

20020430

厚生労働科学研究費補助金

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 14 年度 総括研究報告書

主任研究者 小室 一成

平成 15 (2003) 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・・・・・・・・ 6
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・・・・・・・・・・ 8
竹島 浩
3. 心筋肥大における rap1GAPII の役割に関する研究・・・・・・・・・・ 11
望月 直樹
4. 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13
廣田 久雄
5. Ca²⁺誘発性 Ca²⁺放出機序の異常による心不全発症機序に関する研究・・・・・・・・ 16
高野 博之

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 19

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・ 25

研究要旨

心不全の病態解明のために、転写因子、サイトカイン、核酸代謝、Ca²⁺調節、シグナル伝達に關与する分子の遺伝子改変マウスを作成し、心不全の発症・進展に対するこれらの分子の役割を解析した。さらに心不全モデルラットであるダールラットの心臓における遺伝子の発現パターンを薬剤投与群間で比較検討し、心不全の病態形成に關与している遺伝子を同定した。

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

高野 博之 千葉大学大学院医学研究院

循環病態医科学助手

伝達に重要な受容体である gp130 の下流にある転写因子の STAT、③ATP やアデノシンの調節に關わる核酸代謝の關連酵素である AMPD のうち心筋型アイソザイムである AMPD3、④心筋細胞の Ca²⁺シグナリングに重要な分子であるジャンクトフィリンと Na⁺/Ca²⁺交換体 (NCX)、⑤心肥大の形成に重要な役割を果たす低分子量G蛋白質の Ras に拮抗する Rap1。

II. 作成した遺伝子改変マウスの心臓の形態や機能を解析し、さらにこれらのマウスを用いて圧負荷心肥大モデルや心筋梗塞モデルなどの心疾患モデルを作成した際の心不全の発症・進展に対する効果を解析する。

III. ダール食塩感受性ラットに高食塩食を与えて心不全モデルを作成する。11 週齢よりアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACE-I) またはアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) を浸透圧ポンプを用いて持続投与する。20 週齢の各群の心臓から RNA を抽出し、DNA チップを用いて遺伝子発現を解析する。

(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

心不全の病態解明のために、転写因子、サイトカイン、核酸代謝、Ca²⁺調節、シグナル伝達に關与する分子の遺伝子改変マウスを作成し、心臓の形態や機能に対するこれらの分子の役割を解析する。またこれらのマウスを用いて心肥大モデルや心筋梗塞モデルを作成した際の、心不全の発症・進展に対する効果も検討する。さらに心不全モデルラットであるダールラットの心臓における遺伝子の発現パターンを薬剤投与群間で比較検討し、心不全の病態形成に關与している遺伝子を同定する。

B. 研究方法

I. 遺伝子改変マウスの作成—以下の 5 つの分子の遺伝子改変マウスを作成する。①心臓の発生、分化に必須な転写因子である CSX、②心肥大や心保護のシグナル

C. 研究結果

I. 遺伝子改変マウスの作製—①CSX の過剰発現マウスおよび CSX の dominant negative 分子の過剰発現マウス、②STAT3 の遺伝子欠損マウス、③AMPD3 の

遺伝子欠損マウス、④ジャンクトフィリンの遺伝子欠損マウスおよび NCX の遺伝子欠損マウス、⑤Rap1 の水解促進因子である Rap1GAPII の過剰発現マウス、の全ての遺伝子改変マウスの作製に成功した。

II. 遺伝子改変マウスの解析—①CSX の過剰発現マウスでは ANP、BNP、CARP などの心筋特異的遺伝子の発現が亢進していた。また心毒性を有す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マウスに比べ軽度であった。CSX の dominant negative 分子の過剰発現マウスでは心筋線維の疎少化や毛細血管の増加が認められた。アドリアマイシンの投与により apoptosis を呈する心筋細胞が野生型マウスに比べ多かった。②gp130 の遺伝子欠損マウスは圧負荷に対して多くの心筋細胞が apoptosis を呈し、心不全で死亡した。STAT3 の遺伝子欠損マウスは心拡大と心筋間質の線維化が認められた。また心臓における TGF- β 1、3 および angiotensin II の発現が増強していた。③AMPD3 の遺伝子欠損マウスはヘテロ、ホモともに正常に発育し外見上大きな変化は見られなかった。また他の AMPD 遺伝子の代償的な発現の亢進も認められなかった。しかし AMPD2 および AMPD3 遺伝子のヘテロ欠損マウスを交配し、AMPD2/AMPD3 遺伝子複合変異マウスを作製したところ、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は細胞膜と結合し筋小胞体膜を貫通することにより結合複合体の形成に寄与している。ジャンクトフィリンの遺伝子欠損マウスは受精後 9.5 日に心臓の拍動が微弱化し、その翌日には死亡した。胎児の心筋細胞では結合複合体の構造が減少し、収縮反応に必須な Ca²⁺トランジェントが減弱あるいは消失していた。NCX の遺伝子欠損マウス（ヘテロ）の心臓は機能・形態ともに野生型と変化がなかった。圧負荷により著明な心肥大と左室拡張障害を認めたが収縮能は正常であった。⑤Rap1GAPII の過剰発現マウスでは心臓における活性型の Rap1、Rap2 はともに減少しており、ERK の活性化や心肥大は認められなかった。

III. 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。ACE-I 投与群、ARB

投与群ともに心不全を改善したが、両群における遺伝子発現パターンは大きく異なっていた。

D. 考察

CSX、STAT3、AMPD3、ジャンクトフィリン、NCX、Ras などの分子の心臓形態・機能における役割を解明することができた。また心不全の発症・進展におけるこれらの分子の関与についても解析することができた。DNA チップを用いた遺伝子の解析は心不全の原因遺伝子の同定に役立つと考えられた。

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) Minamino T, Komuro I, et al. Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet* 360:2083-2084, 2002.
- (2) Shirai M, Komuro I, et al. The polycomb-group Rae28 sustains Nkx2.5/Csx expression and is essential for cardiac morphogenesis. *J Clin Invest* 110:177-184, 2002.
- (3) Toko H, Komuro I, et al. Csx/Nkx2-5 is required for homeostasis and survival of cardiac myocytes in the adult Heart. *J Biol Chem*: 277:24735-24743, 2002.
- (4) Takimoto E, Komuro I, et al. Sodium calcium exchanger plays a key role in alteration of cardiac function in response to pressure overload. *FASEB J* 16:373-378, 2002.

