

200711004A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

血管病モデルマウスと血管新生可視化マウスの資源化

平成 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 望月 直樹

平成 20 (2008) 年 4 月

I. 総括研究報告

血管病モデルマウスと血管新生可視化マウスの資源化 -----1

望月 直樹

II. 分担研究報告

1. FoxO 血管発現マウスと血管可視化マウスの作成 -----5

望月 直樹

2. ADAM ファミリー欠損マウスによる ADAM の機能解析に

関する研究 -----7

宮田 敏行

3. 遺伝子改変動物の作製と生物資源化 -----9

松田 潤一郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----11

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----13

血管病モデルマウスと血管新生可視化マウスの資源化

主任研究者 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 血管老化を調節すると予想する転写因子FoxOの血管内皮細胞特異的発現マウスを作製した。正常に生まれることまでを確認した。次年度以降に、老化現象の早期出現を調べる。

分担研究者

宮田 敏行 国立循環器病センター研究所
病因部 部長
松田潤一郎 医薬基盤研究所

A. 研究目的

国民病といっても過言ではない動脈硬化症、糖尿病、虚血性心疾患の臓器障害は、血管の生理的機能の破綻と考えられる。したがって、これらの血管病ともいえる状態の血管障害病態モデルを動物で作製し、新規薬剤の個体での薬効評価系として資することは今後の治療開発戦略として非常に重要である。特に血管可視化マウスでは、癌では血管新生の抑制効果の判定に、虚血性病変では血管新生促進効果を示す薬剤の判定に用いることも可能になる。本研究では、遺伝子改変マウスを作製し、これを資源化することを目指す。

B. 研究方法

血管内皮細胞特異的FoxO1発現マウスの作製Rosa26に FoxO1 3A 変異(Aktによってリン酸化されるSer, Thrを Alaに置換してAkt活性化による核外移行を阻害された変異体)をもつcDNAを挿入し、Cre-loxPによりCreが機能したときのみ、ROSA26によりFoxO1-3Aが発現するマウスを先ず作成した。

このマウスと血管内皮細胞特異的にCre recombinaseを発現するTie2-Creマウスを交配させて、血管内皮細胞特異的にROSA26によってFoxO1-3Aを発現するマウスを得た。

マウスのgenotypingはhuman FoxO1 specificなprimerを用いることでmouse FoxOと区別し、しかもintronをはさむprimerを設計してgenomic DNAとの違いも判定できるようにした。

Ndrp1, Adamts13遺伝子の欠失マウス

マウスES細胞から、Ndrp1遺伝子およびAdamts13遺伝子の欠失マウスを作製する。Ndrp1遺伝子はプロモータ領域とエクソン1領域をloxP配列で挟みこんでコンディショナルノックアウトのコンストラクトを作製し、これを用

いて遺伝子欠失マウスを作製した。

組織学的検討

FoxOにはFLAGタグが付加してあるので、血管内皮細胞で特異的にFLAGが発現していることを免疫染色で確認した。また、様々な臓器から蛋白質を抽出して、anti-FLAG抗体でWestern blotを行いFoxO1-3A-FLAGの発現を確かめた。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立循環器病センターの動物実験委員会の承認を得た後に動物取り扱い規定を遵守して行った。また、動物愛護に配慮して、特に、実験中に動物に苦痛を与えないよう十分な麻酔薬を使用した。

実験動物研究資源バンクの運営と拡充

医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクは、創薬・疾患研究への貢献を目的に、2006年11月より正式に事業を開始した。内容は、①マウス系統の有償分譲、②凍結胚・凍結精子の保護預かりサービス、③保護預かりのためのサポートサービス、④有用マウス資源の収集、⑤関連資源情報の発信である。今年度はこのバンクシステムを運用・拡充し、血管病モデルマウスなどの有用な疾患モデル動物資源収集に対応し、分譲可能な資源数の拡大と、ホームページの拡充、また海外への分譲への対応を行い、利用者への利便性を高めた。

(倫理面への配慮)

動物実験については、主任研究者、分担研究者が所属する国立循環器病センター、並びに医薬基盤研究所のそれぞれの動物実験委員会の承認を得た上で、各施設の実験指針に従って適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

血管病モデル動物の作製

ROSA26 FoxO1-3Aマウスは、これまでにalphaMyosin heavy chain promoter-Creマウスと交配させて、心臓でのFoxO3Aの発現をanti-FLAG抗体で確認していた。

血管内皮細胞特異的にCreを発現するマウスはGFP reporterマウスとの交配で血管特異的なGFPの発現を観察できたのでTie2-Creもマウスも機能的であることがわかっていた。このマウスを交配させた。

ヘテロマウスの交配を行いメンデルの法則にしたがって、トランスジーンを持つマウスが生まれてきたことから、発生段階でのFoxO-3Aの発現は血管形成には異常を起こさないことがわかった。血管の形態学的検討でも大血管の走行や起始異常などは観察されず、肺血管も走行以上を認めなかった。また脳血管の分枝も正常であり、FoxO1の過剰発現による効果は発生に大きな影響がないことがわかった。

肺組織から蛋白質を抽出してWestern blotでFLAGタグつきFoxOの発現を調べたが、anti-FLAGで十分な差のある発現を確認できなかった。したがって、genotyping上ではROSA26-FoxO1-3A, Creの両者を持つマウスでもFoxO1-3Aが十分発現していない可能性も否定できなかった。また、これまでの検討ではFoxO1-3Aは核内に検出されるべきであるが、anti-FLAGでの組織学的検索でもFoxO1-3A/CreマウスとROSA26-FoxO1-3Aマウスで差を認めなかった。

*NdrG1*ノックアウトマウスは、*NdrG1*遺伝子のプロモータ領域とエクソン1領域を欠失して作製した。本遺伝子欠損マウスは、生後3ヶ月頃から後肢に運動機能障害を示した。病理組織学的解析の結果、坐骨神経に脱ミエリン化を伴う神経変性が観察された。NDRG1タンパク質はシュワン細胞に高発現し、ミエリン鞘には存在しない。したがって、本ノックアウトマウスに観察された末梢神経変性は、ミエリン鞘の構造維持に必須のNDRG1の消失が原因と考えられた。NDRG1欠損のヒト疾患は、遺伝性末梢神経変性疾患のCharcot-Marie-Tooth病4D型として知られており、ヒトでの表現型とマウスでの表現型が酷似することから、本遺伝子欠損マウスは、ヒト疾患のモデルマウスになると考えられた。

*Adamts13*ノックアウトマウスは、ADAMTS13のプロテアーゼドメインをコードするエクソン3-6を欠失させて作製した。ヒトでは先天性ADAMTS13遺伝子欠損症は、生後まもなく血小板減少と溶血性貧血を主症状とした血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)を示すが、予想に反して、本マウス(129系統を遺伝的バックグラウンド)はTTPを示さなかった。米国で作製されたC57BL/6系統の*Adamts13*遺伝子欠損マウスもTTPを示さないことから、TTP発症には何らかの因子を更に必要としているようである。しかし、本遺伝子欠損マウスは、ADAMTS13活性を消失しているため、その基質であるフォンビルブランド因子マルチマーの重合度が高く、その結果として平行板型フローチャンバーを用いたコラーゲン上での血小板血栓能が亢進しており、コラーゲンによる血小板数の大きな減少が観察された。

血管病モデル動物等の収集と資源化

①ADAMTS13ノックアウトマウスについては、寄託マウス(雄5匹、雌10匹)を交配させ、採卵用のマウスコロニーを作製し、雄との自然交配により21匹の雌マウスから合計267個の2細胞期胚を得て、凍結保存した。

②NDRG1ノックアウトマウスについては、ノックアウト雄から精子を得、C57BL/6Cr雌の卵子を用いて体外受精にて259個の2細胞期胚を得、凍結保存した。一部の凍結胚を融解、移植し、産仔を得ることが出来、PCRにてノックアウトヘテロマウスであることを確認した。

③NDRG1floxマウスについては、寄託を受けた凍結胚を融解・胚移植し、4匹の産仔を得た。PCR判定によりホモ、ヘテロマウスを確認した。今後、雄マウスが成熟した時点で体外受精により2細胞期胚を作製し凍結保存を行う。

実験動物研究資源バンクの運営と拡充

今年度は上記の資源化の進んだADAMTS13ノックアウトマウス、NDRG1ノックアウトマウスを含む25系統について、ホームページ上に新たに分譲可能な系統として、病態との関連情報とともに公開した。これにより公開資源数が47系統となり、昨年度に比べ倍増した。また今年度は、疾患モデルを中心に25件の分譲を行った。NDRG1ノックアウトマウスなどについて海外からの分譲依頼を受けており、英語版の分譲依頼書を作成し、対応した。

実験動物バンクのホームページについては検索エンジン対策(SEO)を考慮し静的ページを基本とし主要な保有系統は検索サイトでトップ表示されるよう配慮した。疾患モデル動物データベースについては、データは可搬性・柔軟性を考慮しXML形式で記載し、eXistを用いたXMLデータベースの構築を開始した。これによって、利用しやすいバンクシステムとなることが期待される。

D. 考察

FoxO1は血管発生の抑制は起こさないことがわかった。FoxO1ノックアウトマウスは報告で血管形成が阻害されることにより、胎生致死であり、我々はFoxO1の発現バランスが重要と考えてFoxO1-3AによってFoxO1によって転写制御される分子のアンバランスで血管形成に障害がおきることも予想していた。しかし、FoxO1の血管内皮細胞特異的発現マウスは正常に生まれた。

Genotypingでは、FoxO1-3AもCre遺伝子も発現するマウスをえているので、CreによりFoxO1の発現が内皮細胞で誘導されていることは予想できたが、過剰なFoxOの発現を蛋白質としては今年度検出できなかった。これは、発現量が感度以下である可能性もあり今後の検討課題である。

FoxO1はstress responseで核内で機能する。したがって恒常的に核内で発現をさせたときに、加齢とともに様々な細胞外刺激で核外移行ができなくなっていることにより生じる病態があると考えられる。したがって、今後加齢、動脈硬化症モデルとの交配によりさらに血管での機能について検討が必要である。

遺伝性末梢神経変性疾患 Charcot-Marie-Tooth病 4D型の疾患モデルマウスとして、*NdrG1*ノックアウトマウスを医薬基盤研究所に寄託した。また、先天性ADAMTS13遺伝子欠損症の疾患モデルマウスとして、*Adamts13*ノックアウトマウスを医薬基盤研究所に寄託した。これらの資源化されたマウスは医薬基盤研究所を通して、希望する研究者に分譲され、創薬・疾患研究に貢献することが期待される。

実験動物バンクシステムについては、研究者に高品質のモデル動物を迅速に、安定供給するとともに、利用しやすいシステムが必要である。今年度は、血管病研究者を始め多くの利用者のさまざまな要望に答えられるバンクを目指し、分譲可能資源数を昨年度に比べ倍増させ、疾患モデル動物データベースの構築を開始し、海外分譲に対応するなど、実験動物バンク体制の整備・拡充を進めた。

E. 結論

血管病の研究、治療法開発に資するため、血管病モデル動物の生物資源化、血管病研究者への安定供給の確立を目指し、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクとして次のことを行った。(1) 国立循環器病センター研究所より血栓性血小板減少性紫斑病モデル動物 (ADAMTS13ノックアウトマウス、NDRG1ノックアウトマウスなど3系統の) 血管病モデルマウス等を収集し、凍結胚作製による資源化を開始した。(2) 血管病研究者を始め多くの利用者の要望に答えられるバンクを目指し、公開資源数の倍増、疾患モデル動物データベースの構築開始や海外分譲への対応など、実験動物バンク体制の整備・拡充を進めた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(研究業績「英文」)

【原著】

(1) Nakaoka Y, Nishida K, Narimatsu K, Kamiya A, Minami T, Sawa H, Okawa K, Fujio Y, Koyama T,¹ Maeda M, Sone M, Yamasaki S, Arai Y, Koh GY, Kodama T, Hirota H, Otsu K, Hirano T, Mochizuki N.

Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function through transmitting neuregulin-1 /ErbB signaling. **J Clin. Invest** 117:1771-1181, 2007

(2) Takaya A, Kamio T, Masuda M, Mochizuki N, Sawa H, Sato M, Nagashima K, Mizutani A, Matsuno A, Kiyokawa E, Matsuda M. R-Ras regulates exocytosis by Rgl2/Rlf-mediated activation of RalA on endosomes. **Mol Biol Cell.** 18:1850-60,2007

(3) Seguchi O, Takashima S, Yamazaki S, Asakura M, Asano Y, Shintani Y, Wakeno M, Minamino T, Kondo H, Furukawa H, Nakamaru K, Naito A, Takahashi T, Ohtsuka T, Kawakami K, Isomura T, Kitamura S, Tomoike H, Mochizuki N, Kitakaze M. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. **J Clin. Invest** 117; 2812-2824, 2007

(4) T. Miyata, K. Kokame, F. Banno, Y. Shin, and M. Akiyama: ADAMTS13 assays and ADAMTS13-deficient mice. **Curr Opin Hematol**, 14(3): 277-283, 2007

(5) Y. Taketomi, K. Sunaga, S. Tanaka, M. Nakamura, S. Arata, T. Okuda, TC. Moon, HW. Chang, Y. Sugimoto, K. Kokame, T. Miyata, M. Murakami, and I. Kudo: Impaired mast cell maturation and degranulation and attenuated allergic responses in *NdrG1*-deficient mice. **J Immunol**, 178(11): 7042-7053, 2007

(6) Okuda T, Kokame K, Miyata T: Differential expression patterns of NDRG family proteins in the central nervous system. **J Histochem Cytochem**, 56(2):175-82, 2008

(7) Takamura A, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba, E. Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine GM1-gangliosidosis. **Biochem Biophys Res Commun**, 367(3):616-22, 2008.

(8) Fukuda Y, Ishida R, Aoki K, Nakahara K, Takashi T, Mochida K, Suzuki O, Matsuda J, Kasai M. Contribution of Translin to hematopoietic regeneration after sublethal ionizing irradiation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 31(2):207-11, 2008.

(9) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Watanabe H, Iwasaki H, Matsuda J, Noguchi Y, Takimoto K, Itoh M, Tabe M, Iida M, Kubo T, Ogawa S, Nanba E, Higaki K, Ohno K, Brady R O. Chemical chaperone therapy: Clinical effect in murine GM1-gangliosidosis. **Annals of Neurology**, 2007; 62(6):671-675.

(10) Ichinomiya S, Watanabe H, Maruyama K, Toda H,

Iwasaki H, Kurosawa M, Matsuda J, Suzuki Y: Motor and Reflex Testing in GM1-Gangliosidosis Model Mice. *Brain Dev*, May 2007;29(4):210-216.

学会発表

(1) 望月直樹、中岡良和: 心筋-内皮細胞間の相互作用による心機能維持機構 第85回日本生理学会大会 平成20年 東京

(2) 石川昌利, 植村正人, 松山友美, 松本雅則, 石指宏通, 加藤誠司, 坂野史明, 小亀浩市, 辻本達寛, 北澤利幸, 森岡千恵, 藤本正男, 宮田敏行, 藤村吉博, 福井博: マウス急性肝不全モデルにおけるADAMTS13活性の動態. 第43回日本肝臓学会総会、平成19年、東京都

(3) 武富芳隆、須永剛平、田中智之、中村雅典、荒田悟、奥田知彦、杉本幸彦、小亀浩市、宮田敏行、村上誠、工藤一郎、「マスト細胞の成熟に伴って発現誘導されるNDRG1の解析」、第8回Pharmacology-Hematologyシンポジウム(主催: 日本薬学会生物系薬学部会) 平成19年6月8日、金沢市、薬学雑誌、第127巻、Suppl. 1. 31頁 (2007)

(4) 篠崎昇平、羽鳥薫、小亀浩市、川上明夫、金子英司、宮田敏行、下門顕太郎、シンポジウム10、メタボリックシンドロームの血管合併症の分子機構、「小胞体ストレスと動脈硬化: 小胞体ストレス蛋白Herp欠損は動脈硬化進展を抑制する」、第39回日本動脈硬化学会総会学術集会、平成19年7月14日、大阪市

(5) F. Banno, K. Kokame, T. Okuda, S. Honda, S. Miyata, H. Kato, Y. Tomiyama, T. Miyata, Effects of complete deficiency and C-terminal deletion of ADAMTS13 on hemostatic function in mice, **International Mammalian Genome Conference 2007**, October 28-November 1, 2007, Kyoto

(6) 坂野史明、小亀浩市、楊進、宮田茂樹、宮田敏行、「ADAMTS13のC末端ドメイン欠失はマウスに潜在的な血栓性リスクをもたらす」、**BMB2007第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会**、平成19年12月11日～15日、横浜市

(7) 奥田智彦、辻井知美、山田佐知子、宮田敏行、北徹、柳田素子、「ストレス誘導遺伝子NDRG1は腎臓および水晶体において組織保護機能を有する」、**BMB2007第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会**、平成19年12月11日～15日、横浜市

(8) Takamura A, Higaki K, Iida M, Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J. Dysregulation of Trk receptor signaling in β -galactosidase-deficient mouse brain. 第30回日本神経科学学会大会 (2007年9月)

(9) 野口洋子、國枝孝典、山田-内尾こずえ、高野薫、小浦美奈子、鈴木治、塩塚力、石井達、松田潤一郎、

「Gb3合成酵素遺伝子導入によるファブリー病モデルマウス作出の試み」第24回日本疾患モデル学会総会 (2007年8月)

(10) 松田潤一郎、「遺伝子改変マウスを用いたライソゾーム病の新規治療法開発」臨床分科会シンポジウム、第143回日本獣医学会 (2007年4月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

FoxO血管発現マウスと血管可視化マウスの作成

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 血管老化を調節すると予想する転写因子FoxOの血管内皮細胞特異的発現マウスを作製した。正常に生まれることまでを確認した。次年度以降に、老化現象の早期出現を調べる。

A. 研究目的

国民病といっても過言ではない動脈硬化症、糖尿病、虚血性心疾患の臓器障害は、血管の生理的機能の破綻と考えられる。したがって、これらの血管病ともいえる状態の血管障害病態モデルを動物で作製し、新規薬剤の個体での薬効評価系として資することは今後の治療開発戦略として非常に重要である。特に血管可視化マウスでは、癌では血管新生の抑制効果の判定に、虚血性病変では血管新生促進効果を示す薬剤の判定に用いることも可能になる。本研究では、血管老化を制御する転写因子FoxOを血管で特異的に発現するマウスを作製して、血管病のモデルとなりうるかを判定し、もし血管老化促進モデルとなるようならば、資源化する。

B. 研究方法

血管内皮細胞特異的FoxO1発現マウスの作製 Rosa26に FoxO1 3A 変異 (Aktによって磷酸化されるSer, Thrを Alaに置換してAkt活性化による核外移行を阻害された変異体)をもつcDNAを挿入し、Cre-loxPによりCreが機能したときのみ、ROSA26によりFoxO1-3Aが発現するマウスを先ず作成した。

このマウスと血管内皮細胞特異的にCre recombinaseを発現するTie2-Creマウスを交配させて、血管内皮細胞特異的にROSA26によってFoxO1-3Aを発現するマウスを得た。

マウスのgenotypingはhuman FoxO1 specificなprimerを用いることでmouse FoxOと区別し、しかもintronをはさむprimerを設計してgenomic DNAとの違いも判定できるようにした。

組織学的検討

FoxOにはFLAGタグが付加してあるので、血管内皮細胞で特異的にFLAGが発現していることを免疫染色で確認した。また、様々な臓器から蛋白質を抽出して、anti-FLAG抗体でWestern blotを行いFoxO1-3A-FLAGの発現を確かめた。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立循環器病センターの動物実験委員会の承認を得た後に動物取り扱い規定を遵守して行った。また、動物愛護に配慮して、特に、実験中に動物に苦痛を与えないよう十分な麻酔薬を使用した。

C. 研究結果

ROSA26 FoxO1-3A マウスは、これまでにalphaMyosin heavy chain promoter-Creマウスと交配させて、心臓でのFoxO3Aの発現をanti-FLAG抗体で確認していた。

血管内皮細胞特異的にCreを発現するマウスはGFP reporterマウスとの交配で血管特異的なGFPの発現を観察できたのでTie2-Creもマウスも機能的であることがわかっていた。このマウスを交配させた。

ヘテロマウスの交配を行いメンデルの法則にしたがって、トランスジーンを持つマウスが生まれてきたことから、発生段階でのFoxO-3Aの発現は血管形成には異常を起こさないことがわかった。血管の形態学的検討でも大血管の走行や起始異常などは観察されず、肺血管も走行以上を認めなかった。また脳血管の分枝も正常であり、FoxO1の過剰発現による効果は発生に大きな影響がないことがわかった。

肺組織から蛋白質を抽出してWestern blotでFLAGタグつきFoxOの発現を調べたが、anti-FLAGで十分な差のある発現を確認できなかった。したがって、genotyping上ではROSA26-FoxO1-3A, Creの両者を持つマウスでもFoxO1-3Aが十分発現していない可能性も否定できなかった。また、これまでの検討ではFoxO1-3Aは核内に検出されるべきであるが、anti-FLAGでの組織学的検索でもFoxO1-3A/CreマウスとROSA26-FoxO1-3Aマウスで差を認めなかった。

D. 考察

FoxO1は血管発生の抑制は起こさないことがわかった。FoxO1ノックアウトマウスは報告で血管形成

が阻害されることにより、胎生致死であり、我々はFoxO1の発現バランスが重要と考えてFoxO1-3AによってFoxO1によって転写制御される分子のアンバランスで血管形成に障害がおきることも予想していた。しかし、FoxO1の血管内皮細胞特異的発現マウスは正常に生まれた。

Genotypingでは、FoxO1-3Aも Cre遺伝子も発現するマウスをえているので、CreによりFoxO1の発現が内皮細胞で誘導されていることは予想できたが、過剰なFoxOの発現を蛋白質としては今年度検出できなかった。これは、発現量が感度以下である可能性もあり今後の検討課題である。

FoxO1はstress responseで核内で機能する。したがって恒常的に核内で発現をさせたときに、加齢とともに様々な細胞外刺激で核外移行ができなくなっていることにより生じる病態があると考えられる。したがって、今後加齢、動脈硬化症モデルとの交配によりさらに血管での機能について検討が必要である。

E. 結論

FoxO1を血管内皮細胞特異的に発現するマウスを作製した。発生における血管形成にFoxO1依存性転写亢進は影響しないことがわかった。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 (研究業績「英文」)

【原著】

(1) Nakaoka Y, Nishida K, Narimatsu K, Kamiya A, Minami T, Sawa H, Okawa K, Fujio Y, Koyama T,¹ Maeda M, Sone M, Yamasaki S, Arai Y, Koh GY, Kodama T, Hirota H, Otsu K, Hirano T, Mochizuki N. Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function through transmitting neuregulin-1 /ErbB signaling. **J Clin. Invest** 117:1771-1181, 2007

(2) Takaya A, Kamio T, Masuda M, Mochizuki N, Sawa H, Sato M, Nagashima K, Mizutani A, Matsuno A, Kiyokawa E, Matsuda M. R-Ras regulates exocytosis by Rgl2/Rlf-mediated activation of RalA on endosomes. **Mol Biol Cell.** 18:1850-60,2007

