

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
Monzen K, et al.	Smads, tak1, and Their common target atf-2 play a critical role in cardiomyocyte differentiation.	J Cell Biol	153	687-98	2001
Uozumi H, et al.	Gp130 plays a critical role in Pressure Overload-induced Cardiac Hypertrophy.	J Biol Chem	276	23115-23119	2001
Sawada Y, et al.	Rap1 is involved in cell stretching modulation of p38 but not ERK or JNK MAP kinase.	J Cell Sci	114	1221-7	2001
Hiroi Y, et al.	Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation.	Nature Genetics	28	276-280	2001
Hiroi Y, et al.	Two Distinct Mechanisms of Angiotensin II-induced Negative Regulation of the Mitogen-Activated Protein Kinases in Cultured Cardiac Myocytes.	Hypertens Res	24	385-394	2001
Hirata Y et al.	Measurement of plasma brain natriuretic peptide level as a guide for cardiac overload.	Cardiovascular Research	51	585-91	2001
Shimoyama M, et al.	Docetaxel induced cardiotoxicity.	Heart	86	219	2001
Zou Y, et al.	Isoproterenol activates extracellular signal-regulated protein kinases in cardiomyocytes through calcineurin.	Circulation	104	102-8	2001
Zou Y, et al.	Calcineurin plays a critical role in the development of pressure overload-induced Cardiac hypertrophy.	Circulation	104	97-101	2001

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

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 13 年度 総括研究報告書

主任研究者 小室 一成

平成 14 (2002) 年 3 月

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

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 13 年度 総括研究報告書

主任研究者 小室 一成

平成 14 (2002) 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. Ca²⁺調節に関連した心不全に関与する遺伝子の検索に関する研究・・・・・・・・・・6

竹島 浩

3. 心筋肥大における rap1GAPII の役割に関する研究・・・・・・・・・・・・・9

望月 直樹

4. サイトカイン受容体 gp130-STAT3 による心不全進展の分子制御に関する研究

廣田 久雄・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10

5. 心不全に対して ACE-I と ARB がもたらす遺伝子発現の変化に関する研究・・・・・・・・12

廣井 透雄

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17

総括研究報告書

心不全の病態解明と原因遺伝子の同定に関する研究

主任研究者 小室一成 千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学教授

研究要旨

心不全発症に関連ある遺伝子改変マウスおよび心筋細胞、心不全モデル動物を用いて検討した。心臓特異的転写因子、シグナル伝達分子、核酸代謝関連遺伝子、細胞内 Ca^{2+} ストアに関与する分子の遺伝子を改変されたマウスではそれぞれ機能的および解剖学的異常を呈した。心不全およびその薬物治療による遺伝子発現の変化を総括的に解析し得た。これらの知見は今後の心不全の病態解明と新しい治療法の確立のために有益である。

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 東北大学大学院医学系研究科医化学分野
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長
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
廣井 透雄 東京大学医学部附属病院循環器内科助手

を改変した心筋細胞あるいはマウス、およびダール食塩感受性 rat について、組織学、アポトーシス、遺伝子発現などについて検討した。

（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。

A. 研究目的

心不全の病態の解明および有用な予防、治療法を確立するために、心不全発症に関連すると考えられる遺伝子を改変した心筋細胞あるいはマウス、心不全モデル動物を作成し、個々の分子の *in vivo* での役割を明らかにし、心不全の病態を分子レベルで解析する。

B. 研究方法

平成 13 年度は、①心臓の発生、分化に必須な転写因子 CSX/NKX2-5、②サイトカインシグナル伝達分子 STAT3、③核酸代謝関連酵素遺伝子 AMPD2 および AMPD3、④細胞内 Ca^{2+} ストアの量と局在を規定する分子 ジャンクトフィリン-1 および 2、2 型リアノジン受容体、⑤心肥大形成に関わるシグナル分子、RAS ファミリー-低分子量 G 蛋白質の 5 種類の分子の遺伝子

C. 研究結果

① CSX/NKX2-5 P19CL6 細胞に突然変異 CSX/NKX2-5 を安定導入した。突然変異 CSX/NKX2-5 を過剰発現させた P19CL6 細胞は、野生型に比べて H_2O_2 によりアポトーシス細胞が増加した。

② STAT3 Cre loxP 手法により STAT3 心筋特異的欠損マウスを作成した。当該マウスは左室間質、血管周囲の繊維化を認め、TGF- β 1,3 および angiotensinII の発現増強が確認された。

③ AMPD AMPD2 および AMPD3 遺伝子変異ヘテロマウスを交配し、AMPD2/ AMPD3 遺伝子複合変異マウスを作成した。当該マウスは発育不良の後に生後約 3 週で死亡し、骨格筋、肝臓、腎臓で細胞変性像が認められた。