- (5) Zou Y, Komuro I, et al. Molecular and Cellular Mechanisms of Mechanical Stress-Induced Cardiac Hypertrophy. *Endocrine Journal* 49:1-13, 2002.
- (6) Zou Y, Komuro I, et al. Continuous Blockade of L-Type Ca^{2+} Channels Suppresses Activation of Calcineurin and Development of Cardiac Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertens Res* 25:117-124, 2002.
- (7) Asakawa M, Komuro I, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Plays a Critical Role in Inhibition of Cardiac Hypertrophy In Vitro and In Vivo. *Circulation* 105:1240-1246, 2002.
- (8) Minamino T, Komuro I, et al. Endothelial Cell Senescence in Human Atherosclerosis Role of Telomere in Endothelial Dysfunction. *Circulation* 105:1541-1544, 2002.
- (9) Toko H, Komuro I, et al. Angiotensin II type 1a receptor mediates doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Hypertens Res* 25:597-603, 2002.
- (10) Takano H, Komuro I, et al. β -blockers have beneficial effects even on unclassified cardiomyopathy such as isolated ventricular noncompaction. *Inter Medicine* 41:601-602, 2002.
- (11) Monzen K, Komuro I, et al. Dual effects of the homeobox transcription factor *Csx/Nkx2-5* on cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 298:493-500, 2002.
- (12) Funabashi N, Komuro I, et al. Coronary artery patency after metallic stent implantation evaluated by multislice computed tomography. *Circulation* 107:147-148, 2003.
- (13) Sato M, Komuro I, et al. Detection of experimental autoimmune myocarditis in rats by 111 in monoclonal antibody Specific for tenascin-C. *Circulation* 106:1397-1402, 2002.
- (14) Tomita S, Nakatani T, Fukuhara S, Morisaki T, Yutani C: Bone marrow stromal cells contract synchronously with cardiomyocytes in a coculture system. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 50:321-324, 2002
- (15) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Kishida A, Morisaki T, Yutani C, Kitamura S: Comparison of cell labeling procedures for bone marrow cell transplantation to treat heart failure: long-term quantitative analysis. *Transplant Proc* 34:2718-2721, 2002
- (16) Osugi T, Oshima Y, Fujio Y, Funamoto M, Yamashita A, Negoro S, Kunisada K, Izumi M, Nakaoka Y, Hirota H, Okabe M, Yamauchi-Takahara K, Kawase I, Kishimoto T. Cardiac-specific activation of signal transducer and activator of transcription 3 promotes vascular formation in the heart. *J Biol Chem* 277(8):6676-81, 2002.
- (17) Kunisada K, Tone E, Negoro S, Nakaoka Y, Oshima Y, Osugi T, Funamoto M, Izumi M, Fujio Y, Hirota H, Yamauchi-Takahara K. Bcl-x1 reduces doxorubicin-induced myocardial damage but fails to control cardiac gene downregulation. *Cardiovasc Res* 53(4):936-43, 2002
- (18) Oshima Y, Hirota H, Nagai H, Izumi M, Nakaoka Y, Osugi T, Fujio Y, Tateyama H, Kikui M, Yamauchi-Takahara K, Kawase I. Specific cardiomyopathy caused by multisystemic lipid storage in Jordan's anomaly. *Circulation* 9:280-281, 2002.
- (19) Oshima Y, Fujio Y, Funamoto M, Negoro S, Izumi M, Nakaoka Y, Hirota H, Yamauchi-Takahara K, Kawase I. "Aldosterone augments endothelin-1-induced cardiac myocyte hypertrophy with the reinforcement of the JNK pathway." *FEBS Lett* 2002 Jul 31;524(1-3):123-6
- (20) Yamazaki, T., Takeda, K., Gotoh, K., Takeshima, H., Akira, S. & Kurosaki, T. Essential immunoregulatory role for BCAP in B cell development and function. *J. Exp. Med.* 195, 535-545, 2002.
- (21) Higgins, G. A., Kew, J. N. C., Richards, J. G., Takeshima, H., Jenck, F., Adam, G., Wichman, J., Kemp, J. A. & Grottick, A. J. A combined pharmacological and genetic approach to investigate the role of orphanin FQ in learning and memory. *Eur. J. Neurosci.* 15, 911-922, 2002.
- (22) Nishi, M., Hashimoto, K., Kuriyama, K., Komazaki,

- S., Kano, M., Shibata, S. & Takeshima, H. Motor discoordination in mutant mice lacking junctophilin type 3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 318-324, 2002.
- (23) 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* 31, 89-96, 2002.
- (24) Pan, Z., Yang, D., Nagaraj, R. J., Nosek, T. A., Nishi, M., Takeshima, H., Cheng, H. & Ma, J. Dysfunction of store-operated Ca^{2+} channel in muscle cells lacking *mg29* gene. *Nature Cell Biol.* 4, 379-383, 2002.
- (25) Komazaki, S., Ito, K., Takeshima, H. & Nakamura, H. Deficiency of triad formation in developing skeletal muscle cells lacking junctophilin type 1. *FEBS Lett.* 524, 225-229, 2002.
- (26) Eiraku, M., Hirata, Y., Takeshima, H., Hirano, T. & Kengaku, M. Delta/Notch-like EGF-related receptor (DNER), a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 25400-25407, 2002.
- (27) Houtani, T., Ikeda, M., Kase, M., Sato, K., Sakuma, S., Kakimoto, S., Ueyama, T., Munemoto, Y., Takeshima, H. & Sugimoto, T. A subset of nociceptin/orphanin FQ receptor-expressing neurons in the anterior hypothalamic area, as revealed in mice with lacZ reporter gene. *Neurosci. Lett.* 335, 217-219, 2003.
- (28) Inoue, M., Kawashima, T., Takeshima, H., Calo, G., Inoue, A., Nakata, Y. & Ueda, H. In vivo pain-inhibitory role of nociceptin/orphanin FQ in spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* in press.
- (29) Komazaki, S., Nishi, M. & Takeshima, H. Abnormal junctional membrane structures in cardiac myocytes expressing ectopic junctophilin-type 1. submitted.
- (30) Nagashima KI, Endo A, Ogita H, Kawana A, Yamagishi A, Kitabatake A, Matsuda M, Mochizuki N. Adaptor protein Crk is required for ephrin-B1-induced membrane ruffling and focal complex assembly of human aortic endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 13: 4231-4242, 2002.
- (31) Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N. Matsuda M. Activation of Rac and Cdc42 video imaged by Fluorescent Resonance Energy Transfer-Based single molecule Probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell. Biol.* 22: 6582-6591, 2002
- (32) Endo A, Nagashima K, Kurose H, Mochizuki S, Matsuda M, Mochizuki N. Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. *J Biol Chem.* 277: 23747-54, 2002

