

200906006A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

末梢血単核球移植による血管再生治療と
次世代の再生治療を目指した基盤研究

(H20-再生-一般-004)

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 小室 一成

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
末梢血単核球移植による血管再生治療と次世代の再生治療を目指した基盤研究-----	1
小室 一成	
II. 分担研究報告書	
1. 末梢性血管疾患に対する治療・基礎研究-----	6
南野 徹	
2. 虚血性心疾患に対する治療-----	9
宮内 秀行	
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

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

末梢血単核球移植による血管再生治療と次世代の再生治療を目指した基盤研究

研究代表者 小室一成 千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学 教授

研究要旨

末梢血中に骨髄由来の血管内皮前駆細胞が存在し、成体においても胎児期同様に血管の分化形成、すなわち *vasculogenesis* が起こるということが報告されて以来、ヒト虚血性心血管疾患に対して骨髄細胞を用いた細胞治療が、主にアジアとヨーロッパで盛んに行われ、その有効性を検証する研究が始まっているがまだ不確定な点が多い。このような中、我々は独自に末梢血単核球を用いた血管新生治療について基礎研究を重ねてきた。その結果、末梢血単核球は高度な血管新生効果を持つこと、その効果は骨髄由来の単核球と比較して、勝るとも劣らないことを見出した。そこで我々は、十分な血管新生効果がより安全に期待できる、自家末梢血単核球移植を臨床応用する方針とし、本学倫理委員会承認のもと、重症末梢性動脈疾患（安静時疼痛や虚血性潰瘍あり）を対象とした臨床研究を2002年7月より開始し、以後これまでに80例以上に対して本治療を行っている。その結果、約60-70%の症例において治療効果を認めた。さらに臨床データや基礎的検討の結果、末梢血単核球移植によって虚血肢の筋組織の再生がおり、その再生過程において筋組織が分泌する血管増殖因子が持続的に虚血肢に作用し、血管再生を誘導することによって筋組織の再構築を促進しているという新しい作用メカニズムを明らかにした。そこで本研究では、末梢血単核球を用いた血管新生治療の有効性をさらに確認するため、重症間欠性跛行症例、重症虚血性心疾患症例に対してプラセボをコントロールとした2重盲験試験を行う。さらに動物モデルを用いた基礎的な研究を進めることによって、次世代の血管再生治療の開発を行う。本年度、重症虚血肢に対する末梢血単核球移植による血管再生治療と重症虚血性心疾患に対する末梢血単核球細胞移植による血管再生治療の臨床研究登録を開始した。

（研究代表者）

小室一成 千葉大学大学院医学研究院
循環病態医科学 教授

（研究分担者）

南野 徹 千葉大学大学院医学研究院
循環病態医科学 講師

宮内秀行 千葉大学大学院医学研究院
循環病態医科学 助教

A. 研究目的

我々はこれまでに末梢血単核球を用いた血管新生治療について基礎研究を重ねてきた。その結果、末梢血単核球は高度な血管新生効果を持つこと、その効果は骨髄由来の単核球と比較して、勝ると

も劣らないことを見出した。重症末梢性動脈疾患を対象とした臨床研究を2002年7月より開始し、以後これまでに80例以上に対して本治療を行い、その安全性と有効性を確認した。そこで本研究では、末梢血単核球を用いた血管新生治療の安全性や有効性をさらに確認するため、重症間欠性跛行症例、重症虚血性心疾患症例に対してプラセボをコントロールとした2重盲験試験を行う。さらに動物モデルを用いた基礎的な研究を進めることによって、次世代の血管再生治療の開発、治療効果の予想指標の解明を行う。

B. 研究方法

(1) 重症虚血肢に対する末梢血単核球移植による

血管再生治療

これまでの、安静時疼痛や虚血性潰瘍のある重症下肢虚血患者を対象にパイロット研究を行ってきた。これらの対象者においては、倫理的に二重盲験とし難いため、本研究における対象は、末梢性血管疾患による重症間欠性跛行（Fontaine 2B 相当）を有するが、従来の内科および外科的治療にても症状が改善せず、将来的に虚血症状の悪化が見込まれる患者とした。インフォームドコンセントを得た後、症例は細胞移植群とプラセボコントロール群の2群に無作為に分類する。治療前と移植治療6ヶ月後に、トレッドミル検査による最大歩行距離（一次評価項目）、跛行出現距離、下肢血圧回復時間、ABPI、レーザードップラー、下肢シリンチ、MRI、下肢動脈造影、QOLによる判定（二次評価項目）を行い、治療効果を詳細に評価する。

(2) 重症虚血性心疾患に対する末梢血単核球細胞移植による血管再生治療

我々はウサギなどを用いた動物実験を重ね、慢性心筋虚血において、末梢血単核球を開胸下に心筋内に注射すると筋注部位の血管数の増加及び著明な血流改善を認め、その結果心機能の改善が得られることを確認した。また、同時に行ったテレメトリーを用いた心電図解析においても、単核球の心筋内注射に伴う有害不整脈の出現を認めなかった。以上の結果より、虚血性心疾患における末梢血単核球細胞移植は安全かつ有益であると考えた。特に冠動脈バイパス術との併用療法は従来の外科的治療では治療し得なかった心筋虚血を有する症例に対して効果的である可能性がある。このような背景から今回我々は従来の治療法にても虚血症状が改善しない重症虚血性心疾患患者を対象として、自家末梢血単核球細胞移植による血管新生治療を実施することを計画した。対象は、重症虚血性心疾患を有し、冠動脈バイパス術を施行予定であるが、バイパス術施行後も残存する心筋虚

血領域があることが予測される患者とした。

(3) 次世代の血管再生治療を目指した基礎研究
我々は既に本治療の作用メカニズムの一部を解明した。予備実験では、その作用機序に Notch シグナルが重要であることも確認している。本研究では、次世代の再生治療を目指すため、そのシグナルの強弱と臨床効果との相関を検証するとともに、そのシグナルを増強することによって治療効果を増幅する方法を開発していく。

（倫理面への配慮）

(1) 動物を用いた研究は、千葉大学動物実験指針に基づき行う。遺伝子改変マウスの取り扱いや、拡散防止などについては、その指針に従って、十分注意を払いながら実験を行う。

(2)-1 研究対象個人の人権の庇護

患者自らの意志にて本申請医療を希望する場合のみ施行する。患者本人の意志を尊重するとともに、マスメディアからは可能な限り隔離し臨床成績発表の際にも患者のプライバシーに関わる情報の公表は避けるなど、最大限人権保護を優先するように努める。

(2)-2 同意を求める方法

添付説明文書にて末梢血単核球移植で発生する医学的合併症・効能・不利益・利益を十分に説明し、患者自らの意志にて移植医療を希望する場合のみ施行する。また細胞移植の実施中に患者さんより医療中断の意志が表明された際には即座に中止する。

(2)-3 個人への不利益ならびに危険性への配慮

本治療に同意を得られた患者については治療に不利益となる他疾患の有無をスクリーニングするための検査を治療前に全例について行う。治療後は入院中・外来通院を通じて合併症の早期発見とその早期対応に努める。

C. 研究結果

末梢性血管疾患による重症間欠性跛行 (Fontaine 2B 相当) を有するが、従来の内科および外科的治療にても症状が改善せず、将来的に虚血症状の悪化が見込まれる症例に対する臨床試験については、その登録を開始した。初期の 8 症例の検討では、本治療の有効性が示唆された。

次世代の血管再生治療を目指した基礎研究については、遺伝子改変マウスモデルを用いて、Notch シグナルの重要性について検証した。その結果、本治療により虚血組織に置ける Notch シグナルは活性化したが、その活性阻害によって本治療の効果は著しく低下したことから、本治療における Notch シグナルの活性化の重要性が示唆された。

重症虚血性心疾患に対する末梢血単核球細胞移植による血管再生治療に関しては、プラセボコントロール試験に先駆けて、まず用量エスカレーション試験を施行することが、臨床研究の評価委員会で決定されたため、プロトコールの一部を変更した。全例において、細胞移植を行う方針とし、登録を開始した。初期の 10 症例の検討では、本治療と因果関係の疑われる有害事象の報告はなかった。

D. 考察

初期の症例の検討では、本治療の安全性と有効性が示唆された。本研究により重症虚血性心血管疾患に対する有効性が確定すれば、エビデンスのある血管再生治療として多施設において臨床応用を進めることができる。また、末梢血単核球移植による筋組織再生メカニズムが解明されれば、その鍵分子を用いた新たな血管再生医療やレスポンドの選別方法の開発にもつながる。

E. 結論

重症虚血肢に対する末梢血単核球移植による血

管再生治療と重症虚血性心疾患に対する末梢血単核球細胞移植による血管再生治療の臨床研究登録が開始された。初期の症例の検討では、本治療の安全性と有効性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Ito, K., Akazawa, H., Tamagawa, M., Furukawa, K., Ogawa, W., Yasuda, N., Kudo, Y., Liao, C.H., Yamamoto, R., Sato, T., Molkenin, J.D., Kasuga, M., Noda, T., Nakaya, H., Komuro, I. PDK1 coordinates survival pathways and beta-adrenergic response in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:8689-8694, 2009.