④ジャンクトフィリン ジャンクトフィリン-1 欠損マウスは生後まもなく死亡し、triad の減少が電顕上観察された。ジャンクトフィリン-2 あるいは 2 型リアノジン受容体欠損マウスにおいても心筋細胞のストア容量依存性の Ca^{2+} 流入機構の活性化正常であった。

⑤RAS ファミリー低分子量 G 蛋白質 FRET 理論による RAS 活性化の可視化プローブを作成した。当該プローブを血管内皮細胞、線維芽細胞に発現させたところ Ras、Rap1、R-Ras の活性化が可能であった。

⑥ダール 食塩感受性 rat

ダール食塩感受性ラットは、高食塩食負荷により高血圧、心肥大、心不全を呈した。薬剤投与群では、降圧効果はどちらも同程度で不完全であるにもかかわらず、心不全をきたさなかった。また薬剤投与により、遺伝子の発現状態は大きく変化した。

D. 考察

Csx/Nkx2-5 は心筋細胞をストレスから保護する作用があると考えられ、STAT3 は心筋リモデリングに重要であることが示唆された。アデニンヌクレオチド代謝酵素の *in vivo* における重要性が確認された。ジャンクトフィリン-2 欠損により心不全が惹起されることを既に報告したが、ジャンクトフィリン-1 も Ca^{2+} シグナリングに重要であった。RAS ファミリー分子の活性化プローブは心臓特異的に発現させることにより、*in vivo* での動態解析に有用であると考えられた。また、ARB と ACE-I の投与は、心臓での遺伝子発現には異なる影響を与え、両薬剤の心不全予防機序が異なることを示唆すると考えられた。

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

- (1) Izumi M, Komuro I, et al. Bone Morphogenetic protein-2 inhibits serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway. *J Biol Chem* 276:31133-31141, 2001.
- (1) Hosoda T, Komuro I, et al. A Novel myocyte-specific gene Midori promotes the differentiation of P19CL6 cells into cardiomyocytes. *J Biol Chem* 276:35978-35989, 2001.
- (2) Zou Y, Komuro I, et al. Isoproterenol activates extracellular signal-regulated protein kinases in cardiomyocytes through calcineurin. *Circulation* 104:102-8, 2001.
- (4) Zou Y, Komuro I, et al. Calcineurin plays a critical role in the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation* 104:97-101, 2001.
- (5) Hiroi Y, et al. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nature Genetics* 28:276-280, 2001.
- (6) Hiroi Y, et al. Two Distinct Mechanisms of Angiotensin II-Induced Negative Regulation of the Mitogen-activated Protein Kinases in Cultured Cardiac Myocytes. *Hypertens Res* 24:385-394, 2001.
- (7) Izumi M, Fujio Y, et al. Bone morphogenetic protein-2 inhibits serum deprivation-induced

apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway. *J Biol Chem* 276(33):31133-31141, 2001

(8) Tsubori M, Hisatome I, et al. Mitochondrial DNA deletion associated with the reduction of Adenine nucleotides in human atrium and atrial fibrillation. *Eur J Clin Invest* 31:489-496, 2001.

(9) Genetta T, Morisaki H, et al. A novel bipartite intronic splicing enhance promotes the inclusion of a mini-exon in the AMP deaminase 1 gene. *J Biol Chem* 276:25589-25597, 2001.

(10) Iio A, Koide K, et al. Expression pattern of novel chick T-box gene, Tbx20. *Dev Genes Evol* 211:559-562, 2001.

(11) Ito, K., Komazaki, S., Sasamoto, K., Yoshida, M., Nishi, M., Kitamura K. & Takeshima, H. Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J. Cell Biol.* 154, 1059-1068, 2001.

(12) Inoue, M., Matsunaga, S., Reshid, M. H., Yoshida, A., Mizuno, K., Sakurada, T., Takeshima, H. & Ueda, H. Pronociceptive effects of nociceptin/orphaninFQ (13-17) at peripheral and spinal level in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 213-219, 2001.

(13) Yang, D., Pan, Z., Takeshima, H., Wu, C., Nagaraj, R. Y., Ma, J. & Cheng, H. RyR3 amplifies RyR1-mediated Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in neonatal mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 276, 40210-40214, 2001.

(14) Mochizuki N, Yamashita S, et al. Spacio-temporal images of growth factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411:1065-1068, 2001.

(15) Ohba Y, Ikuta K, et al. Requirement for

C3G-dependent Rap1 activation for cell Adhesion and embryogenesis. *EMBO J* 20:3333-3341, 2001.