2. 学会発表

- (1) 小室一成：「心不全に関する再生治療」第102回日本循環器学会北陸地方会、富山、平成14年2月。
- (2) Komuro I. International Opinion Leaders Workshop: New Insights into the Management of Hypertension. April, 2002, Madrid, Spain.
- (3) 小室一成：「心臓リモデリングにおけるP-A系の役割」第87回日本循環器学会北海道地方会、北海道、平成14年6月。
- (4) Komuro I. Stretch-modulation of second messengers and their effects on cardiomyocyte ion transport, Sep, 2002, Oxford, UK.
- (5) 小室一成：「心臓血管リモデリングにおけるアンジオテンシンIIの役割」第50回日本心臓病学会学術集会、名古屋、平成14年9月。
- (6) Komuro I. Gene therapy for myocardial infarction. XV Congress Cardiovascular System Dynamics Society, October, 2002, Sendai, JAPAN.
- (7) Komuro I. American Heart Association 75th Scientific Sessions. PPAR in Cardiac Hypertrophy. November 2002, Chicago, USA.
- (8) 小室一成：「心筋細胞の展望」第122回日本医学会シンポジウム、東京、平成14年12月。
- (9) 森崎隆幸 他、AMP deaminase 欠損症：ゲノム解

析による新たな発見 第36回日本痛風・核酸代謝学会、東京都、2003年2月13-14日。

(10) Hirota H, Izumi M, Terai K, Sugiyama S, Nakaoka Y, Oshima Y, Yamauchi-Takahara K, Kawase I. Bone Morphogenetic Protein-2 Signaling through Smad1 inhibits Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation. Grover Conference on Pulmonary Signaling Mechanisms in the Pulmonary Circulation Colorado USA, Sep 5 2002

(11) Hirota H, Nakaoka Y, Izumi M, Oshima Y, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K, Kawase I. Loss of Stat3-dependent pathway in cardiac cell is a critical event in the onset of myocardial fibrosis. American Heart Association Scientific Sessions 2002, Chicago USA, Nov 19 2002

(13) Nakaoka Y, Nishida K, Oshima Y, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K, Kawase I, Hirano T, Hirota H. Targeted disruption of Gab1 gene leads to developmental abnormalities in heart. American Heart Association Scientific Sessions 2002 Chicago USA, Nov 19 2002

(14) Nakaoka Y, Nishida K, Yamauchi-Takahara K, Kawase I, Hirano T, Hirota H. Targeted disruption of Gab1 gene leads to developmental abnormalities in heart. American Heart Association Scientific Sessions 2002 Chicago USA, Nov 19 2002

(15) Oshima Y, Fujio Y, Sugiyama S, Izumi M, Nakaoka Y, Osugi T, Hirota H, Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T, Kawase I. Cardiac-Specific Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Prevents Myocardial Damage Induced by Ischemia / Reperfusion. American Heart Association Scientific Sessions 2002 Chicago USA, Nov 19 2002

(16) Kunisada K, Yamauchi-Takahara K, Tone E, Fujio Y, Oshima Y, Nakaoka Y, Hirota H. Overexpression of Bcl-xL Inhibits Doxorubicin-Induced Cell Death but Fails to Control Cardiac-Specific Gene Downregulation in Cardiac Myocytes. American Heart Association Scientific Sessions 2002 Chicago USA, Nov 19 2002

(17) 廣田久雄 “Loss of Gp130-Stat3-Dependent Pathway in Cardiac Cell is a Critical Event in the Onset of

Heart Failure and Myocardial Fibrosis” 第66回日本循環器学会学術集会シンポジウム-Molecular Mechanisms for the Development of Heart Failure- 北海道 平成14年4月26日

(18) 竹島浩、“結合膜構造とジャンクトフィリン”、日本薬理学会大会（熊本 2002年3月13日）

(19) 竹島浩、“筋収縮とジャンクトフィリン”、日本生理学会大会（広島 2002年3月25日）

(20) 竹島浩、“心筋細胞の容量依存性 Ca²⁺流入機構”、生理学研究所研究会“興奮性組織のイオン調律性制御メカニズム”（岡崎 2002年8月1日）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（廣田）

Method of Preparing Heart Muscle Cells and Method of Searching for Remedy for Heart Diseases. Date of Filing 27.06.01 European Patent Office

2. 実用新案登録：該当なし

3. その他：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

心不全の原因遺伝子候補として核酸代謝遺伝子をとらえ、代謝律速である AMPD 心筋型アイソザイムをコードする AMPD3 遺伝子について、遺伝子機能を明らかにするために遺伝子改変マウスを利用し *in vivo* 解析を進めている。AMPD3 遺伝子破壊および AMPD2 遺伝子マウスを作製し、さらに、交配により、AMPD3/AMPD2 遺伝子複合破壊マウスを作製した。得られたマウス個体における遺伝子発現を確認するとともに、心血管系を中心に *in vivo* における形態学的変化、機能変化を解析した。AMPD3・AMPD2 両遺伝子破壊ホモマウスは出生後約 2 週齢より体重増加が不良となり、生後約 3 週にて全て死亡した。心筋における変化は顕著でなかったことから、心機能障害は早期死亡の原因とは考えられないが、核酸代謝の生体での重要な役割が示唆された。

A. 研究目的

心不全の原因遺伝子候補として核酸代謝遺伝子をとらえ、代謝律速である AMPD 心筋型アイソザイムをコードする AMPD3 遺伝子について、遺伝子改変マウスを利用し *in vivo* 解析にて遺伝子機能を明らかにする。

B. 研究方法

ES 細胞における相同組換えにより AMPD3 遺伝子破壊および AMPD2 遺伝子破壊クローン細胞を得、胚盤胞インジェクションにより、AMPD3 遺伝子ならびに AMPD2 遺伝子破壊マウスを作製した。さらに、交配により、AMPD3/AMPD2 遺伝子複合破壊マウスを作製した。得られたマウス個体における遺伝子発現を確認するとともに、心血管系を中心に *in vivo* における形態学的変化、機能変化を解析した。

