

平成13年度

# 若手研究者奨励研究報告書

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 第2分野

### 創薬のための生体機能解析に関する研究

## 新規心不全治療薬としての核内受容体作動性遺伝子制御薬剤の開発に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部  
研究者 佐藤 陽治

### 要旨

甲状腺ホルモン誘導体DITPAの心収縮増強作用選択性の機序を探る目的で、培養心筋細胞の遺伝子発現への効果を検討し、ペースメーカーチャネル遺伝子発現上昇作用における内活性の弱さが収縮力選択性の一因であることを示唆する結果を得た。

### 1. 研究目的

心不全において、心筋細胞の筋小胞体カルシウム制御の異常が心筋収縮および弛緩の異常に密接にかかわっている。不全心筋においては心筋小胞体カルシウム制御遺伝子の発現異常とくに心筋小胞体カルシウムポンプの遺伝子およびタンパク質発現の低下が高頻度で観察され、これが筋小胞体カルシウム制御異常、心筋細胞形態異常および心筋収縮性異常の主原因の一つだと近年考えられるようになった (Lehnart *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 1998 853:220-30)。従って心不全における心機能低下を改善する有効な戦略として筋小胞体カルシウムポンプの遺伝子発現量および活性の回復を目指す戦略が考えられる。この戦略が拡張型心筋症および肥大型心筋症モデル動物において著効を奏することは最近、本研究担当者を含むグループの遺伝子改変技術を応用した研究により明らかにされている (Minamisawa *et al.* *Cell* 99: 313-322, 1999; Sato *et al.* *J Biol Chem* 276: 9392-9399, 2001)。これらの知見から現在、病態心筋に対して筋小胞体カルシウムポンプ遺伝子をウィルスベクターに組み込み心筋に導入する遺伝子治療的方法が試みられているが (del Monte *et al.*, *Circulation* 1999 100:2308-11)、ベクターの安全性と作用の組織特異性および投与方法の問題が実用化への大きな障害となっている。本研究では別のアプローチ法として心筋小胞体カルシウムポンプの遺伝子発現および活性を特異的に調節する薬剤の探索、薬理的解析およびその確立を目指す。

甲状腺ホルモン刺激は核内受容体を介して全身の多様な遺伝子転写調節作用を持つが、中でも心臓は甲状腺ホルモン核内受容体刺激に最も敏感な器官である。心筋細胞の筋小胞体カルシウムポンプ遺伝子は、甲状腺ホルモン核内受容体刺激によって強く転写が亢進する。従って心筋小胞体カルシウムポンプ発現量が低い不全心に対して甲状腺ホルモン刺激を加えることにより、カルシウムポンプ発現量低下がオフセットされ、細胞内カルシウム動態および心筋収縮性改善することが期待される。しかし、甲状腺ホルモンには心拍数増加とそれに伴う心筋酸素消費量増加をもたらす副作用があり、甲状腺ホルモンの心疾患への適用上の大きな問題点となってきた。

甲状腺ホルモン誘導体DITPA(3,5-diiodothyropropionic acid, Fig. 1)は内因性甲状腺ホルモン同様、強い心筋収縮性増強作用をもつ。DITPAに特徴的な点として心拍上昇作用よりも筋収縮性増強作用に幾分選択的なリガンドである事が知られているが、この選択性の分子薬理的なメカニズムは全く不明である。ごく最近、内因性甲状腺ホルモンの心拍数増加作用に深く関わる遺伝子がいくつか単離された。本研究ではまずDITPAの選択性が、最近明らかとなりつつあるこれら心拍数関連遺伝子と比べ従来から知られている筋収縮関連遺伝子の方が選択的に制御されることによるものかを検討する。(平成13年度)。また、DITPAに特徴的な選択性のもととなる分子薬理的メカニズムをリガンド・核内受容体・遺伝子複合体の挙動のレベルで評価する(平成14年度)。現在DITPAの心不全および心筋症に対する効果はほとんど明らかではない。そこで内因性甲状腺ホルモンとDITPAの心筋病態への有効性を評価する目的で、心疾患モデル動物を用いてDITPAの心筋病態に対する効果を検