2. 学会発表

(1) 小室一成 : Cardiac Transcription Factors and Heart Failure. The 18th Annual Meeting ISHR Japanese Section. (2001, 秋田)

(2) 廣田久雄 : Gp130 and Heart Failure:Recent Advances and Implication for Cardiovascular Disease. 第 65 回日本循環器学会総会 ACC/JCS joint symposium, 国立京都国際会館 2001 年 3 月 26 日

(3) 森崎隆幸、遠山桂子、森崎裕子:AMPD2/AMPD3 ダブルノックアウトマウスの作製 第 35 回日本痛風・核酸代謝学会総会、神戸市、2002 年 2 月 8-9 日

(4) 竹島浩 : “ Ca^{2+} 放出と結合膜構造”、分子ベクトル輸送シンポジウム (東京 東大山上会館 2001 年 7 月 23 日)

(5) 竹島浩 : “ジャンクトフィリンと結合膜構造”、日本生化学学会大会 (京都 国際会議場 2001 年 10 月 27 日)

(7) Yasushi Fujio, Hisao Hirota, et al. Cardiac specific antivation of Stat3 promotes the vascular formation in the heart; American Heart Association, USA, Nov, 2001.

(8) Morisaki T, Toyama K, Morisaki H. Single nucleotide polymorphism in AMPD genes, Gordon Research Conference, New Port, 2001 年 7 月 1-6 日

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書
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

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長

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。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ため、昨年度に引き続き、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関係するアデニンヌクレオチド代謝の *in vivo* 解析を、*AMPD3* 遺伝子破壊によるモデルマウスの作製と解析を進めるとともに複合 *AMPD* 遺伝子群破壊マウスの作製を進めた。得られた複合 *AMPD* 遺伝子欠損ホモ接合体マウスは出生時まではほぼ正常の発育を示したが、出生後およそ2週より発育不良となり、約3週にて全てのホモマウスが死亡した。臓器障害の詳細は検討中であるが、この動物はヌクレオチド代謝異常の貴重なモデルと考えられ、心筋機能異常との関係を含めてさらに検討を進める予定である。

A. 研究目的

心機能不全の発症機序を解明し、予防ならびに治療の新戦略を開発するためには、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 やアデノシン等のエネルギー源や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に、代謝律速酵素である *AMPD* の機能を *AMPD* 遺伝子を対象に遺伝子改変動物を用いて解析することにより、有用な新知見を得よ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や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* は骨格筋における遺伝性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この酵素のアイソザイムをコードする *AMPD3* が報告されている。こうしたことから、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ある結果を得ることが期待される。

そこで、動物モデルを用いて *AMPD* 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。今年度は、昨年度に作製した心筋に主として発現する *AMPD3* 遺伝子破壊マウスの解析を進めるとともに、別に *AMPD2* 遺伝子破壊クローンを樹立し、それらの交配により *AMPD* 遺伝子複合破壊マウスを作製した。

B. 研究方法

昨年度に、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、*AMPD3* ノックアウト用のベクター（バックアップベクター）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。*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。作製したマウスにおける遺伝子発現の変化について検討を進めた。ついで、マウス *AMPD2* について、*AMPD3* 遺伝子同様にゲノム DNA をもとに活性中心に Puromycin 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、ES 細胞に導入し、相同組み換え体を選択した。胚盤胞へのインジェクションにより、機能破壊された *AMPD2* 遺伝子アレルを有するクローンを得た後、キメラマウスを作製した。交配

により *AMPD2* 遺伝子変異ヘテロマウスを作製し、すでに得られている *AMPD3* 遺伝子変異ヘテロマウスと交配を行って *AMPD* 遺伝子複合破壊マウスを作製した。

C. 研究結果

すでに昨年報告したように *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、胎生期の発生やその後の発育には影響がないが、解析を継続している。一方、*AMPD2* 遺伝子変異マウスも致死的でなく子孫を産することができる。しかし、交配により *AMPD2/AMPD3* 遺伝子複合変異ホモマウスを作製したところ、胎生致死とはならなかったが、生後2週頃より発育不良で体重増加が見られなくなり、いずれの仔マウスも生後約3週において死亡した。詳細な検討は継続中であるが、骨格筋の局所的な脂肪変性を認める個体のほか、肝臓、腎臓における細胞変性像がみられる個体を認めた。全てのマウスにおいて、腎尿細管にタンパク円柱が著明に認められた。死亡原因ならびに組織障害の詳細についてはさらに検討を要するが、*AMPD* 遺伝子複合破壊に起因する異常が考えられる。

D. 考察

AMPD3 遺伝子破壊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、胎生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、*AMPD2* 遺伝子も破壊された *AMPD2/AMPD3* 遺伝子複合変異マウスはホモマウスは生後約3週で全て致死となった。このマウスにおける機能異常は、組織所見より、骨格筋、肝臓、腎臓において想定される。心筋におけるアデニンヌクレオチド代謝異常の役割をはじめ、このマウスの死亡原因ならびに組織障害の詳細については今後の検討を要するが、*AMPD* 遺伝子複合破壊に起因するアデニンヌクレオチド代謝異常によるものとして極めて興味深い。