(3) Seguchi O, Takashima S, Yamazaki S, Asakura M, Asano Y, Shintani Y, Wakeno M, Minamino T, Kondo H, Furukawa H, Nakamaru K, Naito A, Takahashi T, Ohtsuka T, Kawakami K, Isomura T, Kitamura S, Tomoike H, Mochizuki N, Kitakaze

M. A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. **J Clin. Invest** 117; 2812-2824, 2007

学会発表

(1) 望月直樹、中岡良和:心筋-内皮細胞間の相互作用による心機能維持機構 第85回日本生理学会大会 平成20年 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

ADAM ファミリー欠損マウスによるADAMの機能解析に関する研究

分担研究者 宮田敏行 国立循環器病センター研究所 病因部 部長
研究協力者 小亀浩市 国立循環器病センター研究所 脈管生理部 室長
研究協力者 坂野史明 国立循環器病センター研究所 脈管生理部 室員

研究要旨 疾患モデルマウスとして、C57BL/6CrSlc-TgH(*Ndr1*)114NCVC (*Ndr1*ノックアウトマウス)、C57BL/6CrSlc-TgH(*Ndr1*)Flox114NCVC (*Ndr1*コンディショナルノックアウトマウス)、129+Ter/SvJcl-TgH (*Adams13*) NCVC (*Adams13*ノックアウトマウス)、を独立行政法人医薬基盤研究所 実験動物開発研究室に寄託した。

A. 研究目的

国民病といっても過言ではない動脈硬化症、糖尿病、虚血性心疾患の臓器障害は、血管の生理的機能の破綻と考えられる。したがって、これらの血管病ともいえる状態の血管障害病態モデルを動物で作製し、新規薬剤の個体での薬効評価系として資することは今後の治療開発戦略として非常に重要である。本研究では、遺伝子改変マウスを作製し、資源作製を目指す。

B. 研究方法

マウスES細胞から、*Ndr1*遺伝子および*Adams13*遺伝子の欠失マウスを作製する。*Ndr1*遺伝子はプロモータ領域とエクソン1領域をloxP配列で挟みこんでコンディショナルノックアウトのコンストラクトを作製し、これを用いて遺伝子欠失マウスを作製した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立循環器病センターの動物実験委員会の承認を得た後に動物取り扱い規定を遵守して行う。また、動物愛護に配慮して行う。特に、実験中に動物に苦痛を与えないよう十分な麻酔薬を使用する。動物の提供システムについては生物の多様性確保に関する法律を遵守して、遺伝子改変動物の取り扱いには厳重に注意する。

C. 研究結果

*Ndr1*ノックアウトマウスは、*Ndr1*遺伝子のプロモータ領域とエクソン1領域を欠失して作製した。本遺伝子欠損マウスは、生後3ヶ月頃から後肢に運動機能障害を示した。病理組織学的解析の結果、坐骨神経に脱ミエリン化を伴う神経変性が観察された。NDRG1タンパク質はシュワン細胞に高発現し、ミエリン鞘には存在しない。したがって、本ノッ

クアウトマウスに観察された末梢神経変性は、ミエリン鞘の構造維持に必須のNDRG1の消失が原因と考えられた。NDRG1欠損のヒト疾患は、遺伝性末梢神経変性疾患のCharcot-Marie-Tooth病4D型として知られており、ヒトでの表現型とマウスでの表現型が酷似することから、本遺伝子欠損マウスは、ヒト疾患のモデルマウスになると考えられた。

*Adams13*ノックアウトマウスは、ADAMTS13のプロテアーゼドメインをコードするエクソン3-6を欠失させて作製した。ヒトでは先天性ADAMTS13遺伝子欠損症は、生後まもなく血小板減少と溶血性貧血を主症状とした血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)を示すが、予想に反して、本マウス(129系統を遺伝的バックグラウンド)はTTPを示さなかった。米国で作製されたC57BL/6系統の*Adams13*遺伝子欠損マウスもTTPを示さないことから、TTP発症には何らかの因子を更に必要としているようである。しかし、本遺伝子欠損マウスは、ADAMTS13活性を消失しているため、その基質であるフォンビルブランド因子マルチマーの重合度が高く、その結果として平行板型フローチャンバーを用いたコラーゲン上での血小板血栓能が亢進しており、コラーゲンによる血小板数の大きな減少が観察された。

D. 考察

遺伝性末梢神経変性疾患 Charcot-Marie-Tooth病4D型の疾患モデルマウスとして、*Ndr1*ノックアウトマウスを医薬基盤研究所に寄託した。また、先天性ADAMTS13遺伝子欠損症の疾患モデルマウスとして、*Adams13*ノックアウトマウスを医薬基盤研究所に寄託した。これらの資源化されたマウスは医薬基盤研究所を通して、希望する研究者に分譲され、創薬・疾患研究に貢献することが期待

される。

E. 結論

疾患モデルマウスとして、
C57BL/6CrSlc-TgH(*Ndr1*)114NCVC(*Ndr1*ノックアウトマウス)、
C57BL/6CrSlc-TgH(*Ndr1*)Flox114NCVC(*Ndr1*コンディショナルノックアウトマウス)、
129+Ter/SvJcl-TgH(*Adamts13*)NCVC(*Adamts13*ノックアウトマウス)、を独立行政法人医薬基盤研究所 実験動物開発研究室に寄託した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(研究業績「英文」)

【原著】

T. Miyata, K. Kokame, F. Banno, Y. Shin, and M. Akiyama: ADAMTS13 assays and ADAMTS13-deficient mice. *Curr Opin Hematol*, 14(3): 277-283, 2007

Y. Taketomi, K. Sunaga, S. Tanaka, M. Nakamura, S. Arata, T. Okuda, T.C. Moon, H.W. Chang, Y. Sugimoto, K. Kokame, T. Miyata, M. Murakami, and I. Kudo: Impaired mast cell maturation and degranulation and attenuated allergic responses in *Ndr1*-deficient mice. *J Immunol*, 178(11): 7042-7053, 2007

Okuda T, Kokame K, Miyata T: Differential expression patterns of NDRG family proteins in the central nervous system. *J Histochem Cytochem*, 56(2):175-82, 2008

学会発表

(1) 石川昌利, 植村正人, 松山友美, 松本雅則, 石指宏通, 加藤誠司, 坂野史明, 小亀浩市, 辻本達寛, 北澤利幸, 森岡千恵, 藤本正男, 宮田敏行, 藤村吉博, 福井博: マウス急性肝不全モデルにおけるADAMTS13活性の動態. 第43回日本肝臓学会総会、平成19年、東京都

(2) 武富芳隆, 須永剛平, 田中智之, 中村雅典, 荒田悟, 奥田知彦, 杉本幸彦, 小亀浩市, 宮田敏行, 村上誠, 工藤一郎, 「マスト細胞の成熟に伴って発現誘導されるNDRG1の解析」、第8回

Pharmacology-Hematologyシンポジウム(主催:日本薬学会生物系薬学部会)平成19年6月8日、金沢市、薬学雑誌、第127巻、Suppl. 1. 31頁 (2007)

(3) 篠崎昇平, 羽鳥薫, 小亀浩市, 川上明夫, 金子英司, 宮田敏行, 下門顕太郎, シンポジウム10、メタボリックシンドロームの血管合併症の分子機構、

「小胞体ストレスと動脈硬化:小胞体ストレス蛋白Herp欠損は動脈硬化進展を抑制する」、第39回日本動脈硬化学会総会学術集会、平成19年7月14日、大阪市

(4) F. Banno, K. Kokame, T. Okuda, S. Honda, S. Miyata, H. Kato, Y. Tomiyama, T. Miyata, Effects of complete deficiency and C-terminal deletion of ADAMTS13 on hemostatic function in mice, **International Mammalian Genome Conference 2007**, October 28-November 1, 2007, Kyoto

(5) 坂野史明, 小亀浩市, 楊進, 宮田敏行, 宮田敏行, 「ADAMTS13のC末端ドメイン欠失はマウスに潜在的な血栓性リスクをもたらす」、**BMB2007第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会**、平成19年12月11日~15日、横浜市

(6) 奥田智彦, 辻井知美, 山田佐知子, 宮田敏行, 北 徹, 柳田素子, 「ストレス誘導遺伝子NDRG1は腎臓および水晶体において組織保護機能を有する」、**BMB2007第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会**、平成19年12月11日~15日、横浜市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

血管病モデルマウスと血管新生可視化マウスの資源化
分担項目：遺伝子改変動物の作製と生物資源化

分担研究者 松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究リーダー

研究要旨

血管病の研究、治療法開発に資するため、血管病モデル動物の生物資源化、血管病研究者への安定供給の確立を目指し、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクとして次のことを行った。（１）国立循環器病センター研究所より血栓性血小板減少性紫斑病モデル動物など 3 系統の血管病モデルマウス等を収集し、凍結胚作製による資源化を開始した。（２）血管病研究者を始め多くの利用者の要望に答えられるバンクを目指し、公開資源数の倍増、疾患モデル動物データベースの構築開始や海外分譲への対応など、実験動物バンク体制の整備・拡充を進めた。

A. 研究目的

疾患研究や創薬を推進するためには、個体レベルの研究が必須であり、さまざまな疾患に対応した疾患モデル動物が作製されるとともに、多くの研究者に利用されることが重要である。医薬基盤研究所では、実験動物研究資源バンクを設立し、疾患モデルマウスを中心に研究資源を収集し、高品質の資源として保存するとともに、疾患関連研究者への提供を開始している。貴重な疾患モデル動物の収集に関しては、とくに厚生労働省傘下の国立研究機関、ナショナルセンターとの連携を深め、社会的・行政的に重要な疾患に関連したモデル動物を中心とした収集を目指している。

本研究では、国立循環器病センター研究所との共同研究により、血管病研究用モデルマウスに注目し、既に同研究所で維持しているモデルマウスや、新たに作製される血管病モデルマウス、血管新生可視化マウスなどを医薬基盤研究所実験動物バンクにおいて生物資源として収集し、保存、品質管理を行い、血管病研究者に迅速に安定的に供給する体制を構築することを目的とする。血管病モデル動物を用いた研究が推進されることで、生活習慣病の臓器障害をもたらす血管障害のメカニズム解明が進み、新規治療薬や予防法の開発に繋がりが、国民の健康、福祉の一層の向上に寄与することが期待される。

B. 研究方法

1) 血管病モデル動物等の収集と資源化

国立循環器病センター研究所より、ADAMTS13 ノックアウトマウス（血栓性血小板減少性紫斑病モデル）、NDRG1 ノックアウトマウス（Charcot-Marie-Tooth 病モデル）、NDRG1floxed マウス（NDRG1 コンディショナルノックアウト）の 3 系統の寄託を受け、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクにて、2 細胞期胚の凍結保存による資源化を行った。①ADAMTS13 ノックアウトマウスについては、成熟雄 5 匹、雌 10 匹の寄託を受けた。バックグラウンド系統が 129+Ter/SvJcl であり、体外受精率の悪い系統であるため、雌に過排卵処置を行い、雄と自然交配させ卵管より 2 細胞期胚を

採取した。②NDRG1 ノックアウトマウスについては成熟雄の寄託を受け、体外受精にて 2 細胞期胚を得た。③NDRG1floxed マウスは凍結胚での寄託を受けたので、凍結胚を融解し、偽妊娠マウスへ移植し産仔を得た。2 細胞期胚の凍結は、EFS40 ガラス化保存液（EFS40; Ethylene glycol40%, 30%w/v Ficoll170, 0.5M Sucrose）を用いた 2 段階法により行い、50 個/クライオチューブを標準として、液体窒素中に保存した。一部の凍結胚は融解後、偽妊娠マウス卵管に移植し、産仔を得、PCR による遺伝子型判定を行った。