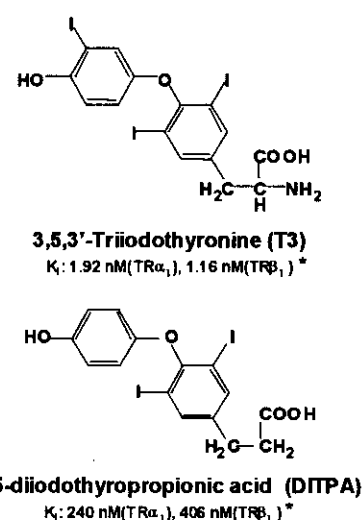


Fig. 1 Chemical structures of triiodothyronine (T3) and 3,5-diiodothyropropionic acid (DITPA) \* vs. [<sup>125</sup>I]T3 (Pennock *et al.*, 1992)

討する（平成15年度）。これらの検討からDITPAよりもさらに心収縮に選択的な新規甲状腺受容体リガンドを探索するスクリーニング法の確立を目指し、核内受容体を介した遺伝子制御による心収縮調節薬という新しいコンセプトに基づく心不全治療の可能性を明らかにする。

## 2. 研究方法

### (A) 初代培養心筋細胞における甲状腺ホルモン受容体リガンドの遺伝子発現調節作用

平成13年度は、迅速かつ効率的に甲状腺ホルモン受容体リガンドの遺伝子発現パターンを評価するために、初代培養心筋細胞を用いた系を確立する。新生仔ラットから酵素処理によって心筋細胞を単離し、分裂細胞除去のため Cytosine arabinoside 存在下無血清培地で培養する。均一になった新生仔ラット心筋細胞に対して内因性甲状腺ホルモン、DITPAを投与し、心筋収縮および心拍数に密接に関連する遺伝子の発現を定量性リアルタイム RT-PCR によって評価した。DITPAによる遺伝子制御プロファイルと内因性甲状腺ホルモンによる遺伝子制御プロファイルとを比較し、DITPAの心収縮機能選択性を裏付ける特異的遺伝子制御作用を探索した。

#### a) 新生仔ラット心筋細胞の培養

1日齢の Sprague-Dawley 系ラットから麻酔下に心室筋を急性単離、冷PBS中で裁断後、37°Cのコラゲナーゼ溶液（0.23 U/ml）中で消化し、遠心分離により細胞を回収した。回収された細胞を DMEM（10% FCS, 100U ペニシリン・ストレプトマイシン含有）に懸濁した後、ポリスチレンプレートに蒔き、線維芽細胞を除く目的で1時間 pre-plating（37°C, 5% CO<sub>2</sub>）を行った。プレートに付着していない細胞に 1-beta-D-arabinofuranosyl cytosine（AraC: 最終濃度 10<sup>-6</sup>M）を添加し、ゼラチンコートされた6穴プレートに 10<sup>6</sup> cells/well の密度で蒔き、24時間インキュベーション（37°C, 5% CO<sub>2</sub>）を行った。翌日、培地を無血清 DMEM（1x ITS-X [Invitrogen], 5 mM タウリン, ペニシリン・ストレプトマイシン含有）に置換した後にさらに24時間インキュベーション（37°C, 5% CO<sub>2</sub>）し、細胞の分化を誘導した。単離から3日目に、T3もしくはDITPAを含む無血清 DMEM に培地を置換し、24時間インキュベーション（37°C, 5% CO<sub>2</sub>）した。細胞単離後4日目、total RNAを Trizol (Invitrogen)により回収し、DNaseI 処理を施した。RNAの濃度は260 nmの吸光度で測定した。OD260/280比は各サンプルで1.6以上であった。

