCCTGGTATGAGGA	AGCTAGGGACGCAGGGTCAA	134
Bcl-2	NM_177410	GTGGACAACATCGCCCTGTG	GCCTTGAGATCAAAGCCCAGAC	124
Bax	NM_007527	CAGGATGCGTCCACCAAGAA	GTTGAAGTTGCCATCAGCAAACA	165
TNF- α	NM_013693	AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA	GGCACCCTAGTTGGTTGTCTTTG	122
IL-1 β	NM_008361	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	GAACGTCACACACCAGCAGGTTA	105
IL-6	NM_031168	CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA	GCAAGTGCATCATCGTTGTCATAC	112
IL-10	NM_010548	GACCAGCTGGACAACATACTGCTAA	GATAAGGCTTGGCAACCCAAGTAA	77
MCP-1	NM_011333	GCATCCACGTGTTGGCTCA	CTCCAGCCTACTCATTGGGATCA	95
MIP-2	NM_009140	GCGCTGTCAATGCCTGAAGA	TTTGACCGCCCTTGAGAGTG	126
BNP	NM_008726	ATCGGATCCGTCAGTCGTT	CCAGGCAGAGTCAGAACTGGAG	94
18S	NM_011296	TTCTGGCCAACGGTCTAGA	CCAGTGGTCTTGGTGTGCTGA	127
XBP1	NM_013842	GAAAGCGCTGCGGAGGAAAC	GAGGGGATCTCTAAAAGTAGAGGC	629*
GAPDH	NM_008084	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	452

*unspliced form

表1 PCR分析に用いたプライマー配列

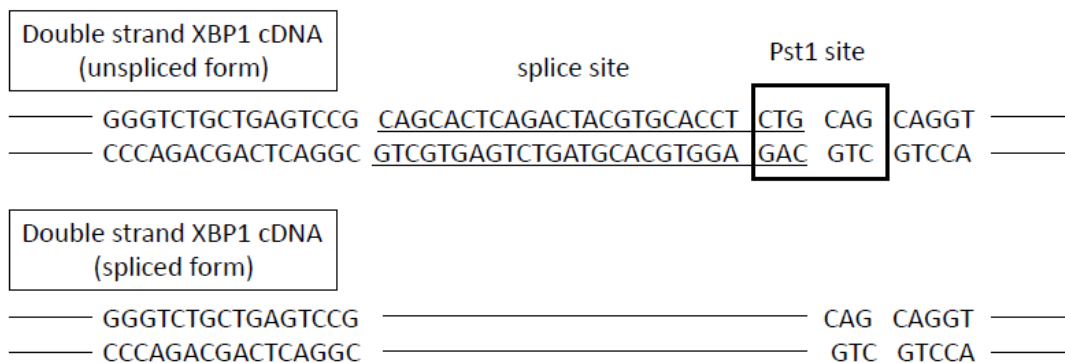


図6 Pst1作用部位

2-8 免疫ブロット分析

抽出後の心臓を、可及的速やかに低温下で、細胞溶解バッファー(300mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 1% Triton X-100:pH7.5)中で破碎した。遠心後、上清中の蛋白を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にて分離し、ニトロセルロース膜へ転写した。目的蛋白の検出は、今回、一次抗体として、phospho-eIF2 α (Ser51)(1:350)(rabbit polyclonal, Cell

Signaling Technology)、BiP(1:350)(rat monoclonal, SANTA CRUZ Biotechnology)に対する特異抗体を、二次抗体として、これに適合したHRP標識抗体(1:1000)(goat anti-rabbit, Cell Signaling Technology; goat anti-rat and sheep anti-mouse, Amersham Biosciences)を用いて、共に室温、60分間反応にて行った。免疫複合体の検出は、ECL Western blotting detection system(GE Healthcare, Japan)を用いた化学発光法にて行い、発光シグナルは、LAS-4000 mini Luminescent image analyzer(v2.0)(FUJIFILM, Japan)を用いて可視化した。サンプル間の蛋白濃度を比較するため、抗体除去後、一次抗体としてHsc70に対する特異抗体(1:000)(mouse monoclonal, SANTA CRUZ Biotechnology)を用いて、再検出を行った。シグナル強度の定量は、Multi Gauge(v3.1)(FUJIFILM, Japan)を用いて、densitometry法にて行った³⁴。

2-9 免疫組織化学染色

摘出・スライスした心臓を、4%パラホルムアルデヒド溶液中で、4°C、4時間固定の後、OCT compound(Sakura Finetech, Japan)中に包埋凍結した。薄切厚は6µmとした。免疫組織化学染色は、酵素抗体法間接法(酵素標識ポリマー法)にて行った。Isobeらの方法に準じて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した後³⁵、一次抗体と室温で60分間反応させた。一次抗体は、マクロファージ検出を目的として anti-CD68(FA-11)(1:500)(rat monoclonal, AbD Serotec, UK)を、好中球検出を目的として anti-Ly-6G(Gr-1)(1:100)(rat monoclonal, Southern Biotech, USA)を用いた。二次抗体反応は、これに適合した HRP ポリマー標識抗体(goat anti-rat, Nichirei, Japan)を用いて、室温、40分間にて行った。3,3'-diaminobenzidine(DAB)発色後、核染色をヘマトキシリンにて7秒間行い、Malinol(Muto Pure Chemicals, Japan)で封入した。染色像の観察は、AH-3 light microscopy(OLYMPUS, Japan)を用いて行った。陰性対照は、一次抗体反応に際して、抗体を含まない抗体希釈液と反応させた。AARにおけるGR-1、及びFA-11陽性細胞数は、倍率400倍にて、1心臓あたり非連続切片3つ中の10視野を無作為抽出して評価し、1mm²あたりの細胞数で表示した。

2-10 TUNEL 染色

2-9同様、摘出・スライスした心臓を固定、包埋、凍結し、薄切は5µmの厚さで行った。浸透化溶液(0.1%クエン酸Na, 0.1%Triton-X 100)中で、氷上、2分間のインキュベーション後、アポトーシスに陥った細胞核を検出するため、TUNEL染色を、*In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR Red(Roche Applied Science, Japan)を用いて、取扱指針に従って行った。続いて、心筋細胞の同定を、一次抗体として、anti-sarcomeric actinin(1:150)(rabbit monoclonal, SANTA CRUZ

Biotechnology)を、二次抗体として、Alexa Fluor^R 488(1:1000)(goat anti-rabbit, Invitrogen)を用いて、各々、室温、60 分間反応にて行った。核は Hoechst 33343(5µg/mL, Invitrogen)にて対比染色した(室温、15 分間)。封入剤はグリセリンを用いた。染色像の観察は、それぞれ TRITC(TUNEL)・GFP(sarcomeric actinin)・DAPI(Hoechst)フィルターを用いて、BZ-9000 fluorescence microscopy(Keyence, Japan)にて行った。AARにおける、sarcomeric actininに囲まれた TUNEL 陽性核数—アポトーシスに陥った心筋細胞数—は、倍率 400 倍にて、1 心臓あたり非連続切片 3 つ中の 10 視野を無作為抽出して評価し、sarcomeric actinin に囲まれた全 Hoechst 陽性核数に占める割合として、百分率表示した。

2-11 DHE 染色

DHE 染色は、スーパーオキシド産生を in situ にて評価する方法である³⁶。DHE は、細胞透過性を有しており、スーパーオキシド存在下に酸化されると、蛍光色素エチジウムブロマイドとなり、DNA 二本鎖内へインターカレートし、紫外線下に発色を示す。

摘出・スライスした心臓を、速やかに OCT compound(Sakura Finetech, Japan)中に包埋凍結した。薄切厚は 7µm とした。切片を、室温に戻し、PBS にて親水化後、5µmol/L DHE(Sigma-Aldrich)溶液を加え、37°C・遮光・湿潤条件下にて、30 分間インキュベーションした。封入剤はグリセリンを用いた。染色像の観察は、TRITC フィルターを用いて、BZ-9000 fluorescence microscopy(Keyence, Japan)にて行った。蛍光像解析は、Lumina Vision(v3.0)(MITANI, JAPAN)を用いて行った。平均蛍光強度の評価は、倍率 200 倍にて、1 心臓あたり非連続切片 3 つ中の 10 視野を無作為抽出して行い、対照群における蛍光強度を基準として相対表示した。

2-12 統計学的解析

全ての統計学的結果は、平均値±標準誤差(mean±SEM)で表示した。2 群間の比較は、Mann-Whitney の U 検定にて行い、多群間の比較は、1 元配置分散分析(1-way ANOVA)の後、Scheffe 法、もしくは Fisher's PLSD 法にて行った。P<0.05 の場合に有意と判定した。

3, 実験結果

3-1 心臓虚血再灌流は ER ストレス応答を介して CHOP 経路を活性化する

心臓虚血再灌流によってCHOP経路が活性化されるかどうか明らかにするため、WTマウスの心臓に、50分間の虚血を左冠動脈結紮にて加えた後、再灌流を結紮解除にて行った。

虚血心筋において、CHOP mRNA は、再灌流後 30 分~2 時間と早期に誘導されたが (sham ope 群に比し約 2.7 倍)、非虚血/正常灌流心筋における同 mRNA の誘導は認められなかった (図 7A)。CHOP 経路は過剰な ER ストレスによって活性化されることが報告されているため¹⁻³、実際、ER 膜上で ER ストレスセンサーとして働く 3 つの主要な膜上蛋白—PERK, ATF6, IRE1—によって開始される ER ストレス応答経路が変化しているかどうか評価した。虚血心筋において、PERK 活性化による eIF2 α のリン酸化は CHOP mRNA 誘導と同時間帯で明らかに検出された (図 7B, 上段、図 7C)。ATF6 活性化による XBP1 mRNA の転写 (総 XBP1 mRNA レベル)、並びに、その後の IRE1 活性化による同 mRNA のスプライシング (sXBP1 mRNA レベル)³² は、二相性の誘導パターンを示し、第 1 ピークは CHOP mRNA 誘導と同時間帯 (再灌流後 2 時間)、第 2 ピークは 1~3 日であった (図 7B, 下段、図 7D-E)。更に、転写因子 sXBP1 の下流で誘導される主要な ER シャペロンの一つ BiP は、その蛋白レベルにおいて、これらよりやや遅れたピークを有す、二相性の発現パターンを示した (各々のピークは、再灌流後 4 時間と 3 日) (図 7F)。

