

称号及び氏名	博士(獣医学) ミュラー 樹
学位授与の日付	平成22年9月30日
論文名	EphB and ephrin-B expression and their function in the myocardial tissue (心筋組織における EphB と ephrin-B の発現と働き)
論文審査委員	主査 小川 和重 副査 岡田 利也 副査 玉田 尋通

論文要旨

緒言

哺乳類の心臓は2つの心房と2つの心室を持つ筋性の臓器で、血液を全身に循環させる生体ポンプとして機能する。心臓の壁は心内膜、心筋層、心外膜の3層構造を示し、中層の心筋層が最も厚い。心筋層は心筋細胞が合胞体化して形成される心筋線維網とその間を充填する線維性結合組織から成り、その中に毛細血管網が心筋細胞の周囲を取り巻くように構築されており、組織学的に非常に複雑な形態をもつ。しかしながら、現在までに正常な心筋組織における細胞・組織構築の維持機構は十分に解明されておらず、この機構の分子学的機序の解明は重要な基礎研究となると考えられる。

ところで、受容体型チロシンキナーゼで最大のファミリーを構成する Eph とそのリガンドである ephrin は、発生期の様々な組織に強く発現し、細胞の接着や運動を制御して細胞の組織化に関与する膜タンパクである。近年、成体の臓器・組織でも Eph と ephrin が細胞構築維持や生理的な機能維持に働くことが報告されている。本研究では、心筋組織において Eph と ephrin が細胞構築維持分子として機能していると仮定して、心室における Eph と ephrin の発現と局在部位を明らかにし、心筋細胞における Eph/ephrin シグナルの働きを検討した。

第一章 心臓における EphB と ephrin-B の発現

Ephrin は分子構造に基づき、GPI アンカー型の ephrin-A サブクラス(A1~A5)と膜貫通型の ephrin-B サブクラス(B1~B3)に分類される。Eph もリガンドへの結合親和性から ephrin-A と結合する EphA (A1~A8, A10)と、ephrin-B と結合する EphB (B1~B4, B6)が哺乳類では同定されている。これまでに遺伝子ノックアウト動物を用いた実験から、EphB と ephrin-B が発生期の心臓の血管構築に不可欠な因子であると報告されているが、その発現を成体と胎子の心臓で比較した報告は存在しない。そこで本章では、成体の心室における EphB と ephrin-B の発現と局在を検討した。

第一節 胎子と成体の心臓における EphB と ephrin-B の発現

RT-PCR で胎子と成体のマウスの心室における EphB 及び ephrin-B の発現を調べた結果、すべての B サブクラスが胎子及び成体の心室で発現していることが判明した。EphB1 の発現は成体の心臓で有意に増強し、EphB2 と EphB4 の発現は胎子と成体で同程度であった。成体の心室におけるタンパク発現を調べた結果、EphB3 と EphB4 に弱いチロシンリン酸化が認められ、一部は ephrin-B と結合することで、活性化していることが示唆された。

第二節 成体の心臓における EphB と ephrin-B の局在

正常な成体マウスの心臓における EphB と ephrin-B の局在を調べるために、ABC 法および蛍光抗体法による免疫染色を行った。ABC 法により、血管内皮細胞は EphB3、EphB4 と ephrin-B1 を発現していることが明らかになった。また血管内皮細胞と心筋細胞膜を識別するために、血管内皮細胞のマーカーである CD31 と EphB の免疫二重染色を行った。EphB4 は血管内皮細胞だけではなく、心筋細胞の細胞膜に局在していることが判明した。

第三節 EphB の活性化と心筋細胞の同調性拍動

心筋細胞に発現する EphB の機能を明らかにするために、in vitro で細胞塊を形成し、隣接心筋細胞塊と同調して自律拍動する初代培養心筋細胞 (primary cultured cardiomyocytes; PCM) を用いて解析を行った。まず、PCM における EphB と ephrin-B の発現を RT-PCR で検討した結果、ephrin-B3 を除くすべての B サブクラスの発現が認められた。次に、可溶性のリガンドである ephrin-B1-Fc を培養液に添加して PCM に発現する EphB の強い活性化を行い、PCM の拍動に及ぼす影響を検討した。その結果、隣接心筋細胞塊間の拍動リズムの同調性は ephrin-B1-Fc の添加により消失することが判明した。