・ Qin, Y., Yasuda, N., Akazawa, H., Ito, K., Kudo, Y., Liao, C.H., Yamamoto, R., Miura, S.I., Saku, K., Komuro, I. Multivalent ligand-receptor interactions elicit inverse agonist activity of AT(1) receptor blockers against stretch-induced AT(1) receptor activation. *Hypertens Res* 32:875-883, 2009.

・ Yoshida, M., Shiojima, I., Ikeda, H., Komuro, I. Chronic doxorubicin cardiotoxicity is mediated by oxidative DNA damage-ATM-p53-apoptosis pathway and attenuated by pitavastatin through the inhibition of Rac1 activity. *J Mol Cell Cardiol* 47:698-705, 2009.

・ Matsuura, K., Honda, A., Nagai, T., Fukushima, N., Iwanaga, K., Tokunaga, M., Shimizu, T., Okano, T., Kasanuki, H., Hagiwara, N., Komuro, I. Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest* 119:2204-2217, 2009.

・ Kayama, Y., Minamino, T., Toko, H., Sakamoto, M., Shimizu, I., Takahashi, H., Okada, S., Tateno, K., Moriya, J., Yokoyama, M., Nojima, A., Yoshimura, M., Egashira, K.,

Aburatani, H., Komuro, I. Cardiac 12/15

lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure. *J Exp Med* 206:1565-1574, 2009.

• Minamino, T., Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., Nojima, A., Nabetani, A., Oike, Y., Matsubara, H., Ishikawa, F., Komuro, I. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med* 15:1082-1087, 2009

• Ikeda, H., Shiojima, I., Ozasa, Y., Yoshida, M., Holzenberger, M., Kahn, C.R., Walsh, K., Igarashi, T., Abel, E.D., Komuro, I. Interaction of myocardial insulin receptor and IGF receptor signaling in exercise-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 47:664-675, 2009.

• Akazawa, H., Komuro, I. “Change Can Happen” by PKA: Proteasomes in in vivo Hearts. *J Mol Cell Cardiol* 46:445-447, 2009.

• Akazawa H, Yasuda N, Komuro, I. Mechanisms and functions of agonist-independent activation in the angiotensin II type 1 receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 302:140-147, 2009.

• Liao, C.H., Akazawa, H., Tamagawa, M., Ito, K., Yasuda, N., Kudo, Y., Yamamoto, R., Ozasa, Y., Fujimoto, M., Wang, P., Nakauchi, H., Nakaya, H., Komuro, I. Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. *J Clin Invest* 120:242-253, 2010.

• Moriya, J., Minamino, T., Tateno, K., Okada, S., Uemura, A., Shimizu, I., Yokoyama, M., Nojima, A., Okada, M., Koga, H., Komuro, I. Inhibition of semaphorin as a novel strategy for therapeutic angiogenesis. *Circ Res* 106:391-398, 2010.

2. 学会発表

(小室一成)

• 第46回日本臨床分子医学会 (平成21年4月12日、東京)「心不全の新しい発症機序と治療」

• 第17回アジア太平洋心臓病学会イブニングセミナー (平成21年5月21日、京都) “Molecular mechanism and new therapy for heart failure”

• ISHNE 2009 ファイアサイドセミナー (平成21年6月4日、神奈川) “Regeneration Therapy for Heart Failure”

• 日本循環器学会北海道地方会教育セッション (平成21年6月13日、北海道)「心不全の新しい発症機序と治療」

• 第19回日本心臓核医学会総会・学術大会 (平成21年6月26日、東京)「糖尿病における心臓の異常について」

• The 9th World Congress on Inflammation (July 9, 2009, Tokyo) “Regeneration Therapy For Heart Failure”

• 第15回日本遺伝子治療学会 (平成21年7月10日、大阪) “Molecular Mechanisms and Novel Treatments For Heart Failure”

• 第15回日本心臓リハビリテーション学会 (平成21年7月18日、東京)「骨格筋の再生を介した単核球によるPAD治療」

• Basic Cardiovascular Sciences Conference 2009-Molecular Mechanisms of Cardiovascular Diseases (July 20-23, 2009, Las Vegas, USA) “Wnt-IGFBP4 Signaling in the Heart”

• 第57回日本心臓病学会学術集会ランチョンセミナー (平成21年9月19日、北海道)「心不全の新しい発症機序と再生治療」

• Advances in heart development:from molecules to cures (Sep 28-Oct 3, 2009, Nice, France) “Wnt signaling regulates cardiomyocyte differentiation and cardiac remodeling”

• 第23回日本臨床内科医学会 (平成21年10月11日、埼玉)「心不全の新しい発症機序と再生治療」

• 第40回日本内科学会九州支部生涯教育講演会 (平成21年11月1日、福岡)「心不全の新しい発症機

序と再生治療」

- ・ The Third International Conference on Cell Therapy (IRICT) (Nov 12, 2009, Seoul, Korea)
“Long-Term Outcome of Therapeutic Neovascularization Using Peripheral Blood Mononuclear Cells for Limb Ischemia”
- ・ Zhongshan Lecture (Dec 7, 2009, Shanghai, China)
“The Role of Statin in the Treatment of Heart Failure”
- ・ SIRIC International Forum 2009: Theme: Imaging for Shedding light to Atherosclerosis (Dec 11, 2009, Seoul, Korea) “Senescence as a cause of atherosclerosis and therapeutic angiogenesis using peripheral blood mononuclear cells”
- ・ 第 23 回日本冠疾患学会ランチョンセミナー (平成 21 年 12 月 19 日、大阪) 「心血管発症抑制を目指した糖尿病治療戦略」
- ・ 2010 Angiotensin Gordon Conference (Feb 21-26, 2010 California, USA) “Molecular & Therapeutic implications of stretch-sensing by the AT1R”

- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | 該当なし |
| 2. 実用新案登録 | 該当なし |
| 3. その他 | 該当なし |

(南野 徹)

1. Minamino T. 血管再生治療の Update と次世代治療法の開発 第 54 回透析医学会学術集会・総会ランチョンセミナー
2. Minamino T. Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. 第 41 回日本動脈硬化学会総会シンポジウム
3. Minamino T, Komuro I. バージャー病に対する血管新生療法 第 50 回日本脈管学会総会 シンポジウム
4. Minamino T, Komuro I. Another phase of therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease. 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会 Plenary Session

H. 知的財産権の出願・登録状況

研究要旨

末梢血中に骨髄由来の血管内皮前駆細胞が存在することが報告されて以来、骨髄単核球細胞を用いた虚血性心血管疾患の治療は著しい早さでヒトへと臨床応用された。しかし未だにその明確な作用メカニズムは不明である。これに対して我々は、独自に末梢血単核球細胞の有用性について基礎的な検討を行った。その結果、末梢血単核球細胞は骨髄由来の単核球と比較して血管新生効果が勝るとも劣らないことなどを明らかにし、末梢血単核球細胞を用いたヒト重症末梢性動脈疾患に対する治療について臨床研究を開始した。これまでに 80 数例に対して本治療を行い、70%以上の症例に有用性を認めた。レスポonderとノンレスポonderとの臨床データの比較から、その治療効果は単核球移植により惹起される虚血組織における血管増殖因子の産生によることが明らかとなりつつある。そこで本研究では、末梢血単核球を用いた血管新生治療の有効性をさらに確認するため、重症間欠性跛行症例に対してプラセボをコントロールとした 2 重盲験試験を行う。さらに動物モデルを用いた基礎的な研究を進めることによって、次世代の血管再生治療の開発を行う。末梢性血管疾患による重症間欠性跛行 (Fontaine 2B 相当) を有する症例に対する臨床試験については、その登録を開始した。次世代の血管再生治療を目指した基礎研究も平行して進め、Notch シグナルの重要性について検証した。

A. 研究目的

我々はこれまでに末梢血単核球を用いた血管新生治療について基礎研究を重ねてきた。その結果、末梢血単核球は高度な血管新生効果を持つこと、その効果は骨髄由来の単核球と比較して、勝るとも劣らないことを見出した。重症末梢性動脈疾患を対象とした臨床研究を 2002 年 7 月より開始し、以後これまでに 80 例以上に対して本治療を行い、その安全性と有効性を確認した。

