

# 厚生科学研究費補助金

厚生科学特別研究事業

心不全の病態解明と原因遺伝子の同定に関する研究

平成 12 年度 総括研究報告書

主任研究者 小室 一成

平成 13 (2001) 年 3 月

## 目 次

### I. 総合研究報告

心不全の病態解明と原因遺伝子の同定に関する研究 . . . . . 1

小室一成

### II. 分担研究報告

1. 心不全の原因遺伝子同定にむけての核酸代謝遺伝子の解析に関する研究 . . . . . 4

森崎 隆幸

2.  $Ca^{2+}$ 調節に関連した心不全に関与する遺伝子の検索 . . . . . 6

竹島 浩

3. 心筋肥大における rap1GAPII の役割 . . . . . 8

望月 直樹

4. サイトカイン受容体 gp130 による心筋細胞保護の分子機序 . . . . . 10

廣田 久雄

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 12

IV. 研究成果の刊行 . . . . . 17

## 研究要旨

心不全の病態形成の機序を解明するために、転写因子、サイトカイン、核酸代謝、Ca<sup>2+</sup>調節、シグナル伝達に関係する分子について遺伝子改変マウスを作成し、生理学、組織学、生化学、分子生物学的手法を用いて解析した。その結果、これらの分子の異常により、心臓の組織、機能に異常が生じることが明かとなった。

今後、DNA microarray 等を用い、個々の分子の心機能における役割について解析する。

森崎 隆幸 国立循環器病センター研究所

バイオサイエンス部長

竹島 浩 久留米大学 分子生命科学研究所教授

望月 直樹 国立循環器病センター研究所

循環器形態研究部部长

廣田 久雄 大阪大学大学院医学研究科

分子病態内科学助手

以下の9種類の遺伝子改変マウスを解析し、心不全の病態形成の機序を解明する。

### ①心筋特異的ホメオボックス遺伝子 CSX

CSX を過剰発現したトランスジェニックマウスを作成した。さらに転写抑制作用のある *Engrailed* と CSX を融合し、CSX の dominant negative 分子を作成し、出生後の心臓に過剰発現するマウスを作成した。この二種類の遺伝子改変マウスを用い、心機能、心臓の組織所見、遺伝子発現等について解析した。

### ②gp130

gp130 は心肥大を惹起する液性因子のひとつであるサイトカイン受容体である。我々はこの gp130 およびその下流に存在する STAT3 の心室特異的遺伝子欠損マウス、活性型および dominant negative STAT3 を過剰発現させたマウスを作成した。gp130、STAT3 が関与するシグナル関連蛋白の圧負荷肥大時における遺伝子発現の変化を DNA microarray 法により検討した。

### ③核酸代謝遺伝子

AMP deaminase をコードする AMPD 遺伝子の一つである AMPD3 ゲノムの変異ヘテロマウス、ホモマウスを作成した。

### ④ジャンクトフィリン

興奮性細胞に共通して存在する結合膜構造の構成蛋白の一つであるジャンクトフィリンについて、サブタイプの解析、組織分布の検討、機能発現実験に

## A. 研究目的

心不全患者数は年々増加しており、高齢者の 10 人に 1 人が心不全を呈していると推定されている。また心不全の予後は極めて不良であり、心不全患者全体の 5 年生存率は 50% 以下であり、重症心不全患者では 3 年生存率が 30% 以下と言われている。特に高齢化社会をむかえる我が国において、心不全の病態の解明および有用な予防、治療法の確立は急務である。心不全に関しては、従来血行動態を中心とする生理学的研究が広くなされてきたが、心不全を惹起する因子は多岐にわたり、その分子レベルでのメカニズムは十分に解明されていない。近年、分子生物学および遺伝子工学の急速な進歩により、個々の分子レベルの発現、機能解析が *in vitro* のみでなく、*in vivo* においても可能となった。我々の研究目的は、疾患モデルマウスにより心不全の病態を遺伝子レベルから明らかにし、病態に応じた新しい治療法を確立することにある。

## B. 研究方法

よる機能解析を行い、心筋に発現するジャンクトフィリンサブタイプの欠損マウスを作製した。

#### ⑤rap1GAPII

三量体 GTP 結合蛋白質  $G\alpha_i$  と結合することで活性化される rap1GAPII を心臓特異的に発現するマウスを作成し、生化学および組織学的に検討した。