2) 実験動物研究資源バンクの運営と拡充

医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクは、創薬・疾患研究への貢献を目的に、2006 年 11 月より正式に事業を開始した。内容は、①マウス系統の有償分譲、②凍結胚・凍結精子の保護預かりサービス、③保護預かりのためのサポートサービス、④有用マウス資源の収集、⑤関連資源情報の発信である。今年度はこのバンクシステムを運用・拡充し、血管病モデルマウスなどの有用な疾患モデル動物資源収集に対応し、分譲可能な資源数の拡大と、ホームページの拡充、また海外への分譲への対応を行い、利用者への利便性を高めた。

（倫理面への配慮）

動物実験については、動物実験委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

1) 血管病モデル動物等の収集と資源化

①ADAMTS13 ノックアウトマウスについては、寄託マウス（雄 5 匹、雌 10 匹）を交配させ、採卵用のマウスコロニーを作製し、雄との自然交配により 21 匹の雌マウスから合計 267 個の 2 細胞期胚を得て、凍結保存した。

②NDRG1 ノックアウトマウスについては、ノックアウト雄から精子を得、C57BL/6Cr 雌の卵子を用い体外受精にて 259 個の 2 細胞期胚を得、凍結保存した。一部の凍結胚を融解、移植し、産仔を得ることが出来、PCR にてノックアウトヘロマウスであることを確認した。

③NDRG1floxed マウスについては、寄託を受けた

凍結胚を融解・胚移植し、4匹の産仔を得た。PCR判定によりホモ、ヘテロマウスを確認した。今後、雄マウスが成熟した時点で体外受精により2細胞期胚を作製し凍結保存を行う。

2) 実験動物研究資源バンクの運営と拡充

今年度は上記の資源化の進んだ ADAMTS13 ノックアウトマウス、NDRG1 ノックアウトマウスを含む25系統について、ホームページ上に新たに分譲可能な系統として、病態との関連情報とともに公開した。これにより公開資源数が47系統となり、昨年度に比べ倍増した。また今年度は、疾患モデルを中心に25件の分譲を行った。NDRG1 ノックアウトマウスなどについて海外からの分譲依頼を受けており、英語版の分譲依頼書を作成し、対応した。

実験動物バンクのホームページについては検索エンジン対策 (SEO) を考慮し静的ページを基本とし主要な保有系統は検索サイトでトップ表示されるよう配慮した。疾患モデル動物データベースについては、データは可搬性・柔軟性を考慮しXML形式で記載し、eXistを用いたXMLデータベースの構築を開始した。これによって、利用しやすいバンクシステムとなることが期待される。

D. 考察

医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクは、疾患研究・創薬研究に特化した、疾患モデルバンクを目指しており、今回、国立循環器病センター研究所から血管病モデル動物等の収集と資源化を進めることが出来た。

今回資源化を行った ADAMTS13 ノックアウトマウスについては体外受精効率が悪く、自然交配に頼る必要があるなど、疾患モデルマウスは系統によっては、資源化の方法は系統ごとの対応が必要である。疾患モデルマウスの安定供給のためには、今後、系統毎に凍結胚の生存性を精査するなどして、保存すべき凍結胚数の検討や、安定した体外受精技術・凍結保存法の改善も必要であろう。

実験動物バンクシステムについては、研究者に高品質のモデル動物を迅速に、安定供給するとともに、利用しやすいシステムが必要である。今年度は、血管病研究者を始め多くの利用者のさまざまな要望に答えられるバンクを目指し、分譲可能資源数を昨年度に比べ倍増させ、疾患モデル動物データベースの構築を開始し、海外分譲に対応するなど、実験動物バンク体制の整備・拡充を進めた。

今後、新たな血管病モデルマウスや血管新生可視化マウスの作製支援を行うとともに、これらの新規モデル動物を実験動物資源バンクで資源化し、研究者への安定供給を行うことで、血管病の研究、治療薬開発などが飛躍的に進展するものと期待される。

E. 結論

血管病の研究、治療法開発に資するため、血管病モデル動物の生物資源化、血管病研究者への安定供給の確立を目指し、医薬基盤研究所実験動物

研究資源バンクとして次のことを行った。(1) 国立循環器病センター研究所より血栓性血小板減少性紫斑病モデル動物など3系統の血管病モデルマウス等を収集し、凍結胚作製による資源化を開始した。(2) 血管病研究者を始め多くの利用者の要望に答えられるバンクを目指し、公開資源数の倍増、疾患モデル動物データベースの構築開始や海外分譲への対応など、実験動物バンク体制の整備・拡充を進めた。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takamura A, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba, E. Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine GM1-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 367(3):616-22, 2008.
- 2) Fukuda Y, Ishida R, Aoki K, Nakahara K, Takashi T, Mochida K, Suzuki O, Matsuda J, Kasai M. Contribution of Translin to hematopoietic regeneration after sublethal ionizing irradiation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31(2):207-11, 2008.
- 3) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Ohkubo M, Watanabe H, Iwasaki H, Matsuda J, Noguchi Y, Takimoto K, Itoh M, Tabe M, Iida M, Kubo T, Ogawa S, Nanba E, Higaki K, Ohno K, Brady R O. Chemical chaperone therapy: Clinical effect in murine GM1-gangliosidosis. *Annals of Neurology*, 2007;62(6):671-675.
- 4) Ichinomiya S, Watanabe H, Maruyama K, Toda H, Iwasaki H, Kurosawa M, Matsuda J, Suzuki Y: Motor and Reflex Testing in GM1-Gangliosidosis Model Mice. *Brain Dev*, May 2007;29(4):210-216.

2. 学会発表

- 1) Takamura A, Higaki K, Iida M, Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J. Dysregulation of Trk receptor signaling in β -galactosidase-deficient mouse brain. 第30回日本神経科学学会大会 (2007年9月)
- 2) 野口洋子、國枝孝典、山田-内尾こずえ、高野薫、小浦美奈子、鈴木治、塩塚力、石井達、松田潤一郎、「Gb3合成酵素遺伝子導入によるファブリー病モデルマウス作出の試み」第24回日本疾患モデル学会総会 (2007年8月)
- 3) 松田潤一郎、「遺伝子改変マウスを用いたライソゾーム病の新規治療法開発」臨床分科会シンポジウム、第143回日本獣医学会 (2007年4月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function via neuregulin-1/ErbB signaling

Yoshikazu Nakaoka,¹ Keigo Nishida,² Masahiro Narimatsu,³ Atsunori Kamiya,⁴ Takashi Minami,⁵ Hirofumi Sawa,⁶ Katsuya Okawa,⁷ Yasushi Fujio,⁸ Tatsuya Koyama,¹ Makiko Maeda,⁸ Manami Sone,¹ Satoru Yamasaki,² Yuji Arai,⁹ Gou Young Koh,¹⁰ Tatsuhiko Kodama,⁵ Hisao Hirota,¹¹ Kinya Otsu,¹¹ Toshio Hirano,^{2,3} and Naoki Mochizuki¹

¹Department of Structural Analysis, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan. ²Laboratory for Cytokine Signaling, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology (RCAI), Yokohama, Japan. ³Laboratory of Developmental Immunology, Osaka University Graduate School of Frontier Biosciences and Graduate School of Medicine, Osaka, Japan. ⁴Department of Cardiovascular Dynamics, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan. ⁵Laboratory for System Biology and Medicine, Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo, Tokyo, Japan. ⁶Department of Molecular Pathobiology, Hokkaido University Research Center for Zoonosis Control, Sapporo, Japan. ⁷Horizontal Medical Research Organization, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan. ⁸Department of Clinical Evaluation of Medicines and Therapeutics, Osaka University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka, Japan. ⁹Department of Bioscience, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan. ¹⁰Biomedical Research Center and Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon, Republic of Korea. ¹¹Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan.

Grb2-associated binder (Gab) family of scaffolding adaptor proteins coordinate signaling cascades downstream of growth factor and cytokine receptors. In the heart, among EGF family members, neuregulin-1 β (NRG-1 β , a paracrine factor produced from endothelium) induced remarkable tyrosine phosphorylation of Gab1 and Gab2 via erythroblastic leukemia viral oncogene (ErbB) receptors. We examined the role of Gab family proteins in NRG-1 β /ErbB-mediated signal in the heart by creating cardiomyocyte-specific Gab1/Gab2 double knockout mice (DKO mice). Although DKO mice were viable, they exhibited marked ventricular dilation and reduced contractility with aging. DKO mice showed high mortality after birth because of heart failure. In addition, we noticed remarkable endocardial fibroelastosis and increase of abnormally dilated vessels in the ventricles of DKO mice. NRG-1 β induced activation of both ERK and AKT in the hearts of control mice but not in those of DKO mice. Using DNA microarray analysis, we found that stimulation with NRG-1 β upregulated expression of an endothelium-stabilizing factor, angiopoietin 1, in the hearts of control mice but not in those of DKO mice, which accounted for the pathological abnormalities in the DKO hearts. Taken together, our observations indicated that in the NRG-1 β /ErbB signaling, Gab1 and Gab2 of the myocardium are essential for both maintenance of myocardial function and stabilization of cardiac capillary and endocardial endothelium in the postnatal heart.

Introduction

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a common cause of heart failure. Epidemiological studies suggest that 25%–30% of DCM is inherited. Among the mutations associated with DCM in humans and mice, several involve genes encoding cytoskeletal proteins and sarcomere-related proteins (1); however, mutations in these known genes account for only a minor proportion of the heritable cardiomyopathies in humans. Cardiac function is maintained by cytokine- and growth factor-triggered intracellular signaling. Genetically modified mice, in which intracellular signaling molecules are either activated or perturbed, also exhibit cardiac

dysfunction, suggesting that coordination of signal transduction systems is critical for the preservation of cardiac function (2).

The Grb2-associated binder (Gab) family proteins, which serve as scaffolding adaptor proteins, crucially intervene between receptors and intracellular signaling molecules to coordinate the signaling cascades of cytokines, growth factors, antigens, and numerous other molecules (3–5). Multiple phosphorylated tyrosine residues of Gab proteins become docking sites for Src homology-2 domain-containing molecules. Docking of Gab to tyrosine phosphatase SHP2 and the p85 regulatory subunit of PI3K leads to the activation of ERK and AKT, respectively (4, 5). Three Gab family members, Gab1, Gab2, and Gab3, have been identified in mammals and are structurally similar (4, 5). Conventional Gab1 knockout (Gab1KO) mice display embryonic lethality with impaired development of heart, placenta, skin, and muscle (6, 7). Gab2KO mice do not show any obvious developmental defects but display impaired allergic responses and osteoclast defects (8–11). Gab3KO mice exhibit no obvious phenotype (12).

We previously demonstrated the importance of Gab1-ERK5 signaling in cardiomyocyte hypertrophy through the leukemia inhibitory factor-gp130-dependent (LIF-gp130-dependent)

Nonstandard abbreviations used: Ang1, angiopoietin 1; ANP, atrial natriuretic peptide; DCM, dilated cardiomyopathy; DKO, cardiomyocyte-specific Gab1/Gab2 double knockout; EFE, endocardial fibroelastosis; EphA4, Eph receptor A4; ErbB, erythroblastic leukemia viral oncogene; Gab, Grb2-associated binder; Gab1CKO, cardiomyocyte-specific Gab1 conditional knockout; Gab1KO, conventional Gab1 knockout; HB-EGF, heparin-binding EGF-like growth factor; LIF, leukemia inhibitory factor; α -MHC, α -myosin heavy chain; NRG-1, neuregulin-1; α -SKA, skeletal α -actin; TSP1, thrombospondin 1.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J. Clin. Invest.* 117:1771–1781 (2007). doi:10.1172/JCI30651.