そこで本研究では、末梢血単核球を用いた血管新生治療の安全性や有効性をさらに確認するため、重症間欠性跛行症例に対してプラセボをコントロールとした 2 重盲験試験を行う。さらに動物モデルを用いた基礎的な研究を進めることによって、次世代の血管再生治療の開発、治療効果の予想指標の解明を行う。

B. 研究方法

(1) 重症虚血肢に対する末梢血単核球移植による血管再生治療

これまで、安静時疼痛や虚血性潰瘍のある重症下肢虚血患者を対象にパイロット研究を行ってきた。これらの対象者においては、倫理的に二重盲験とし難いため、本研究における対象は、末梢性血管疾患による重症間欠性跛行 (Fontaine 2B 相当) を有するが、従来の内科および外科的治療にても症状が改善せず、将来的に虚血症状の悪化が見込まれる患者とした。インフォームドコンセントを得た後、症例は細胞移植群とプラセボコントロール群の 2 群に無作為に分類する。治療前と移植治療 6 ヶ月後に、トレッドミル検査による最大歩行距離 (一次評価項目)、跛行出現距離、下肢血圧回復時間、ABPI、レーザードップラー、下肢シンチ、MRI、下肢動脈造影、QOL による判定 (二

次評価項目)を行い、治療効果を詳細に評価する。

(2) 次世代の血管生再治療を目指した基礎研究

我々は既に本治療の作用メカニズムの一部を解明した。その作用機序に Notch シグナルが重要であることも確認している。本研究では、次世代の再生治療を目指すため、そのシグナルの強弱と臨床効果との相関を検証するとともに、そのシグナルを増強することによって治療効果を増幅する方法を開発していく。

(倫理面への配慮)

(1) 動物を用いた研究は、千葉大学動物実験指針に基づき行う。遺伝子改変マウスの取り扱いや、拡散防止などについては、その指針に従って、十分注意を払いながら実験を行う。

(2)-1 研究対象個人の人権の庇護

患者自らの意志にて本申請医療を希望する場合のみ施行する。患者本人の意志を尊重するとともに、マスメディアからは可能な限り隔離し臨床成績発表の際にも患者のプライバシーに関わる情報の公表は避けるなど、最大限人権保護を優先するように努める。

(2)-2 同意を求める方法

添付説明文書にて末梢血単核球移植で発生する医学的合併症・効能・不利益・利益を十分に説明し、患者自らの意志にて移植医療を希望する場合のみ施行する。また細胞移植の実施中に患者さんより医療中断の意志が表明された際には即座に中止する。

(2)-3 個人への不利益ならびに危険性への配慮

本治療に同意を得られた患者については治療に不利益となる他疾患の有無をスクリーニングするための検査を治療前に全例について行う。治療後は入院中・外来通院を通じて合併症の早期発見とその早期対応に努める。

C. 研究結果

本年度は、末梢性血管疾患による重症間欠性跛行 (Fontaine 2B 相当) を有するが、従来の内科および外科的治療にても症状が改善せず、将来的に虚血症状の悪化が見込まれる症例に対する臨床試験について、その登録を開始した。

すでに初期の 8 例については、6 ヶ月後の評価が終了している。これらの症例においては、これまでのところ、有害事象の報告はなかった。最大歩行距離は、プラセボ群において悪化、もしくは不変である症例が多かったのに対して、治療群では、すべての症例において改善傾向を示した。跛行出現距離、下肢血圧回復時間についても、同様の傾向がみとめられた。ABPI については、両群間に差はみとめられなかった。

次世代の血管生再治療を目指した基礎研究については、遺伝子改変マウスモデルを用いて、Notch シグナルの重要性について検証した。その結果、本治療により虚血組織における Notch シグナルは活性化したが、その活性阻害によって本治療の効果は著しく低下したことから、本治療における Notch シグナルの活性化の重要性が示唆された。

D. 考察

初期の 8 症例の結果により、本治療の安全性と有効性が示唆された。今後、登録症例数を増やすことによって、本治療の有効性について、検証することが可能であると考えられた。

次世代の血管生再治療を目指した基礎研究では、Notch シグナルの重要性を確認することができた。今後は、Notch シグナルを活性化させるというストラテジーを用いて、より有効性の高い治療法を開発していく。

E. 結論

本治療は、末梢性血管疾患による重症間欠性跛行 (Fontaine 2B 相当) に対しても、安全かつ有効である可能性がある。また、Notch シグナルを標的とした、よ

り有効性の高い治療法の開発が可能である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Moriya J, Minamino T, Tateno K, Shimizu N, Kuwabara Y, Sato Y, Saito Y and Komuro I. Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. **Circ Cardiovasc Intervent** 2009; 2: 245-254.

2. 学会発表

1. Minamino T. 血管再生治療の Update と次世代治療法の開発 第 54 回透析医学会学術集会・総会 ランチョンセミナー
2. Minamino T. Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. 第 41 回日本動脈硬化学会総会シンポジウム
3. Minamino T, Komuro I. バージャー病に対する血管新生療法 第 50 回日本脈管学会総会 シンポジウム
4. Minamino T, Komuro I. Another phase of therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease. 第 74 回日本循環器学会総会・学術集会 Plenary Session

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

研究要旨

再生医療は多くの臓器・病態の分野において目覚ましい発展を遂げているが、虚血性疾患も例外ではない。虚血性心疾患、重症下肢虚血に対する血管再生治療が世界規模で行われているが、その安全性・有用性についてのエビデンスは不十分である。これに対して我々は、独自に末梢血単核球細胞の有用性について基礎的な検討を行った。その結果、末梢血単核球細胞は骨髄由来の単核球と比較して血管新生効果が勝るとも劣らないことなどを明らかにし、末梢血単核球細胞を用いたヒト重症末梢性動脈疾患に対する治療について臨床研究を開始した。これまでに 80 数例に対して本治療を行い、70%以上の症例に有用性を認めた。そこで本研究では、末梢血単核球を用いた血管新生治療の有効性をさらに確認するため、重症虚血性心疾患症例に対して用量エスカレーション試験を行う。当初は、プラセボをコントロールとした 2 重盲験試験を計画していたが、プロトコールを一部変更し、登録を開始した。

A. 研究目的

我々はこれまでに末梢血単核球を用いた血管新生治療について基礎研究を重ねてきた。その結果、末梢血単核球は高度な血管新生効果を持つこと、その効果は骨髄由来の単核球と比較して、勝るとも劣らないことを見出した。重症末梢性動脈疾患を対象とした臨床研究を 2002 年 7 月より開始し、以後これまでに 70 例以上に対して本治療を行い、その安全性と有効性を確認した。

そこで本研究では、末梢血単核球を用いた血管新生治療の安全性や有効性をさらに確認するため、重症虚血性心疾患症例に対して用量エスカレーション試験とプラセボをコントロールとした 2 重盲験試験を行う。

B. 研究方法

我々はウサギなどを用いた動物実験を重ね、慢性心筋虚血において、末梢血単核球を開胸下に心筋内に注射すると筋注部位の血管数の増加及び著明な血流改善を認め、その結果心機能の改善が得られることを確認した。また、同時に行ったテレ

メトリーを用いた心電図解析においても、単核球の心筋内注射に伴う有害不整脈の出現を認めなかった。以上の結果より、虚血性心疾患における末梢血単核球細胞移植は安全かつ有益であると考えた。特に冠動脈バイパス術との併用療法は従来の外科的治療では治療し得なかった心筋虚血を有する症例に対して効果的である可能性がある。このような背景から今回我々は従来の治療法にても虚血症状が改善しない重症虚血性心疾患患者を対象として、自家末梢血単核球細胞移植による血管新生治療を実施することを計画した。対象は、重症虚血性心疾患を有し、冠動脈バイパス術を施行予定であるが、バイパス術施行後も残存する心筋虚血領域があることが予測される患者とした。初期の 15 症例に対しては低用量、後期の 15 症例に対しては高用量の治療を行い、その治療効果と安全性についてバイパス術 6 ヶ月後に評価する。

（倫理面への配慮）

(1) 研究対象個人の人権の庇護

患者自らの意志にて本申請医療を希望する場合のみ施行する。患者本人の意志を尊重するとともに、

マスメディアからは可能な限り隔離し臨床成績発表の際にも患者のプライバシーに関わる情報の公表は避けるなど、最大限人権保護を優先するように努める。

(2) 同意を求める方法

添付説明文書にて末梢血単核球移植で発生する医学的合併症・効能・不利益・利益を十分に説明し、患者自らの意志にて移植医療を希望する場合のみ施行する。また細胞移植の実施中に患者さんより医療中断の意志が表明された際には即座に中止する。