(倫理面への配慮)

いずれの研究もマウスを用い、ヒトを扱うことはない。マウスは動物愛護の精神にのっとり、各施設の動物実験取り扱い規約に厳密に従って実験に用いる。

### C. 研究結果

#### ①心筋特異的ホメオボックス遺伝子 CSX

CSX を過剰発現したトランスジェニックマウス (CSX tg) では、ANP、BNP、CARP などの心臓特異的遺伝子の発現が亢進していた。また、心毒性のあるアドリアマイシンの投与による心機能の低下は野生型にくらべ軽度であった。CSX の dominant negative 分子を過剰発現したマウス (CSXLP tg) では組織所見上心筋線維の疎少化、神経線維および毛細血管の増加が見られ、アドリアマイシンの投与により、野生型にくらべ apoptosis を呈する心筋細胞が多かった。

#### ②gp130

gp130 欠損マウスの心臓は圧負荷に対して、多数の心筋細胞が apoptosis を呈し、心不全死した。STAT3 欠損マウスは心拡大および繊維化、肝臓のうっ血などの心不全症状を示した。

#### ③核酸代謝遺伝子

AMPD3 ゲノムの変異ヘテロマウス、ホモマウスはともに正常に発育し、外見上大きな変化は見られず、妊娠も可能であった。また、他の AMPD 遺伝子群の代償的発現も見られなかった。

#### ④ジャンクトフィリン

ジャンクトフィリンは表層膜と結合し筋小胞体膜

を貫通することにより結合膜構造の形成に寄与することが明かとなった。ジャンクトフィリン欠損マウスは受精後 9.5 日に心臓拍動が微弱化し、その翌日には死亡した。ジャンクトフィリン欠損マウス胎児の心筋細胞では結合膜構造が減少し、収縮反応に必要な  $Ca^{2+}$  トランジェントが減弱あるいは消失していた。

#### ⑤rap1GAPII

心臓特異的 rap1GAPII ヘテロトランスジェニックマウスでは活性型の Rap1、Rap2 ともに減少していたが、MAP キナーゼのひとつである Erk の活性化はみられず、組織学的に心肥大も認められなかった。

### D. 考察

#### ①心筋特異的ホメオボックス遺伝子 CSX

CSX は出生後の心臓においても高度に分化した心筋細胞の形質維持、保護に重要であることが明かとなった。今後は CSX tg、野生型、CSXLP tg の遺伝子発現を DNA chip により比較し、心筋細胞の形質維持に必要な分子を比較する。

#### ②gp130

STAT3 は心機能の維持に重要であることが明かとなった。今後、活性型および dominant negative STAT3 を過剰発現させたマウスについてその遺伝子発現を DNA microarray 法により検討する。

#### ③核酸代謝遺伝子

今後、AMPD3 ゲノムの変異マウスを用いて虚血あるいは負荷時の心筋の機能変化について比較検討を要する。

#### ④ジャンクトフィリン

ジャンクトフィリンは心臓の興奮収縮連関の維持に必要な結合膜構造蛋白質であることが明かとなった。今後心不全の原因遺伝子として疾患との関連性について検討する。

#### ⑤rap1GAPII

今後ホモ体での解析をする予定である。

## E. 結論

薬物療法、循環補助装置、心臓移植治療等の進歩にもかかわらず、重症心不全患者は増加の一途をたどっている。本研究のこれまでの成果は心不全の新たな治療法の確立に寄与し、今後の研究の継続は社会的に非常に重要である。

## F. 健康危険情報 該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

竹島浩「リアノジン受容体と細胞内  $Ca^{2+}$  ストア」  
生化学 73 巻 : 5-14, 2001.

廣田久雄「心疾患におけるシグナル伝達分子 gp130 の生理学的意義とその応用」バイオサイエンスとイ  
ンダストリー 58 巻 : 27-30, 2000.

小室一成「心不全の遺伝子治療・細胞移植治療」循環  
器専門医第 8 巻 : 217-224, 2000.

Mochizuki N, et al. Crk Activation of JNK via C3G  
and R-Ras. J Biol Chem 275:12667-12671, 2000.

Takeshima H, et al. Junctophilins: a novel family  
of junctional membrane complex proteins.  
Mol Cell 6:11-22, 2000.