#### b) リアルタイム RT-PCR

特異的mRNAを定量する目的で RT-PCR 反応における標的配列特異的増幅過程を ABI Prism7700 (Applied Biosystems) を用いてモニターした。オリゴヌクレオチドプライマーおよび TaqMan<sup>TM</sup> プローブは Primer Express (Applied Biosystems) を用いてデザインした (Table 1)。TaqMan プローブはオリゴヌクレオチドの5'末端をレポーター色素 FAM（6-carboxy-fluorescein）、3'末端をクエンチャー色素 TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine)でラベルすることにより作製した。RT-PCRは96穴チューブを用いて Total RNA 50 ng に対して各 200 nM の フォワードプライマーおよびリバースプライマー、100 nM の TaqMan<sup>TM</sup> プローブ (Table 1)、

Table 1 Rat primer and probe sequences for real-time RT-PCR

Gene	Forward primer (5'→3')	TaqMan probe (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
αMHC	AATGACAACCTCCTCCCGCTTT	TCATCAGGATCCACTTTGGAGCCACA	CCAGAAGGTAGTCTCTATGTCTGC
SERCA2	TGCTTGTCATGTCCCTTCA	TTGATCCTCTACGTGGAACCTTTGCCA	GCGGTGTGATCTGGAATGA
β <sub>1</sub> AR	CCAAGTGCTGCGATTTCGT	TGTGCATCATGGCCTTCGTGTACCTC	GTCGATCTTCTTACCTGTTTCTG
PLB	CCTTACTCGCTCGGCTATTAGG	CCTCGACTATTGAAATGCCCCAGCAA	ACAGCTTGTCACAGAAGATCAC
HCN1	CTGCCAGTGTTTCGAGCTGATAC	TACTGTCCGCTTTTACTCCCTTTCGGTGG	GGATATTCCTCCAAGACCTCGTT
HCN2	CAAGTGAGCAGTACATGTCCCTTC	CTGACTTCCGCCAGAAGATCCACGAT	CGTCAAACATCTTCCCCTGGTA
HCN4	GGTGGAGGACAACACAGAAATCA	CAGCGGATCAAGATGAAGTACCTGAAAAGC	TGCGAGTCTCCACTATAAGGAAGA

1xOne-Step RT-PCR Universal MasterMix (ABI)、1x Multiscribe Reverse Transcriptase w/ Rnase Inhibitor (ABI) を加え、全量25 $\mu$ lとして ABI Prism7700 を用いて RT-PCR 反応を行った。逆転写反応 (48 °C, 30 min) と DNA polymerase 活性化 (95 °C, 10 min) の後、[95 °C, 15 s→60 °C, 1 min] のサイクルで 40 回 PCR 反応を行った。サンプル中の 18S rRNA 量を内部標準し、測定値は薬物非処理群に対する比として計算した。

### (B) 肥大型心筋症モデルマウスの表現型に対する加齢の影響

甲状腺ホルモン誘導体の心筋病態への有効性を評価する目的で次年度以降に各種の病態モデル動物の使用を予定している。この際、モデルの表現系を詳しく理解し、ヒト病態との相溶性および相違点を把握することは極めて重要と考えられる。肥大型心筋症患者の予後は多くの場合良好であるが、時として加齢により非代償性心筋拡張およびこれに伴う心不全を起こすことが知られている。当研究では本研究者の作製した心筋特異的にカルセクエストリンを 20 倍過剰発現したマウスを肥大型心筋症モデルとして使用することを予定しているが、このモデルとは別に Jones *et al.* (1998) によっても同様なカルセクエストリン過剰発現マウス (10 倍) が作製されている。Jones *et al.* のモデルは本研究者のモデルよりもカルセクエストリン量が少ないにも関わらず、生後 16 週間までに心不全により死亡してしまう。これに対し本研究者のモデルは 3 ヶ月令では死亡率増加は認められないといった相違点がある。この差が単に病態の進行速度の差であるかどうかを検討するために、本研究者のモデルの心筋表現型が加齢 (2-3 ヶ月 vs. 17 ヶ月齢) によってどのように変化するかを検討した。