これらの所見は、心臓虚血再灌流が、恐らくは ER ストレス応答を誘導した結果、CHOP 経路を活性化していることを示している。

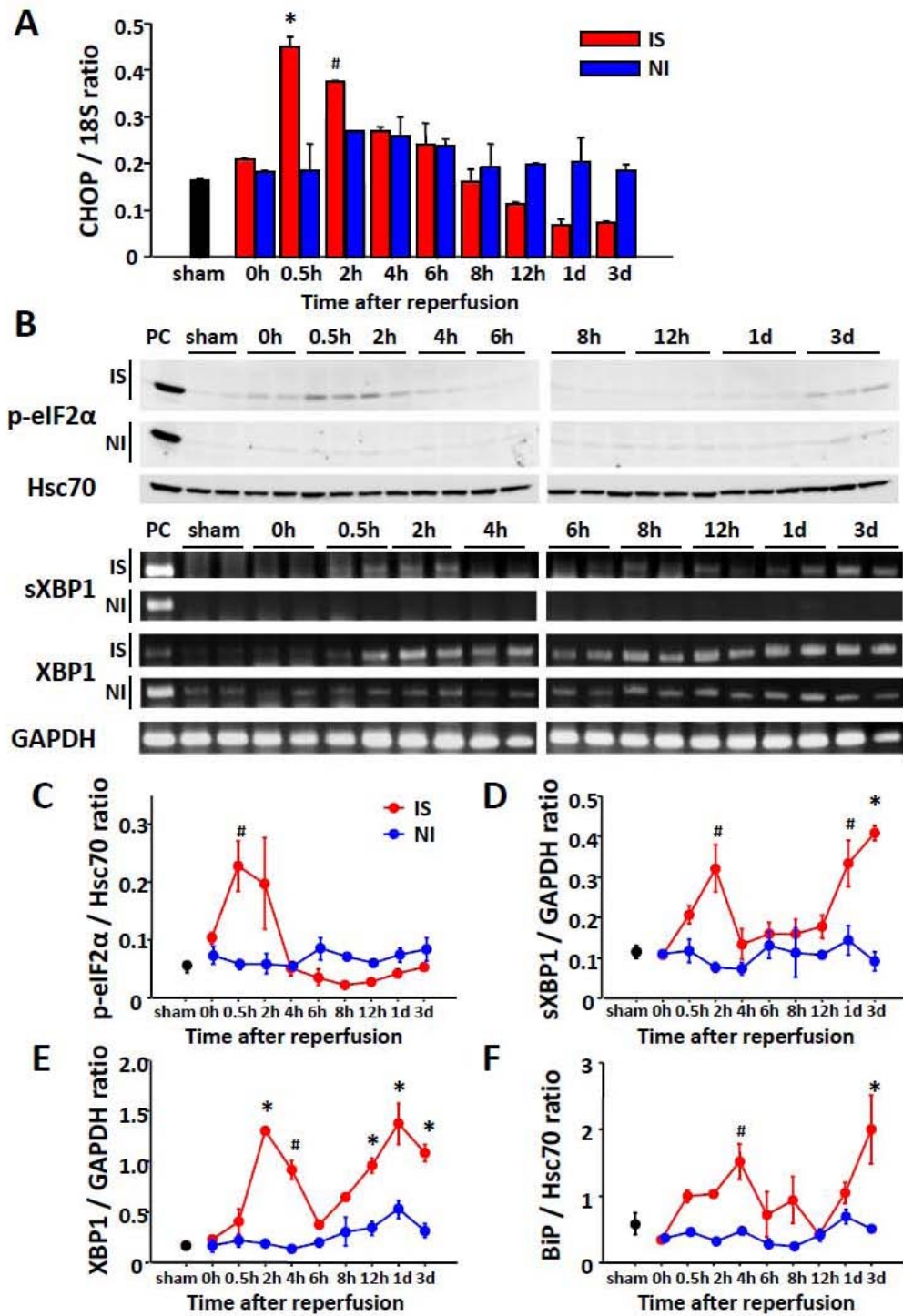


図7 WTマウスにおける、再灌流後のCHOP mRNA, リン酸化eIF2α, spliced/total XBP1 mRNA, BiP 蛋白発現レベルの経時変化 各群n=4 # $p<0.05$, * $p<0.01$ vs sham 群 IS:虚血領域 NI:非虚血領域 PC:陽性対照

3-2 CHOP 欠損は虚血再灌流後の心筋傷害を軽減する

次に、心臓虚血再灌流によって活性化されたCHOP経路が、実際、虚血再灌流傷害形成に寄与しているかどうか明らかにするため、WTとCHOP^{-/-}マウスの心臓に、50分間の虚血を加えた後、8時間および1日の再灌流を行った。これらの再灌流時間の設定は、予備実験において、WTマウスにおける再灌流後の傷害サイズが、8時間後に向かい漸増・ピークを迎え、12時間後に向かい縮小し、以後、定常化した事実に基づいている(図8)。

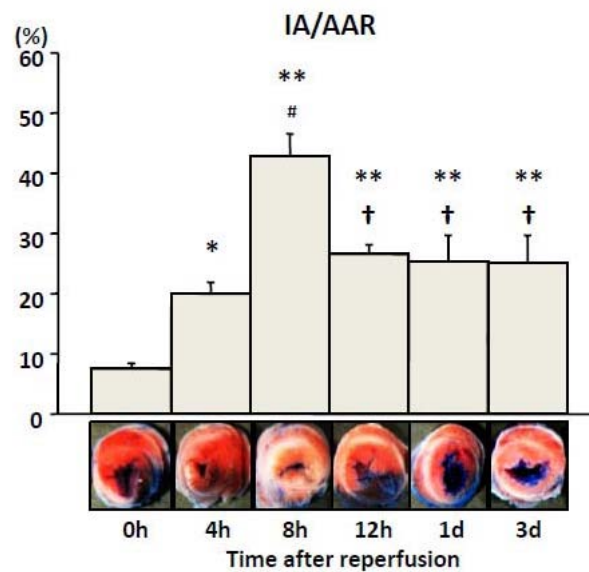


図8 WTマウスにおける、再灌流後の傷害サイズ(IA/AAR)の経時変化(各再灌流時間におけるEvans blue/TTC二重染色像を同時に示す) 各群n=4 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs 再灌流後0時間(50分虚血のみ, 再灌流なし) # $p < 0.01$ vs 再灌流後4時間 † $p < 0.01$ vs 再灌流後8時間

遺伝子背景の異なる両マウス間で、術前の心臓の形態および機能に違いは認められなかった(表2)。TTC染色の結果、再灌流後8時間における心筋傷害サイズ(IA/AAR)は、WTに比しCHOP^{-/-}マウスにて著明に縮小していたが、この違いは再灌流後1日においても依然有意であった(図9A)。尚、両時点における虚血サイズ(AAR/LV)は、両マウス間で同等であった。興味深い事に、両マウスにおいて、8時間から1日に向かい傷害サイズの縮小が確認されたが、その程度はWTマウスでより大きかった。

BNP mRNAは、左室充満圧や壁伸展刺激に応じ心室筋において速やかに合成されるため、

BNPの転写誘導は、生体における循環動態破綻の指標となる³⁷。予備実験において、WTマウスの虚血心筋におけるBNP mRNA誘導は、再灌流後8時間でピークとなり、以後、漸減した(図10)。しかし、この8時間の時点でのBNP mRNA発現レベルは、WTに比し、CHOP^{-/-}マウスにて、より低値であった(図9B)。

これらの結果は、虚血再灌流によって誘導されたCHOP経路は、再灌流後の心臓に、構造的のみならず、恐らくは機能的障害をも、もたらす事を示している。

	WT (n=6)	CHOP ^{-/-} (n=6)
Body weight (g)	23.6±0.2	23.3±0.7
Heart rate (bpm)	544±11	549±7
Heart weight (mg)	116±1	117±4
LV weight (mg)	81±1	83±2
Anterior wall thickness (mm)	0.94±0.02	0.92±0.01
Posterior wall thickness (mm)	0.90±0.03	0.88±0.03
End-diastolic dimension (mm)	3.33±0.02	3.34±0.05
End-systolic dimension (mm)	1.63±0.01	1.69±0.05
Fractional shortening (%)	51.0±0.5	49.6±1.1

Results are shown as mean±SE

表2 術前における心形態・心機能の比較

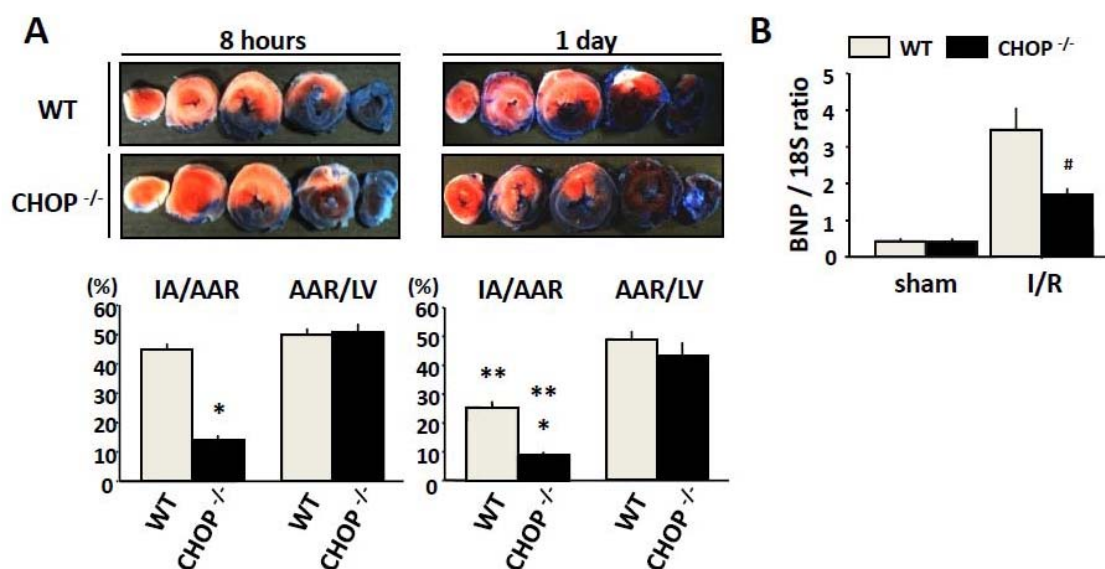


図9 A, 再灌流後8時間、1日における、WT, CHOP^{-/-}マウスの傷害サイズ(IA/AAR)および虚血サイズ(AAR/LV) B, 再灌流後8時間、虚血領域における、WT, CHOP^{-/-}マウスのBNP mRNA発現レベル 各群n=5 #p<0.05, *p<0.01 vs WTマウス虚血再灌流群 **p<0.05 vs 再灌流後8時間(同遺伝子背景マウス間) I/R:虚血再灌流