E. 結論

AMPD3 遺伝子単独破壊マウスは致死的ではなかったが、*AMPD2/AMPD3* 遺伝子複合変異ホモマウスは生後約3週で致死となった。今後、さらなる検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsuboi M, Hisatome I, Morisaki T, Tanaka M, Tomikura Y, Takeda S, Shimoyama M, Ohtahara A, Ogino K, Igawa O, Shigemasa C, Ohgi S, Nanba E: Mitochondrial DNA deletion associated with the reduction of adenine nucleotides in human atrium and atrial fibrillation. *Eur J Clin Invest* 31:489-496, 2001

2) Genetta T, Morisaki H, Morisaki T, Holmes EW: A novel bipartite intronic splicing enhancer promotes the inclusion of a mini-exon in the AMP deaminase 1 gene. *J Biol Chem* 276:25589-25597, 2001

3) Iio A, Koide K, Hidaka K, Morisaki T: Expression pattern of novel chick T-box gene, *Tbx20*. *Dev Genes Evol* 211:559-562, 2001

2. 学会発表

1) T. Morisaki, K. Toyama, H. Morisaki: Single nucleotide polymorphism in *AMPD* genes, Gordon Research Conference, New Port, 2001年7月1-6日

2) 森崎隆幸、遠山桂子、森崎裕子: *AMPD2/AMPD3* ダブルノックアウトマウスの作製 第35回日本痛風・核酸代謝学会総会、神戸市、2002年2月8-9日

G. 知的所有権の取得状況

なし

研究要旨

一般に興奮性細胞では、神経伝達物質の放出や筋細胞の収縮などの生理機能に先立ち脱分極による電気シグナルが細胞内 Ca²⁺濃度上昇の化学シグナルに変換される。心筋細胞におけるシグナル変換反応においては、細胞表層膜の電位依存性 Ca²⁺チャネル(DHP 受容体)、細胞内ストアの Ca²⁺放出チャネル(リアノジン受容体)、両受容体の機能共役の場である結合膜構造の形成に寄与するジャンクトフィリンが必須な分子として同定されている。これらの生理調節に関与する機能分子や細胞内 Ca²⁺ストア機能に寄与する分子を同定することにより、心不全関連機能蛋白を見出すことが本研究の主目的である。平成 13 年度には以下の研究を遂行した。

A. 研究目的

一般に興奮性細胞では、神経伝達物質の放出や筋細胞の収縮などの生理機能に先立ち脱分極による電気シグナルが細胞内 Ca²⁺濃度上昇の化学シグナルに変換される。心筋細胞におけるシグナル変換反応においては、細胞表層膜の電位依存性 Ca²⁺チャネル(DHP 受容体)、細胞内ストアの Ca²⁺放出チャネル(リアノジン受容体)、両受容体の機能共役の場である結合膜構造の形成に寄与するジャンクトフィリンが必須な分子として同定されている。これらの生理調節に関与する機能分子や細胞内 Ca²⁺ストア機能に寄与する分子を同定することにより、心不全関連機能蛋白を見出すことが本研究の主目的である。

B. 研究方法

(1) 心不全関連遺伝子産物の検索：ウサギ心臓より組織破壊、細胞分画法、シヨ糖密度勾配遠心法を組み合わせ、純度の高い心筋小胞体(細胞内 Ca²⁺ストア)分画の調整法の検討を遂行した。また、その小胞体膜画分を抗原として単ク

ローン抗体ライブラリーを作成し、心臓切片による蛍光抗体法による細胞内局在を指標にしたスクリーニングを遂行した。

(2) 心筋細胞における Ca²⁺流入経路の検討：蛍光カルシウム色素法による顕微測光にて、心筋細胞におけるストア依存性 Ca²⁺流入経路を検討した。また、ストア依存性 Ca²⁺流入に対する心不全関連分子 2 型ジャンクトフィリン(JP-2)、2 型リアノジン受容体(RyR-2)の欠損効果をノックアウトマウスを利用して検討した。

(3) ジャンクトフィリンの生理機能解析：哺乳動物では 3 つのジャンクトフィリンサブタイプ JP-1(骨格筋型), -2(心筋型), -3(脳型)が存在する。JP-2 欠損により心不全が引き起こされることは既に報告したが、骨格筋では JP-1 と-2 が共発現しており、JP-1 の生理機能が注目される。そこで、JP-1 ノックアウトマウスの作成を行い、その骨格筋における張力測定や形態学的観察を遂行した。さらに、無脊椎動物(ハエ,線虫)における JP についても、遺伝子クローニングや dsRNA による mRNA 発現阻害実験により検討

した。

C. 研究結果

(1)種々の検討により純度の高い心筋小胞体分画の調整法を確立し、その免疫により約 5,000 種類からなる単クローン抗体ライブラリーを作成した。上述の心筋脱分極- Ca^{2+} シグナル変換反応は Z 線上に形成される二つ組(diad)で行われるため、Z 線上の染色を指標に蛍光抗体法によるスクリーニングを行い、7 種の抗体を単離した。現在、その認識抗原蛋白を明らかにする目的で、cDNA クローニングに向けた準備を行っている。