#### a) カルセクエストリン過剰発現マウスの作製

$\alpha$  ミオシン重鎖プロモーターにより心筋特異的に  $Ca^{2+}$  結合タンパク質カルセクエストリン (マウス由来、心筋型アイソフォーム) を過剰発現しているトランスジェニックマウスは既に報告された方法で作製した (Sato *et al. J Biol Chem* 273: 28470-28477, 1998)。

#### b) イムノブロッティング

10mM イミダゾール (pH7.0)、300mM 蔗糖、1mM DTT、1mM sodium metabisulfite、0.3mM PMSF、5 $\mu$ M/ml ロイペプチン、2mM EDTA、10 $\mu$ M/ml ダイズトリプシンインヒビター II-S、5 $\mu$ M/ml ペプスタチン A を含む溶液中で氷冷下、マウス左心室をホモゲナイズし、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、以前に報告された方法 (Sato *et al. J Biol Chem* 273: 28470-28477, 1998) でカルセクエストリン、筋小胞体カルシウムポンプ (Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase, SERCA)、およびホスホランパンのイムノブロッティングを行った。

#### c) 形態学的・生理学的検討

形態学的検討および単離心筋の Langendorff 灌流は既に報告された方法 (Sato *et al. J Biol Chem* 273: 28470-28477, 1998) により行った。

### (C) 倫理面への配慮

本研究を遂行するにあたり、動物の取り扱いに関しては「国立衛生試験所動物実験に関する指針」(平成元年4月国立衛生試験所動物実験委員会)、「動物実験に関する日本薬理学会指針」(日本薬理学会) および「大学等における動物実験について(通知)」(昭和62年5月25日 文学情第141号 文部省学術国際局長) を遵守した。

## 3. 研究成果

### (A) 初代培養心筋細胞における甲状腺ホルモン受容体リガンドの遺伝子発現調節作用

DITPA および T3 の培養心筋細胞における遺伝子発現作用をリアルタイム RT-PCR により定量した結果を Fig. 2 に示した。DITPA の作用が観察される濃度範囲は T3 に較べて約 100 倍高い濃度であったが、これは DITPA の甲状腺ホルモン受容体に対する親和性が T3 と較べて約 100 倍低いことと合致する (Fig. 1)。2 つの甲状腺ホルモン受容体アゴニストともに心筋収縮性決定において特に重要な  $\alpha$  ミオシン重鎖  $\alpha$  型サブタイプや筋小胞体  $Ca^{2+}$ -ATPase 2a 型アイソフォームの遺伝子の発現に対する

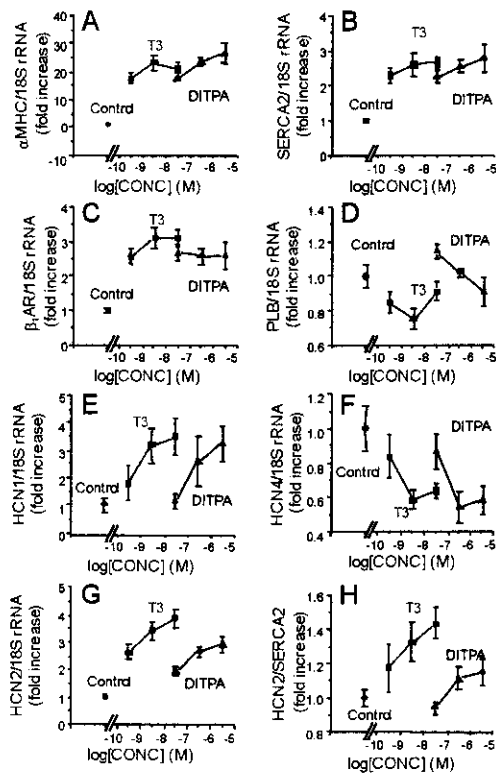


Fig. 2 Effects of T3 and DITPA on expression of mRNA for cardiac  $\alpha$ -myosin heavy chain ( $\alpha$ MHC) (A), sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 2 (SERCA2) (B),  $\beta_1$ -adrenergic receptors ( $\beta_1$ AR) (C), phospholamban (PLB) (D), hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels type 1 (HCN1) (E), type 4 (HCN4) and type 2 (HCN2) (G) in cultured neonatal rat cardiomyocytes. Cells were treated with T3 or DITPA for 24 hours. (H) indicates effects of T3 and DITPA on mRNA ratio between HCN2 and SERCA2. Values are means  $\pm$  S.E. (n=6).