(3) 個人への不利益ならびに危険性への配慮

本治療に同意を得られた患者については治療に不利益となる他疾患の有無をスクリーニングするための検査を治療前に全例について行う。治療後は入院中・外来通院を通じて合併症の早期発見とその早期対応に努める。

C. 研究結果

重症虚血性心疾患に対する末梢血単核球細胞移植による血管再生治療に関しては、プラセボコントロール試験に先駆けて、まず用量エスカレーション試験を施行することが、臨床研究の評価委員会で決定されたため、プロトコールの一部を変更した。全例において、細胞移植を行う方針とし、登録を開始した。

すでに初期の10症例について、6ヶ月後の評価を終了した。冠動脈バイパス後、バイパス血管に対してステント治療を施行した1症例については、ドロップアウト症例とした。本症例以外の症例においては、バイパス術に関連する合併症はみとめたが、本治療と関連のある有害事象は報告されなかった。

D. 考察

プラセボをコントロールとした2重盲験試験に

先駆けて、用量エスカレーション試験を行うことによって、適切な用量を再確認するとともに、評価項目について妥当性についても検証することができると考えられた。

低用量群においては、現在まで本治療と因果関係の疑われる有害事象の報告はなかった。

E. 結論

重症虚血性心疾患に対する末梢血単核球細胞移植による血管再生治療の臨床研究登録が開始された。低用量群においては、本治療と因果関係の疑われる有害事象の報告はなかった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

研究成果の刊行に関する一覧

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ito, K., Akazawa, H., Tamagawa, M., Furukawa, K., Ogawa, W., Yasuda, N., Kudo, Y., Liao, C.H., Yamamoto, R., Sato, T., Molkentin, J.D., Kasuga, M., Noda, T., Nakaya, H., <u>Komuro, I</u>	PDK1 coordinates survival pathways and beta-adrenergic response in the heart	Proc Natl Acad Sci USA	106	8689-8694	2009
Akazawa, H., <u>Komuro, I</u>	“Change Can Happen” by PKA: Proteasomes in in vivo Hearts	J Mol Cell Cardiol	46	445-447	2009
Akazawa, H., Yasuda, N., <u>Komuro, I</u>	Mechanisms and functions of agonist-independent activation in the angiotensin II type 1 receptor. Mol Cell Endocrinol	Mol Cell Endocrinol	302	140-147	2009
<u>Minamino, T.</u> , Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., Nojima, A., Nabetani, A., Oike, Y., Matsubara, H., Ishikawa, F., <u>Komuro, I</u>	A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance	Nat Med	15	1082-1087	2009
Qin, Y., Yasuda, N., Akazawa, H., Ito, K., Kudo, Y., Liao, C.H., Yamamoto, R., Miura, S.I., Saku, K., <u>Komuro, I</u>	Multivalent ligand-receptor interactions elicit inverse agonist activity of AT(1) receptor blockers against stretch-induced AT(1) receptor activation	Hypertens Res	82	875-883	2009
Yoshida, M., Shiojima, I., Ikeda, H., <u>Komuro, I</u>	Chronic doxorubicin cardiotoxicity is mediated by oxidative DNA damage-ATM-p53-apoptosis pathway and attenuated by pitavastatin through the inhibition of Rac1 activity	J Mol Cell Cardiol	47	698-705	2009
Matsuura, K., Honda, A., Nagai, T., Fukushima, N., Iwanaga, K., Tokunaga, M., Shimizu, T., Okano, T., Kasanuki, H., Hagiwara, N., <u>Komuro, I</u>	Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice	J Clin Invest	119	2204-2217	2009

研究成果の刊行に関する一覧

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kayama, Y., <u>Minamino, T.</u> , <u>Toko, H.</u> , Sakamoto, M., Shimizu, I., Takahashi, H., Okada, S., Tateno, K., Moriya, J., Yokoyama, M., Nojima, A., Yoshimura, M., Egashira, K., Aburatani, H., <u>Komuro, I</u>	Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure	J Exp Med	206	1565-1574	2009
Ikeda, H., Shiojima, I., Ozasa, Y., Yoshida, M., Holzenberger, M., Kahn, C.R., Walsh, K., Igarashi, T., Abel, E.D., <u>Komuro, I</u>	Interaction of myocardial insulin receptor and IGF receptor signaling in exercise-induced cardiac hypertrophy	J Mol Cell Cardiol	47	664-675	2009
Liao, C.H., Akazawa, H., Tamagawa, M., Ito, K., Yasuda, N., Kudo, Y., Yamamoto, R., Ozasa, Y., Fujimoto, M., Wang, P., Nakauchi, H., Nakaya, H., <u>Komuro, I</u>	Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts	J Clin Invest	120	242-253	2010
Moriya, J., <u>Minamino, T.</u> , Tateno, K., Okada, S., Uemura, A., Shimizu, I., Yokoyama, M., Nojima, A., Okada, M., Koga, H., <u>Komuro, I</u>	Inhibition of semaphorin as a novel strategy for therapeutic angiogenesis	Circ Res	106	391-398	2010

PDK1 coordinates survival pathways and β -adrenergic response in the heart

Kaoru Ito^a, Hiroshi Akazawa^a, Masaji Tamagawa^b, Kensuke Furukawa^c, Wataru Ogawa^c, Noritaka Yasuda^a, Yoko Kudo^a, Chien-hui Liao^a, Rie Yamamoto^a, Toshiaki Sato^b, Jeffery D. Molkentin^d, Masato Kasuga^c, Tetsuo Noda^a, Haruaki Nakaya^b, and Issei Komuro^{a,1}

Departments of ^aCardiovascular Science and Medicine and ^bPharmacology, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan; ^cDivision of Diabetes, Metabolism, and Endocrinology, Department of Internal Medicine, Kobe University Graduate School of Medicine, 7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan; ^dDepartment of Pediatrics, University of Cincinnati, Children's Hospital Medical Center, 3333 Burnet Avenue, Cincinnati, OH 45229; and ^eDepartment of Cell Biology, Japanese Foundation for Cancer Research, Cancer Institute, 3-10-6 Ariake, Koto-ku, Tokyo 135-8550, Japan

Edited by Eric N. Olson, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, and approved April 2, 2009 (received for review January 5, 2009)

The 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) plays an important role in the regulation of cellular responses in multiple organs by mediating the phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) signaling pathway through activating AGC kinases. Here we defined the role of PDK1 in controlling cardiac homeostasis. Cardiac expression of PDK1 was significantly decreased in murine models of heart failure. Tamoxifen-inducible and heart-specific disruption of *Pdk1* in adult mice caused severe and lethal heart failure, which was associated with apoptotic death of cardiomyocytes and β_1 -adrenergic receptor (AR) down-regulation. Overexpression of Bcl-2 protein prevented cardiomyocyte apoptosis and improved cardiac function. In addition, PDK1-deficient hearts showed enhanced activity of PI3-K γ , leading to robust β_1 -AR internalization by forming complex with β -AR kinase 1 (β ARK1). Interference of β ARK1/PI3-K γ complex formation by transgenic over-expression of phosphoinositide kinase domain normalized β_1 -AR trafficking and improved cardiac function. Taken together, these results suggest that PDK1 plays a critical role in cardiac homeostasis in vivo by serving as a dual effector for cell survival and β -adrenergic response.

AGC kinase | apoptosis | heart failure | receptor internalization

Heart failure, a major cause of morbidity and mortality worldwide, is a clinical syndrome in which the heart is incapable of pumping blood at a rate commensurate with systemic demands (1). Injurious stresses from extrinsic or intrinsic origins trigger the complex intracellular signaling pathways in cardiomyocytes and thereby activate the compensatory mechanisms involving alterations in survival and growth signals, calcium handling, and energy production (2). Simultaneously, the sympathetic nervous, renin-angiotensin-aldosterone, and cytokine systems are activated to cope with a decline in cardiac performance. Although these compensatory systems initially maintain cardiac function within a physiological range, prolonged activation of these systems paradoxically leads to cardiac damage and worsens clinical prognosis (2). Therefore, for the elucidation of the pathophysiology of heart failure, it is very important to dissect the inherent complexity of intracellular signaling pathways that coordinate the cellular homeostasis and neurohumoral responses in cardiomyocytes.