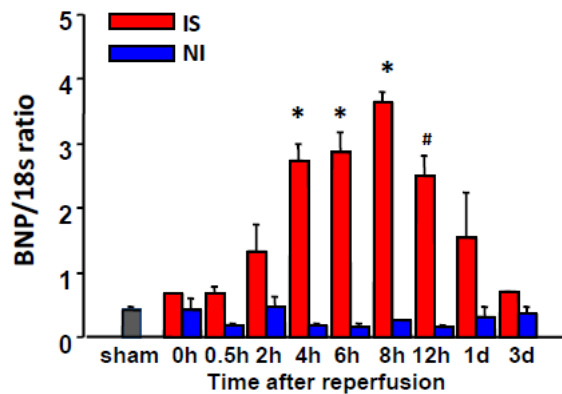


図10 WTにおける、再灌流後のBNP mRNA発現レベルの経時変化

#p<0.01, *P<0.001 vs sham群 IS:虚血領域 NI:非虚血領域

3-3 CHOP欠損は虚血再灌流後の心筋細胞アポトーシスを抑制する

CHOP欠損が心臓虚血再灌流傷害に保護的に作用した機序を調べるため、更に実験を行った。初めに、CHOPはERストレス誘導性アポトーシスの重要な構成因子であるため¹⁻³、TUNEL染色によって、再灌流後の心筋細胞アポトーシスについて評価した。解析に際しては、心筋細胞の骨格蛋白であるα-アクチニンに明瞭に囲まれたTUNEL陽性細胞を、アポトーシスに陥った心筋細胞と定義した。WTマウスにおいて、虚血心筋におけるアポトーシスに陥った心筋細胞は、再灌流後4時間という早期に、その発現が最も顕性化した。以後、8時間までは、発現レベルは一貫して低い状態が維持された(図11)。予想通り、この早い時相において、アポトーシスに陥った心筋細胞の割合は、WTに比しCHOP^{-/-}マウスにおいてかなり低い値を示したが(図12A-B)、その絶対値をみると、WTにおいてさえ、約10%に留まった。

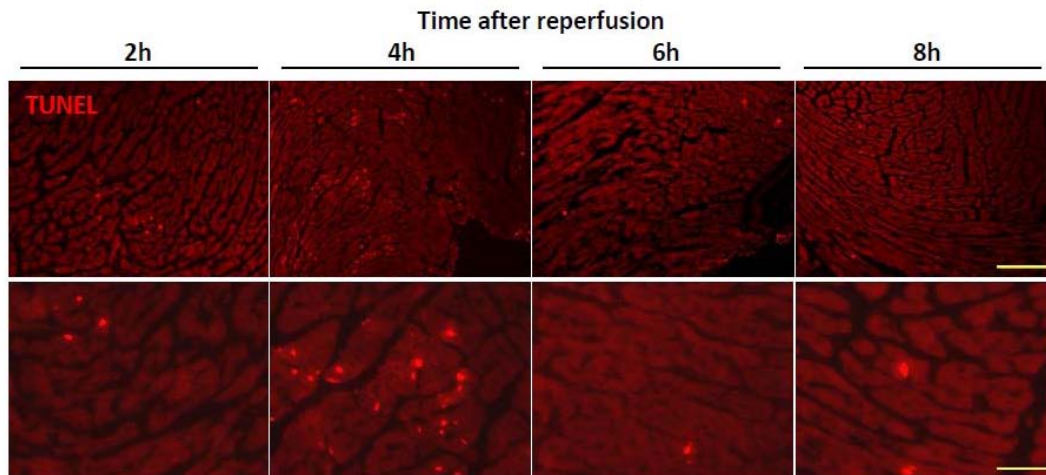


図11 WT における、再灌流後、虚血領域の TUNEL 染色の経時変化 上段:低倍率(黄線 200µm)
下段:高倍率(黄線 50µm)

CHOP は、アポトーシス誘導性蛋白 Bax の発現を上方制御したり⁵、アポトーシス抵抗性蛋白 Bcl-2 の発現を下方制御することによって¹⁰、ミトコンドリア外膜上の Bcl-2 ファミリー蛋白の不均衡をもたらすと考えられているが、この不均衡は、本来、ミトコンドリアからのチトクロム c 放出と、その後のアポトーシス誘導性カスパーゼの活性化に重大な役割を果たしている^{38, 39}。解析の結果、再灌流後 4 時間にて、WT マウスの虚血心筋における Bax mRNA レベルは有意に増加し、Bcl-2 mRNA レベルは低下傾向を示したが、一方、CHOP^{-/-}の虚血心筋における両 mRNA レベルに変化は認められなかった(図12C)。結果として、Bcl-2 と Bax mRNA レベルの比率(Bcl-2/Bax)は、虚血再灌流後に、WT マウスでは減少し、CHOP^{-/-}マウスの虚血心筋では不変であった。

これらの所見は、CHOP 経路が、恐らく、ミトコンドリア依存性アポトーシス経路によって心筋細胞にアポトーシスを誘導している事、並びに、この心筋細胞のアポトーシスが虚血再灌流傷害の形成に寄与している可能性を示唆している。ただ、その絶対的な発現量を考慮した場合、アポトーシスのみでは、WT と CHOP^{-/-}マウス間で認められた心筋傷害サイズの著明な差を完全に説明するのは困難であり、その他のメカニズムの存在を考える必要がある。

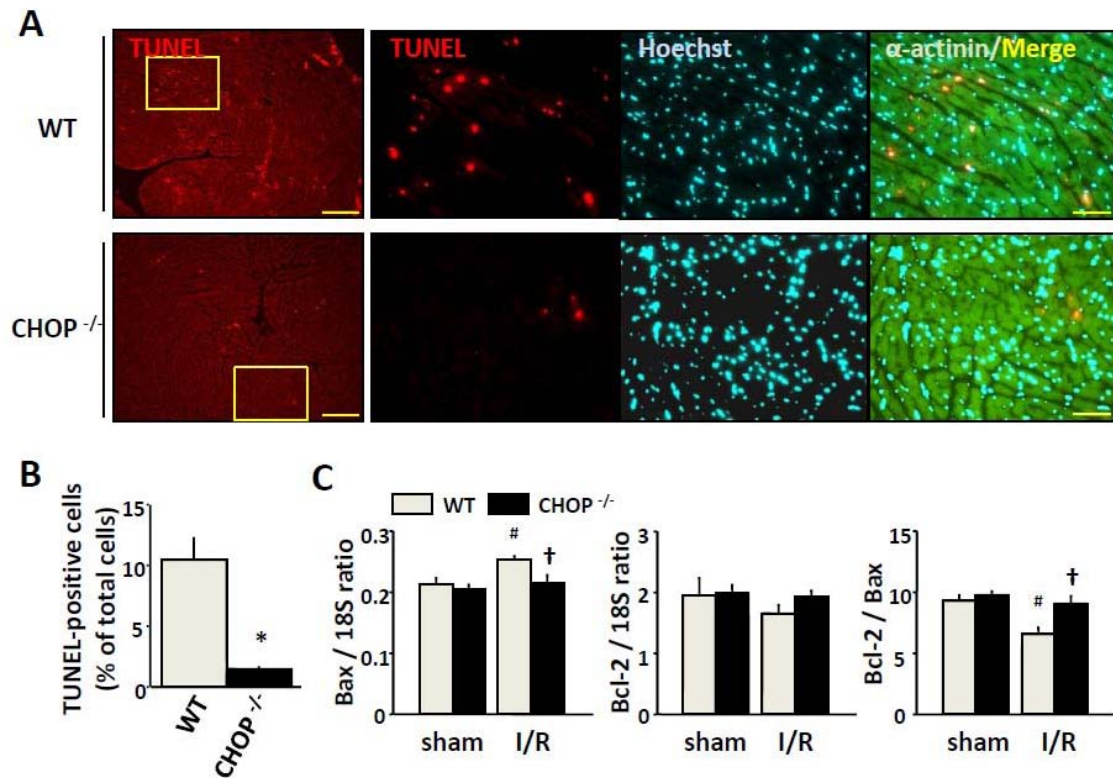


図12 再灌流後4時間、虚血領域における、WT、CHOP^{-/-}マウスの心筋細胞アポトーシス

A, 左2パネル:TUNEL染色像 低倍率(黄線200 μ m)、右6パネル(左2パネル黄囲み領域):

TUNEL(赤)・Hoechst(青)・ α -actinin(緑)重染色像 高倍率(黄線50 μ m) B, アポトーシスに陥った心筋細胞数を、 α -actininに囲まれた、Hoechst陽性核数に占める、TUNEL陽性核数の割合にて算出

C, 再灌流後4時間、虚血領域における、WT、CHOP^{-/-}マウスのBax, Bcl-2 mRNA発現レベル、及び発現比(Bcl-2/Bax) 各群n=5 * p <0.01 vs WTマウス虚血再灌流群 # p <0.05 vs WTマウス sham

群 † p <0.05 vs WTマウス虚血再灌流群 I/R:虚血再灌流

3-4 CHOP 欠損は虚血再灌流後の炎症反応を抑制する

最近、CHOP 経路が、直接的に炎症反応に関与していることを示す報告が、心筋傷害以外の病態モデルを用いた実験にて、幾つか認められている^{34,40,41}。よって、次に、CHOP 経路が、心臓虚血再灌流後の炎症反応に影響を与えているかどうか評価した。WT マウスにおいて、再灌流後の虚血心筋における炎症性サイトカイン TNF- α ・IL-1 β や、好中球・マクロファージのケモカインである MIP-2・MCP-1 の転写誘導は、単相性または二相性パターンを示し、その最大ピークは再灌流後 6~8 時間で共通していたが、一方、抗炎症性サイトカインである IL-10 の転写誘導は、これらとは異なる単相性パターンを示し、再灌流後 30 分で即座にピークに達し、即座に低下した(図13)。興味深い事に、IL-6 mRNA の誘導は、上記炎症性サイトカインの誘導よりも数時間早い、再灌流後 4 時間でピークに達していた。