(2)心筋細胞におけるストア容量依存性の Ca^{2+} 流入機構の活性化を、数種の枯渇条件下にて観察した。この容量依存性 Ca^{2+} 流入は RyR-2 及び JP-2 の欠損により損なわれることはなく、 Ca^{2+} 放出チャンネルや結合膜構造の有無に作用されないことが明らかになった。

(3) JP-1 欠損マウスは授乳することが出来ず、生後まもなく死亡する。電子顕微鏡観察では JP-1 欠損筋で三つ組構造が特異的に減少し、張力測定実験においては単収縮(twitch)が顕著に低下していることが明らかにされた。従って、骨格筋において JP-1 と JP-2 は異なる生理機能を有し、興奮-収縮連関の効率化に重要な三つ組構造の形成に JP-1 は必要不可欠であると考えられた。無脊椎動物においては 1 種の JP が存在し、主に筋細胞のみで発現が観察される。JP の発現を抑制すると、線虫では自発運動量の減少が観察された。これは JP の欠失により Ca^{2+} シグナリングの抑制が生じ、興奮収縮連関効率低下によるものと考えられた。

E. 考察と結論

(1)上記の実験遂行により比較的高純度の心筋小胞体の調製法の開発に成功し、それを用いた単クローン抗体の検索も順調になされた。現在までに数種見い出されている新規と推定される小胞体膜蛋白質群の構造と機能が注目される。

(2)ストア容量依存性 Ca^{2+} 流入では現在まで分子機構についてはまったく不明であるが、その活性化には Ca^{2+} 放出チャンネルが不可欠との仮説が有力である。RyR-2 欠損細胞でもストア容量依存性 Ca^{2+} 流入が存在することから、少なくとも心筋細胞ではその仮説は誤ったものと考察された。

(3)JP 分子群は心筋細胞だけでなく、骨格筋細胞や無脊椎動物における Ca^{2+} シグナリングにも重要であることが判明した。

G. 研究発表

1 論文発表

1. Ahmadi, S., Kotalla, C., Guhring, H., Takeshima, H., Pahl, A. & Zeilhofer, H. U. Modulation of synaptic transmission by nociceptin/orphanin FQ and nocistatin in the spinal cord dorsal horn of mutant mice lacking the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Mol. Pharmacol.* **59**, 612-618, 2001.
2. Shimuta, M., Yoshikawa, M., Fukaya, M., Watanabe, M., Takeshima, H. & Manabe, T. Postsynaptic modulation of AMPA receptor-mediated synaptic responses and LTP by the type 3 ryanodine receptor. *Mol. Cell Neurosci.* **17**, 921-930, 2001.
3. Ichikawa, D., Ozaki, S., Azuma, T., Nambu, H., Kawamoto, H., Iwasawa, Y., Takeshima, H. & Ohta, H. In vitro inhibitory effects of J-113397 on nociceptin/orphanin FQ-stimulated [^{35}S]GTP γ S binding to mouse brain. *Neuroreport* **12**, 1757-1761, 2001.

4. Higgins, G. A., Grottick, A. J., Ballard, T. M., Richards, J. G., Messer, J., Takeshima, H., Pauly-Evers, M., Jeck, F., Adam, G. & Wichmann, J. Influence of the selective ORL1 receptor agonist, Ro64-6198, on rodent neurological function. *Neuropharmacol.* **41**, 97-107, 2001.
5. Ito, K., Komazaki, S., Sasamoto, K., Yoshida, M., Nishi, M., Kitamura K. & Takeshima, H. Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J. Cell Biol.* **154**, 1059-1068, 2001.
6. Inoue, M., Matsunaga, S., Reshid, M. H., Yoshida, A., Mizuno, K., Sakurada, T., Takeshima, H. & Ueda, H. Pronociceptive effects of nociceptin/orphaninFQ (13-17) at peripheral and spinal level in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 213-219, 2001.
7. Yang, D., Pan, Z., Takeshima, H., Wu, C., Nagaraj, R. Y., Ma, J. & Cheng, H. RyR3 amplifies RyR1-mediated Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in neonatal mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **276**, 40210-40214, 2001.
8. Mamiya, T., Noda, Y., Ren, X., Nagai, T., Takeshima, H., Uki, M. & Nabeshima, T. Morphine tolerance and dependence in the nociceptin receptor knockout mice. *J. Neural. Transm.* **108**, 1349-1361, 2001.
9. Kakimoto, S., Houtani, T., Sato, K., Ueyama, T., Sakuma, S., Munemoto, Y., Ohishi, H., Kase, M., Yamashita, T., Takeshima, H. & Sugimoto, T. Brainstem auditory regions in mice: expression of nociceptin/orphanin FQ precursor mRNA in select neurons. *Neurosci Lett.* **314**, 37-40, 2001.
10. Yoshida, M., Sugimoto, A., Ohshima, Y. & Takeshima, H. Important role of junctophilin in nematode motor function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 234-239, 2001.
11. Komazaki, S., Nishi, M., Takeshima, H. & Nakamura, H. Abnormal formation of sarcoplasmic reticulum networks and triads during early development of skeletal muscle cells in mitsugumin29-deficient mice. *Develop. Growth Differ.* **43**, 717-723, 2001.
12. Uehara, A., Yasukouchi, M., Imanaga, I., Nishi, M. & Takeshima, H. Store-operated Ca^{2+} entry irrelevant to Ca^{2+} release channel and junctional membrane complex in heart muscle cells. *Cell Calcium* in press.