Morisaki H, et al. First missense mutations  
(R388W and R425H) of AMPD1  
accompanied with myopathy found in a Japanese  
patient. Hum Mut 16:467-472, 2000.

Funamoto M, et al. Signal transducer and  
activator of transcription 3 is required for  
glycoprotein 130-mediated induction of vascular  
endothelial growth factor in cardiac myocytes. J  
Biol Chem 275:10561-6, 2000.

Saito S, et al.  $\beta$ -adrenergic pathway induces  
apoptosis through calcineurin activation in cardiac  
myocytes. J Biol Chem 275:34528-33, 2000.

Zhu W, et al.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase  
II and calcineurin play critical roles in endothelin  
-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. J Biol  
Chem 275:15239-45, 2000.

Oka T, Komuro I, et al. Fibroblast growth factor  
plays a critical role in SM22  $\alpha$  expression during  
Xenopus Embryogenesis. Arterioscler Thromb  
Vasc Biol 20:907-14, 2000.

### 2. 学会発表

竹島浩「 $Ca^{2+}$ シグナルの普遍性と分化」日本生化学  
会年會会場（横浜）平成 12 年 10 月

望月直樹、松原道行「三量体 GTP 結合蛋白質 Gai  
による制御を受ける Rap1 水解促進因子を介した Erk  
活性化機構」第 73 回日本生化学会総会（横浜）  
平成 12 年 10 月

森崎隆幸他「AMPD 遺伝子群の SNPs 解析」第 45  
回日本人類遺伝学会第 45 回大会、福岡市、2000 年  
10 月 25-27 日

Takeshima H, et al. Novel protein components in  
skeletal muscle ryanodine receptor, Gordon  
Research Conference;  
USA, Jun, 2000.

Mochizuki N, et al: Activation of the ERK/MAPK  
pathway by an isoform of rap1GAP associated with  
Gai. Keystone Symposium Signaling 2000.  
Keystone USA..January, 2000.

Komuro I. Functional Analysis of Csx/NKX2.5  
Mutations That Cause Human Congenital Heart  
Disease. American Heart Association, New Orleans.  
November, 2000.

## H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

分担研究報告書

心不全の原因遺伝子に同定に向けての核酸代謝遺伝子の解析に関する研究

分担研究者 森崎 隆幸 国立循環器病センター研究所 バイオサイエンス部

研究要旨

心不全の発症機序を解明し、予防および治療の新しいストラテジーを開発するために、遺伝子改変マウスを利用した遺伝子機能の解析に向けた研究を推進した。すなわち、心不全の病態生理について理解をすすめて有効な新しい治療法・予防法の開発を行うことを目指し、今年度はエネルギー源である ATP さらに生理活性物質であるアデノシンの調節に大きくかかわるアデニンヌクレオチド代謝を標的に、*in vitro*での解析をおこなうべく、AMPD3 遺伝子破壊によるモデルマウスの作製を進め、AMPD3 遺伝子欠損ヘテロ接合体およびホモ接合体マウスを得た。この動物は心筋のヌクレオチド代謝に変化のある貴重なモデルと考えられ、さらに検討を進める予定である。

A. 研究目的

心不全の発症機序を解明し、予防及び治療の新しいストラテジーを開発するために、遺伝子改変マウスを利用した遺伝子機能の解析に向けた研究の推進は欠かせない。

本研究は ATP やアデノシンなどエネルギー源、シグナル伝達分子の調節に深く関わるアデニンヌクレオチド代謝の機能的理解のため、代謝律速となる AMPD の機能を AMPD3 遺伝子を対象に遺伝子改変動物を用いて機能解析を行うことにより、こうした目的に近づこうとするものである。アデニンヌクレオチド代謝は ATP やアデノシンなどエネルギー源、シグナル伝達分子の調節に深く関わり、心血管系の機能に深く関係する。この代謝系の律速酵素である AMPD は遺伝子欠損症が欧米で高頻度に見られるが、心不全において、この遺伝子欠損と予後が逆相関することが報告され注目されている。一方、虚血再灌流において活性化される遺伝子として AMPD3 が報告され、虚血ならびに心機能不全におけるこの代謝系の機能解析を個体レベルで行うことは意義深く、心血管系の病態解明や治療標的として興味のある結果お徳ることが期待される。