C. 研究結果

AMPD3 遺伝子破壊マウス・AMPD2 遺伝子破壊マウスとも該当遺伝子の正常 mRNA ホモ接合体は生存し、子孫を得ることが可能であった。それぞれ、対応する正常 mRNA は検出されなかった。AMPD3 遺伝子破壊では AMPD2 遺伝子の代償性発現上昇が見られたが、AMPD2 遺伝子破壊における AMPD3 遺伝子の発現変化は明らかではなかった。AMPD3 遺伝子破壊ホモマウスでは組織所見はどの臓器においても変化はなかったが、AMPD2 遺伝子

破壊ホモマウスは体重増加が次第にやや不良となり、生後数週よりタンパク尿を認めた。しかし、光学顕微鏡による検索では腎組織の変化はほとんどないことが明らかとなった。さらに、交配により、AMPD3・AMPD2 両遺伝子破壊ホモマウスは出生後約 2 週齢より体重増加が不良となり、生後約 3 週にて全て死亡した。死亡時のマウスの組織検索では、腎尿細管の拡大と著明な拡大を認めた。AMPD3・AMPD2 両遺伝子破壊では骨格筋以外のすべての組織細胞において AMPD 酵素欠損をきたしていると考えられることから、腎組織において当該核酸代謝異常が重要な変化をきたすと結論づけられる。心筋における変化は顕著でなかったことから、心機能障害は早期死亡の原因とは考えられないが、病的状態における機能変化と核酸代謝との関係はさらに検討が必要と考えられる。

D. 考察

核酸代謝ことにアデニンヌクレオチド代謝の律速酵素 AMPD について AMPD2,AMPD3 両遺伝子破壊マウスが樹立され、腎組織における AMPD 機能について興味ある結果が得られた。今後、このモデル動物は未知の機能の解明、特に心筋機能と核酸代謝との関係を明らかにする目的で有用であることが期待される。

E. 結論

核酸代謝ことにアデニンヌクレオチド代謝の律速酵素 AMPD について AMPD2,AMPD3 両遺伝子破壊マウスが樹立され、腎組織における AMPD 機能について興味ある結果が得られた。今後、このモデル動物は未知の機能の解明、特に心筋機能と核酸代謝との関係を明らかにする目的で有用であることが期待され、in vivo での機能解析の結果が待たれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomita S, Nakatani T, Fukuhara S, Morisaki T, Yutani C: Bone marrow stromal cells contract synchronously with cardiomyocytes in a coculture system. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 50:321-324, 2002
- 2) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Kishida A, Morisaki T, Yutani C, Kitamura S: Comparison of cell labeling procedures for bone marrow cell transplantation to treat heart failure: long-term quantitative analysis. *Transplant Proc* 34:2718-2721, 2002
- 3) Tomikura Y, Hisatome I, Tsuboi M, Yamawaki M, Shimoyama M, Yamamoto Y, Sasaki N, Ogino K, Igawa O, Shigemasa C, Ishiguro S, Ohgi S, Nanba E, Shiota G, Morisaki H, Morisaki T, Kitakaze M: Coordinate induction of AMP deaminase in human atrium with mitochondrial DNA deletion. *Biochem Biophys Res Commun* 302:372-376, 2003.

2. 学会発表

- 1) 森崎隆幸 他、AMP deaminase 欠損症：ゲノム解析による新たな発見 第36回日本痛風・核酸代謝学会、東京都、2003年2月13-14日

G. 知的所有権の取得状況

なし

研究要旨

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關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 14 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。これらの生理調節や新規の細胞内 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：昨年度までと同様に蛍光抗体法による心筋細胞内局在を指標にした膜タンパク質のスクリーニングを遂行した。得られた分子の中で、サルカルメニンとミツグミン 53 の 2 種の分子について、クローニングによる分子構造解析、組織分布検討、ノック共発現している JP-1 と-2 のうち JP-1 欠損

により新生致死となることを既に報告した。

JP-1 と JP-2 の機能的な相違を明らかにするため、骨格筋における結合膜構造と JP サブタイプ発現の成熟化過程、心筋細胞での JP-1 異所的発現の効果について、電子顕微鏡による形態観察と分子生物学的手法にて解析した。

C. 研究結果

(1) 本研究当初より遂行中の心筋膜タンパク質の同定実験を継続するとともに、昨年までに得られたサルカルメニンとミツグミン 53 について現在解析している。両者は心筋と骨格筋に特異的に発現しており、サルカルメニンは小胞体内の独特な Ca²⁺結合活性を有し、ミツグミン 53 は表層膜上の新規 RBCC ファミリーに属する点などで注目される。

(2) 骨格筋の結合膜構造は胎生期までにはほぼ心筋と同様の二つ組(diad)となるが、その後の成熟化の過程で三つ組(triad)が形成される。JP サブタイプ mRNA とタンパク質の発現量を検討した結果、その結合膜構造成熟化と JP-1 の発現増加がよく連関することが明らかになった。すなわち、JP-2 による二つ組形成後 JP-1 の共発

現により三つ組への構造変換が起こると仮定すると、JP-2 を発現している心筋での JP-1 発現で二つ組から三つ組への構造変化が生じることが期待される。そこで、 α -MHC のプロモーターに JP-1 cDNA を連結したトランスジーンを有するマウスを作製した。トランスジェノックマウスの心筋細胞での JP-1 と JP-2 の共発現と、結合膜構造中への両分子の局在が確認された。表層膜に小胞体膜が過剰に巻き付いた異常な結合膜構造の形成が確認されたものの、骨格筋で観察されるような三つ組形成は見い出せなかった。

D. 考察と結論

(1) 現在遂行中の実験で、サルカルメニンのノックアウトマウスは顕著な形態的及び生理的異常は見出せないが、骨格筋における小胞体への Ca^{2+} 再取込みに起因すると考えられる収縮機能での変化が明らかになりつつあり、その分子機序を今後解明する必要がある。また、ミツグミン 53 の機能解明のために、その欠損マウスの作製が急がれる。

(2) 心筋細胞にて JP-1 と JP-2 の共発現により、骨格筋と類似の三つ組形成が観察されないことは、両細胞での結合膜構造の形成機構が異なることを示すものと考察される。結合膜構築に規定する未知の因子の分子同定も今後の課題となる。

E. 研究発表

1 論文発表

1. Yamazaki, T., Takeda, K., Gotoh, K., Takeshima, H., Akira, S. & Kurosaki, T. Essential immunoregulatory role for BCAP in B cell development and function. *J. Exp. Med.* **195**, 535-545,

2002.