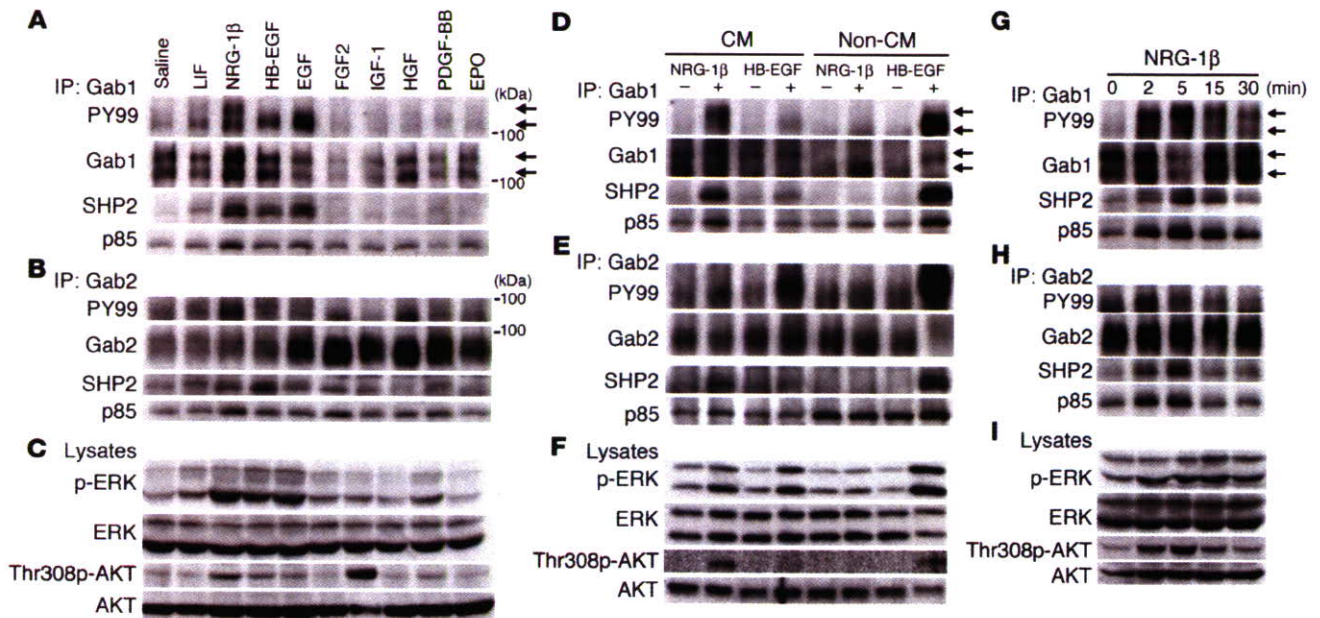


Figure 1

Gab1 and Gab2 are engaged in coordination of NRG-1β/ErbB signaling pathway in the myocardium. Tyrosine phosphorylation of Gab1 (A) and Gab2 (B) and their association with SHP2 and p85 were analyzed by IP of the heart lysates. Mouse heart lysates were prepared at 5 minutes after injection with the cytokines and growth factors listed at top. Heart lysates were subjected to IP with anti-Gab1 (A) or anti-Gab2 (B) serum, followed by IB analysis using the Ab indicated at the left. (C) Activation levels of ERK and AKT were assessed by phospho-specific Ab. Tyrosine phosphorylation of Gab1 (D) Gab2 (E) and their association with SHP2 and p85 was examined by IP of cell lysates from neonatal rat cardiomyocytes (CM) or noncardiomyocytes (non-CM) stimulated with either NRG-1β (50 ng/ml) or HB-EGF (50 ng/ml) for 5 minutes. IP complexes were subjected to IB using the Ab indicated at the left. (F) NRG-1β- and HB-EGF-dependent activation of ERK and AKT was examined in CM and non-CM as in C. Tyrosine phosphorylation of Gab1 (G) and Gab2 (H) and their association with SHP2 and p85 in the mouse hearts were analyzed after injection with 5 μg of NRG-1β as in A and B, respectively. Heart lysates were prepared at the indicated time after injection. Gab1 and Gab2 underwent tyrosine phosphorylation and associated with SHP2 and p85 in a time-dependent manner upon NRG-1β stimulation. (I) Activation of ERK and AKT were assessed as in C. Arrows denote 2 isoforms of Gab1. Representative blots of 3 experiments are shown. PY99, antibody recognizing phospho-tyrosine.

signaling pathway (13). Gab family proteins are also involved in EGF family-erythroblastic leukemia viral oncogene (EGF family-ErbB) receptor family signaling (6, 14, 15). EGF family-ErbB receptor signaling plays crucial roles in heart development and preservation of adult cardiac function (16, 17). Among the EGF family members, neuregulin-1 (NRG-1) (18) and heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) (19) are particularly important agonists for ErbB receptors on cardiomyocytes. NRG-1 serves as a paracrine factor that is shed from the endothelium and activates the ErbB4 homodimer or ErbB2/ErbB4 (also known as HER2/HER4) heterodimer on cardiomyocytes (16, 17, 20, 21). NRG-1-, ErbB2-, and ErbB4-deficient mice display embryonic lethality and similar defects in ventricular trabeculation (22–24). HB-EGF-deficient mice also display abnormal valvular development and cardiac dysfunction (25, 26).

The importance of ErbB signaling in the adult heart was first revealed by the unforeseen adverse effects of trastuzumab (Herceptin), a monoclonal Ab against ErbB2 used in the treatment of breast cancer. Trastuzumab induces heart failure when combined with anthracycline treatment (17, 27, 28). In addition to this clinical evidence, cardiomyocyte-specific ErbB2- and ErbB4-deficient mice both exhibit DCM (29–31). However, the precise intracellular signaling responsible for ErbB-regulated cardiac function is still unclear.

In the present study, we used myocardium-specific deletion of Gab family proteins in the mice to demonstrate that Gab1 and Gab2 in the myocardium are essential for transmitting the signal from NRG-1β/ErbB to directly maintain myocardial function and to subsequently stabilize capillary and endocardial endothelium in the postnatal heart.

Results

Gab1 and Gab2 are engaged in coordination of NRG-1β/ErbB signaling pathway in the myocardium. We aimed at exploring the function of Gab family proteins in the heart. Thus, we first examined the expression of Gab family transcripts by RT-PCR and detected the mRNA of Gab1 and Gab2, but not that of Gab3, in the murine heart (Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI30651DS1). To elucidate how Gab1 and Gab2 are involved in the intracellular signaling in the heart, mice were injected with various cytokines and growth factors. Among these agonists, ErbB receptor-activating agonists, including NRG-1β, HB-EGF, and EGF, induced strong tyrosine phosphorylation of Gab1 and Gab2 and the subsequent association of Gab1 and Gab2 with SHP2 and p85 (Figure 1, A and B). We identified 2 Gab1 isoforms, high-molecular weight (high-MW) Gab1 (120–130 kDa) and low-MW Gab1 (100 kDa). Notably, the high-MW Gab1 underwent tyrosine phosphorylation

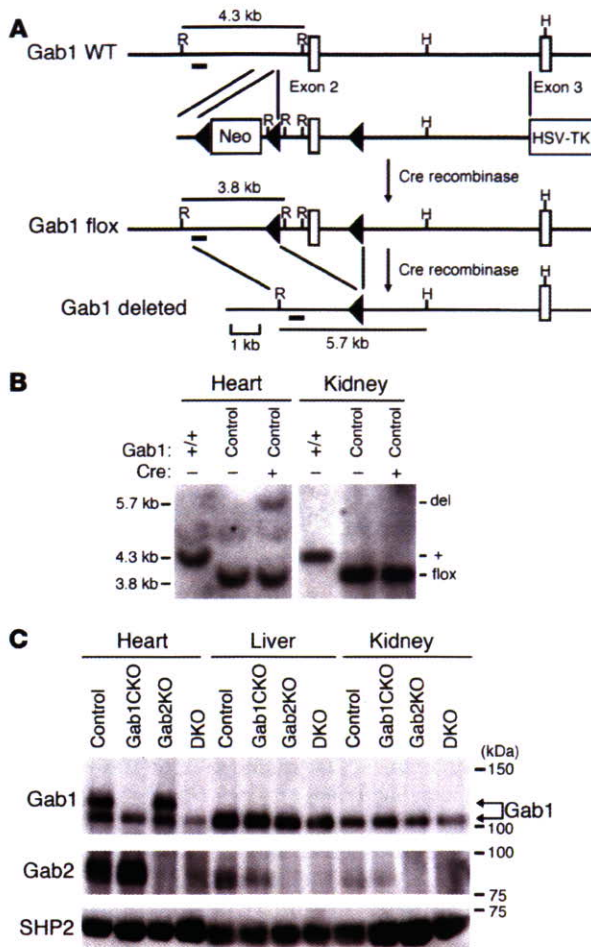


Figure 2

Generation of DKO mice. (A) Schematic illustration of genomic structure of the *Gab1* wild-type, *Gab1* floxed, and *Gab1*-deleted alleles and a targeting vector. *loxP* sequences are indicated by black triangles. Restriction enzyme sites for *Eco*RI and *Hind*III are indicated as R and H, respectively. Fragments detected by the probe (short bold line) used for Southern blot analysis after digestion of genomic DNA with *Eco*RI and *Hind*III are indicated as solid lines measuring 4.3 kb, 3.8 kb, and 5.7 kb. HSV-TK, herpes simplex virus–thymidine kinase. (B) Southern blot analysis demonstrated recombination of the *Gab1^{lox}* allele in the heart, but not in the kidney, of *Gab1^{lox/lox}* mice, which possessed the α -MHC-Cre allele. (C) Following IP, expression of Gab1 and Gab2 was examined by IB using anti-Gab1 (top row) and anti-Gab2 (middle row) serums. SHP2 was examined as a loading control (bottom row). Note that 2 isoforms of Gab1 were detected at the different MW exclusively in the heart (arrows) and that the high-MW Gab1 isoform in the heart was completely depleted in Gab1CKO and DKO. The low-MW Gab1 was also reduced by 80% in the heart of Gab1CKO and DKO mice compared with control and Gab2CKO mice.

upon stimulation exclusively with NRG-1 β , while low-MW Gab1 was phosphorylated by NRG-1 β , HB-EGF, and EGF (Figure 1A). We confirmed that the high-MW Gab1 is a cardiac-specific isoform using molecular mass spectrometric analysis, which showed that the high-MW band that was recognized by anti-Gab1 Ab in Western blot analysis indeed contained the partial amino acid sequence of Gab1 (Supplemental Figure 2, A–C). Activation of both ERK and AKT was found only when stimulated with NRG-1 β , HB-EGF, and EGF (Figure 1C), although activation of AKT was most strongly induced by IGF-1.

We examined whether the difference in Gab1 phosphorylation was due to the diversity of the cell types. To distinguish the signaling processes in cardiomyocytes from those in noncardiomyocytes, including fibroblasts, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells in the heart, we analyzed the action of NRG-1 β and HB-EGF in neonatal rat cardiomyocytes and noncardiomyocytes that had been isolated using the Percoll gradient method (32). NRG-1 β induced tyrosine phosphorylation of Gab1 and Gab2, the subsequent association of Gab1 and Gab2 with SHP2 and p85, and the activation of ERK and AKT in cardiomyocytes but not in noncardiomyocytes (Figure 1, D–F). In clear contrast, HB-EGF induced those changes more strongly in noncardiomyocytes than in cardiomyocytes (Figure 1, D–F). It should be noted that tyrosine phosphorylation of the high-MW Gab1 in cardiomyocytes was induced after stimulation with NRG-1 β but not with

HB-EGF (Figure 1D). These findings suggest that NRG-1 β acts as a highly selective agonist for cardiomyocytes, in agreement with previous reports (33).