そこで、動物モデルを用いて AMPD3 遺伝子の破壊をおこない、そのモデルを用いてヌクレオチド代謝と心不全の関係、さらに治療標的としての評価を行うこ

ととした。

B. 研究方法

我々がすでに明らかにしたマウス AMPD3 遺伝子のゲノム DNA 情報をもとに活性中心に Neomycin 耐性遺伝子を挿入し、3'端にジフテリア毒素遺伝子 A 鎖を付加した遺伝子破壊用ベクターを構築した。得られたベクター（ノックアウトベクター）を ES 細胞に導入し、相同組み換え体を選択し、胚盤胞へのインジェクションにより、機能破壊された AMPD3 遺伝子アレルを有するキメラマウスを作製した。さらに AMPD3 遺伝子欠損アレルを有するクローンの交配により AMPD3 遺伝子変異ヘテロマウス、ホモマウスを作製した。作成したマウスにおける遺伝子発現の変化について検討した。

（倫理面への配慮）

研究には動物モデルを用い、ヒトを扱うことはない。また、実験における動物の使用は動物愛護の精神に則り、施設の実験動物取り扱い基準に従って行う。

C. 研究結果

これまで我々が明らかにしたマウス AMPD3 遺伝子のゲノム DNA 情報を利用して、活性中心に Neomycin 耐性遺伝子を挿入し、3'端にジフテリア毒素遺伝子 A

遺伝子 A 鎖を付加した遺伝子破壊用ベクターは容易に構築でき、また、相同組換えにより生ずるクローンに見られるべきゲノム構造の特徴をもつ DNA 断片を作成することができた。こうした情報を相同組換えクローンのスクリーニング法、ことに PCR による検証法として確立することができ、それに基づいて相同組換え ES クローンの選別を行えた。得られた相同組換え ES クローンによるキメラマウス発生も特に問題なく進めることができた。さらに、キメラマウスの交配により AMPD3 遺伝子異常についてのヘテロ接合体を得ることができた。AMPD3 遺伝子異常ヘテロ接合体同士との交配により、AMPD3 遺伝子異常ホモ接合体個体を得ることができたが、これまでの観察では、AMPD3 遺伝子異常ホモ接合体には、個体レベルで見いだされた異常は今のところ明らかではない。

#### D. 考察

AMPD3 遺伝子の破壊されたマウスはホモ接合体、ヘテロ接合体とも正常に発育し、外見上大きな変化は見られず、妊娠も可能であり、今のところ、胎児期の発生やその後の発育には影響がないと判断された。一方、AMPD 遺伝子群について AMPD 発現するが、ほかの AMPD 遺伝子のほとんど発現しない事の知られる心臓について RNA および蛋白レベルで AMPD 遺伝子及びその産物について検討したところ、AMPD3 については正常 mRNA は検出されず蛋白レベルでも発現していないが、他の遺伝子の代償的発現も見られなかった。このことから、心筋自身の AMPD 機能の変化を来すモデルが得られた。今後、虚血負荷による変化の有無、単離心筋を用いた検討など、心筋におけるアデニンヌクレオチド代謝と機能変化、心筋障害におけるアデニンヌクレオチド代謝の役割などについての検討が必要であると考えられる。

#### E. 結論

AMPD3 遺伝子破壊マウスは外見上大きな変化をも

たらさなかったが、アデニンヌクレオチド、アデノシン、IMP の心筋での機能を明らかにする目的で興味深いモデルと考えられる。

#### F. 健康危険情報 該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Morisaki H, Higuchi I, Abe M, Osame M, Morisaki T. First missense mutations (R388W and R425H) of AMPD1 accompanied with myopathy found in a Japanese patient. *Hum Mut* 16:467-472, 2000.

Morisaki H, Morisaki T, Kariko K, Genetta T, Holmes EW: Positive and negative elements mediate control of alternative splicing in the AMPD1 gene. *Gene* 246:365-372, 2000.

Hisatome I, Kurata Y, Sasaki N, Morisaki T, Morisaki H, Tanaka Y, Urashima T, Yatsushashi T, Tsuboi M, Kitamura F, Miake J, Takeda S, Taniguchi S, Ogino K, Igawa O, Yoshida A, Sato R, Makita N, Shigemasa C. Block of Sodium Channels by Divalent Mercury: Role of Specific Cysteiny Residues in the P-Loop Region. *Biophysical Journal* 79:1336-1345, 2000.