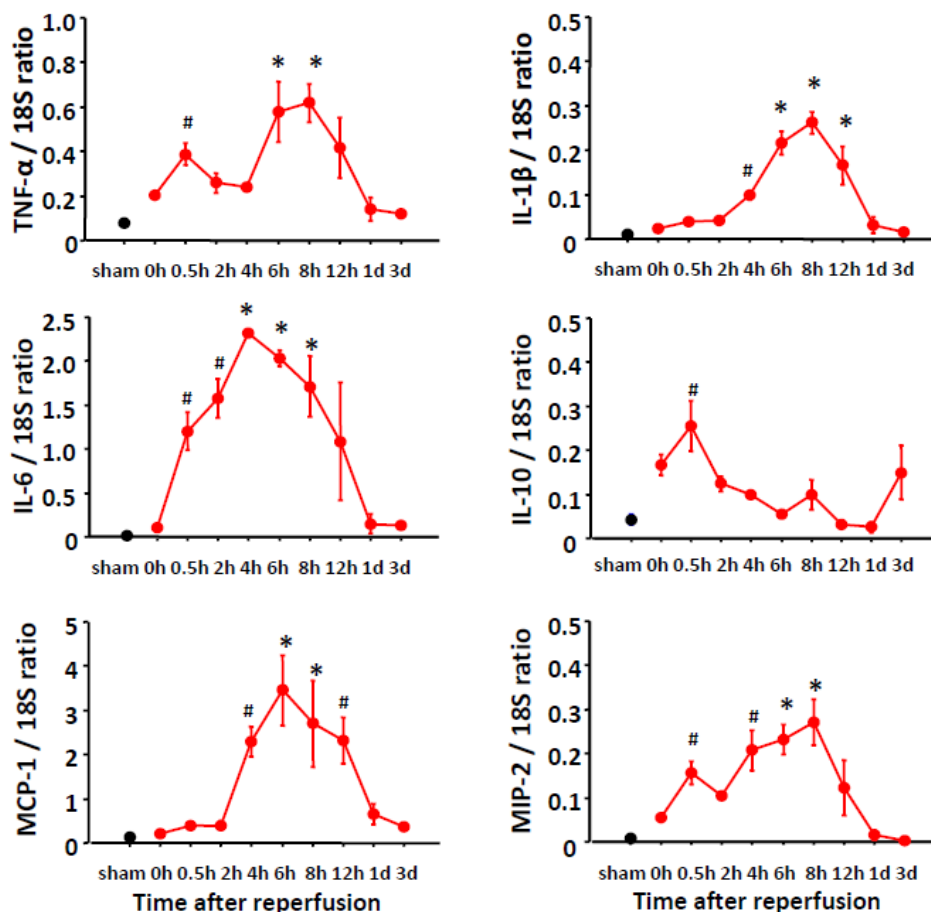
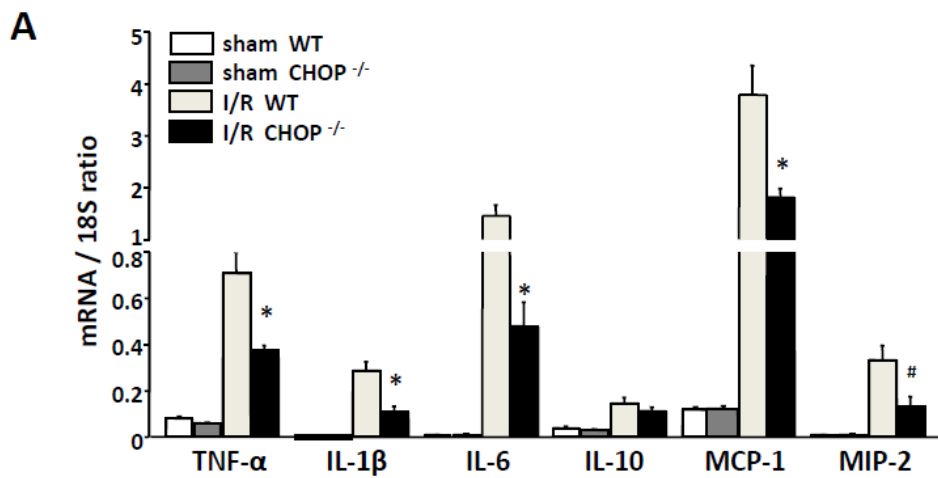


図13 WT における、再灌流後、虚血領域の TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1, MIP-2 mRNA 発現レベルの経時変化 各群 n=4 #p<0.05, *p<0.01 vs sham 群

誘導極期である再灌流後 8 時間において、TNF- α ・IL-1 β ・IL-6・MCP-1・MIP-2 mRNA の発現レベルは全て、WT に比し、CHOP^{-/-}マウスで有意に減少していたが、IL-10 mRNA 発現レベルのみは、遺伝子背景の異なる両マウス間で違いは認められなかった(図14A)。これらケモカイン mRNA の発現レベルの有意な減少に伴い、再灌流後 1 日における虚血心筋への炎症性細胞浸潤も、CHOP^{-/-}マウスにて有意に抑制されていた(図14B-C)。

これらの事実は、CHOP 経路が、虚血再灌流後の組織炎症を増強する事を示しており、この炎症増強作用が、心臓虚血再灌流傷害形成のもう一つの強力な構成要因となり得る事を示している。



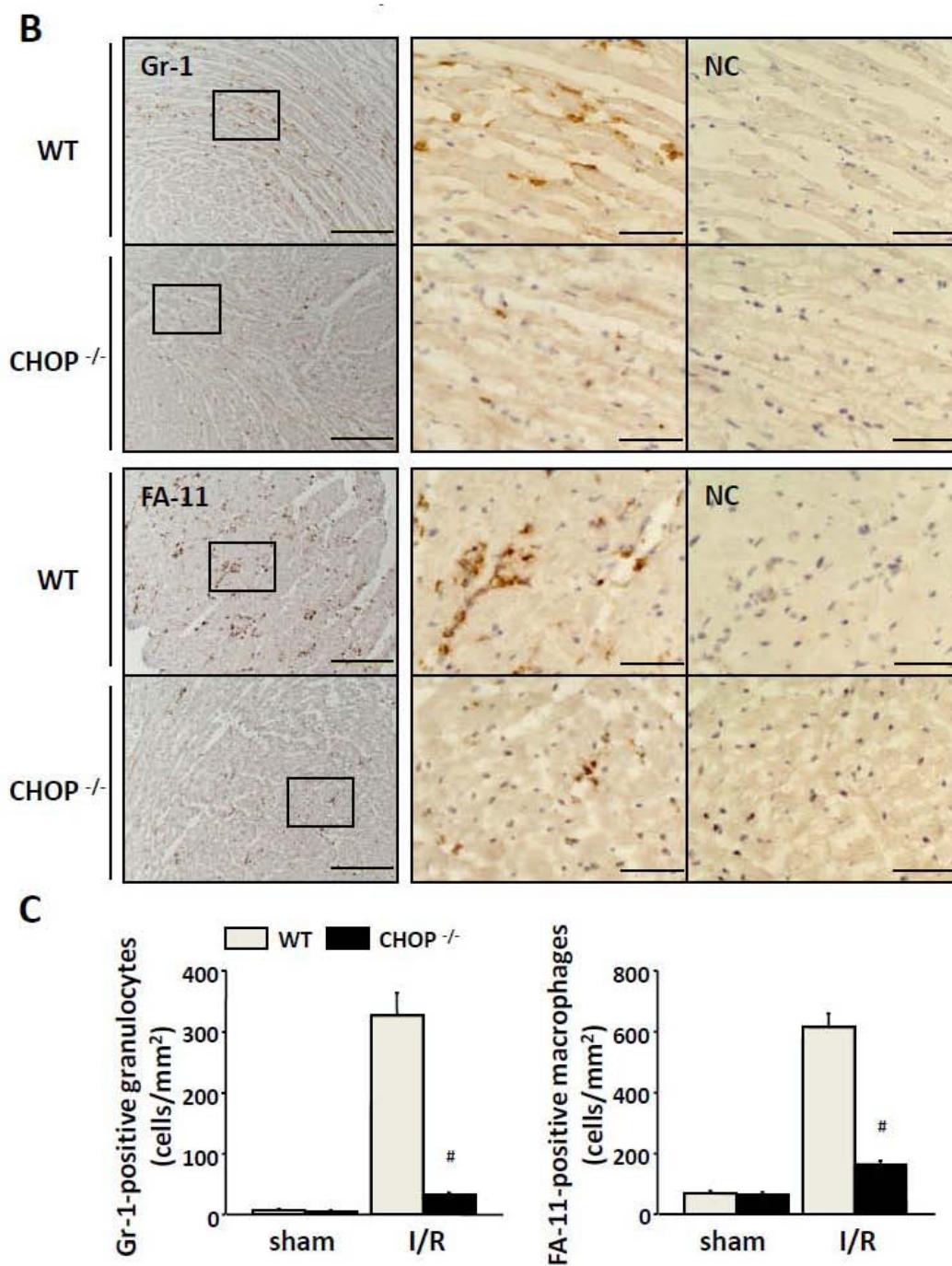


図14 A, 再灌流後 8 時間、虚血領域における、WT, CHOP^{-/-}マウスの TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1, MIP-2 mRNA 発現レベル B, 再灌流後 1 日、虚血領域における、WT, CHOP^{-/-}マウスの Gr-1 陽性好中球と、FA-11 陽性マクロファージ染色像 左パネル:低倍率(黒線 200 μ m) 中央・右パネル(左パネル黒囲み領域):高倍率(黒線 50 μ m) C, 再灌流後 1 日、虚血領域における、1mm² 当たりの Gr-1 陽性好中球と、FA-11 陽性マクロファージ浸潤数 各群 n=5 [#]p<0.05, *p<0.01 vs WT マウス虚血再灌流群 NC:陰性対照 I/R:虚血再灌流

3-5 CHOP 経路は炎症刺激に反応して向炎症性活性を示す

CHOP 経路が、その向炎症活性を、特に、今回の心臓虚血再還流モデルの様な炎症環境下において示す事を確認するため、WT と CHOP^{-/-}マウス由来の培養心筋細胞を、LPS 単独刺激 (10 μ g/mL)、強力な ER ストレス誘導物質である TG の単独刺激 (3 μ mol/L)、LPS+TG 同時刺激 (10 μ g/mL + 3 μ mol/L)、および溶媒単独添加 (コントロール)、のいずれかの処理に割り付けた。

WT マウス由来心筋細胞において、CHOP mRNA の発現レベルは、コントロールに比し、LPS 単独刺激後に明らかな増加を示すことはなかったが、TG 単独刺激後、並びに LPS+TG 同時刺激後ではかなり増加し、その程度は、両刺激間で同等であった(図15A)。この所見は、今回の実験プロトコールの範囲においては、LPS 刺激は、単独刺激でも TG との同時刺激でも、CHOP 経路を活性化しない事を示している。この条件下で、LPS 単独刺激、あるいは LPS+TG 同時刺激を加えると、TNF- α 、IL-6 mRNA は、WT と CHOP^{-/-}マウス由来の心筋細胞で、共に誘導されたが、その誘導レベルは、遺伝子背景間でも、サイトカイン間でも異なっていた。TNF- α mRNA 誘導レベルに関しては、LPS 単独刺激後と LPS+TG 同時刺激後とでは、同程度の増加を示し、これは、遺伝子背景の違いの影響を受ける事はなかった(図15B)。対照的に、IL-6 mRNA 誘導レベルに関しては、WT 由来心筋細胞においては、LPS 単独刺激後より、LPS+TG 同時刺激後に更に増加したが、CHOP^{-/-}由来心筋細胞においては、同様の増幅反応は認められなかった(図15C)。興味深い事に、TG 単独刺激では、遺伝子背景の異なる心筋細胞間で、両サイトカイン mRNA の発現レベルに全く差は確認されなかった。