Therefore, we focused on the NRG-1 β -dependent signaling pathway through Gab1 and Gab2 in the murine hearts. Gab1 and Gab2 underwent tyrosine phosphorylation and associated with SHP2 and p85 after injection with NRG-1 β in a time-dependent manner (Figure 1, G and H). In addition, both ERK and AKT were also activated by NRG-1 β in a time-dependent manner (Figure 1I). We also checked the activation of ErbB family receptors of murine hearts stimulated with NRG-1 β . NRG-1 β induced tyrosine-phosphorylation of ErbB2 and ErbB4 but not that of ErbB1 (EGFR) or ErbB3 in accordance with a previous report in which cardiomyocytes were used in vitro (Supplemental Figure 3, A–D) (21). Furthermore, Gab1 associated with ErbB4 in a phosphorylation-dependent manner after injection with NRG-1 β (Supplemental Figure 3E). These data suggest the engagement of Gab family proteins in the coordination of NRG-1 β /ErbB signaling pathway.

Generation of cardiomyocyte-specific Gab1 conditional knockout mice. To elucidate the function of Gab family proteins in myocardium, we first generated cardiomyocyte-specific *Gab1* conditional knockout (Gab1CKO) mice using the Cre-*loxP* system. Using homologous recombination in embryonic stem cells, we created a *Gab1^{lox}* allele by introducing 2 *loxP* sites into introns flanking exon 2, which encodes part of the pleckstrin homology domain

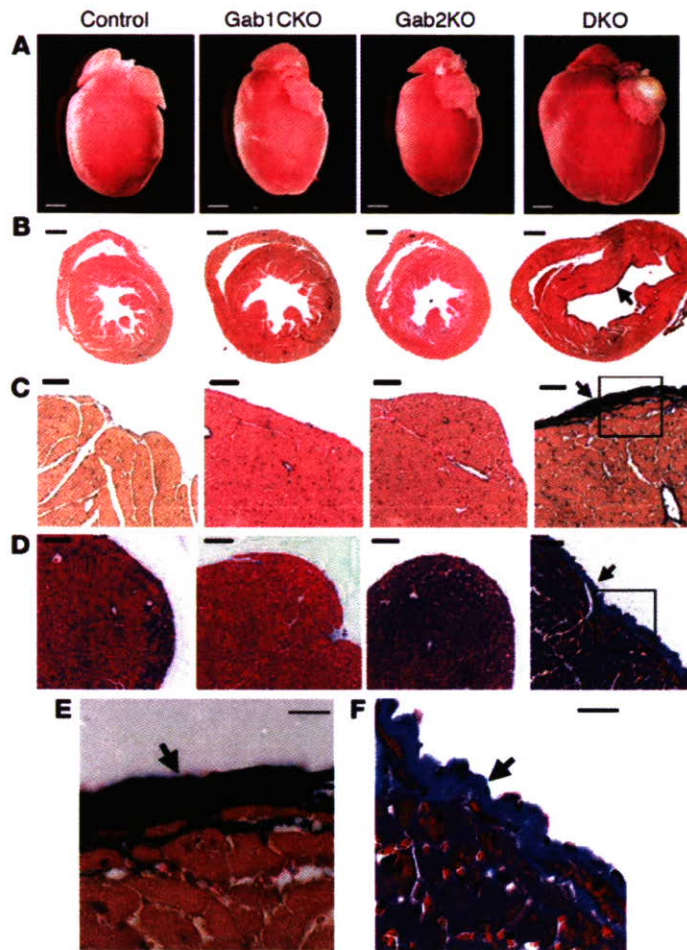


Figure 3

DKO mice display dilated cardiomyopathic features accompanied by EFE. (A) Representative images of whole hearts from 4 groups at 10 weeks of age. (B) Transverse sections of the hearts were stained using the elastica van Gieson method. DKO hearts showed marked biventricular dilation and slight wall thinning compared with the other 3 groups of hearts. (C and E) Higher magnification of elastica van Gieson-stained section of DKO heart shows the focal accumulation of elastic fibers (black) in the endocardium (arrows in B and C). (D) Masson's trichrome-stained section of DKO heart shows focal accumulation of collagen (blue) in the endocardium (arrow in D). (E and F) Boxed regions of C and D, respectively, are enlarged. Scale bars: 1 mm (A and B); 20 μm (C–F).

diomyocytes and noncardiomyocytes isolated from neonatal rat hearts (32) and detected the high-MW isoform of Gab1 exclusively in cardiomyocytes (Supplemental Figure 2D).

In Gab1CKO mice, the high-MW Gab1 was completely deleted and the low-MW Gab1 was reduced to about 20% of control (*Gab1^{flox/flox}*) littermates. The residual low-MW Gab1 protein might be attributed to the noncardiomyocytes present in the heart. These data indicated the successful depletion of Gab1 in the cardiomyocytes (Figure 2C), because α -MHC promoter functions exclusively in the myocardium. In 3-day-old Gab1CKO mouse hearts, we detected an extent of Gab1 protein depletion similar to that of 3- or 10-week-old mice (Supplemental Figure 4B).

Generation of cardiomyocyte-specific Gab1/Gab2 double knock-out mice. In murine hearts, mRNAs of Gab1 and Gab2 were detected by RT-PCR (Supplemental Figure 1). Gab2 can rescue the loss of Gab1 for activation of ERK in the EGF signaling pathway (36). We thus assumed that Gab2 might compensate for the deletion of Gab1 in the cardiomyocytes of Gab1CKO mice.

To completely deplete Gab family proteins in cardiomyocytes, Gab1CKO mice were crossed with Gab2KO mice. We created *Gab1^{flox/flox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(+)* mice by crossing *Gab1^{flox/flox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(+)* mice with *Gab1^{flox/flox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(-)* mice in the final breeding. The offspring of these crossings were recovered at expected Mendelian ratios as follows: *Gab1^{flox/flox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(-)* (*n* = 44; 24.6%); *Gab1^{flox/flox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(+)* (*n* = 46; 25.7%); *Gab1^{flox/flox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(-)* (*n* = 39; 21.8%); *Gab1^{flox/flox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(+)* (*n* = 50; 27.9%). Thereafter, we analyzed the following 4 groups of mice: *Gab1^{flox/flox}Gab2^{+/+} α -MHC-Cre(-)* (control); *Gab1^{flox/flox}Gab2^{+/+} α -MHC-Cre(+)* (Gab1CKO); *Gab1^{flox/flox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(-)* (Gab2KO); and *Gab1^{flox/flox}Gab2^{-/-} α -MHC-Cre(+)* (DKO). Both Gab2KO and DKO mice displayed normal appearance and normal cardiac morphology at birth (Supplemental Figure 5A). Gab2 protein was completely depleted in the Gab2KO and DKO mice, indicating the successful depletion of Gab1 and Gab2 in the cardiomyocytes of DKO mice (Figure 2C).

DKO mice display dilated cardiomyopathic features accompanied by endocardial fibroelastosis. We performed gross morphological examination of the hearts of the 4 groups at 10 weeks of age because we did not find any morphological abnormalities in the hearts of Gab1CKO, Gab2KO, or DKO mice at birth (Supplemental Figure 5A). Although there was no morphological difference among Gab1CKO, Gab2KO, and control mice (Figure 3A), DKO mice exhibited significantly higher heart weight-to-body weight ratios

(Figure 2A). The protein expression of Gab1 in all tissues of mice homozygous for the *Gab1-loxP*-targeted allele (*Gab1^{flox/flox}* mice) was almost the same level as in wild-type mice (data not shown). To cause recombination of the floxed allele exclusively in cardiomyocyte lineage, *Gab1^{flox/flox}* mice were crossed with transgenic mice expressing α -myosin heavy chain promoter-driven Cre recombinase (α -MHC-Cre mice) (34, 35) (Figure 2A). We confirmed the Cre-mediated recombination during embryogenesis (E10.5 and E14.5) by crossing α -MHC-Cre mice with enhanced GFP reporter mice (Supplemental Figure 4A). The Gab1CKO (*Gab1^{flox/flox} α -MHC-Cre(+)*) mice were born normally at the expected Mendelian frequency, whereas Gab1KO mice were embryonically lethal (6). In addition, the Gab1CKO mice displayed normal appearance and normal cardiac morphology at birth (Supplemental Figure 5A).

We observed the expected genetic recombination at the *Gab1* locus in the ventricles of Gab1CKO mouse hearts but not in other tissues (Figure 2B). In order to estimate the expression of Gab1 protein, immunoblot analyses were performed using the extracts from heart, liver, and kidney (Figure 2C). As described above, 2 isoforms of Gab1 proteins were detected in hearts, while low-MW Gab1 was commonly detected, suggesting that the high-MW Gab1 is a cardiac-specific isoform. Moreover, high-MW Gab1 protein was deleted in Gab1CKO hearts, suggesting that high-MW Gab1 is a product of the same *Gab1* gene that has low MW. In addition, we used Percoll gradient centrifugation to analyze the expression of Gab1 in car-

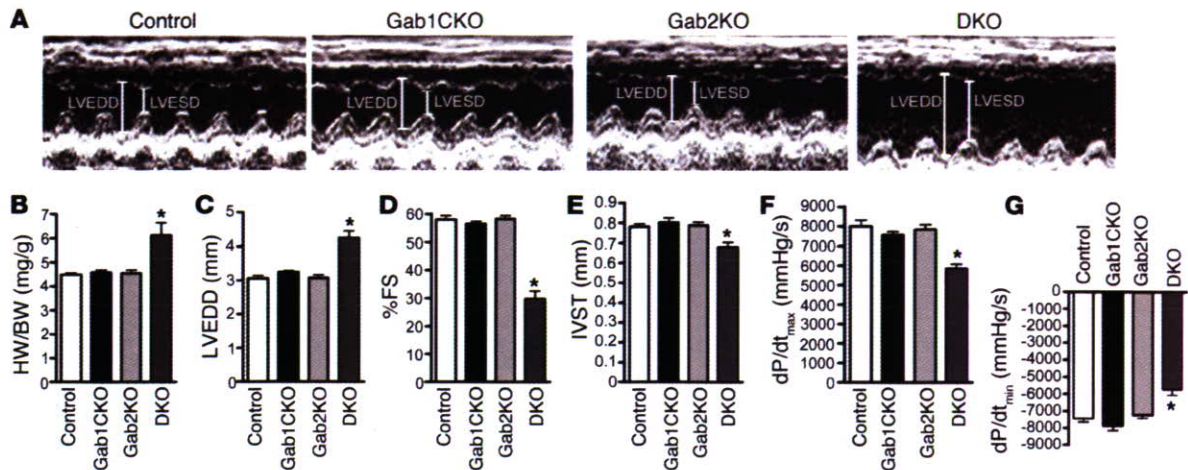


Figure 4

DKO mice exhibit dilated cardiomyopathic features. (A) Representative examples of M-mode echocardiographic images of LV from each group of mice at 10 weeks of age. LVEDD, LV end-diastolic dimension; LVESD, LV end-systolic dimension. (B) Heart weight/body weight (HW/BW) ratio of control mice ($n = 9$), Gab1CKO mice ($n = 6$), Gab2KO mice ($n = 6$), and DKO mice ($n = 10$) at 10 weeks of age. (C) LVEDD, (D) fractional shortening (%FS), and (E) interventricular septal thickness (IVST) of control mice ($n = 8$), Gab1CKO mice ($n = 8$), Gab2KO mice ($n = 7$), and DKO mice ($n = 14$) at 10 weeks of age. There were no significant differences in BW or heart rate among the 4 groups. (F) The maximum first derivative of LV pressure (LV dP/dt_{max}) and (G) the minimum first derivative of LV pressure (LV dP/dt_{min}) were obtained by catheterization of LV from right carotid artery in control mice ($n = 7$), Gab1CKO mice ($n = 6$), Gab2KO mice ($n = 7$), and DKO mice ($n = 7$) at 12 weeks of age. * $P < 0.01$ compared with all other genotypes.

than the other 3 groups without significant differences in body weight (Figure 3A and Figure 4B). Histological examination also demonstrated both left and right ventricular enlargement in DKO mice similar to DCM (Figure 3B).