DITPAの最大作用は T3 と同程度であった (Fig. 2A, 2B)。心筋収縮調節および心拍数調節の双方に重要と考えられる  $\beta_1$  アドレナリン受容体サブタイプ遺伝子の発現はDITPAおよび T3 の投与により上昇したが、その最大作用も2つの甲状腺ホルモン受容体アゴニスト間で同等であった (Fig. 2C)。 $\alpha$ ミオシン重鎖、SERCA2、 $\beta_1$ アドレナリン受容体遺伝子の発現において同程度の効果を発揮する用量において、T3 はホスホランバン遺伝子の発現を約 20 %抑制したが、DITPAは有意なホスホランバン遺伝子抑制作用が認められなかった (Fig. 2D)。ペースメーカーチャンネル (HCN) のうち、HCN1およびHCN4の遺伝子発現に対するDITPAの最大作用は T3 と同程度であった (Fig. 2E, 2F)。 $\alpha$ ミオシン重鎖、SERCA2、 $\beta_1$ アドレナリン受容体遺伝子の発現において同程度の効果を発揮する用量において、HCN2の遺伝子発現に対するDITPAの作用は T3 と較べて有意に低かった (Fig. 2G)。

T3 は HCN2/SERCA2 の mRNA 量比を増加させたことから T3 の遺伝子発現増加作用はSERCA2遺伝子よりもHCN2遺伝子に選択的であるが明らかとなった。これに対し、DITPA処理では HCN2/SERCA2 の用量依存的な傾向が見られたものの、有意な増加は見られなかった (Fig. 2H)。

### (B) 肥大型心筋症モデルマウスの表現型に対する加齢の影響

Jones *et al.* (1998) のモデルとは対照的に本研究者のカルセクエストリン過剰発現マウスは最低 17 ヶ月齢まで外見上の異常は認められず、17 ヶ月までの生存率も 100 %であった。また Fig. 3 に示したように、心筋のカルセクエストリンタンパク質レベルは 17 ヶ月齢でも若齢期と同様、野生型と較べて 20 倍の過剰発現が維持されていた。重篤な病態心筋においては SERCA、ホスホランバンのタンパク質レベルが変化することがあるが、17 ヶ月齢のカルセクエストリン過剰発現マウスと野生型マウスにおける心筋 SERCA およびホスホランバン量には差が認められなかった。

若齢 (2~3 ヶ月齢) カルセクエストリン過剰発現マウスにおいては心肥大が報

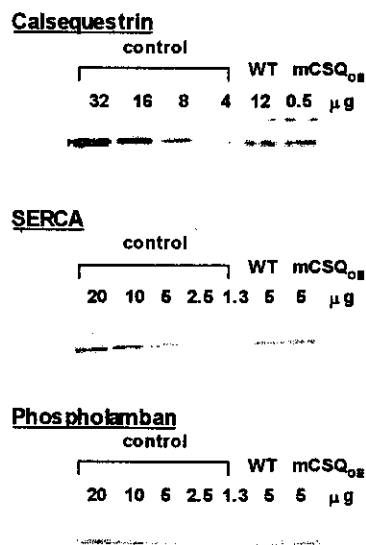


Fig. 3 Immunoblotting for SR  $\text{Ca}^{2+}$  handling proteins in aged transgenic mouse hearts. Dilution series of a control homogenate from pooled wild-type hearts were used to generate standard lines for quantitation of calsequestrin, sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) and phospholamban levels in cardiac ventricular homogenates from 17-month old calsequestrin-overexpressing mice ( $\text{mCSQ}_{0.8}$ ) and their age-matched wild-type (WT) littermates. For the quantitation of phospholamban, the solubilized samples were boiled for 5 min to fully dissociate the pentameric form of phospholamban into monomers. Calsequestrin levels in  $\text{mCSQ}_{0.8}$  were approximately 20-fold above WT, and SERCA and phospholamban levels were not different between the two groups.