2 学会発表

1. 竹島浩、"Ca²⁺放出と結合膜構造"、分子ベクトル輸送シンポジウム（東京 東大山上会館 2001年7月23日）
2. 竹島浩、"ジャンクトフィリンと結合膜構造"、日本生化学会大会（京都 国際会議場 2001年10月27日）
3. Hiroshi Takeshima "Ryanodine Receptor and Junctophilin in Cardiac Myocytes" International Symposium on Receptors and Ion Transporters in Cardiovascular System（大阪 阪大銀杏会館 2002年2月5日）

心筋肥大における rap1GAPII の役割

分担研究者 望月 直樹 国立循環器病センター研究所循環器形態部

研究要旨: 心臓における Ras ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白質の機能を明らかにするため、本年度は Ras 活性化の可視化プローブの作製と動物個体への導入のための DNA を準備した。Ras, Rac 分子の各種細胞増殖刺激依存性の活性化の可視化は培養細胞レベルでは実現した。心臓・血管特異的に同プローブを発現するマウスを解析することで心臓肥大・拡張への Ras ファミリー蛋白質の関与を明らかにすることが可能となる。

A. 研究目的

本研究では心臓疾患、特に心筋肥大を起こす原因となる Ras ファミリー蛋白質の同疾患における役割をあきらかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) Ras 活性化の可視化プローブの作製

FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) 理論を応用した一波長励起二波長測光型の Ras 活性化の可視化プローブを作製する。

(2) Ras ファミリー分子可視化プローブを用いた培養細胞レベルでの Ras 活性化のモニターリング

培養血管内皮細胞・線維芽細胞にモニターリングプローブを transfection して発現させた。この細胞を各種細胞成長因子(上皮細胞増殖因子・血管内皮細胞増殖因子・スフィンゴシン1 磷酸・血小板由来増殖因子、など)で刺激したときの Ras, Rac の活性化のモニターリングした。

C. 研究結果

① Ras 蛋白質活性化プローブ Raichu (Ras and Interacting Chimeric Unit) を作製した。どうプローブを改変することで、Ras, Rap1, R-Ras, の活性化の可視化が可能となった。

② 細胞種による違いにより同一増殖刺激によっても Ras, Rap1 蛋白質が活性化される場所が変わることが明らかになった。

③ 臓器特異的にプローブをマウスで発現するために Cre/loxP システムを今後計画しているが、血管特異的に発現する Tie-2 プロモーター下流で Cre を発現するマウスを作製している。

D. 考察

今年度 Ras 活性化プローブの作製を終了したので、マウスでの組織特異的発現を実現し、心臓での Ras ファミリー分子の活性化を検討することが残された。心臓で Cre 特異的発現マウスは昨年度本研究で入手しており、実現可能と考えている。また、Ras ファミリー分子の中でも Ras,

Rap1, R-Ras などの活性化機構が細胞依存性似変化するために臓器レベルでの活性化の変化を見ることは非常に興味深いと考える。さらに、血管特異的に発現してその活性化を見ることで、血管疾患による心臓疾患の病態解明が可能となると思われる。

E. 結論

本年度、Ras ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白質の細胞内での活性化の可視化に成功し、今後動物個体への導入により、心疾患における同分子群の機能解明がなされると思われる。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A, and Matsuda M. Spacio-temporal images of growth factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411: 1065-1068, 2001.
2. Ohba Y, Ikuta K, Ogura A, Matsuda J, Mochizuki N, Nagashima K, Kurokawa K, Bruce J. Mayer, Maki K, Miyazaki J, Matsuda M. Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *EMBO J* 20: 3333-3341, 2001.
3. Kurokawa K, Mochizuki N, Ohba Y, Mizuo H, Miyawaki A, Matsuda M. A Pair of Fluorescent Resonance Energy Transfer-based Probes for Tyrosine Phosphorylation of the CrkII Adaptor Protein in Vivo. *J Biol Chem* 276: 31305-31310, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

サイトカインシグナル伝達分子 Gp130-STAT3 による心不全進展の分子制御に関する研究
分担研究者 廣田 久雄 大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座助手