##### 2. 学会発表

森崎隆幸他「AMPD 遺伝子群の SNPs 解析」第 45 回日本人類遺伝学会第 45 回大会、福岡市、2000 年 10 月 25-27 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得 該当なし

##### 2. 実用新案登録 該当なし

##### 3. その他 該当なし

## 研究要旨

興奮収縮連関を制御する Ca<sup>2+</sup>シグナリングにおいて小胞体は重要な機能を果たしている。この小胞体と心不全の関連を明かにするために、小胞体膜上蛋白であるジャンクトフィリンノックアウトマウスを作成し、解析した。ジャンクトフィリンノックアウトマウスは胎生期に心不全で死亡した。その心筋細胞では小胞体膜の結合膜構造が少なく、Ca<sup>2+</sup>シグナリングが消失ないし減弱した。ジャンクトフィリンは心臓の機能維持に必須な蛋白であり、心不全関連遺伝子の一つであることが判明した。

### A. 研究目的

循環器系筋細胞の収縮を制御する Ca<sup>2+</sup>シグナリングにおいて、小胞体は重要な機能を果たしている。しかしながら、Ca<sup>2+</sup>シグナリングに寄与する小胞体の蛋白の全容や生理機能、さらにその異常による病態については不明である。小胞体膜上の蛋白質リアノジン受容体やジャンクトフィリン、特に心筋細胞での機能について、明らかにする必要があると考えられた。

### B. 研究方法

平成 12 年度にはジャンクトフィリンのノックアウトマウスの作成とその解析が主に行われた。

#### (倫理面への配慮)

本申請においてなされる細胞および動物を取り扱うすべての実験は当該施設の倫理規約にのっておこなわれる。

### C. 研究結果

ジャンクトフィリン欠損マウスは受精後 9.5 日に心臓拍動が微弱化し、その翌日には死亡した。ジャンクトフィリン欠損マウス胎児の心筋細胞では結合膜構造が減少し、収縮反応に必須な Ca<sup>2+</sup>トランスジェントが減弱あるいは消失していた。

### D. 考察

心臓で高発現するジャンクトフィリンを欠損するマ

ウスは胎生期に心不全のため死亡する。その心筋細胞では細胞表層膜と小胞体膜の結合膜構造が極端に減少し、その結果異常な Ca<sup>2+</sup>シグナリングが生じていると結論された。従って、ジャンクトフィリンは心不全関連遺伝子の 1 つであることが判明した。

### E. 結論

ジャンクトフィリンは細胞表層膜と小胞体膜の近接構造の形成に関与する新規膜蛋白である。その欠損は心筋細胞の Ca<sup>2+</sup>シグナリングに異常を生じさせ、胎生期に致死的な心不全を引き起こす。

### F. 健康危険情報 該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

竹島浩「リアノジン受容体と細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストア」  
生化学 73 巻：5-14, 2001.

竹島浩「細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストア膜と細胞表層膜の近接構造の分子機構 小胞体膜タンパク質ジャンクトフィリンの発見」実験医学 18 巻：2351-2354, 2001.

Kouzu Y, Moriya T, Takeshima H, Yoshioka T, Shibata S. Mutant mice lacking ryanodine receptor type3 exhibit deficits of contextual fear conditioning and activation of calcium/calmodulin-dependent protein II in the



hippocampus. Molecular Brain Research 76:142-150, 2000.

Nishi M, Mizushima A, Nakagawara K, Takeshima H. Characterization of Human Junctophilin Subtype Genes. Biochemical and Biophysical Research Communications 273:920-927, 2000.

Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M. & Kangawa, K. Junctophilins: A Novel Family of Junctional Membrane Complex Proteins. Mol. Cell 6 : 11-22, 2000.

## 2. 学会発表

竹島浩「心筋細胞における  $Ca^{2+}$  ストアの機能」  
生化学会年会シンポジウム  $Ca^{2+}$  シグナルの普遍性と  
分化（日本生化学会年会会場 パシフィコ横浜  
2000年 10月 14日）。

Hiroshi Takeshima, Mitsugumins, novel protein components in skeletal muscle ryanodine receptor, Gordon Research Conference; USA, Jun, 2000.