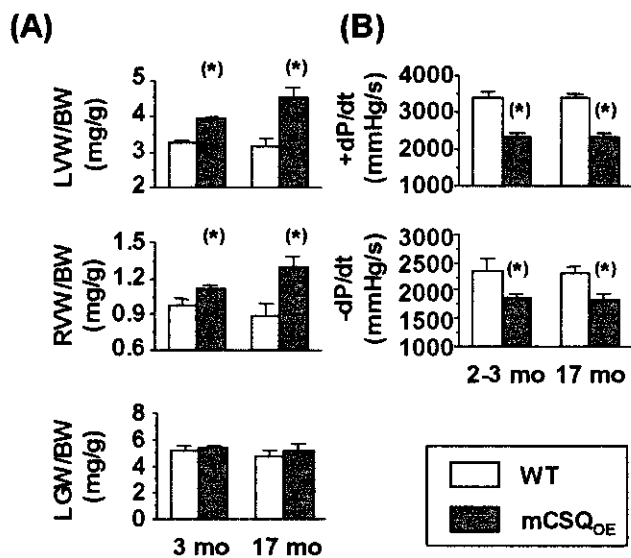


Fig. 4 (A) Blotted weights of cardiopulmonary tissues were normalized to body weight and were not significantly different between 3- and 17-month old mCSQ<sub>OE</sub> or WT FVB/N mice. LVW: left ventricular weight, RVW: right ventricular weight, LGW: lung weight. (B) The maximal rates of contraction (+dP/dt) and relaxation (-dP/dt) were not altered with age (2-3 vs. 17 months) in Langendorff perfused hearts of mCSQ<sub>OE</sub> FVB/N mice or their WT littermates. Values are means  $\pm$  S.E. (n=3-8). \* p<0.05 vs. WT (Two-way ANOVA).

#### 4. 考察

##### (A) 初代培養心筋細胞における甲状腺ホルモン受容体リガンドの遺伝子発現調節作用

培養心筋細胞において $\alpha$ ミオシン重鎖、SERCA2、 $\beta_1$ アドレナリン受容体、HCN1、HCN4遺伝子の発現変化作用に関してDITPAはT3と同等のintrinsic activityをもつと考えられるが、②これらの遺伝子発現において同等の効力を示す濃度においてDITPAはT3のようなホスホランパン遺伝子発現低下作用を示さないこと、および③T3と較べてDITPAはHCN2遺伝子上昇作用においてpartial agonistであることが明らかとなり、T3とDITPAは特定の遺伝子に対してintrinsic activityが異なることが示唆された。

HCN2チャンネルは心室筋に発現が多く伝導系細胞における発現が少ないこと、およびcAMP非存在下の $V_{1/2}$ 値が約-80 mVと深いことから、通常の状態では心拍数調節に直接関与しているとは考えにくい。しかし甲状腺ホルモン存在下では $\beta_1$ アドレナリン受容体発現量増加に伴う細胞内cAMP濃度の上昇によりHCN2の $V_{1/2}$ 値上昇が起こると考えられるため、HCN2は甲状腺ホルモン刺激下では心拍数増加作用および不整脈誘発作用に関わっている可能性がある。この点でHCN2遺伝子発現におけるpartial agonismはDITPAの心拍数への作用の弱さに関与している可能性がある。