第二章 拍動解析ツールの開発

前章で明らかにした心筋細胞塊間の同調性拍動の消失現象を詳細に解析するため、動画から心筋細胞の拍動リズムをグラフ化することで、拍動の同調性を解析することができる画像解析ソフトの開発を行った。心筋細胞の初代培養は容易ではなく、多数の胎子の使用が不可欠である。そこで、PCM の代替となり得る細胞の利用を検討するために、マウス胚性癌腫細胞 P19CL6 の効率的な心筋細胞への分化法の開発を試みた。

第一節 胚性癌腫細胞の心筋細胞への分化

P19CL6 は培養が比較的容易であり、また簡便な方法によって効率よく心筋細胞へ分化する細胞株である。しかしながら、本研究において既存の分化法では高い効率で心筋細胞に分化させることができず、実験間で分化効率に大きな差が認められた。そこで、P19CL6 から多層的に増殖する亜株 P19CL6-A1 (A1) を作出し、P19CL6 と A1 を使用して分化法の改良を試みた。その結果、培養液中の牛胎子血清濃度を既報よりも下げ、P19CL6 では分化剤として 10 μ M の 5-azacytidine (5-Aza) を 24 時間作用させ、その後 1.0% DMSO 存在下で分化させる方法が、A1 では 10 μ M の 5-Aza を 72 時間作用させ、その後同様に DMSO 存在下で分化させる方法が最適であった。この分化条件で、拍動細胞の出現頻度がピークとなる分化刺激後 16 日目の α -myosin heavy chain mRNA は、P19CL6 と比べ A1 で有意に強く発現していた。さらに、心筋細胞のマーカーである α -actin の蛍光免疫染色を行い、陽性細胞が占める割合を計測した結果、その割合は 4 割程度ではあったが A1 で有意な増大が認められた。初代培養では 9 割以上が心筋細胞であることを考慮すると、EphB/ephrin-B シグナルの解析には初代培養を選択すべきであると判断された。

第二節 拍動解析ソフトの開発

心筋細胞は周期的に収縮する。周期的な回帰性を示す運動を撮影した動画からその周期を解析する方法として、相関係数を因子とする方法がある。すなわち、ある任意の動画構成画像と各時点における構成画像の類似性を相関係数として表し、縦軸を相関係数、横軸を時間でグラフ化する。本章では、任意に指定した最大 6 箇所的心筋細胞塊の拍動を解析するソフト VisoRhythm の開発を行った。前節の方法で分化させた A1 由来の心筋細胞に、強心剤 (Ouabain と 3-isobutyl-1-methylxanthine) を濃度段階的に添加して拍動を記録した動画から、VisoRhythm を用いて拍動周期を数値化して用量反応曲線を描き、VisoRhythm の有用性を実証した。

第三節 PCM の VisoRhythm による拍動解析

第一章第三節で観察された拍動の同調性消失現象を VisoRhythm で解析した。PCM の培養液に ephrin-B1-Fc を添加してから約 15 分後に間欠的な拍動の同調性の乱れが一時的に出現した。この一時的に発生した乱れは非常に短時間で起こる現象で、動画の目視だけでは見落とす可能性が高く、VisoRhythm による解析で初めて明らかになった。さらに ephrin-B1-Fc 添加後約 20 分で 2 つの隣接心筋細胞塊は完全に拍動周期が異なり、独自に自律拍動していた。

第三章 EphB シグナルと connexin43

心筋細胞の拍動刺激はギャップ結合により隣接心筋細胞に伝播する。ギャップ結合は膜タンパクである connexin が環状の 6 量体 (connexon) を細胞膜上に形成され、それに隣接した細胞膜上に同様に形成される connexon と結合することで構築される細胞間チャンネルである。本章では、ephrin-B1-Fc 添加による心筋細胞塊間の拍動の同調性消失現象が、ギャップ結合型細胞間情報伝達 (GJIC) の遮断に起因すると仮定し、心室の心筋細胞に発現する主な connexin である Connexin43 (Cx43) と EphB の相互作用について検討した。

第一節 PCM に発現する EphB の活性化動態

Ephrin-B1-Fc 添加による心筋細胞塊間の同調性拍動の変調と EphB のリン酸化レベルの相関を解析するために、心筋細胞膜に局在する EphB4 について免疫沈降とウエスタンブロットを用いて EphB4 のリン酸化動態を検討した。本節では EphB4 との結合親和性が ephrin-B1-Fc よりも高い ephrin-B2-Fc を PCM に添加した。添加 0 分後の EphB4 のチロシンリン酸化は微弱であったが、心筋細胞塊間の同調性拍動の変調が始まる 15 分後に強いリン酸化が起こり、その強いリン酸化は 60 分後にも認められた。