2. Higgins, G. A., Kew, J. N. C., Richards, J. G., Takeshima, H., Jenck, F., Adam, G., Wichman, J., Kemp, J. A. & Grottick, A. J. A combined pharmacological and genetic approach to investigate the role of orphanin FQ in learning and memory. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 911-922, 2002.

3. Nishi, M., Hashimoto, K., Kuriyama, K., Komazaki, S., Kano, M., Shibata, S. & Takeshima, H. Motor discoordination in mutant mice lacking junctophilin type 3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 318-324, 2002.

4. 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* **31**, 89-96, 2002.

5. Pan, Z., Yang, D., Nagaraj, R. J., Nosek, T. A., Nishi, M., Takeshima, H., Cheng, H. & Ma, J. Dysfunction of store-operated Ca^{2+} channel in muscle cells lacking mg29 gene. *Nature Cell Biol.* **4**, 379-383, 2002.

6. Komazaki, S., Ito, K., Takeshima, H. & Nakamura, H. Deficiency of triad formation in developing skeletal muscle cells lacking junctophilin type 1. *FEBS Lett.* **524**, 225-229, 2002.

7. Eiraku, M., Hirata, Y., Takeshima, H., Hirano, T. & Kengaku, M. Delta/Notch-like EGF-related receptor (DNER), a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. *J. Biol. Chem.* **277**, 25400-25407, 2002.

8. Houtani, T., Ikeda, M., Kase, M., Sato, K., Sakuma, S., Kakimoto, S., Ueyama, T., Munemoto, Y., Takeshima, H. & Sugimoto, T. A subset of

nociceptin/orphanin FQ receptor-expressing neurons in the anterior hypothalamic area, as revealed in mice with lacZ reporter gene. *Neurosci. Lett.* 335, 217-219, 2003.

9. Inoue, M., Kawashima, T., Takehima, H., Calo, G., Inoue, A., Nakata, Y. & Ueda, H. In vivo pain-inhibitory role of nociceptin/orphanin FQ in spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* in press.

10. Komazaki, S., Nishi, M. & Takehima, H. Abnormal junctional membrane structures in cardiac myocytes expressing ectopic junctophilin type 1. submitted.

2 学会発表

1. 竹島浩、”結合膜構造とジャンクトフィリン”、日本薬理学会大会（熊本 2002年3月13日）
2. 竹島浩、”筋収縮とジャンクトフィリン”、日本生理学会大会（広島 2002年3月25日）
3. 竹島浩、”心筋細胞の容量依存性 Ca²⁺流入機構”、生理学研究所研究会”興奮性組織のイオン調律性制御メカニズム”（岡崎 2002年8月1日）

分担研究報告書

心不全の病態解明と原因遺伝子の同定
(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部長

研究要旨 心筋肥大の心筋細胞と血管再生における血管内皮細胞での低分子GTP結合タンパク質の活性化のメカニズムを解明することを目的とした。分子の活性化の可視化を生体で行うべく可視化プローブ発現マウスを作製した。心臓ではRasの活性化を可視化可能なマウスを、血管ではRac活性化可視化マウスをそれぞれ作製した。今後病態モデルでの可視化を行うことで病態解明が可能になった。

A. 研究目的

心筋細胞の機能異常は細胞内情報伝達系の異常により引き起こされたり、不十分な血管新生は血管内皮細胞の遊走能異常や分化異常が原因になっていると予想される。心不全の原因として今日一番多くは虚血性心疾患であるので、心筋と血管の両方の機能をマウス個体で可視化して検討する。心筋細胞ではRasスーパーファミリー分子のうちRasについて血管新生では細胞運動を制御しているRacについてその機能を時間的・空間的に検討可能な遺伝子改変マウスを作製する。

B. 研究方法

Ras活性化可視化プローブ発現マウスの作製

—これまでの研究ですでにRas分子と活性化プローブを作製した（昨年度報告、pRaichu-Ras）。このプラスミドのうちCAGGSプロモーター、Raichu-Rasのcoding DNAとpolyAまでを含むDNAをtransgeneとしてマウスに導入した（本研究は大阪大学微生物病研究所 大場博士の協力を得て行った）。このマウスにRaichu-Rasが発現していることは組織の溶解液をイムノブロット（抗GFP抗体）で検出して確認した。

Rac活性化可視化分子pRaichu-Racの作成—Rac分子活性化の可視化プローブの構造はRaichu-Rasを基本としている。Yellow Fluorescent Protein (YFP)、スパーサー、PAKのCRIBドメイン、Rac Cyan Fluorescent Protein (CFP)を発現するキメラ分子である（このcDNAは大阪大学微生物病

研究所 松田教授より提供された）。このRaichu-RacのDNAをloxP-neo-loxPの3つに繋げたDNAを構築した。

血管特異的Rac活性化可視化プローブ発現マウスの作製—マウス個体血管内皮細胞特異的にRaichu-Racを発現させるためにTie-2プロモーター依存性Cre発現マウスとVE-Cadherin依存性Cre発現マウスをまず作製した。Tie-2プロモーターは10kb以上のFirstイントロンを含むTie-2Cre(long)発現マウスをTexas Southwestern大学 Tom Sato博士より提供した頂いた。またCoreプロモーター依存性Cre発現マウスは当該研究で作製しTie-2Cre(short)。さらにVE-Cadherin依存性にCreを発現するマウスはVE-Cadプロモーター（-2484-24）のVE-cadherin遺伝子上流にCre遺伝子をつなげて同遺伝子をtransgeneとしてマウス胚に導入した。（動物の取り扱いには国立循環器病センター附属動物実験施設倫理規定を遵守して行った）。

C. 研究結果

Raichu-Ras発現マウス：CAGGSプロモーターは骨格筋と心筋で特に強く働くために胎児心臓から新生児心臓でRaichu-Rasの発現を確認できた。また、実体蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、やはり心臓での発現が非常に高く、観察可能であった。Ras活性化はFluorescent Resonance Energy Transfer (FRET)で評価可能であるが、現在成長過程でのRasの活性化パターンの解析をしている。

血管内皮細胞特異的Raichi-Rac発現マウス

ス：Tie-2(long)マウスはすでに確立されたマウスなのでまずこれとLoxP-Raichu-Racマウスを交配して、Raichu-Racが個体で発現するか確認した。血管での発現を蛍光実体顕微鏡で確かめた。Cre-LoxPシステムが働いていることを確認できたので、さらに当研究室で作製したTie-2Cre(short)マウスとの交配を行った。こちらもF1ではあるがメンデルの法則に従いRaichu-Racを血管特異的に発現するマウスを得ることができた。VE-CadherinCreマウスはVE-CadとLoxP-LacZマウスの交配でまず血管系での発現を確認した後に、LoxP-Raichu-Racの交配を行った。