研究要旨 サイトカインシグナル伝達分子 Gp130 により活性化される転写因子 STAT3 による心不全進展の分子制御の機能解析の目的で STAT3 の心臓特異的遺伝子欠損マウス (STAT3CKO) を作製した。生後約5ヶ月の STAT3 CKO の左心室において van Gieson 染色陽性により同定される著明な心筋間質および血管周囲の線維化を認めた。線維化のメカニズムの解析のため、線維化関連蛋白の発現を免疫染色にて観察したところ STAT3 CKO の心室にて TGF- β 1, 3 および angiotensin II の発現増強が確認された。これらのことは STAT3 が心筋リモデリングの制御に重要であることを示唆した。以上より、サイトカインシグナル伝達分子 gp130-stat3 は心不全進展の分子制御に重要であり、今後の新たな治療戦略のターゲットになると考えられた。

A. 研究目的

我々はこれまで Interleukin-6 (IL-6) サイトカインファミリーである Leukemia Inhibitory factor (LIF) が培養心筋細胞において signal transducing factor 3 (STAT3)、phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) および Erk MAPK を活性化し心筋肥大を誘導し心保護的に作用することを示し、IL-6/IL-6 受容体ダブルトランスジェニックマウスが心臓肥大を呈することを見出した。さらに gp130 心室特異的欠損マウス(GPCKO) を作製し、圧負荷モデルを作製したところ、心拡大を呈し生存率 10%以下であった。GPCKO の心筋では 30%の心筋細胞でアポトーシスを認め、コントロールに比し有意に増加していた。これより心臓が負荷を受け代償期より非代償期をへて、心不全にいたる過程において gp130 を介したアポトーシスの制御が重要であることが示された。今回、サイトカインシグナル伝達分子 Gp130-STAT3 による心不全進展の分子制御の詳細な機能解析の目的で STAT3 の心臓特異的遺伝子欠損マウスを作製した。

B. 研究方法

心室筋特異的ミオシン 2V のプロモーター領域に Cre 遺伝子を導入した心室筋特異的 Cre 発現マウス(CreTg) と STAT3 の活性化に必須の SH2 ドメインの両端に loxP を導入したマウスを交配させ STAT3 心室筋特異的欠損マウス (STAT3CKO) を作製した。

(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ののっておこなわれる。

C. 研究結果

STAT3CKO にて STAT3 の活性化が抑制されていることを確認する目的で、LIF 静注による STAT3 のリン酸化を観察したところ、STAT3 CKO の心筋において STAT3 の活性化が有意に抑制された。生後約5ヶ月の STAT3 CKO の左心室において van Gieson 染色陽性により同定される著明な心筋間質および血管周囲の線維化を認めた。線維化のメカニズムの解析のため、線維化関連蛋白の発現を免疫染色にて観察したところ STAT3 CKO の心室にて TGF- β 1, 3 および angiotensin II の発現増強が確認された。

D. 考察

これらのことは STAT3 が心筋リモデリングの制御に重要であることを示唆した。

E. 結論

サイトカインシグナル伝達分子 gp130-stat3 は心不全進展の分子制御に重要であり今後の新たな治療戦略のターゲットになると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Izumi M, Fujio Y, Kunisada K, Negoro S, Tone E, Funamoto M, Osugi T, Oshima Y, Nakaoka Y, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K, Hirota H. Bone morphogenetic protein-2 inhibits serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway. *J Biol Chem* 276(33):31133-31141, 2001

2. Negoro S, Kunisada K, Fujio Y, Funamoto M, Darville MI, Eizirik DL, Osugi T, Izumi M, Oshima Y, Nakaoka Y, Hirota H, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Circulation* 2001;104 (9):979-981, 2001

2. 学会発表

廣田久雄 「Gp130 and Heart Failure: Recent Advances and Implication for Cardiovascular Disease」 第65回日本循環器学会総会 ACC/JCS joint symposium, 国立京都国際会館 2001年3月26日

Yasushi Fujio, Hisao Hirota et al., Cardiac specific activation of Stat3 promotes the vascular formation in the heart; American Heart Association, USA, November, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

angiotensin converting enzyme inhibitor (ACE-I)と angiotensin receptor blocker (ARB) は、その薬理学的メカニズムが異なるにも関わらず、心不全を対象としたこれまでの動物実験や大規模臨床試験において、心不全予防効果がほぼ同程度と考えられている。しかし両薬剤の投与は、不全心にそれぞれ固有の遺伝子発現変化をもたらすことを示し、両者の予防機序が異なることを示唆する。

A. 研究目的

ACE-I と ARB が心不全に異なるメカニズムで効果をもたらすことを明らかにして、将来個々の患者の病態に応じた薬の使い分けをめざす。

B. 研究方法

ダール食塩感受性ラットを用いて心不全モデルを作成した。11 週齢より、ARB である candesartan (1mg/kg/day)または ACE-I である benazepril (1mg/kg/day)を、浸透圧ポンプを用いて持続投与した。20 週齢において、各群の心臓より RNA を抽出し、GeneChip を用い 8800 の遺伝子について発現を解析した。