第二節 ephrin-B 添加が GJIC に及ぼす影響

EphB の活性化が GJIC に及ぼす影響を Scrape Loading (SL) 法により検討した。SL 法とは、ギャップ結合を通過する膜不透過性蛍光色素 (Lucifer Yellow: LY) を培養液中に加え、細胞を鋭利な刃物で割裂することで LY を細胞内に直接導入し、一定時間後に割裂部位から隣接する細胞への蛍光色素の拡散程度を評価する手法である。本節では、PCM の他に細胞株である NRK (Normal Rat Kidney) を用いて解析を行った。NRK は Cx43 を発現し、ギャップ結合の研究に汎用されている細胞株であり、EphB3、B4、B6 と ephrin-B1、-B2 を発現していた。NRK では、GJIC を遮断すると報告されている EGF と同程度の遮断効果が ephrin-B1-Fc 添加後 15 分、30 分において認められた。PCM においても ephrin-B1-Fc 添加により GJIC の遮断が誘導され、その遮断効果は NRK を用いて得られた結果と同程度であった。

第三節 EphB4 と connexin43 の相互作用

心筋細胞における EphB4 と Cx43 の分子間相互作用について免疫沈降とウエスタンブロットによる Pull-down assay で検討を行った。PCM において、内因性の EphB4 は Cx43 と共沈し、さらに ephrin-B1-Fc 添加 15 分後において両分子の結合性が増加することが明らかになった。

総括

1. 成体の心臓には EphB と ephrin-B サブクラスの mRNA が発現し、EphB3 と EphB4 はチロシンリン酸化していることが明らかになった。また、血管内皮細胞には EphB3、EphB4 と ephrin-B1、心筋細胞には EphB4 が局在することも判明した。
2. 胚性癌腫細胞 P19CL6 から亜株 A1 を作出し、既存の方法を改良し効率的な心筋細胞への分化法を開発した。また、動画から拍動を解析するソフト VisoRhythm を開発し、A1 から分化した心筋細胞を使って強心薬の薬理学的作用を明示して、ソフトの有用性を実証した。
3. PCM に ephrin-B1-Fc を添加して EphB を強く活性化させると隣接心筋細胞塊間の拍動の同調性が消失した。PCM において EphB の活性化は GJIC の遮断を誘導すること、EphB4 と Cx43 の結合性を増強させることが明らかになった。

以上より、心筋組織において血管内皮に発現する ephrin-B1 と心筋細胞に発現する EphB4 が結合すると、心筋細胞の合胞体形成の主要分子である Cx43 に作用して心筋細胞の脱合胞体化に関与することが示唆された。しかし、正常心筋組織では基底膜が両細胞間に存在し、両分子が結合できないため、EphB/ephrin-B シグナルは心臓の組織構築が変化する病的な状態、あるいは発生期において役割を果たすのではないかと推測される。

審査結果の要旨

心臓は血液を循環させるポンプとして働く臓器である。心臓の壁は心内膜、心筋層（心筋組織）、心外膜の3層から成り中層の心筋層が最も厚い。心筋層は心筋細胞（心筋線維）が合胞体化して形成される心筋線維網とその間を充填する結合組織から成り、その中で毛細血管網が心筋細胞の周囲を取り巻くように構築され、組織学的に非常に複雑な形態を示すが、この複雑な細胞・組織構築の形成・維持機構は十分に解明されていない。

細胞の組織化に関与する膜タンパクとして受容体型チロシンキナーゼ Eph とそのリガンド ephrin が挙げられる。Eph は分子構造に基づき EphA (A1~A8, A10) と EphB (B1~B4, B6) に、ephrin は EphA と結合する ephrin-A (A1~A5) と EphB と結合する ephrin-B (B1~B3) に分類される。Eph と ephrin は発生期に強く発現し細胞の組織化に関与することが報告されているが、近年、成体の臓器・組織でも細胞構築維持や生理的な機能調節に働くことが明らかにされてきた。心臓においては、EphB と ephrin-B が発生期の血管構築に不可欠な分子であると報告されているが、その発現と働きを成体の心臓で調べた報告は存在しない。本研究では、成体の心筋組織における EphB と ephrin-B の発現と局在部位を明らかにし、心筋細胞における EphB シグナルの働きを培養心筋細胞で検討した。