## H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

## 研究要旨

心肥大における低分子量 GTP 結合蛋白質 Rap の役割を調べるため、Rap を抑制する蛋白質である Rap1GAPII を心臓特異的に発現するヘテロトランスジェニックマウスを作成し、組織学、生化学的に解析した。このトランスジェニックマウスの心臓では GTP-Rap1、GTP-Rap2 ともに減少していたが、組織学的には明かな変化を認めなかった。今後、ホモトランスジェニックマウスによる検討を行っていく。

### A. 研究目的

心肥大における低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras ファミリーの役割を遺伝子導入モデルで検討する。特に機能の不明な分子 Rap について調べる。Rap ファミリーは4つの蛋白質群からなるため、4つすべてのノックアウトは難しいので、Rap に対する水解促進蛋白質 rap1GAPII を発現させ Rap 機能を抑制することによる変化を調べる。

### B. 研究方法

- ① MLCv プロモーター下流で Cre リコンビナーゼを発現するマウスと CAG プロモーター下流に loxP-neo-loxP-rap1GAPII を発現するマウスを交配させ心臓特異的に rap1GAPII を発現するマウスを作成する。
- ② Rap ファミリーの活性化が抑制されているか否かを GST-RalGDS を用いた pull-down アッセイで調べる。
- ③ 心筋細胞の肥大・配列異常の有無を組織学的に検討する。

(倫理面への配慮)

国立国際医療センター研究所動物実験動物取り扱い規約を遵守して当該実験を行う。

### C. 研究結果

計画通りに rap1GAPII を心臓特異的に発現するマウスが得られた。イムノプロット法で rap1GAPII の蛋白質の発現を確認できた。心臓では GTP-Rap1、GTP-Rap2 ともに減少していることがわかった。

組織学的には明かな変化を認めなかった。

### D. 考察

Rap1GAPII の心臓特異的発現マウスでは明らかな表現型の異常を認めなかったが、今回用いたマウスは rap1GAPII のヘテロマウスであるのでホモマウスでの検討も必要と考えた。

### E. 結論

本年度、心臓特異的 rap1GAPII 発現マウスを作成できた。組織学的に心肥大など著変を認めなかったが、今後負荷モデルでの検討を行っていく。

### F. 健康危険情報 該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Mochizuki N, Ohba Y, Kobayashi S, Otsuka N, Graybiel A. M., Tanaka S, and Matsuda M. Crk Activation of JNK via C3G and R-Ras. J Biol Chem 275:12667-12671, 2000.

Ohba Y, Mochizuki N, Yamashita S, Chan A.M., Schrader JW, Hattori S, Nagashima K, and Matsuda M. Regulatory Proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. J Biol Chem 275:20020-20026, 2000.

Ohba Y, Mochizuki N, Matsuo K, Yamashita S, Nakaya M, Hashimoto Y, Hamaguchi M, Kurata T, Nagashima K, Matsuda M. Rap2 as a Slowly

Responding Molecular Switch in the Rap1 Singaling Cascade. *Molecular and Cellular Biology* 20 : 6074-6083, 2000.

Yamashita S, Mochizuki N, Ohba Y, Tobiume M, Okada Y, Sawa H, Nagashima K, Matsuda M, CalDAG-GEFIII Activation of Ras, R-Ras, and Rap1. *J Biol Chem* 275:25488-25493, 2000.

## 2. 学会発表

望月直樹、松原道行「三量体 GTP 結合蛋白質 G  $\alpha_i$  による制御を受ける Rap1 水解促進因子を介した Erk 活性化機構」第 73 回日本生化学会総会（横浜）平成 12 年 10 月

Mochizuki N, et al. Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G $\alpha_i$ . *Keystone Symposium Signaling 2000*. Keystone USA. January, 2000.