##### (B) 肥大型心筋症モデルマウスの表現型に対する加齢の影響

カルセクエストリン過剰発現(20倍)による心筋小胞体のCa<sup>2+</sup>制御障害は心肥大の形成と持続に関わっていると考えられる。17カ月齢のマウスの心筋表現型を検討した結果、本研究者の作成したカルセクエストリン過剰発現マウスにおける心筋表現型は非常に安定で、加齢による病態の悪化は認められなかったことから、予後が良好なヒト肥大型心筋症に類似した表現型と考えられる。カルセクエストリンを心筋特異的に過剰発現しているJones et al. (1998)のマウスモデルでは本研究者よりも低いレベルの過剰発現(10倍)であるにもかかわらず若齢での心不全死が起こるが、これはカルセクエストリン過剰発現そのものよりも、マウス系統など、アーチファクトの相乗効果によるものである可能性が高い。実際、Jones et al.の用いたマウスの系統(DBA/2)は野生型においても生後数週齢で心筋の石灰化が起こることが以前から知られている。

#### 5. まとめ

本年度の研究によってペースメーカーチャンネル遺伝子発現上昇作用におけるintrinsic activityの弱

告されている(Sato et al., 1998)。17ヶ月齢のカルセクエストリン過剰発現マウスにおいては左心房がほぼ全域にわたり石灰化・線維化していたものの、左右心室筋湿重量/体重比は若齢群と較べて有意な変化が見られなかった(Fig. 4A)。また肺湿重量/体重比(肺鬱血・心不全の指標)も加齢による変化および遺伝型の差による違いは認められなかった。

若齢カルセクエストリン過剰発現マウスにおいては興奮収縮連関の心筋小胞体Ca<sup>2+</sup>制御系異常と、それに伴う低心筋収縮能が報告されている(Sato et al., 1998)。2-3ヶ月齢および17ヶ月齢のカルセクエストリン過剰発現マウス心筋の収縮能・弛緩能を単離心筋灌流標本により検討したところ、若齢カルセクエストリン過剰発現マウスで観察された低収縮能および低弛緩能は加齢によってさらに悪化することないことが明らかとなった(Fig. 4B)。

さがDITPAの持つ収縮力選択性の原因の一つであることが示唆された。以上の結果を踏まえ、DITPAの遺伝子選択性および収縮力選択性の機序を転写因子レベルで分子薬理的に解明する目的で、各遺伝子のプロモーター部位に存在する核内ホルモン応答配列を含むレポーター遺伝子を作成し、DITPAおよび T3 の遺伝子転写制御作用を検討する系の確立に現在着手している。

また本年度はカルセクエストリン過剰発現マウスにおける加齢の影響を評価することで、同マウスの肥大型心筋症モデルとしての性格をより詳細に検討した。この検討の過程において、遺伝子改変操作とそれに伴う細胞機能・形態などの表現型の変化を結びつけるときには遺伝子改変の直接的影響と間接的影響の評価および系統などの表現型決定に重要なほかの遺伝的要因を十分考慮に入れることの重要性が明らかとなった。

## 6. 研究発表

Sato, Y., Schmidt, A.G., Kiriazis, H., Hoit, B.D. & Kranias, E.G. Compensated hypertrophy of cardiac ventricles in aged transgenic FVB/N mice overexpressing calsequestrin *Mol Cell Biochem* 2002 (in press)

Sato, Y., Mori, S., Fujino, T., Nishimaki-Mogami, T. & Inoue, K. Selective gene expression by a thyroid hormone receptor agonist in cardiomyocytes. *Jpn J Pharmacol* **88** (Suppl. I), 262P (2002).

Sato, Y., Schmidt, A.G., Kiriazis, H., Hoit, B.D. & Kranias, E.G. Re-evaluation of heart failure in transgenic mice with impaired SR Ca<sup>2+</sup> release. *J Mol Cell Cardiol* **33(9)**, 1757-9 (2001).

## 7. 知的所有権の取得状況

(ア)	特許取得	なし
(イ)	実用新案登録	なし
(ウ)	その他	なし

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社