The 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is a member of the AGC serine/threonine kinase family that functions downstream of phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) and activates several AGC kinases, including Akt, p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K), and serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1), by phosphorylating these enzymes at their activation loops (3). The physiological functions of PDK1 have been investigated by targeted disruption of *Pdk1* gene. Mouse embryos systemically deficient for *Pdk1* were lethal during early embryogenesis, displaying multiple abnormalities that included lack of somites, forebrain, and neural crest-derived tissues (4). Alessi et al. (5) recently generated striated muscle-specific PDK1 conditional knockout mice (PDK1-MCKCre) by crossing mice harboring a "floxed" *Pdk1*

allele with transgenic mice expressing Cre recombinase under the control of the *muscle creatine kinase* (*MCK*) promoter. PDK1-MCKCre mice died of heart failure by 11 weeks of age. Interestingly, PDK1-MCKCre mice showed attenuation of cardiomyocyte cell growth and impairment of left ventricular (LV) contraction. It was reported that cardiomyocytes deficient for *Pdk1* were sensitive to hypoxia (5), and that ischemic preconditioning failed to protect *Pdk1*-hypomorphic mutant mice against myocardial infarction (MI) (6). However, the mechanisms of how PDK1 deficiency induces these cardiac abnormalities remain to be resolved.

In this study, we found that the expression levels of PDK1 protein were significantly decreased in the failing hearts of murine models. We generated tamoxifen-inducible and heart-specific PDK1 conditional knockout mice (PDK1-MerCre) to elucidate the relevance of PDK1 to the pathogenesis of heart failure. We disrupted the *Pdk1* gene in the adulthood and demonstrated that PDK1 plays a role in the regulation of normal cardiac function by preventing cardiomyocyte apoptosis and by preserving responsiveness to β -adrenergic stimulation.

Results

Generation of Tamoxifen-Inducible and Heart-Specific PDK1 Knockout Mice. We examined alterations in the expression levels of PDK1 in failing hearts. Heart failure was induced in mice by producing myocardial infarction or administering doxorubicin i.p. Two weeks after operation of myocardial infarction or doxorubicin injection, expression levels of PDK1 were significantly decreased in the failing hearts, compared with control hearts (Fig. S1).

To assess the pathophysiological significance of PDK1 down-regulation, we created a model of temporally regulated inactivation of *Pdk1* specifically in the adult hearts. We crossed *Pdk1*^{flox/flox} mice (7, 8) with transgenic mice expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase protein fused to two mutant estrogen-receptor ligand-binding domains (MerCreMer) under the control of the α -myosin heavy chain promoter (9). In the resulting *Pdk1*^{flox/flox}/MerCreMer⁺ mice (PDK1-MerCre) at the age of 10 weeks, we administered tamoxifen successively for 5 days and confirmed by immunoblot analysis that functional PDK1 expression was almost undetectable specifically in the hearts on day 7 after the initiation of tamoxifen treatment (Fig. S2A).

Next, we examined whether the activation of kinases downstream of PDK1 were suppressed in the hearts of PDK1-MerCre. In

Author contributions: H.A. and I.K. designed research; K.I., M.T., K.F., N.Y., Y.K., C.-h.L., and R.Y. performed research; K.F., J.D.M., and T.N. contributed new reagents/analytic tools; K.I., M.T., W.O., T.S., M.K., and H.N. analyzed data; and K.I., H.A., and I.K. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: komuro-ky@umin.ac.jp.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0900064106/DCSupplemental.

PDK1-MerCre hearts and further enhanced at 4 weeks after tamoxifen treatment (Fig. 1F). These results suggest that PDK1-MerCre mice exhibited cardiac dysfunction as early as 1 week after tamoxifen treatment and LV remodeling at 4 weeks.

It was reported that PDK1-MCKCre showed marked reduction both in the heart size and in cardiac contractility (5). Since the *MCK* promoter directs expression of Cre recombinase before birth (5, 12), retardation of heart growth that was not proportional to somatic growth after birth might lead to cardiac dysfunction. However, the surface areas of cardiomyocytes were not significantly different between PDK1-MerCre mice and control mice 1 week after tamoxifen treatment (Fig. 1G). Given that LV dysfunction was already observed as early as 1 week after tamoxifen treatment (Fig. 1C and D), we suppose that reduction of cardiomyocyte size is not critically involved in the impairment of LV contraction observed in PDK1-MerCre hearts.

Increased Cardiomyocyte Apoptosis in PDK1-MerCre Mice. We next examined whether cardiomyocyte apoptosis was involved in the pathogenesis of heart failure in PDK1-MerCre mice. TUNEL staining revealed that the number of apoptotic cells was dramatically increased in PDK1-MerCre hearts 1 week after tamoxifen treatment (Fig. 2A). TUNEL-positive cells were cardiomyocytes, because these cells were positively stained with anti-sarcomeric α -actinin antibody (Fig. 2B). In addition, immunostaining revealed an increase in cardiomyocytes positively stained for cleaved caspase-3 in PDK1-MerCre hearts (Fig. 2C). The prevalence of TUNEL-positive cardiomyocytes was $1.14 \pm 0.05\%$ of total cardiomyocytes (Fig. 2D). Therefore, cardiomyocyte loss through apoptotic cell death may play an important role in the pathogenesis of heart failure in PDK1-MerCre mice.

In the hearts of PDK1-MerCre, the expression level of proapoptotic Bax was increased, whereas those of anti-apoptotic molecules such as Bcl-2 and Bcl-xL were unchanged (Fig. 2E). SGK1 has been reported to be functionally anti-apoptotic in the hearts (13). The basal level of phosphorylated SGK1 was reduced in PDK1-MerCre hearts (Fig. 2F). It has been reported that SGK1, in concert with Akt, mediates cell survival by phosphorylating and inactivating the Forkhead transcription factor FOXO3a (13, 14). FOXO3a is phosphorylated at Thr-32 and Ser-315 by SGK1, and Akt favors the phosphorylation of Thr-32 and Ser-253 (14). In PDK1-MerCre hearts, phosphorylation levels of FOXO3a at Thr-32 and Ser-253 were significantly decreased (Fig. 2F). Collectively, these results suggest that up-regulation of Bax protein and reduction of Akt and SGK1 activity were potentially involved in enhancing susceptibility of cardiomyocytes to apoptosis in PDK1-MerCre mice.

Overexpression of Bcl-2 Protein Prevented Cardiomyocyte Apoptosis and Partially Rescued Cardiac Dysfunction in PDK1-MerCre Mice. To examine whether cardiomyocyte apoptosis plays a causative role in the pathogenesis of heart failure in PDK1-MerCre mice, we crossed PDK1-MerCre with transgenic mice with cardiac-specific overexpression of Bcl-2 (Bcl2-Tg mice) (15). In PDK1-MerCre \times Bcl2-Tg hearts, the number of TUNEL-positive cardiomyocytes was significantly decreased in comparison with PDK1-MerCre hearts (Fig. 2G), and the %FS showed partial but significant improvement (Fig. 2H). These results suggest that cardiac dysfunction is caused in part by cardiomyocyte loss through apoptosis in PDK1-MerCre mice.

Impairment of β -adrenergic Responsiveness in PDK1-MerCre Hearts. Incomplete restoration of cardiac function by prevention of cardiomyocyte apoptosis implies that some functional abnormalities persist in viable cardiomyocytes in PDK1-MerCre mice. To determine whether β -adrenergic responsiveness was changed in PDK1-MerCre hearts, we carried out Langendorff perfusion analysis in the hearts 1 week after tamoxifen treatment, and evaluated responsiveness to isoproterenol, a β -AR agonist, and forskolin, an activator of adenylate cyclase that increases cAMP independently