## H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

## 研究要旨

gp130 シグナルが制御する心不全関連遺伝子を同定するために、STAT3 心室筋特異的欠損マウス、活性型ないしはドミナントネガティブ STAT3 トランスジェニックマウスを作成し、解析した。STAT3 心室筋特異的欠損マウスでは心筋間質の繊維化を認めた。DNA microarray 法により、活性型 STAT3 トランスジェニックマウスでは心肥大や抗 apoptosis に関連する遺伝子の発現増強が確認された。今後これらの gp130 シグナルの標的遺伝子を解析する。

### A. 研究目的

心負荷適応とその破綻による心不全の過程において、G 蛋白結合型受容体を使用する $\alpha 1$  受容体作動物質、アンジオテンシン II、エンドセリンや gp130 関連サイトカインなど、さまざまな液性因子の関与が報告されている。しかしながらそれぞれの因子がどの時期に、どのように重要であるかといった検討はされていない。申請者は心筋特異的 gp130 欠損マウスを作成し、サイトカイン-gp130 系が心臓の圧負荷適応に必須であることを見いだした。代償性心肥大が心不全に移行する際の遺伝子ネットワークを解明することにより革新的な心不全治療の実現が期待されることより、本研究は gp130 シグナルが制御する心不全の発症を抑制ないしは促進する遺伝子を同定することを目的とする。

### B. 研究方法

A) STAT3 心室筋特異的欠損マウスの作成と解析：  
心室筋特異的 Cre 発現マウスと stat3 の活性化に必須の SH2 ドメインの両端に lox-P を導入したマウスを交配させた。これより STAT3 心室筋特異的欠損マウスを作成し、解析した。

B) 活性型ないしはドミナントネガティブ STAT3 トランスジェニックマウスの作成と DNA microarray 法：  
心筋特異的プロモーター $\alpha$ MHC の下流に活性型ないしはドミナントネガティブ STAT3cDNA を導入し、活

性型ないしはドミナントネガティブ STAT3 トランスジェニックマウスを作成し、解析した DNA microarray 法にてドミナントネガティブ STAT3 をコントロールに活性型 STAT3 トランスジェニックマウスにおいて増強遺伝子群を同定した。  
(倫理面への配慮)

本申請においてなされる細胞および動物を取り扱うすべての実験は当該施設の倫理規約にのっておこなわれる。

### C. 研究結果

A) 生後約5ヶ月の STAT3 心室筋特異的欠損マウスの心室筋において van Gieson 染色により同定される著明な心筋間質の線維化を認めた。

B) 活性型 STAT3 トランスジェニックマウスにおいて VEGF の発現増強を観察した。また DNA microarray 法により、同マウスにおいて肥大関連遺伝子（心房性利尿ペプチド 4.3 倍）や抗アポトーシスに関連するいくつかの遺伝子の発現増強が確認された。

### D. 考察

心筋における STAT3 のターゲットとして心筋線維化を制御している分子の存在が想定された。また、gp130 シグナルのターゲットとして複数の分子が関与していることが確認された。

## E. 結論

gp130 関連分子である stat3 の心筋特異的変異マウスの解析により、心不全を制御する gp130 シグナルのターゲット分子の候補群を同定できた。

## F. 健康危険情報 該当なし

## G. 研究発表

### A) 論文発表

#### 1. 論文発表

「心疾患におけるシグナル伝達分子 gp130 の生理的意義とその応用」バイオサイエンスとインダストリー 58 巻 : 27-30, 2000.

Funamoto M, Fujio Y, Kunisada K, Negoro S, Tone E, Osugi T, Hirota H, Izumi M, Yoshizaki K, Walsh K, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K.

Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glycoprotein 130-mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. J Biol Chem 275: 10561-6, 2000.

## H. 知的所有権の出願・取得状況

- 1.特許取得 該当なし
- 2.実用新案登録 該当なし
- 3.その他 該当なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Mochizuki N, Ohba Y, et al.	Crk Activation of JNK via C3G and Ras.	J Biol Chem	275	12667-12671	2000年
Ohba Y, Mochizuki N, et al.	Regulatory Proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R- Ras3.	J Biol Chem	275	20020-20026	2000年
Hisatome I, Morisaki H, et al.	Block of Sodium Channels by Divalent Mercury:Role of Specific Cysteiny Residues in the P-Loop Region.	Biophysical Journal	79	1336-1345	2000年
Morisaki H, Morisaki T, et al.	Positive and negative elements mediate control of alternative splicing in the AMPD1 gene.	Gene	246	365-372	2000年
Funamoto M, Fujio Y, et al.	Signal transducer and Activator of Transcription 3 Is Required for Glycoprotein 130-mediated Induction of Vascular Endothelial Growth Factor in Cardiac Myocytes.	J Biol Chem	275	10561-10566	2000年
Abe M, Takeshima H, et al.	Myoadenylate deaminase deficiency with progressive muscle weakness and atrophy caused by new missense mutations in AMPD1 gene:case report In a Japanese Patient.	Neuromuscular	10	472-477	2000年
Komazaki S, Takeshima H, et al.	Junctophilins:A Novel Family of Junctional Membrane Complex Proteins.	Mol Cell	6	11-22	2000年
Morisaki H, Higuchi I, et al.	First Missense Mutations(R38 8W and R425H) of AMPD1 Accompanied With Myopathy Found in a Japanese Patient.	Human Mutation	16	467-472	2000年
Yamashita S, Mochizuki N, et al.	Ca/DAG-GEFIII Activation of Ras, R-Ras, and Rap1.	J Biol Chem	275	25488-25493	2000年

