

遺伝子異常と心機能の相関

分担研究者 菅 弘之 国立循環器病センター研究所長

遺伝子異常と心機能の相関を調べるには遺伝子異常の結果起こったタンパク発現の異常によって心機能がどのように変わったかを調べるのがまず有効な手がかりになると思われる。ラットではこのような条件を満たす病態モデルを作製あるいは入手できるので、力学的エネルギー学的観点からの心機能の評価と遺伝子異常の結果起こったタンパク発現の異常との相関性を明らかにすることを目指している。

A. 研究目的

遺伝子異常と心機能の相関を調べるにはまず正常なラットの心機能の信頼できる評価法を確立する必要がある。ラットの左心室機能はイヌと異なり収縮期末圧容積関係が非線形である。そのため、機械的総エネルギー(PVA)の求め方やPVAの酸素コスト、収縮性の酸素コストの求め方を新たに開発する必要がある。さらにこれらの方法で得られた心機能評価の結果と遺伝子異常の結果起こったタンパク発現の異常との相関性を調べることを目的とする。

B. 研究方法

コレシストキニン A 受容体の欠損する自然発症糖尿病ラットを長期飼育した後、心臓を摘出し、別の正常ラットにより代謝的なサポートを行い、正常時よりは少ない頻度でペーシングを行い拍動させ、左心室圧、心筋酸素消費量を計測し、ESPVR や弛緩末期の時定数や、心筋酸素消費量とPVAの関係、PVAの酸素コストとカルシウムハンドリングに要する酸素消費量、収縮性の酸素コストを求めた。また、筋小胞体のカルシウムポンプの発現量やミオシンアイソザイムも調べた。

(倫理面への配慮)

なお、日本生理学会動物倫理規定は完全に遵守している。現段階ではヒトに対する応用研究は含まれていない。

C. 研究結果

本年度の研究結果から、自然発症糖尿病ラットは先天的遺伝子異常の結果、筋小胞体のカルシウムポンプの発現量の低下が見られ、心機能としては低頻度のペーシングでは、収縮機能、PVA の酸素コスト、カルシウムハンドリングに要する酸素消費量や収縮性の

酸素コストにはなんら異常が見られないが、弛緩機能障害と1分間当たりのカルシウムハンドリングに要する酸素消費量の減少が見られた。

D. 考察

本研究の結果では筋小胞体のカルシウムポンプの発現量の低下と心機能の特に弛緩機能障害との間で明確な相関が見られた。また、その障害の程度もペーシングの頻度を減らすことにより収縮機能の障害までには及ばなかったため、筋小胞体のカルシウムポンプの発現量の低下はそれほどシビアでないことが推定された。

E. 結論

本研究のように遺伝子異常からタンパク発現の異常を有する病態モデルの心機能評価からそのタンパクと心機能の相関を明らかにできた。今後さらに他の病態モデルにおいて本研究の成果を応用して行きたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tuji, T. et al. (incl Suga, H. and Takaki, M.): Rat cardiac contractile dysfunction included by Ca^{2+} overload: possible link to the proteolysis of α -fodrin, Am. J. Physiol. 281 Heart Circ. Physiol): H1286-H1294 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

研究協力者

高木都 (奈良県立医科大学教授)

遺伝子改変小動物を用いた右心系循環障害の発生病機と治療に関する研究

分担研究者 白井幹康 国立循環器病センター研究所室長

生体において、循環、呼吸及び代謝は常に連動し、密接に協調し合っている。従って、これらの調節機構を解明するには、各々のパラメータを、同一個体で同時に記録、解析する必要がある。本研究では、循環、呼吸、代謝の機能維持に関連する遺伝子・タンパク質の個体レベルでの機能解析を可能とするため、覚醒下遺伝子改変マウスの循環(血圧、心拍数)、呼吸(一回換気量、呼吸回数等)及び代謝(酸素消費量、二酸化炭素排出量)が、beat by beat から日内変動レベルまで実時間解析できる新しいシステムを開発した。さらに、これをプロスタサイクリン(PGI₂)欠損マウスに応用し、循環、呼吸、代謝調節における PGI₂ の役割について研究を進めた。

A. 研究目的

循環、呼吸、代謝の協調は、生命維持に必須である。特に、循環器系と呼吸器系は、ガス交換に止まらず、物質代謝や体液、体温調節、さらには血圧、血流調節の面からも機能的に密接に協調し合っている。また、両系の間には、神経及び体液を介した多くの情報交換があり、互いの機能を調節し合っている。しかし、従来の生理学研究の多くは、両系を別々に研究してきた。

近年、遺伝子導入及び欠損動物などの遺伝子操作技術が確立し、遺伝子・タンパク質レベルの知見を個体レベルに還元して検証することが試みられている。しかし、遺伝子操作が最も確立しているマウスにおいては、覚醒下で循環、呼吸、代謝を同時に記録し、実時間解析できる技術が確立していないため、遺伝子改変技術をこれらの調節機構の解明に十分生かせていないのが現状である。