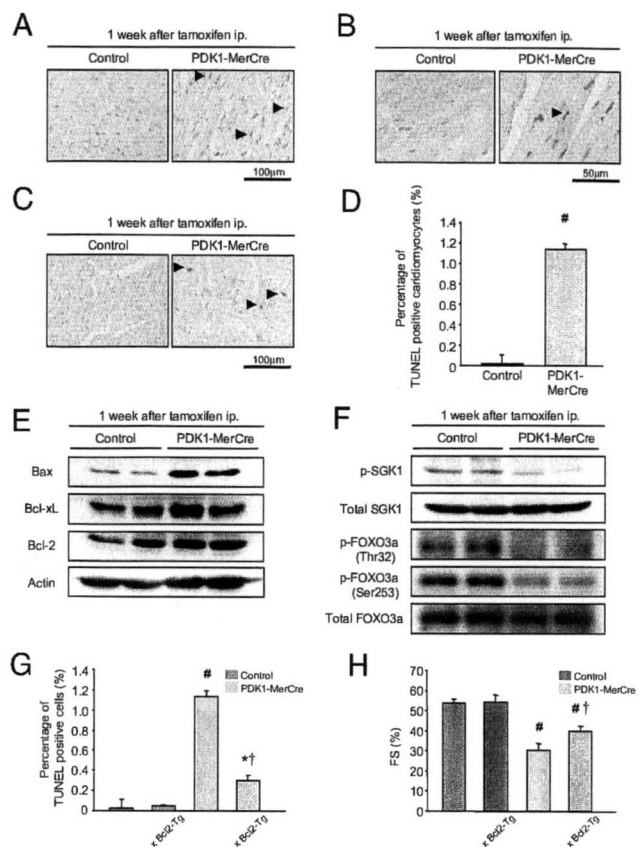


Fig. 2. Cardiomyocyte apoptosis in the pathogenesis of heart failure in PDK1-MerCre mice. (A) TUNEL staining. Arrowheads indicate TUNEL-positive cardiomyocytes. (B) Double staining for TUNEL staining (brown) and sarcomeric α -actinin (red). Arrowheads indicate TUNEL-positive cardiomyocytes. (C) Immunostaining for cleaved caspase-3. Arrowheads indicate cardiomyocytes positively stained for cleaved caspase-3. (D) Percentage of TUNEL-positive cardiomyocytes. Values represent the mean \pm SEM (3,000 cardiomyocytes in each group). #, $P < 0.01$ versus control group. (E) Immunoblot analysis of Bcl-2 family proteins in the hearts. (F) Immunoblot analysis of phosphorylated-SGK1 at Ser-78, total SGK1, phosphorylated-FOXO3a at Thr-32 or at Ser-253, and total FOXO3a in the hearts. (G) Percentage of TUNEL-positive cardiomyocytes in control, Bcl2-Tg, PDK1-MerCre, and PDK1-MerCre \times Bcl2-Tg mice. Values represent the mean \pm SEM (3,000 cardiomyocytes in each group). #, $P < 0.01$ versus control group; *, $P < 0.05$, versus control group; †, $P < 0.01$ versus PDK1-MerCre group. (H) Measurement of fractional shortening of control, Bcl2-Tg, PDK1-MerCre, and PDK1-MerCre \times Bcl2-Tg mice by echocardiography. Values represent the mean \pm SEM of data from control mice ($n = 10$), control \times Bcl2-Tg mice ($n = 6$), PDK1-MerCre mice ($n = 10$), and PDK1-MerCre \times Bcl2-Tg mice ($n = 6$). #, $P < 0.01$ versus control mice. †, $P < 0.01$ versus PDK1-MerCre mice. FS, % of fractional shortening.

of β -AR. As shown in Fig. 3A, the baseline parameters of $+dp/dt$ and $-dp/dt$ were significantly lower in PDK1-MerCre mice than in control mice. Both isoproterenol and forskolin induced positive chronotropic and inotropic responses in control mice (Fig. 3A). However, PDK1-MerCre mice showed a significant reduction in the maximal changes in HR, $+dP/dt$, and $-dP/dt$ after the stimulation of isoproterenol (1×10^{-8} M), compared with control mice (Fig. 3B). In contrast, the maximal changes in these parameters after the stimulation of forskolin (1×10^{-7} M) did not differ significantly between PDK1-MerCre and control mice (Fig. 3B). These results suggest that the responsiveness of β -AR is impaired in PDK1-MerCre mice.

Next, we measured the amount of β_1 -AR in the membrane fraction by immunoblot analysis. In PDK1-MerCre hearts, the expression levels of β_1 -AR in membrane fraction were markedly

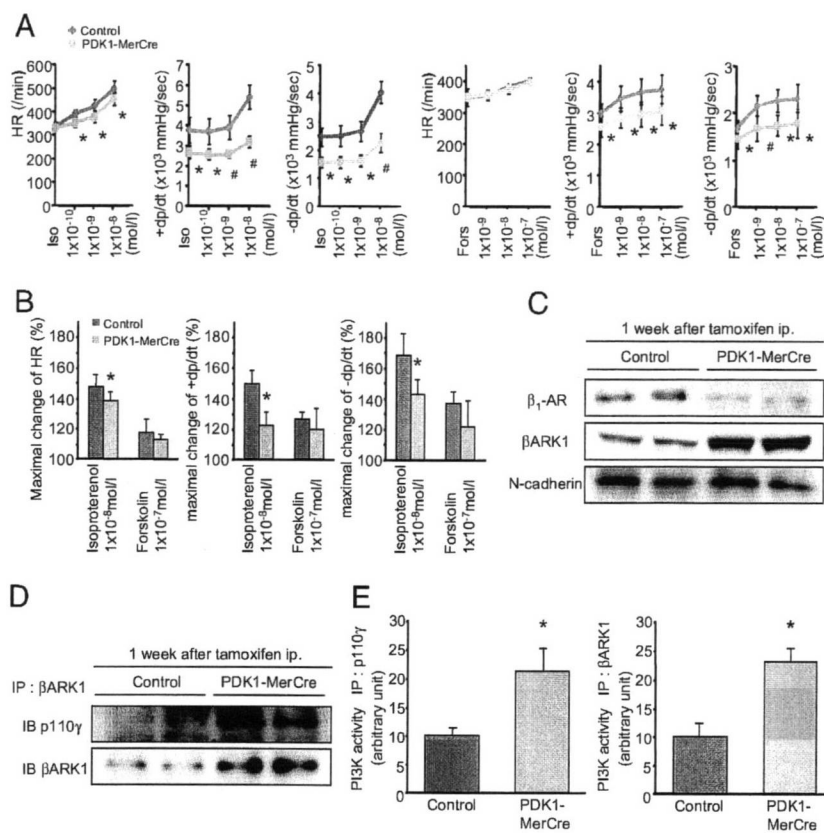


Fig. 3. Impaired β -adrenergic responsiveness in PDK1-MerCre mice. (A) Effects of isoproterenol and forskolin on heart rate, contraction, and relaxation in Langendorff-perfused mouse hearts 1 week after tamoxifen treatment. +dp/dt, maximum rate of LV pressure development; -dp/dt, maximum rate of LV pressure decline; HR, heart rate. Values represent the mean \pm SEM. *, $P < 0.05$ versus control group, #, $P < 0.01$ versus control group. (B) The % changes in HR, +dp/dt, and -dp/dt before and after treatment with isoproterenol (1×10^{-8} M) or forskolin (1×10^{-7} M) were calculated. Values represent the mean \pm SEM. *, $P < 0.05$ versus control group. (C) Immunoblot analysis of β_1 -AR and β ARK1 in membrane fraction of the hearts. N-cadherin was used as an internal control for the amount of membrane protein. (D) Immunoblot analysis of β ARK1-associated p110 γ protein in the hearts. (E) Kinase assays for PI3-K activity. The hearts were subjected to immunoprecipitation with antibody to p110 γ , or β ARK1, and the resulting precipitates were assayed for the kinase assay. PI3-K activity of control mice was adjusted to 10 arbitrary units.

down-regulated (Fig. 3C). Inversely, the amount of β_1 -AR in cytosolic fraction was increased in PDK1-MerCre hearts, compared with control hearts, while the total amount of β_1 -AR was unchanged (Fig. S3A and B), suggesting that receptor internalization underlies β_1 -AR down-regulation in membrane fraction of PDK1-MerCre hearts. In response to β -AR stimulation, increased cAMP activates protein kinase A (PKA), which directly phosphorylates phospholamban (PLN) at Ser-16. PDK1-MerCre hearts showed a significant decrease in cAMP concentrations (Fig. S3C) and phosphorylation level of PLN at Ser-16 (Fig. S3D), compared with control hearts. Phosphorylated PLN dissociates from sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase2 (SERCA2) and thereby enhances Ca^{2+} uptake by SERCA2, which leads to enhancement of cardiac contractility (2). These results suggest that, in PDK1-MerCre hearts, robust β_1 -AR internalization leads to contractile dysfunction.

It has been reported that phosphorylation of β -AR by β -AR kinase 1 (β ARK1, commonly known as G protein-coupled receptor kinase 2) regulates receptor internalization (16). In the hearts of PDK1-MerCre mice 1 week after tamoxifen treatment, the expression levels of β ARK1 (Fig. 3C) and β ARK1-associated p110 γ , a catalytic subunit of PI3-K γ , were increased (Fig. 3D). Notably, PI3-K activity immunoprecipitated with antibodies to either p110 γ or β ARK1 was enhanced (Fig. 3E) in PDK1-MerCre hearts. β ARK1 forms complex with PI3-K γ through the phosphoinositide kinase (PIK) domain, and protein kinase activity of PI3-K γ in this complex is required for receptor internalization (17). Therefore, these results suggest that enhanced PI3-K γ activity in PDK1-MerCre hearts increases β ARK1/PI3-K γ complex formation, and that β ARK1 phosphorylates β -AR to cause robust receptor internalization.