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Ohba Y, Mochizuki N, et al.	Rap2 as a Slowly Responding Molecular Switch in the Rap1 Signaling Cascade.	Molecular and Cellular Biology	20	6074-6083	2000年
Xu X, Takeshima H, et al.	Molecular Cloning of cDNA Encoding a Drosophila Ryanodine Receptor and Functional Studies of the Carboxyl-Terminal Calcium Release Channel.	Biophysical Journal	78	1270-1280	2000年
Hayek S.M., Takeshima H, et al.	Characterization of a calcium- regulation domain of the skeletal-muscle ryanodine receptor.	Biochem J.	351	57-65	2000年
Takeshima H, Nagaraj R.Y et al.	Increased susceptibility to fatigue of slow-and fast-twitch muscles from mice lacking the MG29 gene.	Physiol Genomics	4	43-49	2000年
Kouzu Y, Takeshima H, et al.	Mutant mice lacking ryanodine receptor type3 exhibit deficits of contextual fear conditioning and activation of calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II in the hippocampus.	Molecular Brain Research	76	142-150	2000年

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Zhu W, Komuro I, et al.	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy	J Biol Chem	275	15239-45	2000年
Aikawa R, Komuro I, et al.	Rho plays an important role in angiotensin II-induced hypertrophic responses in cardiac myocytes.	Mol Cell Biochem	212	177-182	2000年
Shimoyama M, Komuro I.	Calcineurin inhibitor attenuates the development and induces the regression of cardiac hypertrophy in rats with salt-sensitive hypertension.	Circulation	102	1996-2004	2000年
Saito S, Komuro I, et al.	$\beta$ -adrenergic pathway induces apoptosis through calcineurin activation in cardiac myocytes.	J Biol Chem	275	34528-33	2000年
Oka T, Komuro I, et al.	Fibroblast growth factor plays a critical role in SM22 $\alpha$ expression during Xenopus Embryogenesis.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	20	907-14	2000年
Akazawa H, Komuro I, et al.	Targeted disruption of the homeobox transcription factor Bapx1 results in lethal skeletal dysplasia with asplenia and gastroduodenal malformation.	Genes Cell	5	499-513	2000年
Kajita E, Komuro I, et al.	Isolation and characterization of xenopus laevis aldolase B cDNA and expression patterns of aldolase A, B and C genes in adult tissues, oocytes and embryos of xenopus laevis(1).	Biochim Biophys Acta	1493	101-18	2000年
Wakimoto K, Komuro I, et al.	Targeted disruption of Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger gene Leads to cardiomyocyte apoptosis and defects in heart beat. J Biol Chem 275:36991-8	J Biol Chem	275	36991-8	2000年



## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Zhu W, Komuro I, et al.	Functional analyses of three Csx/Nkx-2.5 mutations that cause human congenital heart disease.	J Biol Chem	275	35291-6	2000年
Shiojima I, Komuro I, et al.	Transcriptional regulation of human cardiac homeobox gene CSX1.	Biochim Biophys Res Commun	272	749-57	2000年

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
竹島 浩	リアノジン受容体と細胞内Ca <sup>2+</sup> ストア	生化学	73	5-14	2001年
小室 一成	心不全の遺伝子治療・細胞移植治療	循環器専門医	8	217-224	2000年
竹島 浩	細胞内Ca <sup>2+</sup> ストア膜と細胞表層膜の近接構造の分子機構	実験医学	18	2351-2354	2000年

20000397

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
P12-16の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