本研究の目的は、遺伝子・タンパク質レベルの知見を統合して、生体を有機的に捉える研究を推し進めるため、そのベースとなる小動物での循環、呼吸、代謝の計測術を確立することである。

B. 研究方法

循環(血圧、心拍数)の計測には、慢性実験用テレメトリ自動解析システム(DATA SCIENCES 社)を応用した。麻酔下でカテーテルを左頸動脈に挿入固定し、送信器は背部の皮下に埋め込んだ。従来の腹部大動脈にカテーテルを挿入する方法では、下肢の虚血がしばしば生じるため、頸動脈挿入法を新たに採用した。呼吸(一回換気量、呼吸回数、吸気、呼気時間等)は、動物を無拘束チャンパー内に入れ、ホールボディプレチスモグラフィ法(BUXCO 社)を用いて計測した。代謝は、SABLE SYSTEMS 社の酸素及び二酸化炭素解析装置(分解能<0.001%)を応用し、ケージ内の酸素と二酸化炭素の濃度変化から求めた。

(倫理面への配慮)

当施設内の実験動物福祉小委員会での審査を受けた後、実験を実施した。小動物へのテレメトリ計測機器の装着は、動物に苦痛を与えない様、麻酔下で行った。

覚醒動物を用いる実験では、良好な飼育環境を維持し、使用動物数並びに刺激負荷時の動物への苦痛を最小限に止める様、十分な注意を払った。

C. 研究結果及び考察

1) 血圧、心拍数の日内変動リズムは、送信器の埋め込み後 2 日目で回復し、約 30 日間に渡って、安定した計測ができた。また、埋め込みによる体温、酸素消費量及び行動などの異常や運動麻痺などは認められなかったことから、カテーテル留置による脳虚血は無いものと考えられた。

2) room air 環境では、PGI₂ 欠損マウス(10-12 週齢)の血圧、心拍数、呼吸機能及び代謝の平均レベルと日内変動リズムは、対照マウスと比較し差がなかった。さらに、一酸化窒素(NO)の合成酵素阻害薬(L-NAME)の効果も、両マウス間で差がなかった。このことは、room air 下では、PGI₂ の循環、呼吸、代謝調節上での役割は、あまり大きくない無ことを示唆した。また、PGI₂ 欠損マウスでの NO の代償性放出増大は、少ないと推定された。

3) 低酸素(10% O₂)負荷に対する急性応答(血圧、酸素消費量は減少、心拍数、分時換気量は増大)は、PGI₂ 欠損及び対照マウスのいずれにも認められたが、呼吸応答は前者でやや小さかった。他方、L-NAME 投与下での低酸素負荷時、対照では、心拍、分時換気量は共に L-NAME 非投与下とほぼ同じか、より大きな増大を示したが、PGI₂ 欠損マウスでは、これらの増大応答はほぼ消失した。また、低酸素時の酸素消費量のレベルは、対照では L-NAME 投与で増大したが、PGI₂ 欠損マウスでは逆に大きく減少した。以上の結果は、PGI₂ の単独欠損は、低酸素時の循環、呼吸、代謝の急性応答にあまり大きな影響を及ぼさないが、NO と同時に欠損が起こると、重大な影響が生じることを示唆した。特に、心拍と呼吸の増大応答の欠落は、生命を維持するには極めて危険な状態であり、酸素消費量の大きな減少は、心血管機能不全による酸素運搬能の障害を強く示唆するものと考えられた。

D. 結論

1) 本研究で開発した循環、呼吸、代謝の同時モニタリ

ングシステムの覚醒下遺伝子改変マウスへの応用は、遺伝子・タンパク質の個体レベルでの機能解析に極めて有用な方法であり、今後は循環、呼吸、代謝疾患の新しい治療薬開発に際し、効果判定や副作用の把握にも役立つものと期待される。

2) PGI₂ は、安静時より、ストレス下での循環、呼吸、代謝調節に重要であり、特に、NO との協調作用は、生命維持に必須であると考えられる。

E. 健康危険情報

特に無し

F. 研究発表

1. 論文発表

1) M. Shirai, A. Shimouchi, H. Mori et al.: K_{ATP} channels predominantly regulate conduit vessel tone in normoxic cat pulmonary arteries in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 422: 181-184, 2001

2) M. Shirai, A. Shimouchi, S. Ikeda et al.: Two-week, but not 1-week, hypoxic exposure enhances nitric oxide-mediated basal tone regulation in rat resistance pulmonary arteries. *Jpn. J. Physiol.* 51: 395-398, 2001

3) A. Ikai, M. Shirai, T. Ikeda et al.: Hypoxic pulmonary vasoconstriction disappears in a rabbit model of cavopulmonary anastomosis. *Circulation* 104: II645, 2001

4) K. Matsukawa, M. Shirai, J. Murata et al.: Sympathetic cholinergic vasodilatation of skeletal muscle

small arteries. *Jpn. J. Pharmacol.* 88: 14-18, 2002

5) J. T. Pearson, N. Yagi, M. Shirai et al.: Future investigations of micro-macro level cardiac functions using X-ray diffraction. *BME* 2002, in press.