Disruption of β ARK1/PI3-K γ Complex Restored β -AR Internalization and Partially Rescued Cardiac Dysfunction in PDK1-MerCre Mice. To corroborate that enhanced PI3-K γ activity promotes β -AR inter-

nalization by forming complex with β ARK1 and that robust β -AR internalization causes cardiac dysfunction, we examined whether disruption of the β ARK1/PI3-K γ complex normalizes β -AR trafficking and improves cardiac function in PDK1-MerCre mice. For that purpose, we crossed PDK1-MerCre mice with transgenic mice harboring cardiac-specific overexpression of PIK domain (PIK-Tg mice) (16), which competitively inhibits the association between β ARK1 and PI3-K γ . The amount of β ARK1-associated p110 γ protein was significantly decreased in PDK1-MerCre \times PIK-Tg mice, compared with PDK1-MerCre mice (Fig. 4A). Importantly, β ARK1-associated PI3-K activity was markedly decreased in PDK1-MerCre \times PIK-Tg mice, compared with PDK1-MerCre mice (Fig. 4B, Lower), although total PI3-K γ activity remained elevated (Fig. 4B, Upper). As a consequence, in PDK1-MerCre \times PIK-Tg mice 1 week after tamoxifen treatment, the expression levels of β_1 -AR in membrane fraction were restored (Fig. 4C). The %FS in echocardiographic examination showed partial but significant improvement (Fig. 4D). Overexpression of PIK domain did not influence cardiomyocyte apoptosis, because the prevalence of TUNEL-positive cardiomyocytes (Fig. 4E), as well as the amount of cleaved poly(ADP-ribose) polymerase, Bax, and phosphorylated FOXO3a (Fig. S4), was unchanged in PDK1-MerCre hearts. In addition, overexpression of Bcl-2 protein did not influence β -adrenergic response, because the amount of β ARK1-associated p110 γ protein (Fig. 4A), β ARK1-associated PI3-K activity (Fig. 4B), the expression levels of membranous β_1 -AR (Fig. 4C), as well as cAMP concentration and phosphorylation levels of PLN at Ser-16 (Fig. S5), were unchanged in PDK1-MerCre hearts. These results suggest that enhancement of β ARK1-associated PI3-K γ activity induces robust β -AR internalization, and thereby contributes to cardiac dysfunction, independently of cardiomyocyte apoptosis, in PDK1-MerCre mice.

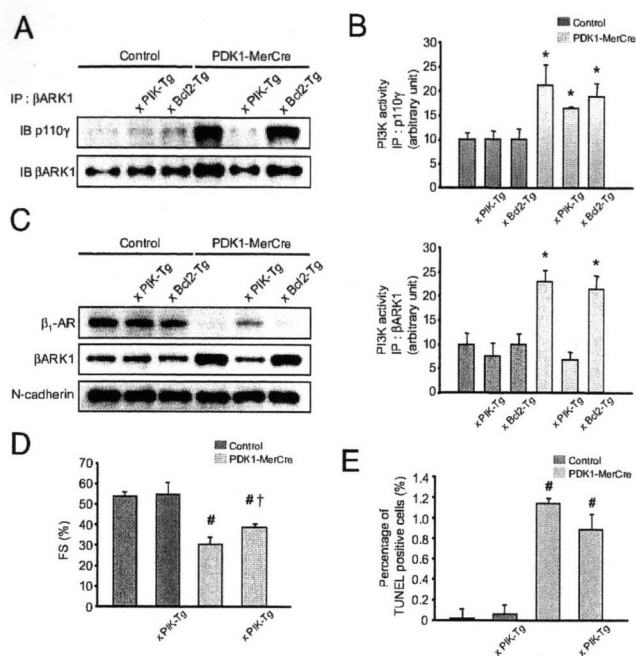


Fig. 4. Alleviated cardiac dysfunction in PDK1-MerCre mice by overexpression of PIK domain or Bcl-2 protein. (A) Immunoblot analysis of β ARK1-associated p110 γ protein in the hearts. (B) Kinase assays for PI3-K activity in the hearts. The hearts were subjected to immunoprecipitation with antibody to p110 γ (Upper) or β ARK1 (Lower), and the resulting precipitates were assayed for the kinase activity. PI3-K activity of control mice was adjusted to 10 arbitrary units. (C) Immunoblot analysis of β_1 -AR and β ARK1 in membrane fraction in the hearts. N-cadherin was used as an internal control for the amount of membrane protein. (D) Fractional shortening measured by echocardiography. Values represent the mean \pm SEM of data from control mice ($n = 10$), control \times PIK-Tg mice ($n = 6$), PDK1-MerCre mice ($n = 10$), and PDK1-MerCre \times PIK-Tg mice ($n = 6$). #, $P < 0.01$ versus control mice. †, $P < 0.01$ versus PDK1-MerCre mice. FS, % of fractional shortening. (E) Percentage of TUNEL-positive cardiomyocytes. Values represent the mean \pm SEM (3,000 cardiomyocytes in each group). #, $P < 0.01$ versus control group. †, $P < 0.01$ versus PDK1-MerCre group.

Discussion

Our present study revealed that PDK1 plays an integrative role in normal cardiac function by coordinating survival signals and β -adrenergic response (Fig. S6). Besides the fundamental role in promoting cell growth and survival observed in many tissues in common (18–21), PDK1 uniquely accommodates β -adrenergic response to prevent cardiac decompensation. In addition, decreased expression of PDK1 protein in experimental models of heart failure raises a possibility that functional alterations of PDK1 may be implicated in the pathogenesis of heart failure, although it remains unclear how PDK1 expression is regulated in stressed hearts.

β -AR signaling plays a pivotal role in the chronotropic and inotropic functions in the hearts (22). In PDK1-MerCre hearts, the activity of β ARK1-associated PI3-K γ was enhanced, which enforced robust β_1 -AR down-regulation. PDK1 is a direct downstream effector of PI3-K and may participate in the negative feedback regulation of PI3-K signaling pathway (20). Importantly, overexpression of PIK-domain prevented β_1 -AR down-regulation by interfering β ARK1/PI3-K γ complex formation, and alleviated cardiac dysfunction in PDK1-MerCre mice. A recent report demonstrated that PI3-K γ negatively modulates cardiac contractility by promoting phosphodiesterase 3B-mediated destruction of cAMP in a kinase-independent manner (23), but we did not observe significant change in the activity of phosphodiesterase 3B in PDK1-

MerCre hearts despite enhanced PI3-K γ activity (Fig. S7). Therefore, we suppose that impairment of β -adrenergic responsiveness results from intense β -AR down-regulation in PDK1-MerCre hearts.

It remains controversial whether down-regulation and desensitization of β -AR function is beneficial or detrimental in failing hearts. Indeed, clinical trials have indicated that the use of β -AR antagonists improves morbidity and mortality in patients of heart failure (1). Sustained β -AR overstimulation promotes energy consumption and apoptosis in cardiomyocytes (1, 24). But, accumulating evidence has suggested that normalization of β -adrenergic signaling by interfering β ARK1 function rescued numerous genetic and experimental models of heart failure in mice (16, 25–28). A possible explanation for this discrepancy is that the therapeutic window for optimal level of β -AR signaling may be narrow in failing hearts (22, 28). It has been reported that the proapoptotic effect of β_1 -AR stimulation is dependent on Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) (24). The phosphorylation level of CaMKII was decreased in PDK1-MerCre hearts, and restored to a subnormal level by overexpression of PIK domain (Fig. S8). Importantly, normalization of β_1 -AR did not induce excessive activation of CaMKII and cardiomyocyte apoptosis (Fig. 4E and Fig. S4). Thus, the β_1 -AR normalization may improve contractile function without evoking a ‘fight or flight’ reaction, unlike the simple β_1 -AR activation. Alternatively, robust β -AR internalization may activate adverse intracellular signaling pathways through β -arrestins (29) and abrogate the cardioprotective effects mediated by transactivation of epidermal growth factor receptor (30). Further investigations will be required to clarify the entire mechanisms of how normalization of β -AR signaling confers therapeutic benefits on failing hearts.

A growing body of evidence has suggested that cardiomyocyte apoptosis plays an important role in the pathogenesis of heart failure (31). In PDK1-MerCre hearts, the phosphorylation levels of Akt, SGK1 and FOXO3a were reduced, which may give rise to marked increase in cardiomyocyte apoptosis. In addition, PDK1-MerCre hearts showed an increase in expression level of Bax protein, a key molecule that translocates to the mitochondrial membrane and triggers the release of cytochrome c into the cytoplasm (31). Overexpression of Bcl-2 attenuated apoptotic loss of cardiomyocytes and alleviated cardiac dysfunction in PDK1-MerCre mice, suggesting that cardiomyocyte apoptosis contributes to the development of heart failure.