これらの結果は、CHOP 経路の向炎症性を支持するものであり、この性質は、炎症刺激に応答して、恐らくは IL-6 のような特定のサイトカイン遺伝子の転写制御を介して、発揮されることが推察される。

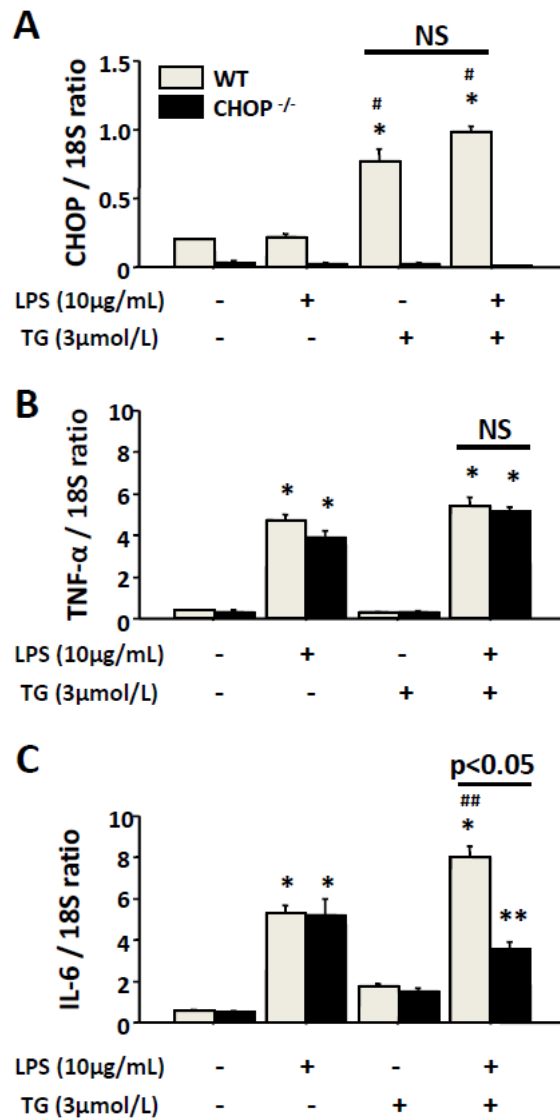
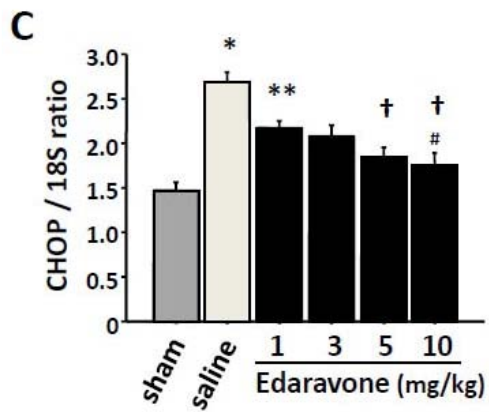
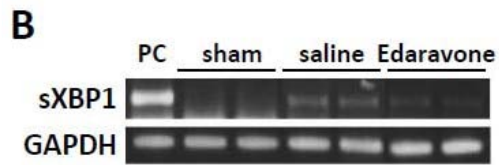
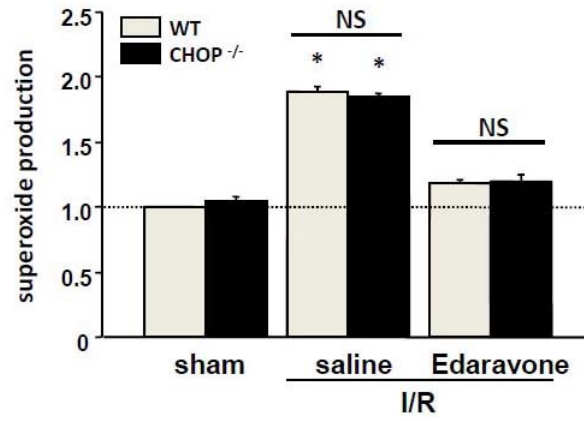
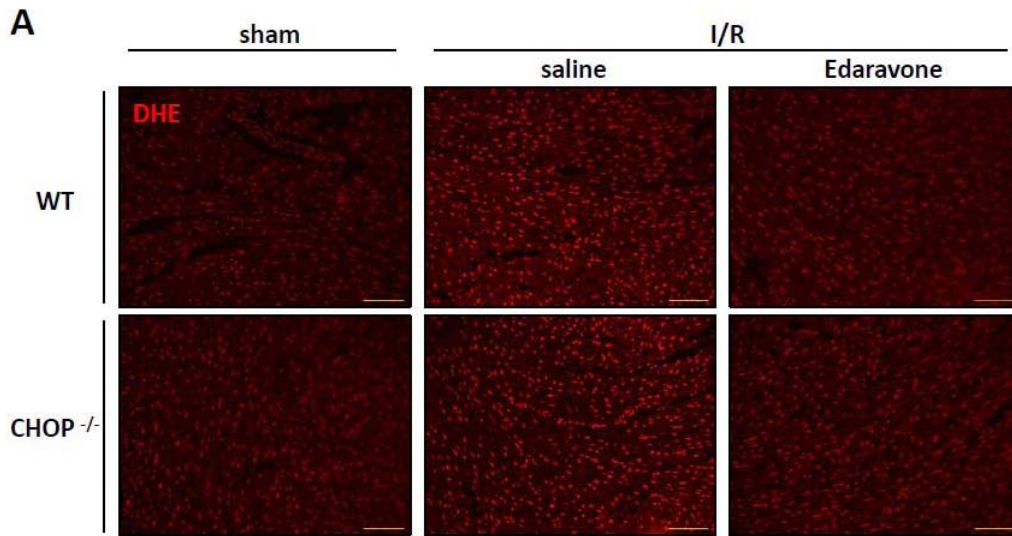


図15 WT、CHOP^{-/-}マウス由来の培養心筋細胞を、コントロール群、LPS (10μg/mL) 単独刺激群、TG (3μmol/L) 単独刺激群、LPS (10μg/mL) + TG (3μmol/L) 同時刺激群に割り付け、4 時間刺激後の、CHOP, TNF-α, IL-6 mRNA 発現レベルを比較 各群 n=4 **p*<0.001, ***p*<0.01 vs コントロール群 (同遺伝子背景間) #*p*<0.001, ##*p*<0.005 vs LPS 単独刺激群 (同遺伝子背景間) NS: 有意差なし

3-6 虚血再灌流によって産生された ROS は CHOP 誘導に至る ER ストレス応答を引き起こす

これまでの研究にて、虚血心筋の再灌流により爆発的な ROS 産生が起こり、これが、虚血再灌流傷害における決定的なメディエーターの一つとして作用する事が示されている^{13, 42, 43}。一方、ROS は、機序的には ER ストレスの原因になり得るが^{2, 15, 16, 44-47}、実際、心臓虚血再灌流後に産生された過剰な ROS が、CHOP 誘導にまで至る ER ストレス応答を引き起こすかどうかは、未だ検討されていない。そこで、日本で臨床応用されているフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンが²⁵、心臓虚血再灌流後の ER ストレスを制御しうるかどうか、その可能性について検討するため、WT マウスを、エダラボン投与群、または生食投与群に無作為に割り付け、50 分間の心筋虚血を左冠動脈結紮にて加えた後、心筋再灌流を結紮解除にて行った。エダラボン、または生食は、再灌流 5 分前に、眼窩静脈内へボラス投与した。まず、ROS の一種である、スーパーオキシドの細胞内産生を DHE 染色で評価してみると、生食投与群の虚血心筋において、50 分間の虚血終了時点(再灌流なし)では、スーパーオキシドは殆どまたは全く産生されていなかったが、再灌流後早期の 30 分の時点では、明らかなスーパーオキシド産生が確認され、その産生レベルは、WT と CHOP^{-/-}マウス間で同等であった(図16A)。エダラボン 5mg/kg の投与により、このスーパーオキシドの過剰産生はほぼ完全に消去され(図16A)、更に、WT マウスにおける XBP1 mRNA スプライシング(図16B)、CHOP mRNA 誘導(図16C)も抑制された。特に、CHOP mRNA の誘導レベルに関しては、エダラボン濃度の増加と共に、容量依存的に減少し、今回使用した最高容量である 10mg/kg では、sham ope 群と同程度にまで抑制された。予想通り、エダラボン 5mg/kg 投与群—CHOP mRNA 誘導の抑制効果としては 10mg/kg と統計学的に同等(図16C)—では、生食投与群に比し、再灌流後 8 時間における炎症反応は著明に抑制され(図16D)、傷害サイズ (IA/AAR) も、虚血サイズ (AAR/LV) は両群同等ながら、著明に抑制された(図16E)。