2. 学会発表

1) 白井幹康他4名 慢性低酸素性肺高血圧症の形成過程で起こる肺微小動脈の NOS 発現増大は血管トーン調節に関与するか? 第 78 回日本生理学会大会(微小循環学の最近のトピックスに関するシンポジウム)(京都、2001)

2) A. Ikai, T. Ikeda, M. Shirai et al. Efficacy of additional pulmonary blood flow in the pulmonary circulation of cavopulmonary anastomosis. 3rd World Congress of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery (Toronto, 2001)

3) 猪飼秋夫他 5 名 Abnormal vasodilation of peripheral pulmonary arteries detected in a novel rabbit model of cavopulmonary anastomosis 第 65 回日本循環器学会(京都、2001)

4) J. T. Pearson, M. Shirai. Roles of nitric oxide and prostacyclin in circulatory and ventilatory control in rodents. COE International Symposium (大阪、2002)

5) 白井幹康他 4 名 下大静脈血は生理的血管トーンの維持に必須である。第 79 回日本生理学会大会(広島、2002)

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者名 | 論文タイトル名 | 発表雑誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|--------------------------------|----------|-------------|------|
| Ueno, N. Murakami, M. Tanioka, T. Fujimori, K. Tanabe, T. Urade, Y. Kudo, I. | Coupling between cyclooxygenases, terminal prostanoid synthase and phospholipase A ₂ s. | J. Biol. Chem. | 276 | 34918-34927 | 2001 |
| Hatae, T. Wada, M. Yokoyama, C. Shimonishi M. Tanabe, T. | Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR δ . | J. Biol. Chem. | 276 | 4260-4267 | 2001 |
| Suhara, H. Sawa, Y. Yokoyama, C. Tanabe, T. Matsuda, H. et al. | Gene transfer of human prostacyclin synthase into the liver is effective for a treatment of pulmonary hypertension in rats. | J. Thoracic. Cardiovasc. Surg. | | in press. | 2002 |
| Halvorsen, B. Staff, A.C. Henriksen, T. Sawamura, T. Ranheim, T. | 8-iso-Prostaglandin F ₂ increases expression of LOX-1 in JAR cells. | Hypertension | 37(4) | 1184-1190 | 2001 |
| Cominacini, L. Rigoni, A. Pasini, A.F. Garbin, U. Davoli, A. Campagnola, M. Pastorino, A.M. Cascio, V.L. Sawamura, T. | The binding of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. | J. Biol. Chem. | 276(17) | 13750-13755 | 2001 |
| Chen, M. Narumiya, S. Masaki, T. Sawamura, T | Conserved carboxyl-terminal residues within the lectin-like domain of LOX-1 are essential for oxidized LDL binding. | Biochem. J. | 355(Pt2) | 289-296 | 2001 |
| Shimaoka, T. Kume, N. Minami, M. Hayashida, K. Sawamura, T. Kita, T. Yonehara, S. | LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria | J. Immunol. | 166 | 5108-5114 | 2001 |
| Chen, M. Inoue, K. Narumiya, S. Masaki, T. Sawamura, T | Requirements of basic amino acid residues within the lectin-like domain of LOX-1 for the binding of oxidized low-density lipoprotein. | FEBS Lett. | 499 | 215-219 | 2001 |

| 発表者名 | 論文タイトル名 | 発表雑誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|--------------------------------|-----|-----------|------|
| Morawietz, H., Duerrschmidt, N. Niemann, B. Galle, J. Sawamura, T. Holtz, J. | Induction of the oxLDL receptor LOX-1 by endothelin-1 in human endothelial cells. | Biochem. Biophys. Res. Commun. | 284 | 961-965 | 2001 |
| Shimaoka, T. Kume, N. Minami, M. Hayashida, K. Sawamura, T. Kita, T. Yonehara, S. | Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) supports cell adhesion to fibronectin. | FEBS Lett. | 504 | 65-68 | 2001 |
| Chen, M. Nagase, M. Fujita, T. Narumiya, S. Masaki, T. Sawamura, T. | Diabetes enhances lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in the vascular endothelium: possible role of lox-1 ligand and age. | Biochem Biophys Res Commun | 287 | 962-968 | 2001 |
| Iwai-Kanai, E. Hasegawa, K. Sawamura, T. Fujita, M. Yanazume, T. Toyokuni, S. Adachi, S. Kihara, Y. Sasayama, S. | Activation of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Induces Apoptosis in Cultured Neonatal Rat Cardiac Myocytes. | Circulation | 287 | 2948-2954 | 2001 |
| Jono, T. Miyazaki, A. Nagai, R. Sawamura, T. Kitamura, T. Horiuchi, S. | Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). | FEBS Lett. | 511 | 170-174 | 2002 |
| Yoshihara, F. Horio, T. Nishikimi, T. Matsuo, H. Kangawa, K. | Possible involvement of oxidative stress in hypoxia-induced adreno-medullin secretion in cultured rat cardiomyocytes. | Eur. J. Pharmacol. | 436 | 1-6 | 2002 |
| Nagaya, N. Uematsu, M. Kojima, M. Ikeda, Y. Yoshihara, F. Shimizu, W. Hosoda, H. Mori, H. Kangawa, K. et al. | Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. | Circulation | 104 | 1430-1435 | 2001 |

| 発表者名 | 論文タイトル名 | 発表雑誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|----------------------------|-----|-------------|------|
| Nagaya, N. Miyatake, K. Uematsu, M. Oya, H. Shimizu, W. Hosoda, H. Kojima, M. Nakanishi, N. Mori, H. Kangawa, K. | Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. | J.Clin. Endocrinol. Metab. | 86 | 5854-5859 | 2001 |
| Shindo, T. et al. | Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. | Circulation | 104 | 1964-1971 | 2001 |
| Imai, T. et al. | Vascular smooth muscle cell-directed overexpression of heme oxygenase-1 elevates blood pressure through attenuation of nitric oxide-induced vasodilation in mice. | Circ. Res. | 89 | 55-62 | 2001 |
| Shindo, T. et al. | Elevated sympathetic nervous activity in mice deficient in aCGRP. | Circ. Res. | 89 | 983-990 | 2001 |
| Tsuboi, M. Hisatome, I. Morisaki, T. Tanaka, M. Tomikura, Y. Takeda, S. Shimoyama, M. Ohtahara, A. Ogino, K. Igawa, O. Shigemasa, C. Ohgi, S. Namba, 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 |
| Genetta, T. Morisaki, H. Morisaki, T. Holmes E.W. | A novel bipartite intronic splicing enhancer promotes the inclusion of a mini-exon in the AMP deaminase I gene. | J. Biol. Chem. | 276 | 25589-25597 | 2001 |
| Iio, A. Koide, K. Hidaka, K. Morisaki, T. | Expression pattern of novel chick T-box gene, Tbx20. | Dev. Genes Evol. | 211 | 559-562 | 2001 |
| 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 |

| 発表者名 | 論文タイトル名 | 発表雑誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|---------------------------------------|-----|-------------|------|
| 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. | <i>J. Cell Biol.</i> | 154 | 1059-1068 | 2001 |
| 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. | <i>J. Biol. Chem.</i> | 276 | 40210-40214 | 2001 |
| Yoshida, M. Sugimoto, A. Ohshima, Y. Takeshima, H. | Important role of junctophilin in nematode motor function. | <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> | 289 | 234-239 | 2001 |
| 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. | <i>Develop. Growth Differ.</i> | 43 | 717-723 | 2001 |
| Suzuki, S Araki, J. Doi, Y. Fujinaka, W. Minami, H. Iribe, G. Mohri, S. Shimizu, J. Hirakawa, M. Suga, H. | Coupling interval from slow to tachycardiac pacing decides sustained alternans pattern. | <i>Am. J. Physiol.</i> | 280 | H1368-H1375 | 2001 |
| Tsuji, T. Ohga, Y. Yoshikawa, Y. Sakata, S. Abe, T. Tabayashi, N. Kobayashi, S. Kohzuki, H. Yoshida, K. Suga, H. Kitamura, S. Taniguchi, S. Takaki, M. | Rat cardiac contractile dysfunction induced by Ca^{2+} overload: Possible link to the proteolysis of fodrin. | <i>Am. J. Physiol.</i> | 281 | H286-H1294 | 2001 |

| 発表者名 | 論文タイトル名 | 発表雑誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|--------------------|-----|---------|------|
| Shirai, M. Shimouchi, A. Mori, H. Nagaya, N. Nakanishi, N. et al. | K _{ATP} channels predominantly regulate conduit vessel tone in normoxic cat pulmonary arteries in vivo. | Eur. J. Pharmacol. | 422 | 181-184 | 2001 |
| Shirai, M. Shimouchi, A. Ikeda, S. Oya, H. Min, K-Y. et al. | Two-week, but not 1-week, hypoxic exposure enhances nitric oxide-mediated basal tone regulation in rat resistance pulmonary arteries. | Jpn. J. Physiol. | 51 | 395-398 | 2001 |