（倫理面への配慮）

いずれの研究もラットを用い、ヒトを扱うことはない。ラットは動物愛護の精神にのっとり、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

ダール食塩感受性ラットは、高食塩食負荷により高血圧、心肥大、心不全を呈した。薬剤投与群では、降圧効果はどちらも同程度で不完全であるにもかかわらず、心不全をきたさなかった。また薬剤投与により、遺伝子の発現状態は大きく変化した。

D. 考察

ARB と ACE-I の投与は、血圧低下、心筋線維化抑制および心不全防止効果において同等と考えられ

たが、心臓での遺伝子発現には異なる影響を与え、両薬剤の心不全予防機序が異なることを示唆すると考えられた。

E. 結論

ARB と ACE-I の心不全予防作用は異なる機序によることが示唆された。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Hiroi Y, et al. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nature Genetics* 28:276-280, 2001.

(2) Hiroi Y, et al. Two Distinct mechanisms of Angiotensin II-induced Negative Regulation of the Mitogen-Activated Protein Kinases in Cultured Cardiac Myocytes. *Hypertens Res* 24:385-394, 2001.

2. 学会発表

(1) Tbx5 associates with Csx/Nkx2.5 and activates cardiac gene expression. *Gordon Research Conference, Italy, April, 2001.*

H. 知的所有権の出願・取得状況

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
Hosoda T, et al.	A novel myocyte-specific gene Midori promotes the differentiation of P19CL6 cells into cardiomyocytes.	J Biol Chem	276	35978-35989	2001
Meacci E, et al.	Dual regulation of sphingosine 1-phosphate-induced phospholipase D activity through RhoA and protein kinase C- α in C2C12 myoblasts.	Cell Signal	13	593-8	2001
Wakimoto K, et al.	Expression of Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger (NCX1) gene in the developmental mouse embryo and adult mouse brain.	Comparative Biochemistry and Physiology Part B	130	191-8	2001
Gu Y, et al.	Growth hormone signalling and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes.	Mol Cell Biochem	223	35-46	2001
Shimoyama M, et al.	Effects of Controlled-Release Nifedipine on Left-ventricular Hypertrophy in Japanese Patients with Hypertension. An Open-Label, Uncontrolled Study.	Current Therapeutic Research	62	773-782	2001
Negoro S, et al.	Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase.	Circulation	104(9)	979-981	2001
Izumi M, et al.	Bone morphogenetic protein-2 inhibits serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway.	J Biol Chem	276(33)	31133-31141	2001

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, et al.	Spatio-temporal images of Growth factor-induced Activation of Ras and Rap1.	Nature	411	1065-1068	2001
Ohba Y, et al.	Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion And embryogenesis.	EMBO J	20	3333-3341	2001
Kurokawa N, et al.	A Pair of Fluorescent Resonance Energy Transferbased Probes for Tryosine Phosohorylation of the CrkII Adapotr Protein in Vivo.	J Biol Chem	276	31305-31310	2001
Ahmadi S, et al.	Modulation of Synaptic transmission by nociceptn/ orphhanin FQ and nocistatin in the spinal cord dorsal horn of mutant mice lacking the nociceptin/orphanin FQ receptor/	Mol Pharmacol	59	612-618	2001
Shimuta M, et al.	Postsynaptic modulation of AMPA Receptor-mediated Synaptic responses and LTP by The type 3 ryanodine receptor.	Mol Cell Neurosci	17	921-930	2001
Higgins G, et al.	Influence of the selective ORL1 receptor agonist, Ro64-6198, on Rodent neurological function.	Neuropharmacol	41	97-101	2001
Ito K, et al.	Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1.	J Cell Biol	154	1059-1067	2001
Inoue M, et al.	Pronociceptive effects of Nociceptin/orphaninFQ (13-17) At peripheral and spinal level in mice.	J Pharmacol Exp Ther	299	213-219	2001

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
Mamiya T, et al.	Morphine tolerance and Dependence in the nociceptin Receptor knockout mice.	J Neural Transm	108	1349-1361	2001
Yoshida M, et al.	Important role of junctophilin in Nematode motor function.	Biochem Biophys Res Commun	289	234-239	2001
Tsubori M, et al.	Mitochondrial DNA deletion associated with the reduction of adenine nucleotides in human atrium and atrial fibrillation.	Eur J Clin Invest	31	489-496	2001
Genetta T, et al.	A Novel bipartite intronic Splicing enhancer promotes the Inclusion of a mini-exon in the AMP deaminase 1 gene.	J Biol Chem	276	25589-25597	2001
Iio A, et al.	Expression pattern of novel Chick T-box gene, Tbx20.	Dev Genes Evol	211	559-562	2001
Negoro S	Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase.	Circulation	104(9)	979-981	2001
Izumi M	Bone morphogenetic protein-2 inhibits serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway.	J Biol Chem	276(33)	31133-31141	2001

20010445

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