現在、胎仔マウスが得られているので、このマウスのwhole mountでの解析を行なっているところである。

D. 考察

分子の活性化の可視化プローブを用いて、個体での分子の機能を検討することはどこでどのように機能しているかを明らかにできることで有効な機能解析方法であると考えている。特に心筋肥大が起きている部位や、血管新生（心臓での側副血行路）部位でのどのような分子機能異常が起きているかを明らかにすることは今後の治療を考えていく上で重要な命題である。

本年度の研究でわれわれは心臓でのRas分子活性化の可視化プローブ発現マウスの作製にせいこうしたので今後このマウスを使って圧負荷モデル・心筋梗塞モデルを用いてRas分子の時間的・空間的機能解析を行っていく計画である。

また、血管内皮細胞特異的Rac活性化分子発現マウスもF1ではあるが作製できたので今後homo mouseの確立を行っていく。さらに眼球での血管新生モデルも当該研究室で確立できたので、種々の増殖刺激依存性Racの生体での活性化を検討する。また、虚血モデルでの血管新生におけるRacの機能解析もRaichu-Rac発現マウスを用いて行っていく。

E. 健康危険情報

なし。

F. 結論

Ras分子活性化可視化プローブ発現マウスと血管内皮細胞特異的Rac活性化可視化マウスの作製に成功した。本モデルを今後活用して心不全原因遺伝子の解析が可能となった。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nagashima KI, Endo A, Ogita H, Kawana A, Yamagishi A, Kitabatake A, Matsuda M, Mochizuki N. Adaptor protein Crk is required for ephrin-B1-induced membrane ruffling and focal complex assembly of human aortic endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 13: 4231-4242, 2002

(2) Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N. Matsuda M. Activation of Rac and Cdc42 video imaged by Fluorescent Resonance Energy Transfer-Based single molecule Probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell. Biol.* 22: 6582-6591, 2002

(3) Endo A, Nagashima K, Kurose H, Mochizuki S, Matsuda M, Mochizuki N. Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. *J Biol Chem.* 277: 23747-54, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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 による心不全進展における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 STAT3CKO の左心室において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 STAT3CKO の心室にて TGF- β 1, 3 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 transducer and activator of transcription 3 (Stat3)、phosphatidylinositol 3 kinase および 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た。また 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報告し、さらに gp130 心室特異的欠損マウス (GPCKO) を作製し、圧負荷ストレスをかけたところ、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とおこなわれる。

C. 研究結果

STAT3CKO は正常に成長した。生後 13 週目の STAT3CKO を用いて心臓超音波検査を施行したが、左心室の壁厚正常、心拡大なし。収縮力もコントロールマウスと差は認めなかった。興味深いことに、同時期の STAT3CKO の左心室において van Gieson 染色陽性により同定される心筋間質および血管周囲の線維化を認め、生後 20 週目の観察ではさらに増強していた。線維化メカニズムの解析のため、心筋線維化関連蛋白のうち transforming growth factor (TGF)- β ファミリーの発現を免疫染色にて観察した。STAT3CKO の心室にて心筋間質および血管周囲に TGF- β 1 および 3 の発現増強が確認された。このことより STAT3CKO に認められた線維化はこれら TGF- β 1 および 3 の発現増強が関与することが考えられた。それではなぜ Stat3 欠損心筋では TGF- β 1 および 3 の発現が増強するのか。これまでいくつかの細胞系で物理的な伸展刺激が TGF- β の発現を誘導することが報告されている。そこで心筋における生理的な圧負荷による TGF- β の発現誘導が Stat3 により制御されているのではないかと仮説を立てて以下の実験を行った。ラット培養心筋細胞をシリコンコートしたゴム製の伸展刺激

装置上で培養し 6 時間の伸展刺激を与えた。この心筋細胞において TGF- β 1 の発現を RT-PCR 法で観察したところ、伸展刺激前に比して有意な増加を示した。次に Stat3 ドミナントネガティブアデノウイルスおよびコントロールとなる β ガラクトシダーゼ発現ウイルスを感染させた後、同様の伸展刺激をしたところ Stat3 ドミナントネガティブアデノウイルス前処置により TGF- β 1 の発現がコントロールウイルスの前処置に比して有意に増加していた。これより培養心筋細胞において伸展刺激により誘導される TGF- β 1 は同時に活性化される Stat3 により抑制されていると考えられた。STAT3CKO においては生理的な圧負荷刺激により活性化される Stat3 を介した抑制が働かないことより心筋の線維化が進行したと推論された。

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. Osugi T, Oshima Y, Fujio Y, Funamoto M, Yamashita A, Negoro S, Kunisada K, Izumi M, Nakaoka Y, Hirota H, Okabe M, Yamauchi-Takahara K, Kawase I, Kishimoto T. Cardiac-specific activation of signal transducer and activator of transcription 3 promotes vascular formation in the heart. *J Biol Chem* 277(8):6676-81, 2002
2. Kunisada K, Tone E, Negoro S, Nakaoka Y, Oshima Y, Osugi T, Funamoto M, Izumi M, Fujio Y, Hirota H, Yamauchi-Takahara K. Bcl-x1 reduces doxorubicin-induced myocardial damage but fails to control cardiac gene downregulation. *Cardiovasc Res* 53(4):936-43.