A significant accumulation of elastic fibers and collagen was observed exclusively in the endocardium of DKO mice (Figure 3, B–F), while fibrotic replacement was not found in the interstitial spaces of the ventricles of DKO mice (Supplemental Figure 6, A and B). There was no significant increase in the number of apoptotic myocardial cells in the hearts of DKO mice compared with those of control mice (Supplemental Figure 7, A and B). The endocardial deposition of elastic fibers and collagen was not found in the neonates of DKO, but was found to some extent in all of the DKO mice after 3 weeks (Supplemental Figure 5A and data not shown). These endocardium-specific changes were coincident with the pathological features of endocardial fibroelastosis (EFE), the genetic causality of which has not been fully elucidated to date (37, 38). We further examined the vasculature in the heart by immunostaining with anti-vWF Ab. Intriguingly, we found abnormally dilated vessels positively stained with anti-vWF Ab exclusively in the LV of DKO mice but not in those of control, Gab1CKO, or Gab2KO mice (Figure 5A). These dilated vessels in DKO mice exhibited the impairment in recruitment of α -SMA-positive VSMCs (Figure 5, B and C). These findings indicate that the maintenance system for both endocardial and vascular endothelium might be disturbed in the DKO mouse hearts. Furthermore, EFE and increased abnormal vessels in the hearts of DKO mice were indirectly ascribed to the lack of Gab1 and Gab2 in the myocardium because there was no abnormality in the other 3 groups.

We assessed in vivo cardiac function by echocardiography and cardiac catheterization. Echocardiography revealed a significant increase in LV end-diastolic dimension (Figure 4, A and C), decreased fractional shortening (Figure 4, A and D), and decreased interventricular septal wall thickness (Figure 4E) in 10-week-old

DKO mice compared with age-matched mice of the other 3 groups. Although we did not find a significant changes of LV end-diastolic dimension or fractional shortening between the DKO and control mice at 3 weeks of age, we did observe these changes after 6 weeks of age (Supplemental Figure 8, A and B). Consistent with the echocardiographic findings, cardiac catheterization at 12 weeks of age revealed a marked reduction of the maximum first derivative of LV pressure exclusively in DKO (Figure 4F), demonstrating a reduction in myocardial contractility of the DKO hearts. The accompanying reduction of the minimum first derivative of LV pressure in the DKO mouse hearts indicated the impairment of LV relaxation (Figure 4G). There were no significant differences in heart rate or LV peak pressure among the 4 groups (data not shown). This relaxation failure was supported by the electron microscopic findings. We noticed that sarcomere length was reduced in the DKO mouse hearts, which indicated the hypercontraction phenotype (39), although we could detect slight changes in the mitochondria of DKO mouse hearts (Supplemental Figure 7, C and D). In agreement with the reduced contractility and relaxation reflecting heart failure, the fetal cardiac gene program was reactivated, as evidenced by the significant increase in both *atrial natriuretic peptide* (ANP) and *skeletal α -actin* (α -SKA) mRNAs in DKO mice (Figure 6, A–C).

Approximately 70% of the DKO mice died, presumably of heart failure accompanied by pleural effusion, between 3 and 72 weeks of age (Figure 6D). We observed remarkably dilated ventricles in DKO mice that had died of heart failure (Supplemental Figure 5B, right panel). The other 3 groups of mice lived normally during the observation period of 500 days (Figure 6D). In agreement with this survival analysis, we did not observe any enlargement of the hearts of Gab1CKO and Gab2KO mice at 300 and 500 days of age. (Supplemental Figure 5B and data not shown). These data indicate that depletion of both Gab1 and Gab2 in the myocardium result in DCM-like phenotype accompanied by EFE.

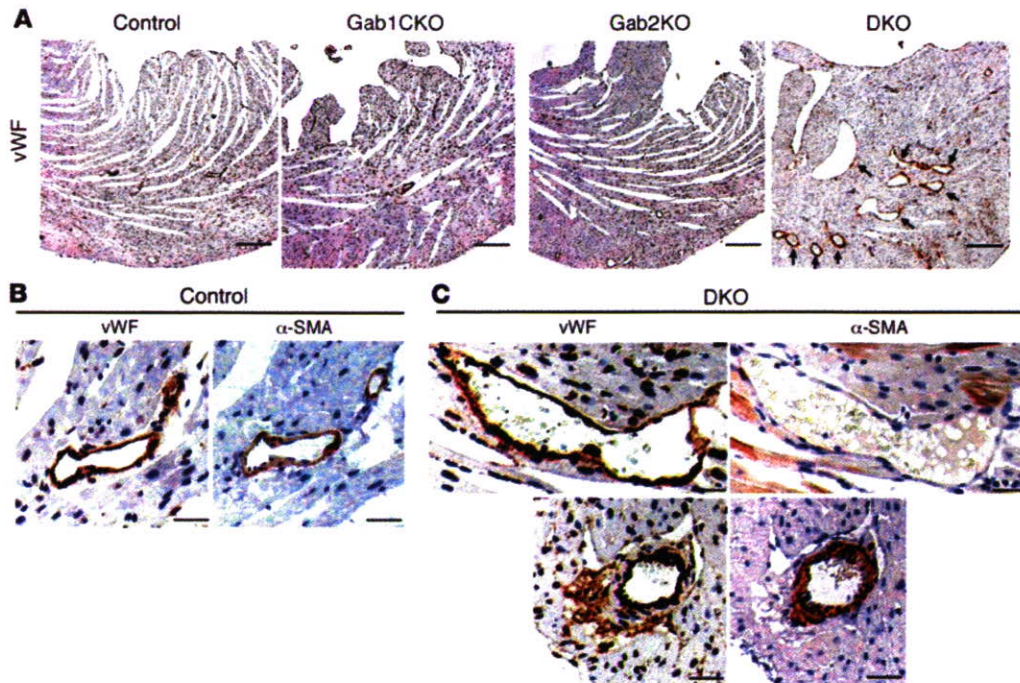


Figure 5

DKO mice display vascular abnormalities in the ventricles. (A) Heart sections from 4 groups of mice at 6 weeks of age were immunostained with anti-vWF Ab. vWF-positive, abnormally dilated vessels were observed in the left ventricles of DKO mice (arrows) but not in those of control, Gab1CKO, or Gab2KO mice. Representative photographs are shown. (B and C) Heart sections from control (B) and DKO (C) mice at 6 weeks of age were immunostained with anti-vWF and anti- α -SMA Abs. The abnormally dilated vessels in DKO mice were not surrounded by α -SMA-positive VSMCs in most cases (C, top panels), although vessels of normal diameter near the epicardium in DKO mice were surrounded by α -SMA-positive VSMCs (C, bottom panels) as observed in control mice (B). Representative images are shown. Scale bars: 200 μ m (A); 20 μ m (B and C).

Gab1 and Gab2 are required for NRG-1 β /ErbB signaling in the heart. To determine requirements of Gab1 and Gab2 in NRG-1 β -triggered signaling in the myocardium, we examined the activation of ERK and AKT after injection of NRG-1 β . NRG-1 β -induced activation of ERK and AKT was completely abrogated in DKO mice but not in the other 3 groups (Figure 7, A–C), suggesting a compensatory function of Gab1 and Gab2 in the heart. Consistently, tyrosine phosphorylation of Gab1 and subsequent association with SHP2 and p85 were observed in control and Gab2KO mice but not in Gab1CKO or DKO mice (Figure 7D). Tyrosine phosphorylation of Gab2 and subsequent association with SHP2 and p85 were conversely observed in control or Gab1CKO mice but not in Gab2KO or DKO mice (Figure 7E). Tyrosine phosphorylation of ErbB2 and ErbB4 was comparable among the 4 groups (Figure 7F). IGF-1- and HB-EGF-dependent activation of ERK and AKT were not affected in the hearts of DKO mice (Supplemental Figure 9, A and B). These data indicate that Gab1 and Gab2 are required exclusively for NRG-1 β /ErbB signal-dependent activation of ERK and AKT in the heart.

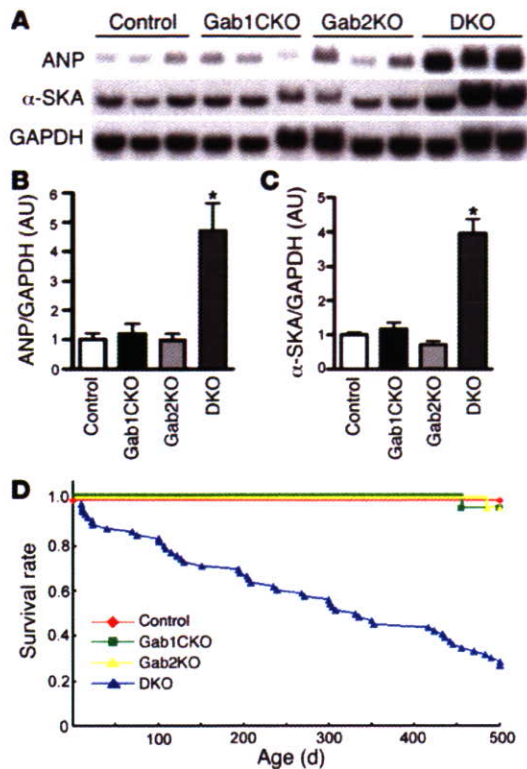
Angiopoietin 1 upregulation induced by NRG-1 β is impaired in Gab1/Gab2-deficient myocardium. Because we observed no cardiac abnormalities in Gab2KO mice, we determined that the primary cause of EFE and abnormal vessels in DKO mouse hearts was not the lack of Gab2 in endothelial cells. To identify the potential signal defect that caused EFE and malformed vessels downstream of the NRG-1 β /ErbB–Gab1/Gab2 signaling pathway in the myocardium, we used microarrays to carry out a global survey of mRNA in control and DKO mice treated with or without NRG-1 β for 8 hours.

We found several transcripts that were upregulated by stimulation with NRG-1 β in the hearts of control mice but not in those of DKO mice (Figure 8A). Among these transcripts presented in the cluster diagram, we considered thrombospondin 1 (TSP1) and angiopoietin 1 (Ang1) to be potential paracrine factors from myocardium and Eph receptor A4 (EphA4) to be important for the intercellular communication between cardiomyocytes and surrounding cells.

To address the pathogenesis of endocardial and vascular abnormalities observed in DKO mouse hearts, we focused on Ang1 because it has an important role in maturation of both vascular endothelium and endocardial endothelium *in vivo* (40–42). We confirmed by northern blot analysis that NRG-1 β upregulated *Ang1* mRNA in the hearts of control mice, but not DKO mice (Figure 8, B and C). NRG-1 β consistently induced significant upregulation of *Ang1* mRNA in cultured cardiomyocytes but not in noncardiomyocytes (Figure 8, D–F). In association with defective expression of Ang1, CD31-positive capillary density was significantly decreased in the LV of DKO mice compared with control (Figure 8, G and H). Taken together, these findings suggest that the lack of NRG-1 β -induced upregulation of Ang1 might be one of the possible causes for pathogenesis of EFE and abnormal vasculatures in DKO mouse hearts.

Discussion

To our knowledge, the present study is the first to reveal the essential roles of Gab family proteins for NRG-1 β /ErbB signaling pathway in the heart. Gab1 and Gab2 were markedly tyro-

**Figure 6**

DKO mice die of heart failure. (A) Northern blot analyses of the hearts from control, Gab1CKO, Gab2KO, and DKO mice ($n = 3$ for each group) at 12–14 weeks of age showed the increased expression of mRNAs for ANP and α -SKA in DKO mice. GAPDH mRNA was also measured for sample loading control. (B and C) The relative levels of ANP and α -SKA mRNA (normalized to GAPDH mRNA levels) were quantified from 3 mouse hearts in each group. ($*P < 0.01$ compared with all other groups.) (D) Kaplan-Meier curves showing survival rate in control mice ($n = 30$), Gab1CKO mice ($n = 30$), Gab2KO mice ($n = 30$), and DKO mice ($n = 66$) mice by 500 days. The number of dead DKO mice was 48 (72.7%); $P < 0.001$ for DKO versus control, Gab1CKO, and Gab2KO mice by log-rank test.

sine phosphorylated in the myocardium after stimulation with NRG-1 β among various growth factors and cytokines. Tyrosine-phosphorylated Gab1 and Gab2 subsequently associated with SHP2 and p85, resulting in strong activation of both ERK and AKT in the myocardium. NRG-1 β -dependent activation of ERK and AKT was almost completely abrogated in the DKO mouse hearts. In agreement with NRG-1 β -dependent downstream signaling defects, DKO mice displayed DCM-like phenotypes and EFE with aging. Interestingly, DKO mouse hearts also displayed abnormally dilated vessels with the loss of VSMCs. To address the mechanism for the abnormality in endocardial/vascular endothelium in DKO mouse hearts, we performed DNA microarray analysis and found several vasculature-regulating gene transcripts, such as Ang1, upregulated by NRG-1 β in control, but not in DKO, mouse hearts. Thus, Gab family proteins mediate NRG-1 β -dependent stabilization of endocardial/vascular endothelium through the paracrine system from cardiomyocytes in the heart.

Gab1 and Gab2 are specifically required for coordination of NRG-1 β /ErbB-dependent signaling pathway in the myocardium. NRG-1 β shed from endothelial cells activates ErbB2/ErbB4 heterodimer or ErbB4 homodimer on the cardiomyocytes (16, 17, 21). Consistent with this notion, we found that NRG-1 β induced prominent tyrosine phosphorylation of Gab1 and Gab2 in cardiomyocytes but not in noncardiomyocytes. In addition, the cardiomyocyte-specific, high-MW isoform of Gab1 was tyrosine phosphorylated after stimulation with NRG-1 β but not with other agonists including HB-EGF and EGF. It has been reported that HB-EGF-deficient mice develop heart failure (25, 26). Given that HB-EGF induced a much stronger tyrosine phosphorylation of Gab1 and Gab2 in noncardiomyocytes than in cardiomyocytes in our study and that valvular structures are developed from noncar-

diomyocytes (19), the heart failure observed in HB-EGF-deficient mice might have resulted from abnormal signaling in the development of the valvular apparatus. Therefore, the cardiac phenotypes observed in DKO mice were mainly ascribable to the defects of the NRG-1 β /ErbB signaling pathway in the myocardium. Consistent with this, similar DCM-like phenotypes are found in cardiac-specific ErbB2- and ErbB4-deficient mice (29–31).

NRG-1 β activates both ERK and PI3K/AKT pathways in cardiomyocytes in vitro, both of which have been implicated in modulation of cell survival and protein synthesis (21, 43). NRG-1 β actually induced strong activation of ERK and AKT in the hearts of control, but not DKO, mice. This finding provides what we believe to be the first in vivo evidence that Gab1 and Gab2 are required for transmission of the NRG-1 β /ErbB signal to downstream signaling pathways, ERK and AKT. DKO mice progressively developed DCM phenotypes, demonstrating clearly that Gab1 and Gab2 were essential for maintenance of myocardial function through transmission of NRG-1 β /ErbB signaling pathway (Figure 9).

DKO mice also exhibited abnormal deposition of elastic fibers and collagen specifically in the endocardium, reminiscent of the pathological features observed in primary EFE. Clinically, primary EFE is found mainly in infants, children, and adolescents and is frequently accompanied by contractile deterioration similar to DCM. Although there have been some reports suggesting the heritable causality of primary EFE (37, 38), the precise pathogenetic mechanisms have not been elucidated to date. These DKO mice may provide the first mouse model of EFE. Further genetic analysis of cardiac-specific isoform of Gab1 will certainly contribute to our understanding of the pathogenesis of EFE.

DKO mouse hearts also displayed abnormal vasculatures as well as EFE. Microarray analysis enabled us to identify several transcripts that were upregulated by NRG-1 β in the control hearts but not in DKO hearts. Among these transcripts selected in the cluster analysis, TSP1, EphA4, and Ang1 have been reported to be involved in the intercellular-dependent vascular regulation (40, 44, 45). Intriguingly, NRG-1 β /ErbB2/ErbB4 signaling, Ang1/Tie2 signaling, VEGF/VEGFR2 signaling, and serotonin-mediated (5-HT_{2B}-mediated) signaling are required for the proper maturation of endocardium (16, 17, 40, 46, 47). Moreover, Ang1- or Tie2-deficient mice exhibit embryonic lethality accompanied by abnormally dilated vessels as well as defects in the endocardium (40, 42, 48). Furthermore, we demonstrated for the first time that postnatal cardiomyocytes are important Ang1-producing cells, whereas Ang1 has been believed to be mainly secreted from vascular mural cells such as pericytes and VSMCs (40, 41). Thus, we could pro-

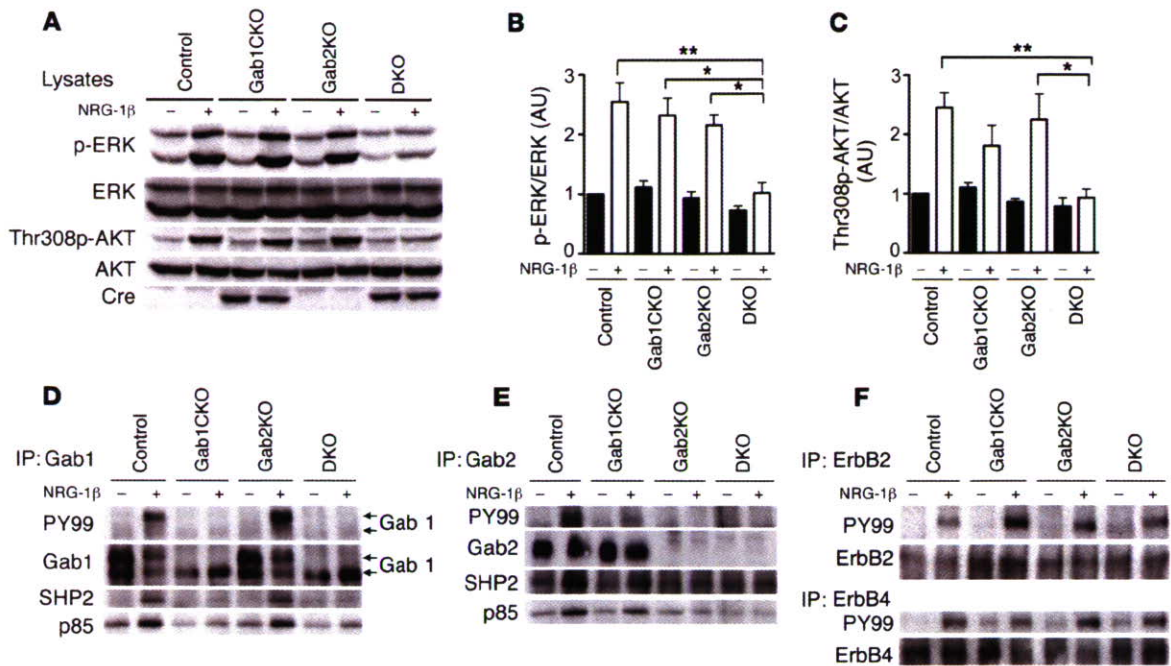


Figure 7

Gab1 and Gab2 are required for NRG-1 β -dependent ERK and AKT activation in the heart. (A) NRG-1 β -induced activation of ERK and AKT in the hearts from the indicated mice was assessed using phospho-specific Abs. Activation of ERK and AKT was exclusively attenuated in DKO hearts compared with the other 3 groups. Representative blots of 4 experiments are shown. (B) Phosphorylation of ERK was quantified against total ERK ($n = 4$). (C) Phosphorylation of AKT was quantified against total AKT ($n = 4$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ for the indicated groups. Tyrosine phosphorylation of Gab1 (D) and Gab2 (E) and their association with SHP2 and p85 in hearts from the 4 groups of mice after injection with NRG-1 β was examined as in Figure 1, A and B. Arrows in D denote the 2 isoforms of Gab1. (F) Tyrosine phosphorylation of ErbB2 (upper panels) and ErbB4 (lower panels) in hearts from the 4 groups were assessed at 5 minutes after NRG-1 β injection. Tyrosine phosphorylation of ErbB receptors in the murine hearts upon NRG-1 β stimulation was examined by IP with anti-ErbB2 or anti-ErbB4 Ab, followed by IB with the Abs indicated at the left.

pose that the defective expression of Ang1 might be involved in the pathogenesis of EFE and abnormal vessels in DKO hearts, though we cannot exclude the possibility that other vasculature-regulating genes, such as TSP1 and EphA4, play important roles in endocardial maintenance. Cardiac-specific gene ablation of Ang1 would be helpful to understand its importance in cardiomyocyte-endothelial cell interactions.

So far, it has been well established that NRG-1 functions as a cytoprotective growth factor in cardiomyocytes (17, 21, 43). Here, our findings propose a novel function of NRG-1; NRG-1 regulates vascular homeostasis through the paracrine expression of endothelium stabilization factors, such as Ang1, via Gab family proteins. Importantly, accumulating evidence has revealed that normal endothelial function is required for the maintenance of myocardial function (16). Collectively, Gab1 and Gab2 in the myocardium are essential for both maintenance of myocardial function and stabilization of capillary or endocardial endothelium through transmission of NRG-1 β /ErbB signaling (Figure 9).

Methods

Materials. Anti-phospho-p44/p42 ERK (Thr202/Tyr204), anti-phospho-AKT (Thr308), and anti-AKT Abs were purchased from Cell Signaling Technology. The use of anti-Gab1 and anti-Gab2 serums in IP was described previously (13, 49). The Abs against Gab1, Gab2, and p85 used in IB analysis were from Millipore; Abs against antibody recognizing phospho-tyro-

sine (PY99), ERK1, ERK2, and SHP2 were from Santa Cruz Biotechnology Inc.; Abs against vWF and α -SMA were from Dako; the Ab against CD31 was from BD Biosciences – Pharmingen; and the Ab against Cre was from EMD Biosciences. Collagenase, Percoll, recombinant NRG-1 β (NRG-1 β EGF domain; sold as heregulin- β 1), HGF, and PDGF-BB were from Sigma-Aldrich. HB-EGF and EGF were from R&D Systems. FGF2 was from EMD Biosciences. LIF was from Millipore. IGF-1 and erythropoietin were kindly provided by Astellas Pharma and Chugai Pharmaceutical Co., respectively.

Cell cultures. Primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes were prepared from ventricles of 1- to 2-day-old Wistar rats (Kiwa Jikken Dobutsu) on Percoll gradient as described previously (32). Briefly, ventricles were isolated from neonatal rats and treated with trypsin and collagenase for 30 minutes at 37°C. Isolated cells were suspended in 58.5% Percoll in HBSS (20 mM HEPES, 116 mM NaCl, 12.5 mM NaH₂PO₄, 5.6 mM glucose, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄; pH 7.35) and added to the discontinuous gradient consisting of 40.5% and 58.5% Percoll in HBSS. After centrifugation at 1,400 g for 30 minutes at 15°C, the cardiomyocytes were collected from the interface of the discontinuous Percoll gradient and further enriched by preplating for 60 minutes on noncoated dishes. Unattached cells were cultured as cardiomyocytes in M-199 (Invitrogen) with 10% FBS. Attached cells were cultured as noncardiomyocytes in DMEM with 10% FBS. Immunocytochemical examination with anti-sarcomeric α -actinin Ab (Sigma-Aldrich) revealed that more than 95% cultured cells in the cardiomyocyte fraction were sarcomeric α -actinin-positive cardiomyocytes (data not shown). The population of noncardiomyocytes is described in the supplemental information.