これらの事実は、CHOP 誘導に至る ER ストレス応答が、少なくとも再灌流後早期に過剰産生される ROS によって引き起こされる事を示唆している。



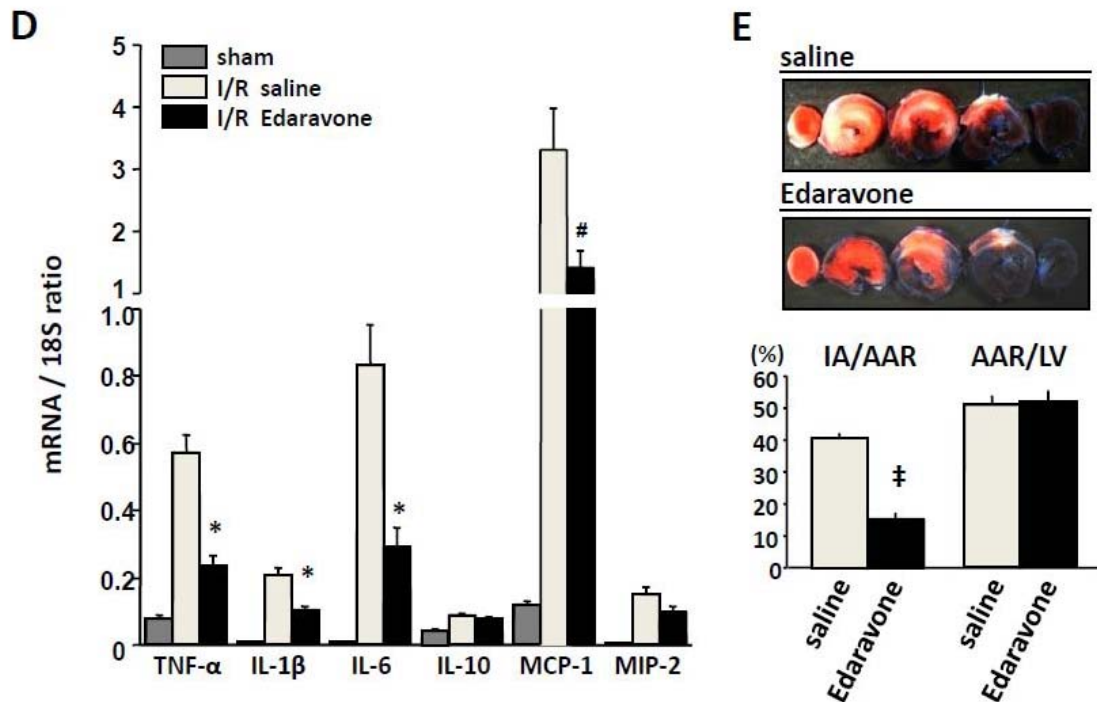


図16 A, WT, CHOP^{-/-}マウスに対し、再灌流5分前にエダラボン(5mg/kg)、または生食投与した後の、再灌流後30分、虚血領域におけるDHE染色像の比較 パネル:黄線100μm グラフ:WTマウス sham群における平均蛍光強度を基準値として表示 各群n=4 **p*<0.001 vs sham群(同遺伝子背景間) B, WTマウスに対し、再灌流5分前にエダラボン(5mg/kg)、または生食投与した後の、再灌流後30分、虚血領域におけるsXBP1 mRNA発現 C, WTマウスに対し、再灌流5分前にエダラボン(1, 3, 5, 10mg/kg)、または生食投与した後の、再灌流後30分、虚血領域におけるCHOP mRNA発現レベル 各群n=6 **p*<0.005, ***p*<0.01 vs sham群 †*p*<0.05 vs saline群 #*p*=有意差なし D, WTマウスに対し、再灌流5分前にエダラボン(5mg/kg)、または生食投与した後の、再灌流後8時間、虚血領域におけるTNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, MCP-1, MIP-2 mRNA発現レベルの比較 各群n=4 #*p*<0.05, **p*<0.01 vs saline群 E, WTマウスに対し、再灌流5分前にエダラボン(5mg/kg)、または生食投与した後の、再灌流後8時間、虚血領域における傷害サイズ(IA/AAR)および虚血サイズ(AAR/LV)の比較 各群n=6 ‡*p*<0.01 vs saline群 I/R:虚血再灌流 NS:有意差なし PC:陽性対照

4, 考察

転写因子CHOPは、小胞体機能が重度に障害された(ERストレス)際に、細胞にアポトーシスを引き起こす重要な構成分子の一つであり¹⁻³、近年、種々の細胞・動物モデルを用いた実験にて、CHOP欠損がアポトーシス抵抗性を示したことから、CHOPの様々な病態への関与が認識され始めている³。特に、慢性心筋虚血の病態においては、CHOPのノックダウンが、長時間低酸素刺激によって起こる心筋細胞のアポトーシスを抑制することが示されている⁴⁸。しかし、CHOP経路が、心臓虚血再灌流傷害の病態、特に、その炎症過程において果たす役割に関しては、未だ明らかとなっていなかった。本研究では、in vivo心臓虚血再灌流モデルにおいて、少なくとも再灌流早期に過剰産生されたROSが、ERストレス誘導性CHOP経路を活性化し、活性化されたCHOP経路は、心筋細胞にアポトーシスを誘導するだけでなく、組織炎症を増強することで、その後の心臓虚血再灌流傷害を悪化させる事を示した(図17)。更に、in vitroの実験結果は、炎症環境においては、CHOPに起因した向炎症性シグナルが本来の炎症反応を修飾している可能性、並びに、その複雑な制御機構を支持するものであった。尚、本研究において初めて発見された主な点として、まず、フリーラジカルスカベンジャーを再灌流直前に投与する事で、慢性虚血刺激だけではなく、純粋な再灌流刺激—再灌流によって産生されたROS—も、CHOP誘導に至るERストレス応答を来たしうる点、次に、再灌流後の炎症組織において、CHOP経路が向炎症活性を示しうる点、が挙げられる。また、in vivoにおいて、今回初めて、ERストレス活性化の経時変化を直接示した点も明記しておきたい。

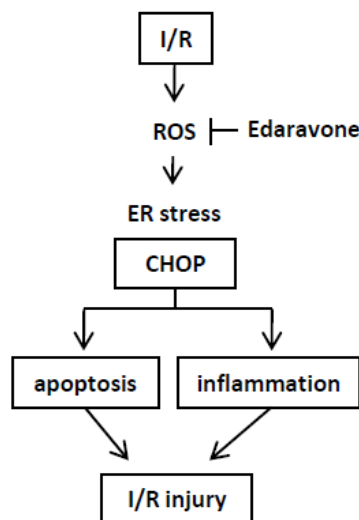


図17 心臓虚血再灌流傷害形成におけるCHOP経路の役割

これまで、心臓虚血再灌流後に心筋細胞のアポトーシスが起きている事を示した報告は多数あり⁴⁹⁻⁵¹、これにERストレスが関与している事を示す報告も幾つか存在する^{19, 20}。しかし、ERストレス誘導性アポトーシスを来たす経路として、CHOP経路以外にも、ASK1-JNK経路・カスパーゼ-12経路といった複数の経路が存在する事を考慮した場合^{2, 3}、各々の経路がどの程度、再灌流後の心筋細胞のアポトーシス発現に寄与しているかを明らかにすることは、将来の臨床応用の観点からも意義がある。以前の研究では、JNK1あるいはJNK2欠損は、再灌流後の心筋細胞のアポトーシスを約40%減らしたが⁵²、これと対照的に、本研究では、CHOP欠損は、心筋細胞のアポトーシスをほぼ完全に抑制した。この事は、CHOP経路もまた、心筋虚血再灌流後の心筋細胞アポトーシス誘導に重要な役割を果たしている可能性を示している。このCHOP経路の強力なアポトーシス活性の説明として、一つは、CHOPがERストレス下で、最も高度に誘導される遺伝子群の一つである事³、加えて、ERストレス下でJNK経路を活性化するのに必要なMAPKKKの一つASK1は、同時にp38経路の活性化を介してCHOPをリン酸化しうるが、このCHOPのリン酸化は、CHOP本来の転写活性を増強すると共に、アポトーシス活性を最大限に引き上げる事³、が挙げられる。現在までの所、CHOP誘導からアポトーシスに至るまで(下流)のメカニズムとしては、アポトーシス抵抗性蛋白Bcl-2の下方制御¹⁰、アポトーシス誘導性蛋白Bax・Bimの上方制御⁵、Baxのミトコンドリア移行¹²、等が報告されており、本研究でも虚血再灌流後のBcl-2/Bax比減少が確認されたが、これらは全て、CHOP誘導性アポトーシスが、主にミトコンドリア依存性経路によって起きている事を支持している^{38, 39}。しかしながら、CHOP誘導以降の正確なカスケードについては未だ明らかとなっておらず、今後の更なる検討を要する。

いずれにしても、心筋虚血再灌流後早期における心筋細胞アポトーシスの発現レベルは、WTマウスにおいてさえ低値であったことは事実である。これに一致して、これまでの多数の報告でも、再灌流後3~4時間という早期におけるTUNEL陽性細胞の割合は、10%未満~18%程度と比較的低値に留まっており⁵³⁻⁵⁵、これらの結果は、今回、CHOP欠損が組織学的な傷害サイズを著明に抑制した機序として、アポトーシス抑制以外にも、別の機序—今回確認された炎症抑制—が存在する可能性を支持すると同時に、この推察が今回のモデルに特別なものではないことを示唆している。

近年、ERストレスが炎症反応を引き起こす事に関しては、PERK経路によるinhibitor of NF- κ B (I κ B)の翻訳抑制や、IRE1経路による直接的なI κ B kinase (IKK)リン酸化を介した、NF- κ B活性化機序によって示唆されているが¹、CHOP経路が直接、炎症と関連しているかどうかについては、

完全に明らかになっていない^{34, 40, 41}。本研究では、CHOP経路は、恐らくは、TNF- α ではなく、IL-6といった特定のサイトカイン遺伝子の転写を制御することによって、心筋の炎症を増強していることが示唆された。Tabasらは、この可能性を支持する研究結果を報告しており、マクロファージに遊離コレステロールが蓄積すると、複数の炎症性シグナル経路が活性化されるが、そのうちCHOP-ERK1/2経路は、IL-6 mRNAの誘導に特異的に関与していたものの、TNF- α mRNAの発現には関与してなかった⁴⁰。これに一致して、本研究でも、培養心筋細胞を使った予備実験にて、CHOP経路がERK1/2のリン酸化を誘導する事を確認している(図18)。一方、ごく最近ではあるが、ヒト単球由来細胞株を用いた実験にて、本研究のIL-6で認められた様な、LPS+TG同時刺激によるmRNAの相乗的誘導がIL-23でも認められており、CHOPノックダウンによって強力に抑制された⁵⁶。この所見は、CHOP経路の向炎症性を更に認識させるものであるが、CHOPによるこの2サイトカインの制御機構は恐らく異なっており、CHOPはIL-23のプロモーター領域に結合するが⁵⁶、IL-6のプロモーター領域には結合しないことが示されている⁵⁷。

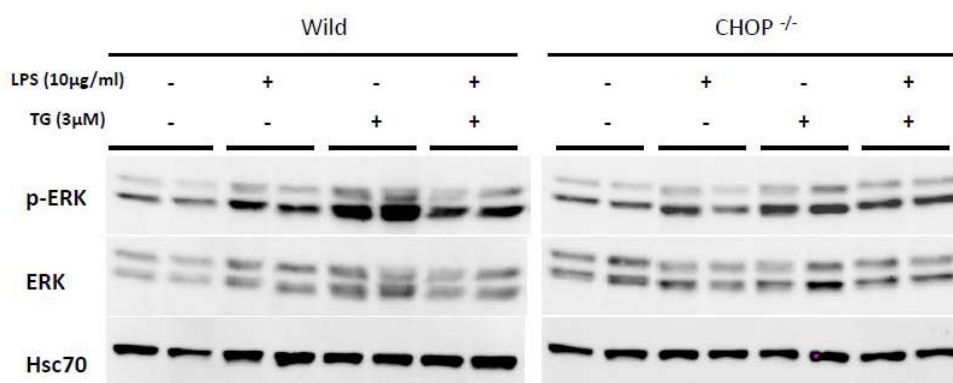


図18 WT、CHOP^{-/-}マウス由来の培養心筋細胞を、コントロール群、LPS(10 μ g/mL)単独刺激群、TG(3 μ mol/L)単独刺激群、LPS(10 μ g/mL)+TG(3 μ mol/L)同時刺激群に割り付け、4時間刺激後の、リン酸化ERK1/2、total ERK1/2発現を比較 各群n=3