The previous paper demonstrated that PDK1-MCKCre mice showed growth retardation and contractile dysfunction of cardiomyocytes (5). In our study, PDK1-MerCre mice showed severe heart failure without alterations in cardiomyocyte size. Besides regulation of cell growth, PDK1 controls cardiac homeostasis by promoting cell survival and preserving β -AR response. The phenotypic difference between PDK1-MerCre mice and PDK1-MCKCre mice resulted from the timing of gene disruption. The *Pdk1* gene was deleted within a week in tamoxifen-treated PDK1-MerCre hearts of adult mice, but in contrast, *Pdk1* disruption commenced before birth in PDK1-MCKCre mice. The number of apoptotic cardiomyocytes was pronouncedly increased in PDK1-MerCre hearts, but was unchanged in PDK1-MCKCre hearts (5). Some compensation mechanisms may prevent proapoptotic effects of *Pdk1* disruption in PDK1-MCKCre mice.

In conclusion, PDK1 is a pivotal effector with dual functions to promote survival of cardiomyocytes and to preserve β -AR response in vivo (Fig. S6). In this regard, up-regulation of PDK1 in the hearts may emerge as a potential therapeutic strategy for heart failure.

Methods

Generation of PDK1-MerCre Mice. Mice harboring a *Pdk1*^{fllox} allele were previously described (7, 8). Mice expressing MerCreMer under the control of α -myosin heavy chain promoter were previously described (9). Details are in *SI Methods*. Bcl2-Tg mice and PIK-Tg mice were kindly gifted by Dr. Michael D. Schneider (Imperial

College, London, U.K.) (15) and Dr. Howard A. Rockman (Duke University Medical Center, Durham, NC) (16). All of the experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Chiba University.

Echocardiography and Isolated Heart Preparation. Transthoracic echocardiography was performed on conscious mice with Vevo 660 Imaging System using a 25-MHz linear probe (Visual Sonics Inc.). For analyses of hemodynamic parameters, hearts were excised rapidly and mounted on a Langendorff perfusion system, and a balloon was inserted into the cavity of the left ventricle (32). Isolated hearts were stabilized for 30 min by perfusion of Krebs-Henseleit buffer followed by perfusion of isoproterenol (NIKKEN Chemical Laboratory) or forskolin (Sigma). For measurement of surface areas of cardiomyocytes, hearts were enzymatically dissociated as described previously (33).

Histological Analysis and Immunohistochemistry. Hearts were excised and immediately fixed in 10% neutralized formalin, embedded in paraffin. Serial sections at 5 μ m were stained with hematoxylin and eosin for morphological analysis, and with Masson's trichrome for detection of fibrosis. For immunohistochemistry, Vectastain ABC kit (Vector Laboratories) was used to detect the primary antibodies. TUNEL assay was performed on paraffin sections, using an in situ apoptosis detection kit (Takara Bio Inc.).

Western Blot Analysis and Subcellular Fractionation. Protein samples were fractionated by SDS/PAGE, and immunoblot analysis was performed as described

previously (34). The membrane and cytosol fractions were isolated from lysate of the hearts as previously described (35).

Assay for PI3-K Activities. PI3-K activity was measured as previously described (36). We determined Akt activity using a Akt Kinase Assay Kit according to the manufacturer's protocol (Cell Signaling Technology).

Antibodies. The following antibodies were used: p110 γ , phosphorylated-SGK, and cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology), β ARK1, Bax, Bcl-xL, Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology), β_1 -AR (Affinity BioReagents), N-cadherin (Zymed Laboratories Inc.), SGK1, FOXO3a, phosphorylated-FOXO3a (Thr-32), phosphorylated-FOXO3a (Ser-253) (Upstate) and actin (Sigma).

Statistical Analysis. All data are presented as means \pm SEM. All data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Fisher procedure for comparison of means. A probability value of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Drs. M. D. Schneider and H. A. Rockman for generously providing Bcl2-Tg and PIK-Tg mice, respectively. We thank M. Akao and Y. Oike for technical advice, and A. Furuyama, M. Ikeda, Y. Ohtsuki, and I. Sakamoto for their excellent technical assistance. This work was supported in part by grants from the Japanese Ministry of Education, Science, Sports, and Culture, and Health and Labor Sciences Research Grants (to IK and HA); grants from Japan Intractable Diseases Research Foundation, Kowa Life Science Foundation, and Takeda Science Foundation (to HA).

1. Katz AM (2008) The "modern" view of heart failure: How did we get here?. *Circ Heart Fail* 1:63–71.
2. Mudd JO, Kass DA (2008) Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451:919–928.
3. Toker A, Newton AC (2000) Cellular signaling: Pivoting around PDK-1. *Cell* 103:185–188.
4. Lawlor MA, et al. (2002) Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *EMBO J* 21:3728–3738.
5. Mora A, et al. (2003) Deficiency of PDK1 in cardiac muscle results in heart failure and increased sensitivity to hypoxia. *EMBO J* 22:4666–4676.
6. Budas GR, Sukhodub A, Alessi DR, Jovanovic A (2006) 3'Phosphoinositide-dependent kinase-1 is essential for ischemic preconditioning of the myocardium. *FASEB J* 20:2556–2558.
7. Sakae H, et al. (2003) Requirement for 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) in insulin-induced glucose uptake in immortalized brown adipocytes. *J Biol Chem* 278:38870–38874.
8. Inoue H, et al. (2006) Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab* 3:267–275.
9. Sohal DS, et al. (2001) Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res* 89:20–25.
10. Williams MR, et al. (2000) The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr Biol* 10:439–448.
11. Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell* 129:1261–1274.
12. Bruning JC, et al. (1998) A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2:559–569.
13. Aoyama T, et al. (2005) Serum and glucocorticoid-responsive kinase-1 regulates cardiomyocyte survival and hypertrophic response. *Circulation* 111:1652–1659.
14. Brunet A, et al. (2001) Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* 21:952–965.
15. Imahashi K, Schneider MD, Steenbergen C, Murphy E (2004) Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 95:734–741.
16. Perrino C, et al. (2005) Restoration of beta-adrenergic receptor signaling and contractile function in heart failure by disruption of the betaARK1/phosphoinositide 3-kinase complex. *Circulation* 111:2579–2587.
17. Naga Prasad SV, Jayatilake A, Madamanchi A, Rockman HA (2005) Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* 7:785–796.
18. Mora A, Lipina C, Tronche F, Sutherland C, Alessi DR (2005) Deficiency of PDK1 in liver results in glucose intolerance, impairment of insulin-regulated gene expression and liver failure. *Biochem J* 385:639–648.
19. Hashimoto N, et al. (2006) Ablation of PDK1 in pancreatic beta cells induces diabetes as a result of loss of beta cell mass. *Nat Genet* 38:589–593.
20. Okamoto Y, et al. (2007) Restoration of glucokinase expression in the liver normalizes postprandial glucose disposal in mice with hepatic deficiency of PDK1. *Diabetes* 56:1000–1009.
21. Belgardt BF, et al. (2008) PDK1 deficiency in POMC-expressing cells reveals FOXO1-dependent and -independent pathways in control of energy homeostasis and stress response. *Cell Metab* 7:291–301.
22. Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 415:206–212.
23. Patrucco E, et al. (2004) PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118:375–387.
24. Zhu WZ, et al. (2003) Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca2+/calmodulin kinase II. *J Clin Invest* 111:617–625.
25. Harding VB, Jones LR, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Rockman HA (2001) Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5809–5814.
26. Shah AS, et al. (2001) In vivo ventricular gene delivery of a beta-adrenergic receptor kinase inhibitor to the failing heart reverses cardiac dysfunction. *Circulation* 103:1311–1316.
27. Nienaber JJ, et al. (2003) Inhibition of receptor-localized PI3K preserves cardiac beta-adrenergic receptor function and ameliorates pressure overload heart failure. *J Clin Invest* 112:1067–1079.
28. Raake PW, et al. (2008) G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circ Res* 103:413–422.
29. Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308:512–517.
30. Noma T, et al. (2007) Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J Clin Invest* 117:2445–2458.
31. Foo RS, Mani K, Kitsis RN (2005) Death begets failure in the heart. *J Clin Invest* 115:565–571.
32. Suzuki M, et al. (2001) Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res* 88:570–577.
33. Sambrano GR, et al. (2002) Navigating the signalling network in mouse cardiac myocytes. *Nature* 420:712–714.
34. Akazawa H, et al. (2004) Diphtheria toxin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in mouse model of heart failure. *J Biol Chem* 279:41095–41103.
35. Takeishi Y, Jalili T, Ball NA, Walsh RA (1999) Responses of cardiac protein kinase C isoforms to distinct pathological stimuli are differentially regulated. *Circ Res* 85:264–271.
36. Sakae H, et al. (1997) Phosphoinositide 3-kinase is required for insulin-induced but not for growth hormone- or hyperosmolarity-induced glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 11:1552–1562.