2002

3. Oshima Y, Hirota H, Nagai H, Izumi M, Nakaoka Y, Osugi T, Fujio Y, Tateyama H, Kikui M, Yamauchi-Takahara K, Kawase I. Specific cardiomyopathy caused by multisystemic lipid storage in Jordan's anomaly. *Circulation* 9:280-281, 2002.
 4. Oshima Y, Fujio Y, Funamoto M, Negoro S, Izumi M, Nakaoka Y, Hirota H, Yamauchi-Takahara K, Kawase I. "Aldosterone augments endothelin-1-induced cardiac myocyte hypertrophy with the reinforcement of the JNK pathway." *FEBS Lett* 2002 Jul 31;524(1-3):123-6
- #### 2. 学会発表
1. Hirota H, Izumi M, Terai K, Sugiyama S, Nakaoka Y, Oshima Y, Yamauchi-Takahara K, Kawase I. Bone Morphogenetic Protein-2 Signaling through Smad1 inhibits Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation. Grover Conference on Pulmonary Signaling Mechanisms in the Pulmonary Circulation Colorado USA, Sep 5 2002
 2. Hirota H, Nakaoka Y, Izumi M, Oshima Y, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K, Kawase I. Loss of Stat3-dependent pathway in cardiac cell is a critical event in the onset of myocardial fibrosis. American Heart Association Scientific Sessions 2002, Chicago USA, Nov 19 2002
 3. Nakaoka Y, Nishida K, Oshima Y, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K, Kawase I, Hirano T, Hirota H. Targeted disruption of Gab1 gene leads to developmental abnormalities in heart. American Heart Association Scientific Sessions 2002 Chicago USA, Nov 19 2002
 4. Nakaoka Y, Nishida K, Yamauchi-Takahara K, Kawase I, Hirano T, Hirota H. Targeted disruption of Gab1 gene leads to developmental abnormalities in heart. American Heart Association Scientific Sessions 2002 Chicago USA, Nov 19 2002
 5. Oshima Y, Fujio Y, Sugiyama S, Izumi M, Nakaoka Y, Osugi T, Hirota H, Yamauchi-

Takahara K, Kishimoto T, Kawase I. Cardiac-Specific Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Prevents Myocardial Damage Induced by Ischemia / Reperfusion. American Heart Association Scientific Sessions 2002 Chicago USA, Nov 19 2002

6. Kunisada K, Yamauchi-Takahara K, Tone E, Fujio Y, Oshima Y, Nakaoka Y, Hirota H. Overexpression of Bcl-xL Inhibits Doxorubicin-Induced Cell Death but Fails to Control Cardiac-Specific Gene Downregulation in Cardiac Myocytes. American Heart Association Scientific Sessions 2002 Chicago USA, Nov 19 2002

7. 廣田久雄 “Loss of Gp130-Stat3-Dependent Pathway in Cardiac Cell is a Critical Event in the Onset of Heart Failure and Myocardial Fibrosis” 第 66 回日本循環器学会学術集会シンポジウム- Molecular Mechanisms for the Development of Heart Failure- 北海道 平成14年4月26日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

Method of Preparing Heart Muscle Cells and Method of Searching for Remedy for Heart Diseases. Date of Filing 27.06.01 European Patent Office

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

研究要旨

心不全の原因として心筋細胞内 Ca²⁺ の調節異常が知られている。Na⁺/Ca²⁺交換体 (NCX) は Na⁺と Ca²⁺の交換輸送に関与し、心筋細胞内の Ca²⁺ 調節に重要な役割を果たしている。本研究では NCX ヘテロノックアウトマウスを用いて心臓における NCX の役割を解析した。その結果、圧負荷や虚血・再灌流などの病態下では NCX が心筋障害を促進させる可能性が示唆された。NCX の減少による細胞内や小胞体内の Ca²⁺ 濃度の増加が機序の一つとして考えられた。したがって NCX の作用を抑制させることは、圧負荷や虚血・再灌流などにより発症・進行した心不全に対する新たな治療戦略となりうると考えられる。

A. 研究目的

心不全の原因として心筋細胞内 Ca²⁺ の調節異常がある。Na⁺/Ca²⁺交換体 (NCX) は Na⁺と Ca²⁺の交換輸送に関与し、心筋細胞内の Ca²⁺ 調節に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし NCX に対する特異的な阻害薬や刺激薬が存在しないことから、心筋細胞における役割についてはまだ十分に解明されていない。そこで今回、NCX ヘテロノックアウトマウスを用いて心臓における NCX の役割を調べた。

B. 研究方法

(1) 野生型 (WT) マウスと NCX ヘテロノックアウト (KO) マウスの胸部大動脈を縮窄し、圧負荷に対する心臓の影響を手術 3 週間後に評価した。心内圧は心臓カテーテル検査により、心機能は心エコー検査により解析した。心臓の線維化の程度は Azan 染色により評価した。SERCA2、L 型 Ca²⁺チャネル、ライアノジン受容体の mRNA の発現量を Northern blot により調べた。

(2) WT マウスとこの KO マウスより摘出した心臓をランゲンドルフ心にて 30 分間虚血後、120 分間再灌流し心機能を評価した。また再灌流後、心臓の切片をトリフェニルテトラゾリウム (TTC) で染色して梗塞巣の大きさを評価した。Western blot により Ca²⁺ 調節に関与する蛋白の発現量を調べた。両マウスから単離した心室筋細胞を用いて小胞体内

Ca²⁺ 濃度を測定した。

(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) 圧負荷後の心機能における NCX の作用

WT マウスと KO マウスの間でシャムオペ後の収縮期 (LVP) と拡張末期 (EDP) の左室内圧、左室収縮能 (dP/dt)、左室拡張能 (-dP/dt) に差はみられなかった。また心エコーにおいても WT マウスと KO マウスの間でシャムオペ後の心室中隔厚 (IVST)、後壁厚 (PWT)、左室拡張末期径 (LVDd)、左室収縮末期径 (LVDs) に差はみられなかった。心エコーで測定した心機能も両マウス間で差はなかった。しかし圧負荷後 3 週間の時点では両マウスとも peak LVD と EDP の上昇を認め、特に KO マウスでその変化は著明であった。dP/dt は WT では変化がなかったが、KO マウスでは上昇がみられた。これらの結果から、KO マウスの方が圧負荷に対する反応が強くなり、圧負荷後の収縮能も増加することが明らかになった。-dP/dt は KO マウスで著明に上昇したが、LVP の dip and plateau パターンがみられることから、拘束型の拡張障害を生じている可能性が示唆された。心エコーでは圧負荷後の左室駆出率 (EF) は WT マ

ウスで低下したが、KO マウスでは低下はみられなかった。圧負荷後の左室壁厚の増大は WT マウスと比べ KO マウスで著明であった。ドップラーによる左室流入血流パターンは KO マウスで拘束型拡張障害を示した。

シャムオペ後に比べ、圧負荷後では両マウスともに心重量/体重比が増加したが、その変化は KO マウスでより著明であった。WT マウス、KO マウスともにシャムオペ後の心臓に線維化はみられなかったが、圧負荷 3 週間後では KO マウスの心臓で線維化が認められた。