他の向炎症機序を示した報告もある。マウスの急性肺炎モデルを用いたある報告では、CHOP^{-/-}マウスにおけるIL-1 β の気道内分泌、好中球の肺組織浸潤は減少していたが、これは、インフラマソーム(IL-1 β 活性化に関与する蛋白複合体)の構成要素であるcaspase-11の、CHOPによる転写誘導が抑制されたためであった³⁴。別の報告では、CHOP結合配列がCD11b(Mac-1の構成要素)のプロモーター領域に存在する事を示し、実際、マウスの炎症性腸疾患モデルにおいて、CHOP^{-/-}マウスにおけるマクロファージの腸組織浸潤が減少していることを示した⁴¹。これらの報告と一致して、本研究でも、再灌流後のcaspase-11 mRNA発現レベル(結果省略)、マクロファージ浸潤レベルは何れも、WTに比し、CHOP^{-/-}マウスの虚血心筋にて、より低値であった。

しかしながら、TG単独刺激では、WTとCHOP^{-/-}マウス由来心筋細胞間で、IL-6 mRNA発現レベルに全く違いが認められなかった事(同様の結果は、最近の研究にて、IL-23でも認められている⁵⁶)、また、本研究ならびに上記3報告における所見は全て、炎症モデルから得られた結果に基づいている事を考慮すると、このCHOP経路の向炎症性は、炎症環境下においてのみ認められることが推察される。何れにしても、CHOP経路と炎症性シグナル経路間で相互反応を来たすに至る分子機構に関しては、非常に興味を持たれる所であり、今後の更なる検討を要す。

ERは、酸化ストレスの影響を強く受けやすい細胞内小器官の一つと考えられている。ER腔内における高濃度カルシウム環境は、ERシャペロンが、その蛋白フォールディング能を十分に発揮する上で特に重要であるが²、ROSは、恐らくは、ER膜上のIP3感受性カルシウムチャネルを開口し、また、SERCA活性を阻害する事で、ER腔内カルシウム濃度を低下させうる⁴⁴。更に、ROSは、蛋白フォールディングやジスルフィド結合を形成する上で特化した、ER腔内のレドックス環境にも直接影響を与えうる⁴⁵、また、ERに内在する蛋白全てに、直接、あるいは脂質過酸化を介して間接的に、酸化傷害を与えうる^{46, 47}。これらの全ての事象は、ROSがER内に、アンフォールド蛋白、またはミスフォールド蛋白の蓄積を引き起こし、結果として、ERストレス応答を誘導する可能性を示唆するものであるが、これを実際に示した報告は殆どない。本研究は、心臓虚血再灌流モデルにおいて初めて、再灌流後の過剰なROS産生—特にスーパーオキシド産生—が、ERストレス応答経路の活性化に重要な役割を果たしている事を直接示した。これに一致して、林らは、脳虚血再灌流後に、SOD過剰発現マウスにて、ER内における、直接的または間接的な蛋白酸化障害のマーカであるカルボニル基・4-HNE結合蛋白の蓄積抑制と共に、PERK・eIF2 α のリン酸化が軽減される事を示し⁴⁷、Keithらは、心臓虚血再灌流後に、この4-HNEの還元酵素の一つであるアルドース還元酵素を過剰発現させたマウスにて、PERKのリン酸化レベルが抑制される事を示している¹⁷。

実験系では、これまで多数の再灌流補助療法(薬剤介入)が、心臓再灌流傷害に対する保護効果を示してきたが、実臨床では、なかなかその有用性を再現するに至っていない^{13, 58}。この乖離を来たす理由として一つ重要なのは、心臓虚血再灌流においては、目的の薬剤を、至適時間に至適濃度で、至適作用部位(組織あるいは細胞)に到達させる事が非常に困難な点が挙げられる^{13, 43}。この点に関して、エダラボンは、静脈内投与が可能で、低分子量(174.2kDa)、脂溶性の薬剤であり、薬物動態的に有利な点を幾つか兼ね備えた優れたフリーラジカルスカベンジャーと言える。実際、急性心筋梗塞の臨床にて、血行再建直前のエダラボン投与が、心筋逸脱酵素で評価した梗塞サイズ、並びに臨床転帰(再灌流性不整脈・心不全による再入院)を改善する事

が示されており^{59, 60}、これは、再灌流後の血漿MCP-1レベル低下を伴っていた⁶⁰。本研究は、エダラボンが、ROSによる直接的な酸化傷害のみならず、過剰なERストレスを介して引き起こされる間接的な酸化傷害をも軽減する事を示すことで、このエダラボンの心臓虚血再灌流傷害に対する保護効果を、機序の面から一層確固たるものとした。興味深い事に、マウスのグリア細胞を用いたある研究では、エダラボンは、強力なERストレス誘導物質ツニカマイシンによる、XBP1スプライシング、並びにBiP・CHOPの翻訳誘導を抑制したが、これはROSが全く産生されていない状況下で認められており⁶¹、この事は、エダラボンに、ROS除去を介さない、直接的なERストレス軽減機構が別に存在する可能性を示唆している。

最後に、本研究において未解決の問題につき考察する。

本研究では、心臓虚血再灌流におけるCHOPの転写誘導は再灌流後早期に認められたが、ERストレス応答の上流の動態をみた所、3つの主要なERストレスセンサーであるPERK・ATF6・IRE1の活性化—eIF2 α リン酸化・XBP1転写誘導・XBP1スプライシング—は、全て同時相で起こっており、ERストレス由来であると考察した。これを支持する報告として、少ない報告数ではあるが、CHOPの転写誘導は、何れも再灌流後2時間と、本研究同様早期に認められており^{20, 22}、事前にERストレス応答を賦活化しておくことで、CHOPの転写誘導が抑制される事が示されている²⁰。

本研究では、再灌流早期のみならず後期(1~3日)にも、虚血心筋におけるERストレス誘導が確認された。しかも、興味深い事に、この時期のERストレスセンサー活性化パターンは早期のものとは異なり、PERK経路(eIF2 α リン酸化)を除く、ATF6経路・IRE1経路(XBP1転写誘導・XBP1スプライシング・BiP誘導)を中心としたもので、CHOP転写誘導を伴っていなかった。今回、この後期ERストレス応答に関する詳細な検討は行っていないが、誘因に関しては、再灌流後期におけるBNP・炎症性サイトカインmRNAレベルは既に基線に戻っていることから、これらの翻訳による小胞体過負荷(ERストレス)というよりは寧ろ、組織リモデリングに関わる細胞外基質等の翻訳による小胞体過負荷を可能性として考えるべきであろう。ただ、このCHOP誘導を伴わない活性化パターンを、生体防御の観点から考えてみると、あたかも次の侵襲に備え保護経路を活性化している状態—プレコンディショニング応答—とも捉えられ、通常の小胞体過負荷とは異なった特殊な機序によって、後期ERストレスが誘導されているのかもしれない。

本研究における心筋傷害サイズは、再灌流後8時間から1日にかけて縮小しており、かつ、その程度は遺伝子背景間で異なっていた。この正確なメカニズムは依然不明であるが、今回用いた評価方法であるTTC染色が、ミトコンドリアの酵素活性を検出するものであり、従って、酵素学的

に不活性な生存細胞、アポトーシス細胞、浮腫性組織は何れもTTC非反応領域(傷害領域)に含まれることを考慮すると、本研究で確認された機序から推察される説明としては、近隣の貪食細胞によるアポトーシス細胞の排除、あるいは、向炎症性サイトカインの転写誘導が再灌流後8時間でピークに到達し、1日までには基線に戻った経時変化からは、血管透過性の正常化が挙げられる。

本研究において、CHOP 欠損が、IL-6 および TNF- α mRNA の発現パターンに与えた影響は、in vivo と in vitro 実験で、明らかに異なっていた。培養心筋細胞を用いた予備実験の結果(図18)が、Tabas らが提唱する CHOP-ERK1/2-IL-6 経路の存在⁴⁰を肯定するものだとすると、この違いを生じた理由として、まず1つめに、in vivo と in vitro 実験における評価時間の違いが挙げられる。WT マウスにおける、再灌流後のサイトカイン転写誘導の経時変化に着目すると、IL-6 のみが、TNF- α を含めた他の向炎症性サイトカインより数時間早くピークに達していた。つまり、後者を評価時間に設定した in vivo 実験の結果は、CHOP-ERK1/2 経路で産生された IL-6 に起因するサイトカイン間相互作用により、TNF- α をはじめとした向炎症性サイトカイン全般が誘導された状態をみているのかもしれない。次に、in vivo と in vitro 実験における炎症細胞の関与の違いが挙げられる。今回用いた心筋細胞培養プロトコールは、非心筋細胞を pre-plating 法により除去するものであった。つまり、in vivo 実験の結果は、虚血心筋に常在もしくは浸潤してきた炎症細胞が、TNF- α 含めた向炎症性サイトカイン全般を産生し、更には、近接する心筋細胞における CHOP-ERK1/2 経路を含めた炎症応答に多少なりとも影響を及ぼしている状態をみているのかもしれない。

本研究では、再灌流早期の過剰な ROS 産生が確認された。虚血再灌流における ROS 産生機序として、ミトコンドリア電子伝達系再酸素化、(主に内皮細胞における)キサンチンオキシダーゼ活性化、(主に好中球における)NADPH オキシダーゼ活性化、が考えられているが¹³、ex vivo モデルでも、再灌流早期の ROS 産生が確認されていること⁶²、並びに、in vivo モデルを用いた本研究でも、再灌流後 30 分における好中球浸潤は僅かである事が予想されることから、少なくとも再灌流早期における ROS 産生に、NADPH オキシダーゼの関与は少ないと考えられる。以下に、虚血再灌流におけるキサンチンオキシダーゼ活性化を介した ROS 産生の模式図を示す(図19)。

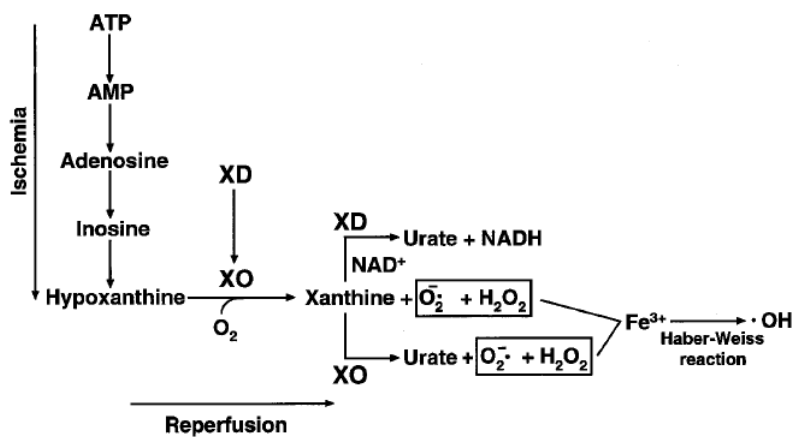


図19 虚血再灌流におけるキサンチンオキダーゼ活性化を介した ROS 産生機構
 XD:キサンチンデヒドロゲナーゼ, XO:キサンチンオキシダーゼ

5, 結語

心筋虚血再灌流障害の病態完成に、ERストレスを介したCHOP経路が重要な役割を果たしている事が示された。臨床的には、心筋虚血再灌流傷害は、急性冠症候群に対する早期再灌流療法(経皮的冠インターベンション)のみならず、人工心肺を用いた心臓手術、心移植でも認められる現象であり、このCHOP経路の阻害が、今後の虚血再灌流障害に対する有用な心筋保護戦略となる可能性が期待される。

6, 参考文献

1. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008;454:455-462.
2. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*. 2005;115:2656-2664.
3. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 2004;11:381-389.
4. Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K, Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Mochizuki N, Kitakaze M. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation*. 2007;116:1226-1233.
5. Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, Sawada T, Okuda K, Asano Y, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Komuro I, Kitakaze M, Minamino T. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation*. 2010;122:361-369.
6. Okada T, Yoshida H, Akazawa R, Negishi M, Mori K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J*. 2002;366:585-594.
7. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 2000;6:1099-1108.
8. Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, Kaufman RJ. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell*. 2001;7:1165-1176.
9. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 2004;18:3066-3077.
10. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes

- cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* 2001;21:1249-1259.
11. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell.* 2007;129:1337-1349.
 12. Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ.* 2004;11:390-402.
 13. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007;357:1121-1135.
 14. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 1960;70:68-78.
 15. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal.* 2007;9:2277-2293.
 16. Verkhratsky A, Petersen OH. The endoplasmic reticulum as an integrating signalling organelle: from neuronal signalling to neuronal death. *Eur J Pharmacol.* 2002;447:141-154.
 17. Keith RJ, Haberzettl P, Vladykovskaya E, Hill BG, Kaiserova K, Srivastava S, Barski O, Bhatnagar A. Aldose reductase decreases endoplasmic reticulum stress in ischemic hearts. *Chem Biol Interact.* 2009;178:242-249.
 18. Nicolaou P, Rodriguez P, Ren X, Zhou X, Qian J, Sadayappan S, Mitton B, Pathak A, Robbins J, Hajjar RJ, Jones K, Kranias EG. Inducible expression of active protein phosphatase-1 inhibitor-1 enhances basal cardiac function and protects against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 2009;104:1012-1020.
 19. Martindale JJ, Fernandez R, Thuerauf D, Whittaker R, Gude N, Sussman MA, Glembotski CC. Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. *Circ Res.* 2006;98:1186-1193.
 20. Natarajan R, Salloum FN, Fisher BJ, Smithson L, Almenara J, Fowler AA, 3rd. Prolyl

- hydroxylase inhibition attenuates post-ischemic cardiac injury via induction of endoplasmic reticulum stress genes. *Vascul Pharmacol.* 2009;51:110-118.
21. Qi X, Vallentin A, Churchill E, Mochly-Rosen D. deltaPKC participates in the endoplasmic reticulum stress-induced response in cultured cardiac myocytes and ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43:420-428.
 22. Zhang GG, Teng X, Liu Y, Cai Y, Zhou YB, Duan XH, Song JQ, Shi Y, Tang CS, Yin XH, Qi YF. Inhibition of endoplasmic reticulum stress by ghrelin protects against ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Peptides.* 2009;30:1109-1116.
 23. Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, Akira S, Araki E, Mori M. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:10845-10850.
 24. Kaikita K, Hayasaki T, Okuma T, Kuziel WA, Ogawa H, Takeya M. Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Pathol.* 2004;165:439-447.
 25. Edaravone Acute Infarction Study Group. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis.* 2003;15:222-229.
 26. Kawahara Y, Tanonaka K, Daicho T, Nawa M, Oikawa R, Nasa Y, Takeo S. Preferable anesthetic conditions for echocardiographic determination of murine cardiac function. *J Pharmacol Sci.* 2005;99:95-104.
 27. Ruetten H, Dimmeler S, Gehring D, Ihling C, Zeiher AM. Concentric left ventricular remodeling in endothelial nitric oxide synthase knockout mice by chronic pressure overload. *Cardiovasc Res.* 2005;66:444-453.
 28. Geoghegan-Morphet N, Burger D, Lu X, Sathish V, Peng T, Sims SM, Feng Q. Role of neuronal nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2007;75:408-416.
 29. Nickson P, Toth A, Erhardt P. PUMA is critical for neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Cardiovasc Res.* 2007;73:48-56.
 30. Peng T, Lu X, Feng Q. Pivotal role of gp91phox-containing NADH oxidase in

- lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression and myocardial depression. *Circulation*. 2005;111:1637-1644.
31. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-159.
 32. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001;107:881-891.
 33. Nakayama Y, Endo M, Tsukano H, Mori M, Oike Y, Gotoh T. Molecular mechanisms of the LPS-induced non-apoptotic ER stress-CHOP pathway. *J Biochem*. 2010;147:471-483.
 34. Endo M, Mori M, Akira S, Gotoh T. C/EBP homologous protein (CHOP) is crucial for the induction of caspase-11 and the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced inflammation. *J Immunol*. 2006;176:6245-6253.
 35. Isobe Y, Chen ST, Nakane PK, Brown WR. STUDIES ON TRANSLOCATION OF IMMUNOGLOBULINS ACROSS INTESTINAL EPITHELIUM I. IMPROVEMENTS IN THE PEROXIDASE-LABELED ANTIBODY METHOD FOR APPLICATION TO STUDY OF HUMAN INTESTINAL MUCOSA. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 1977;10:161-171.
 36. Kim-Mitsuyama S, Yamamoto E, Tanaka T, Zhan Y, Izumi Y, Izumiya Y, Ioroi T, Wanibuchi H, Iwao H. Critical role of angiotensin II in excess salt-induced brain oxidative stress of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 2005;36:1083-1088.
 37. Nakagawa O, Ogawa Y, Itoh H, Suga S, Komatsu Y, Kishimoto I, Nishino K, Yoshimasa T, Nakao K. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest*. 1995;96:1280-1287.
 38. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74:609-619.
 39. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*.

- 2001;2:63-67.
40. Li Y, Schwabe RF, DeVries-Seimon T, Yao PM, Gerbod-Giannone MC, Tall AR, Davis RJ, Flavell R, Brenner DA, Tabas I. Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6: model of NF-kappaB- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2005;280:21763-21772.
 41. Namba T, Tanaka K, Ito Y, Ishihara T, Hoshino T, Gotoh T, Endo M, Sato K, Mizushima T. Positive role of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, a transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response in the development of colitis. *Am J Pathol*. 2009;174:1786-1798.
 42. Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem*. 1988;263:1353-1357.
 43. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev*. 2008;88:581-609.
 44. Ermak G, Davies KJ. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol*. 2002;38:713-721.
 45. Gorlach A, Klappa P, Kietzmann T. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:1391-1418.
 46. van der Vlies D, Makkinje M, Jansens A, Braakman I, Verkleij AJ, Wirtz KW, Post JA. Oxidation of ER resident proteins upon oxidative stress: effects of altering cellular redox/antioxidant status and implications for protein maturation. *Antioxid Redox Signal*. 2003;5:381-387.
 47. Hayashi T, Saito A, Okuno S, Ferrand-Drake M, Dodd RL, Nishi T, Maier CM, Kinouchi H, Chan PH. Oxidative damage to the endoplasmic reticulum is implicated in ischemic neuronal cell death. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:1117-1128.
 48. Terai K, Hiramoto Y, Masaki M, Sugiyama S, Kuroda T, Hori M, Kawase I, Hirota H. AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*. 2005;25:9554-9575.

49. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 1994;94:1621-1628.
50. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation.* 1997;95:320-323.
51. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:197-208.
52. Kaiser RA, Liang Q, Bueno O, Huang Y, Lackey T, Klevitsky R, Hewett TE, Molkentin JD. Genetic inhibition or activation of JNK1/2 protects the myocardium from ischemia-reperfusion-induced cell death in vivo. *J Biol Chem.* 2005;280:32602-32608.
53. Chua CC, Gao J, Ho YS, Xiong Y, Xu X, Chen Z, Hamdy RC, Chua BH. Overexpression of IAP-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773:577-583.
54. Shan X, Xu X, Cao B, Wang Y, Guo L, Zhu Q, Li J, Que L, Chen Q, Ha T, Li C, Li Y. Transcription factor GATA-4 is involved in erythropoietin-induced cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 2009;134:384-392.
55. Burger D, Xiang F, Hammoud L, Lu X, Feng Q. Role of heme oxygenase-1 in the cardioprotective effects of erythropoietin during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296:H84-93.
56. Goodall JC, Wu C, Zhang Y, McNeill L, Ellis L, Saudek V, Gaston JS. Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:17698-17703.
57. Hattori T, Ohoka N, Hayashi H, Onozaki K. C/EBP homologous protein (CHOP) up-regulates IL-6 transcription by trapping negative regulating NF-IL6 isoform. *FEBS Lett.* 2003;541:33-39.
58. Prasad A, Stone GW, Holmes DR, Gersh B. Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the "dark side" of reperfusion. *Circulation.* 2009;120:2105-2112.
59. Tsujita K, Shimomura H, Kawano H, Hokamaki J, Fukuda M, Yamashita T, Hida S,

- Nakamura Y, Nagayoshi Y, Sakamoto T, Yoshimura M, Arai H, Ogawa H. Effects of edaravone on reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2004;94:481-484.
- 60.** Nakamura Y, Yamada Y, Shimomura H, Nagayoshi Y, Tsujita K, Yamashita T, Fukuda M, Ohba K, Nako H, Ogura Y, Chitose T, Yamaguchi M, Nagata T, Soejima H, Kaikita K, Sugiyama S, Ogawa H. The effect of edaravone on plasma monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with acute myocardial infarction. *J Cardiol.* 2009;54:416-424.
- 61.** Qi X, Okuma Y, Hosoi T, Nomura Y. Edaravone protects against hypoxia/ischemia-induced endoplasmic reticulum dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311:388-393.
- 62.** West MB, Rokosh G, Obal D, Velayutham M, Xuan YT, Hill BG, Keith RJ, Schrader J, Guo Y, Conklin DJ, Prabhu SD, Zweier JL, Bolli R, Bhatnagar A. Cardiac myocyte-specific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemia/reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition. *Circulation.* 2008;118:1970-1978.