第1章では、成体マウスの心室における EphB および ephrin-B の発現と局在部位を検討した。その結果、(1)すべての EphB と ephrin-B の mRNA が発現していること、(2) EphB3 と EphB4 タンパクはリン酸化し活性化していること、(3) EphB4 は心筋細胞に、EphB3、EphB4 と ephrin-B1 は毛細血管内皮細胞に局在していることが明らかになった。心筋細胞に発現する EphB の機能を解明するために、初代培養心筋細胞 (PCM) を用いて EphB の活性化が PCM に及ぼす影響を検討した。PCM は細胞塊を形成し隣接心筋細胞塊と同調して自律拍動する。可溶性リガンド ephrin-B1-Fc (B1-Fc) を PCM に添加すると隣接心筋細胞塊間の拍動の同調性が消失したため、EphB の強い活性化は心筋細胞の同調性拍動に影響を及ぼすことが示唆された。

心筋細胞の初代培養は容易でなく、解析には多くの実験動物の胎子心臓を材料に PCM を作製する必要がある。第2章では、分化多能性を有するマウス胚性癌腫細胞 P19CL6 を材料に効率的な心筋細胞分化法の開発を試み PCM の代替材料になるか検討した。P19CL6 から作出した亜株 A1 と親株を既法の方法を改良して分化させ、分化効

率を α -actin 発現陽性細胞の出現率と α -myosin heavy chain の mRNA 発現量を指標に比較検討した。A1 の分化効率は親株と比べ有意に高く作製には成功したが、9 割以上が心筋細胞である初代培養に比べ割合は著しく低く、代替材料として適さないと判断された。また本章では、拍動の同調性を解析できる画像解析ソフトの開発を行った。任意の動画構成画像のある領域と各時点における構成画像の同一領域の類似性を相関係数として表し、縦軸を相関係数、横軸を時間としてグラフ化するソフト VisoRhythm を開発した。VisoRhythm は最大 6 箇所的心筋細胞塊の拍動を解析できる。PCM の拍動の同調性消失現象を VisoRhythm で解析した結果、B1-Fc 添加約 15 分後に間欠的な拍動の同調性の乱れが一時的に出現し、約 20 分後に 2 つの隣接心筋細胞塊は完全に拍動周期が異なることが判明した。

第 3 章では、B1-Fc 添加後の EphB4 の活性化動態をチロシンリン酸化レベルの測定により解析した。その結果、EphB4 の強い活性化は B1-Fc 添加 15 分後に起こり、60 分後にも引き続き認められた。加えて、B1-Fc 添加による拍動の同調性消失現象が、ギャップ結合型細胞間情報伝達 (GJIC) の阻害に起因すると仮定し、その検証を行った。心筋細胞の拍動刺激はギャップ結合 (GJ) により隣接心筋細胞に伝播するが、心筋細胞の GJ は 12 量体の connexin43 (Cx43) によって形成される細胞間チャンネルである。EphB4 の活性化が GJIC に及ぼす影響を Scrape Loading (SL) 法で検討した。その結果、PCM において B1-Fc 添加により GJIC が有意に阻害されることが明らかになり、EphB4 の活性化は心筋細胞の GJIC 阻害を誘導することが示唆された。また、EphB4 と Cx43 の分子間相互作用について免疫沈降とウエスタンブロットにより検討した。その結果、内因性の EphB4 は Cx43 と共沈し、B1-Fc 添加で両分子の結合性は増強することが明らかになり、活性化 EphB4 は Cx43 に作用して GJIC を阻害することが示唆された。

本研究で、(1)成体の心臓において心筋細胞は EphB4 を発現していること、(2)B1-Fc を添加して EphB4 を活性化させると隣接心筋細胞塊間の拍動の同調性が消失すること、(3)開発した拍動解析ソフト VisoRhythm で拍動の同調性消失現象を解析すると、添加約 15 分後からこの現象は出現し、EphB4 の強い活性化との相関性が示唆されたこと、(4)EphB4 の強い活性化は GJIC の遮断を誘導し、拍動の同調性消失は GJIC の遮断に起因する可能性が高いことが明らかになった。これらの成果は、心筋組織における細胞構築の形成・維持機構の解明に寄与し、獣医学・医学の発展に貢献すると判断される。従って、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。