WT マウスと KO マウスの間でシャムオペ後の心臓における SERCA2、L 型 Ca^{2+} チャネル、リアノジン受容体 2 の mRNA の発現レベルに差はみられなかった。しかし、圧負荷後の SERCA2 の mRNA の発現は WT マウスで減少したが、KO マウスでは変化はみられなかった。圧負荷後の L 型 Ca^{2+} チャネルの mRNA の発現は両マウスで同程度に減少した。圧負荷後のリアノジン受容体 2 の mRNA の発現は両マウスともに変化はみられなかった。

(2) 虚血・再灌流障害における NCX の作用

WT マウスと KO マウスで虚血前の心機能（心拍数、左室内圧）に有意差はなかった。虚血・再灌流後の心収縮は WT マウスの心臓に比べ KO マウスでより早く開始した。また心収縮機能は WT マウスに比べ KO マウスでより著明に回復した。虚血・再灌流後、TTC 染色により解析した心筋梗塞範囲は WT マウスに比べ KO マウスで有意に縮小していた。

KO マウスの心臓で虚血・再灌流障害が軽減する機序を調べるために、心臓での SERCA2 と L 型 Ca^{2+} チャネルの蛋白量を調べたが、両マウス間で発現量に差はなかった。またパッチクランプ法で調べた L 型 Ca^{2+} チャネルの current density も両マウス間で差はなかった。単離した心筋細胞を用いて Ca^{2+} transient を解析したところ、KO マウスにおいて caffeine による Ca^{2+} transient の amplitude の増大と decline phase の遅延が認められた。これらの結果から、KO マウスの心筋細胞では小胞体内 Ca^{2+} 濃度が増加している可能性が示唆された。

D. 考察

圧負荷や虚血・再灌流時において NCX は心機能障害の一因となっている可能性が示唆された。したがって、このような病態では NCX を抑制させることが心保護につながる可能性がある。

E. 結論

NCX ヘテロノックアウトマウスを用いることにより、心臓における NCX の役割が解明された。圧負荷や虚血・再灌流などの病態下では NCX が心筋障害を促進させる可能性が示唆された。NCX の減少により細胞内や小胞体内の Ca^{2+} 濃度が増加することが、機序の一つとして考えられた。したがって NCX の作用を抑制させることは、ある病態下で発症・進行した心不全に対する新たな治療戦略となりうると思われる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takano H, Zou Y, Akazawa H, Toko H, Mizukami M, Hasegawa H, Asakawa M, Nagai T, Komuro I. Inhibitory molecules in signal transduction pathways of cardiac hypertrophy. *Hypertension Research*. 2002, 25, 491-498.
- (2) Toko H, Zhu W, Takimoto E, Shiojima I, Hiroi Y, Zou Y, Oka T, Akazawa H, Mizukami M, Sakamoto M, Terasaki F, Kitaura Y, Takano H, Nagai T, Nagai R, Komuro I. Csx/Nkx2-5 is required for homeostasis and survival of cardiac myocytes in the adult heart. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277, 24735-24743.
- (3) Aikawa R, Nitta-Komatsubara Y, Kudoh S, Takano H, Nagai T, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Reactive oxygen species induce cardiomyocyte apoptosis partly through TNF- α . *Cytokine*. 2002, 18, 179-183.
- (4) Ikeda Y, Hiroi Y, Hosoda T, Utsunomiya T, Matsuo S, Ito T, Inoue J, Sumiyoshi T, Takano H, Nagai R, Komuro I. Novel point mutation in the cardiac transcription

factor *CSX/NKX2.5* associated with congenital heart disease. *Circulation Journal*. 2002, 66, 561-563.

(5) Takano H, Komuro I. Roles of peroxisome proliferator-activated receptor γ in cardiovascular disease. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2002, 16, 108-114.

(6) Asakawa M, Takano H, Nagai T, Uozumi H, Hasegawa H, Kubota N, Saito T, Masuda Y, Kadowaki T, Komuro I. PPAR γ plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Circulation*. 2002, 105, 1240-1246.

(7) Takimoto E, Yao A, Toko H, Takano H, Shimoyama M, Sonoda M, Wakaimoto K, Takahashi T, Akazawa H, Mizukami M, Nagai T, Nagai R, Komuro I. Sodium calcium exchanger plays a key role in alteration of cardiac function in response to pressure overload. *FASEB Journal*. 2002, 16, 373-378.

(8) Aikawa R, Nagai T, Kudoh S, Zou Y, Tanaka M, Tamura M, Akazawa H, Takano H, Nagai R, Komuro I. Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. *Hypertension*. 2002, 39, 233-238.

(9) Zou Y, Yamazaki T, Nakagawa K, Yamada H, Iriguchi N, Toko H, Takano H, Akazawa H, Nagai R, Komuro I. Continuous blockade of L-type Ca²⁺ channels suppresses activation of calcineurin and development of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research* 2002, 25, 117-124.

Hypertension Research 2002, 25, 117-124.

(10) Zou Y, Takano H, Akazawa H, Nagai T, Mizukami M, Komuro I. Molecular and cellular mechanisms of mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Endocrine Journal*. 2002, 49, 1-13.

2. 学会発表

(1) Nagai T, Takano H, et al. A crucial role of fibronectin in integrin and focal adhesion kinase mediated signaling in neonatal rat cardiomyocytes. 第66回日本循環器学会、平成14年4月、札幌。

(2) Zou Y, Takano H, et al. Overexpression of Heart

Shock Transcription Factor 1 in the heart protects cardiomyocytes from injury after ischemia/reperfusion. 第66回日本循環器学会、平成14年4月、札幌。

(3) Hasegawa H, Takano H, et al. Cervastatin inhibited the progression of cardiac hypertrophy and reduced the mortality of the hypertensive heart failure rat model. 第66回日本循環器学会、平成14年4月、札幌。

(4) Hasegawa H, Takano H, et al. Long-term antioxidant administration attenuated the progression of cardiac hypertrophy and reduced the mortality of hypertensive heart failure rat model. 第66回日本循環器学会、平成14年4月、札幌。

(5) Toko H, Takano H, et al. Junctophilin-2 plays an important role in isoproterenol-induced cardiomyocytes. 第66回日本循環器学会、平成14年4月、札幌。

(6) Toko H, Takano H, et al. Altered pattern of gene expression in heart failure. 第66回日本循環器学会、平成14年4月、札幌。

(7) Sakamoto M, Takano H, et al. Cardioprotective genes are elevated in physiological hypertrophy. 第66回日本循環器学会、平成14年4月、札幌。

(8) Sakamoto M, Takano H, et al. Different gene expressions in volume of overload and pressure overload hypertrophy. 第66回日本循環器学会、平成14年4月、札幌。

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし