

200911012A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

心筋細胞死誘導による
心不全発症の新規モデルマウスの開発
(H20-生物資源-一般-001)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 赤澤 宏

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

心筋細胞死誘導による心不全発症の新規モデルマウスの開発 ----- 1

赤澤 宏

II. 分担研究報告

1. 動物モデルに対する薬物治療の効果判定 ----- 7

小室 一成

2. 心不全誘導のプロトコールの検討 ----- 11

塩島 一朗

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 13

IV. 研究成果の刊行物・別冊 ----- 16

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

心筋細胞死誘導による心不全発症の新規モデルマウスの開発

研究代表者 赤澤 宏 千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学 特任講師

研究要旨 心不全の創薬研究の推進のために、心不全発症の経過を自在にコントロールできる新規の心不全モデルマウスの作製を行っている。マウス作製のためのトランスジーンが培養細胞系で機能することを確認した後に、トランスジェニックマウスの作製を行った。しかし、心筋細胞におけるトランスジーンの発現に問題点があり、作成デザインの変更を検討している。タモキシフェンおよびジフテリア毒素の投与に関して、細胞死の誘導効率や安全性について検討し、投与プロトコールの最適化を行った。

(研究代表者)

赤澤 宏 千葉大学大学院医学研究院
循環病態医科学特任講師

(研究分担者)

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

塩島 一朗 大阪大学大学院医学系研究科
先進心血管治療学寄附講座
准教授

A. 研究目的

わが国では生活習慣の欧米化や高齢化にともなわぬ心不全患者が急増しているが、心不全の予後は依然として不良であり、心不全に対する創薬のニーズは非常に高い。創薬研究には、標的分子の同定や薬効試験、安定性検定のためにモデル動物が必要である。心不全は、心筋障害や心筋細胞死をトリガーとして、残存心筋に過剰な血行力学的負荷がかかることで構築変化が生じ発症すると考えられる。

本研究の目的は、心筋細胞死誘導による心不全発症のモデルマウスを確立し、創薬に役立てることである。私たちはジフテリア毒素（DT）による心不全モデルマウスを作製した。DT受容体はヘパリン結合性EGF様増殖因子前駆体（proHB-EGF）であるが、マウス proHB-EGF は DT 受容体として機能

しない。心筋特異的にヒト proHB-EGF 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスでは、DT 投与によって受容体を発現する心筋細胞が細胞死を生じる。しかし、このマウスでは約 17%の心筋細胞しか DT 受容体を発現しておらず、量的に多様な心筋細胞死を誘導することができない。そこで、全ての心筋細胞で DT 受容体の発現誘導が可能で、任意に心筋細胞死の割合を制御することで、心不全発症の経過を自在にコントロールできる新規モデルマウスの作製を計画した。

B. 研究方法

動物モデルの開発と解析

Chicken β -actinプロモーター/サイトメガロウイルスエンハンサーの下流に、loxP配列で挟まれた β -galactosidase遺伝子、その下流にヒト proHB-EGF遺伝子を組み込んだトランスジーンを作製した。このトランスジーンを用いてトランスジェニックマウス（CAG inducible proHBEGFマウス）を作製した。F1マウスに対して、トランスジーン発現パターンについて心臓組織をX-gal染色することで検討を行った。

心不全誘導のプロトコールの検討

約 17%の心筋細胞においてジフテリア毒素受容

体を恒常的に発現するモデルマウスの作製は完了している。このモデルマウスを用いて、DT を用量と投与回数を変えて投与し、心筋細胞死誘導の時間的・空間的な制御が可能であるか検討を行った。

DT 受容体を発現する心筋細胞を *in situ* hybridization 法により同定し、DT 投与後に生存している受容体発現細胞の推移を調べた。

動物モデルに対する薬物治療の効果判定

タモキシフェン投与によって心筋特異的に Cre 発現を誘導できる MerCreMer マウスを用いて、タモキシフェン投与による心機能に与える影響について検討を行った。これまでは、タモキシフェンを 20 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回、5 日間腹腔内投与することで、全ての心筋細胞において Cre/loxP による遺伝子組換えを誘導することができることを確認していたが、floxed アレルを有していないコントロールマウスにおいても一過性の心機能低下が生じる場合があった。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、千葉大学動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこない、実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

C. 研究結果

動物モデルの開発と解析

Chicken β -actinプロモーター/サイトメガロウイルスエンハンサーの下流に、loxP配列で挟まれた β -galactosidase遺伝子、その下流にヒト proHB-EGF遺伝子を組み込んだトランスジーンを作成した。このトランスジーンはCOS7細胞に遺伝子導入すると β -galactosidase遺伝子が発現して

X-gal染色で青染すること、およびCreの発現ベクターと共に遺伝子導入するとヒトproHB-EGF遺伝子の発現が誘導されることが確認されている。

このトランスジーンを用いてトランスジェニックマウス (CAG inducible proHBEGFマウス) を作成した。Germline transmissionが確認できたF1マウスにおいて、トランスジーン発現パターンを X-gal染色により検討した。その結果、2回のインジェクションで得られたF1マウスのすべてのラインにおいて、トランスジーン発現がモザイク状で、発現比率にも個体差が見られた。Chicken β -actinプロモーター/サイトメガロウイルスエンハンサーではマウス心臓においてすべての心筋細胞でトランスジーン発現誘導が難しいと考え、心筋特異的 α -myosin heavy chainプロモーターを用いたトランスジーンを作成することとした。

心不全誘導のプロトコールの検討

DT は 5%ラクトースを含む 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) に溶解し、マウス大腿筋へ筋肉内投与した。

5 mg/kg の 1 回投与ですべての DT 受容体発現細胞が 1 週間後に消失した。また、 2×10^{-2} mg/kg を 2 週間毎に 5 回投与行った場合にも、DT 受容体発現細胞はすべて消失することが確認された。

動物モデルに対する薬物治療の効果判定

コーンオイルに溶解したタモキシフェンを 20 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回、5 日間腹腔内投与した場合、投与後 3 日目から 14 日目にかけて一過性の心機能低下を認める個体があった。そこで、6 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回、14 日間腹腔内投与を行ったところ、このような一過性の心機能低下を認める個体は見られなくなった。MerCreMer マウスと Cre/loxP 系のインディケーターマウスである CAG-CAT-LacZ マウスとの交配を行った場合に、このプロトコールによるタモキシフェン投

与を行うことで、Cre/loxPによる遺伝子組換えの誘導が可能であることも確かめられた。

D. 考察

新規モデルマウス作製のためのトランスジーンが培養細胞系で機能することを確認した後に、トランスジェニックマウスの作製を行った。しかし、2回のインジェクションで得られたトランスジェニックマウスでは、トランスジーンの発現に関して問題点が見つかった。Chicken β -actinプロモーター/サイトメガロウイルスエンハンサーではマウス心臓においてすべての心筋細胞でトランスジーン発現誘導が難しいと考えられる。そこで、心筋特異的 α -myosin heavy chainプロモーターの下流に、loxP配列で挟まれた β -galactosidase遺伝子、その下流にヒトproHB-EGF遺伝子を組み込んだトランスジーンを用いてトランスジェニックマウス(α MHC inducible proHBEGFマウス)の作成を行い、さらにタモキシフェン投与によりユビキタスにCre発現を誘導できるRosa26-CreERT2マウスとの交配を行うことで、目的とする心不全発症の新規モデルマウス(DT-CHFマウス)を作成することとした。

DTは5 μ g/kgの1回投与ですべてのDT受容体発現細胞を細胞死誘導可能である。また、 2×10^{-2} μ g/kgを5回に分割することでも、すべてのDT受容体発現細胞を細胞死誘導することが可能であった。したがって、DTの投与プロトコールによって、細胞死誘導の時間的・空間的な制御が可能であることが示された。

また、過剰なCreの核内移行が心機能に影響を与える可能性が考えられる。現在作製中の新規モデルマウスにおいては、DT受容体の発現を量的、時間的、空間的に任意に制御することが可能である。心機能に影響を与えうるタモキシフェンの投与プロトコールに関しては、十分な注意が必要と考えられる。

E. 結論

ジフテリア毒素投与により心筋細胞死を特異的に、さらに任意にコントロールすることができる新規モデルマウスの作製を行っている。Chicken β -actinプロモーター/サイトメガロウイルスエンハンサーではマウス心臓においてすべての心筋細胞でトランスジーン発現誘導が難しく、作成のデザイン変更が必要である。

また、タモキシフェンやジフテリア毒素の投与に関して、細胞死の誘導効率や安全性について検討し、投与プロトコールの最適化を行った。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- [Akazawa H, Komuro I.](#) “Change can happen” by PKA: Proteasomes in *in vivo* hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46:445-447.
- [Akazawa H, Yasuda N, Komuro I.](#) Mechanisms and functions of agonist-independent activation in the angiotensin II type 1 receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;302:140-147.
- Ito K, [Akazawa H](#), Tamagawa M, Furukawa K, Ogawa W, Yasuda N, Kudo Y, Liao C, Yamamoto R, Sato T, Molkenin JD, Kasuga M, Noda T, Nakaya H, [Komuro I.](#) PDK1 coordinates survival pathways and β -adrenergic response in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:8689-94.
- Moriya J, Minamino T, Tateno K, Shimizu N, Kuwabara Y, Sato Y, Saito Y, [Komuro I.](#) Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb

- ischemia. *Circ Cardiovasc Interv.* 2009;2:245-54.
- Orimo M, Minamino T, Miyauchi H, Tateno K, Okada S, Moriya J, Komuro I. Protective role of SIRT1 in diabetic vascular dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:889-94.
 - 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.* 2009; 206:1565-1574.
 - 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.* 2009;119: 2204-2217.
 - Qin Y, Yasuda N, Akazawa H, Ito K, Kudo K, Liao CH, Yamamoto R, Miura S, Saku K, Komuro I. Multivalent ligand-receptor interactions elicit inverse agonist activity of AT₁ receptor blockers against stretch-induced AT₁ receptor activation. *Hypertens Res.* 2009;32:875-83.
 - 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.* 2009;15:1082-1087.
 - Ikeda H, Shiojima I, Ozasa Y, Yoshida M, Holzenberger M, Kahn CR, Walsh K, Igarashi T, Abel ED, Komuro I. Interaction of myocardial insulin receptor and IGF receptor signaling in exercise-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47:664-75.
 - 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.* 2009;47:698-705.
 - Liao CH, 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.* 2010;120:242-53.
 - 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.* 2010;106:391-398.
 - Mizote I, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Taneike M, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Matsumura Y, Nishida K, Komuro I, Hori M, Otsu K. Activation of MTK1/MEKK4 induces cardiomyocyte death and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:302-309.
2. 学会発表
- 国内
- (赤澤 宏)
- 第15回日本遺伝子治療学会年次学術集会（吹田：2009年7月9-11日）：“PDK1 as a therapeutic target for gene therapy to coordinate survival pathways and β -adrenergic response in failing hearts.”
 - 第26回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会（札幌：2009年12月4-5日）：“Agonist-independent

activation of angiotensin II receptor in the pathogenesis of left ventricular remodeling.”

- ・ 第39回日本心脈管作動物質学会（名古屋：2010年2月5日）：「アゴニスト非依存的なアンジオテンシンII受容体活性化の分子機構と役割」
- ・ 第74回日本循環器学会学術集会（京都：2010年3月5-7日）：「メカニカルストレスによるAT₁受容体活性化と心肥大」
- ・ International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism 2010 (Mar 31-Apr 1, 2010, Nara, Japan):” Agonist-independent activation of angiotensin II receptor in cardiovascular remodeling.”

(小室 一成)

- ・ 第46回日本臨床分子医学会（東京：2009年4月12日）：「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（京都：2009年5月21日）：“Molecular mechanism and new therapy for heart failure.”
- ・ ISHNE 2009 ファイアサイドセミナー（神奈川：2009年6月4日）：“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（北海道：2009年6月13日）：「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（東京：2009年6月26日）：「糖尿病における心臓の異常について」
- ・ The 9th World Congress on Inflammation（東京：2009年7月9日）：“Regeneration therapy for heart failure.”
- ・ 第15回日本遺伝子治療学会（大阪：2009年7月10日）：“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（東京：2009年7月18日）：「骨格筋の再生を介した単核球によるPAD治療」
- ・ 第57回日本心臓病学会学術集会ランチョンセミナー（北海道：2009年9月19日）：「心不全の新しい発症機序と再生治療」
- ・ 第23回日本臨床内科医学会（埼玉：2009年10月11日）：「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（福岡：2009年11月1日）：「心不全の新しい発症機序と再生治療」
- ・ 第23回日本冠疾患学会ランチョンセミナー（大阪：2009年12月19日）：「心血管発症抑制を目指した糖尿病治療戦略」

海外

(赤澤 宏)

- ・ Gordon Research Conference Angiotensin (Feb 21-26, 2010, Ventura, USA): “Cardiac overexpression of angiotensin II type 1 receptor induces ventricular remodeling independently of angiotensin II.”

(小室 一成)

- ・ Basic Cardiovascular Sciences Conference 2009 -Molecular Mechanisms of Cardiovascular Diseases (Jul 20-23, 2009, Las Vegas, USA): “Wnt-IGFBP4 signaling in the heart.”
- ・ Advances in Heart Development: From Molecules to Cures (Sep 28-Oct 3, 2009, Nice, France): “Wnt signaling regulates cardiomyocyte differentiation and cardiac remodeling.”
- ・ 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.”
- Gordon Research Conference Angiotensin (Feb 21-26, 2010, Ventura, USA): “Molecular and therapeutic implications of stretch-sensing by the AT1 receptor.”

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 タモキシフェン投与によって心筋特異的に Cre 発現を誘導できる MerCreMer マウスを用いて、タモキシフェン投与による心機能に与える影響について検討を行った。これまで行っていた 20 mg/kg/day、5 日間腹腔内投与では、全ての心筋細胞において Cre/loxP による遺伝子組換えを誘導することができるが、floxed アレルを有していないコントロールマウスにおいても一過性の心機能低下が生じる場合がある。種々の投与条件を比較検討した結果、6 mg/kg/day、14 日間腹腔投与で、心機能に影響を与えることなく遺伝子組換えを誘導できることが明らかとなった。

A. 研究目的

わが国では生活習慣の欧米化や高齢化にともない心不全患者が急増しているが、心不全の予後は依然として不良であり、心不全に対する創薬のニーズは非常に高い。創薬研究には、標的分子の同定や薬効試験、安定性検定のためにモデル動物が必要である。心不全は、心筋障害や心筋細胞死をトリガーとして、残存心筋に過剰な血行力学的負荷がかかることで構築変化が生じ発症すると考えられる。本研究の目的は、心筋細胞死誘導による心不全発症のモデルマウスを確立し、創薬に役立てることである。分担研究者は、動物モデルに対する薬物治療の効果判定を担当している。

B. 研究方法

本研究では、タモキシフェン投与によって心筋特異的に Cre 発現を誘導できる MerCreMer マウスを用いて、タモキシフェン投与による心機能に与える影響について検討を行った。これまでは、タモキシフェンを 20 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回、5 日間腹腔内投与することで、全ての心筋細胞において Cre/loxP による遺伝子組換えを誘導することができることを確認していたが、floxed アレ

ルを有していないコントロールマウスにおいても一過性の心機能低下が生じる場合があった。薬物治療の効果判定を行う上で、タモキシフェンによる心機能への影響を正確に評価しておくことは非常に重要である。

（倫理面への配慮）

実験動物を用いる研究については、千葉大学動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこない、実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

C. 研究結果

コーンオイルに溶解したタモキシフェンを 20 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回、5 日間腹腔内投与した場合、投与後 3 日目から 14 日目にかけて一過性の心機能低下を認める個体があった。そこで、6 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回、14 日間腹腔内投与を行ったところ、このような一過性の心機能低下を認める個体は見られなくなった。MerCreMer

マウスと Cre/loxP 系のインディケーターマウスである CAG-CAT-LacZ マウスとの交配を行った場合に、このプロトコールによるタモキシフェン投与を行うことで、Cre/lpxP による遺伝子組換えの誘導が可能であることも確かめられた。

D. 考察

過剰な Cre の核内移行が心機能に影響を与える可能性が考えられる。現在作製中の新規モデルマウスにおいては、ジフテリア毒素受容体の発現を量的、時間的、空間的に任意に制御することが可能である。心機能に影響を与えうるタモキシフェンの投与プロトコールに関しては、十分な注意が必要と考えられる。

E. 結論

タモキシフェン投与によって心筋特異的に Cre 発現を誘導できる MerCreMer マウスでは、タモキシフェンの投与プロトコールによっては、一過性の心機能低下を来す。タモキシフェンは、6 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回、14 日間腹腔内投与によって、Cre/lpxP による遺伝子組換えを誘導し、しかも心機能に影響を与えないことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Akazawa H, Komuro I. "Change can happen" by PKA: Proteasomes in *in vivo* hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46:445-447.
- Akazawa H, Yasuda N, Komuro I. Mechanisms and functions of agonist-independent activation in the angiotensin II type 1 receptor. *Mol Cell Endocrinol.*

2009;302:140-147.

- Ito K, Akazawa H, Tamagawa M, Furukawa K, Ogawa W, Yasuda N, Kudo Y, Liao C, Yamamoto R, Sato T, Molkentin JD, Kasuga M, Noda T, Nakaya H, Komuro I. PDK1 coordinates survival pathways and β -adrenergic response in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:8689-94.
- Moriya J, Minamino T, Tateno K, Shimizu N, Kuwabara Y, Sato Y, Saito Y, Komuro I. Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. *Circ Cardiovasc Interv.* 2009;2:245-54.
- Orimo M, Minamino T, Miyauchi H, Tateno K, Okada S, Moriya J, Komuro I. Protective role of SIRT1 in diabetic vascular dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:889-94.
- 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.* 2009; 206:1565-1574.
- 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.* 2009;119: 2204-2217.
- Qin Y, Yasuda N, Akazawa H, Ito K, Kudo K, Liao CH, Yamamoto R, Miura S, Saku K, Komuro I. Multivalent ligand-receptor interactions elicit inverse agonist activity of AT₁ receptor blockers against stretch-induced AT₁ receptor activation. *Hypertens Res.* 2009;32:875-83.

- 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*. 2009;15:1082-1087.
 - Ikeda H, Shiojima I, Ozasa Y, Yoshida M, Holzenberger M, Kahn CR, Walsh K, Igarashi T, Abel ED, Komuro I. Interaction of myocardial insulin receptor and IGF receptor signaling in exercise-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47:664-75.
 - 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*. 2009;47:698-705.
 - Liao CH, 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*. 2010;120:242-53.
 - 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*. 2010;106:391-398.
 - Mizote I, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Taneike M, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Matsumura Y, Nishida K, Komuro I, Hori M, Otsu K. Activation of MTK1/MEKK4 induces cardiomyocyte death and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48:302-309.
- 国内
- 第46回日本臨床分子医学会（東京：2009年4月12日）：「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（京都：2009年5月21日）：“Molecular mechanism and new therapy for heart failure.”
 - ISHNE 2009 ファイアサイドセミナー（神奈川：2009年6月4日）：“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（北海道：2009年6月13日）：「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（東京：2009年6月26日）：「糖尿病における心臓の異常について」
 - The 9th World Congress on Inflammation（東京：2009年7月9日）：“Regeneration therapy for heart failure.”
 - 第15回日本遺伝子治療学会（大阪：2009年7月10日）：“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（東京：2009年7月18日）：「骨格筋の再生を介した単核球によるPAD治療」
 - 第57回日本心臓病学会学術集会ランチョンセミナー（北海道：2009年9月19日）：「心不全の新しい発症機序と再生治療」
 - 第23回日本臨床内科医学会（埼玉：2009年10月11日）：「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（福岡：2009年11月1日）：「心不全の新しい発症機序と再生治療」
 - 第23回日本冠疾患学会ランチョンセミナー（大阪：2009年12月19日）：「心血管発症抑制を目指した糖

2. 学会発表

海外

- Basic Cardiovascular Sciences Conference 2009 -Molecular Mechanisms of Cardiovascular Diseases (Jul 20-23, 2009, Las Vegas, USA): “Wnt-IGFBP4 signaling in the heart.”
- Advances in Heart Development: From Molecules to Cures (Sep 28-Oct 3, 2009, Nice, France): “Wnt signaling regulates cardiomyocyte differentiation and cardiac remodeling.”
- 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.”
- Gordon Research Conference Angiotensin (Feb 21-26, 2010, Ventura, USA): “Molecular and therapeutic implications of stretch-sensing by the AT1 receptor.”

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 心不全の創薬研究の推進のために、心筋細胞死誘導による心不全発症のモデルマウスの作製を行っている。タモキシフェン投与によりジフテリア毒素受容体を心筋細胞に任意に発現させ、さらにジフテリア毒素の投与により心筋細胞死を誘導する。分担研究では、ジフテリア毒素投与による心筋細胞死誘導のプロトコールの最適化を行った。

A. 研究目的

わが国では生活習慣の欧米化や高齢化にともない心不全患者が急増しているが、心不全の予後は依然として不良であり、心不全に対する創薬のニーズは非常に高い。創薬研究には、標的分子の同定や薬効試験、安定性検定のためにモデル動物が必要である。心不全は、心筋障害や心筋細胞死をトリガーとして、残存心筋に過剰な血行力学的負荷がかかることで構築変化が生じ発症すると考えられる。本研究の目的は、心筋細胞死誘導による心不全発症のモデルマウスを確立し、創薬に役立てることである。分担研究者は、心筋細胞誘導のプロトコールの検討を担当している。

B. 研究方法

タモキシフェン投与によって心筋特異的に Cre 発現を誘導できる MerCreMer マウスを用いて、ジフテリア毒素受容体を心筋特異的に任意に発現させた後に、ジフテリア毒素を筋肉内投与し、ジフテリア毒素受容体発現心筋細胞を傷害させて、心不全を誘導するモデルマウスの確立を目指している。既に作製済みの心筋特異的ジフテリア毒素受容体発現マウスを用いて、ジフテリア毒素を用量と投与回数を変えて投与し、心筋細胞死誘導の時間的・空間的な制御が可能であるか検討を行った。

ジフテリア毒素受容体を発現する心筋細胞を *in*

situ hybridization 法により同定し、ジフテリア毒素投与後に生存している受容体発現細胞の推移を調べた。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、千葉大学動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこない、実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。

C. 研究結果

ジフテリア毒素は 5%ラクトースを含む 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) に溶解し、マウス大腿筋へ筋肉内投与した。

5 mg/kg の 1 回投与ですべての DT 受容体発現細胞が 1 週間後に消失した。また、 2×10^{-2} mg/kg を 2 週間毎に 5 回投与行った場合にも、DT 受容体発現細胞はすべて消失することが確認された。

D. 考察

ジフテリア毒素は 5 μ g/kg の 1 回投与ですべてのジフテリア毒素受容体発現細胞を細胞死誘導可能である。また、 2×10^{-2} μ g/kg を 5 回に分割す

ることでも、すべてのジフテリア毒素受容体発現細胞を細胞死誘導することが可能であった。したがって、ジフテリア毒素の投与プロトコールによって、細胞死誘導の時間的・空間的な制御が可能であることが示された。

E. 結論

ジフテリア毒素の投与量と投与間隔をかえることで、ジフテリア毒素受容体発現細胞の細胞死誘導を時間的・空間的に制御することが可能である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ikeda H, Shiojima I, Ozasa, Y, Yoshida M, Holzenberger M, Kahn CR, Walsh K, Igarashi T, Abel ED, Komuro I. Interaction of myocardial insulin receptor and IGF receptor signaling in exercise-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47:664-75.
- 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.* 2009;47:698-705.

2. 学会発表

該当なし.

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表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Akazawa H,</u> <u>Komuro I</u>	“Change can happen” by PKA: Proteasomes in <i>in vivo</i> hearts.	<i>J Mol Cell Cardiol.</i>	46	445-447	2009
<u>Akazawa H,</u> Yasuda N, <u>Komuro I</u>	Mechanisms and functions of agonist-independent activation in the angiotensin II type 1 receptor.	<i>Mol Cell Endocrinol.</i>	302	140-147	2009
Ito K, <u>Akazawa H,</u> Tamagawa M, Furukawa K, Ogawa W, Yasuda N, Kudo Y, Liao C, Yamamoto R, Sato T, Molkentin JD, Kasuga M, Noda T, Nakaya H, <u>Komuro I</u>	PDK1 coordinates survival pathways and β -adrenergic response in the heart.	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	125	286-287	2009
Moriya J, Minamino T, Tateno K, Shimizu N, Kuwabara Y, Sato Y, Saito Y, <u>Komuro I</u>	Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia.	<i>Circ Cardiovasc Interv.</i>	2	245-254	2009
Orimo M, Minamino T, Miyachi H, Tateno K, Okada S, Ito K, <u>Komuro I</u>	Protective role of SIRT1 in diabetic vascular dysfunction.	<i>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</i>	29	889-894	2009

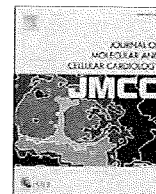
発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kayama Y, Minamino T, Toko H, Sakamoto M, Shimizu I, Takahashi H, Okada S, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Yoshimura M, Egashira K, Aburatani H, <u>Komuro I</u>	Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure.	<i>J Exp Med.</i>	206	1565-1574	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.	<i>J Clin Invest.</i>	119	2204-2217	2009
Qin Y, Yasuda N, <u>Akazawa H</u> , Ito K, Kudo K, Liao CH, Yamamoto R, Miura S, 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.	<i>Hypertens Res.</i>	32	875-883	2009
Minamino T, 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.	<i>Nat Med.</i>	15	1082-1087	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikeda H, <u>Shiojima I</u> , Ozasa, Y, Yoshida M, Holzenberger M, Kahn CR, Walsh K, Igarashi T, Abel ED, <u>Komuro I</u>	Interaction of myocardial insulin receptor and IGF receptor signaling in exercise-induced cardiac hypertrophy.	<i>J Mol Cell Cardiol.</i>	47	664-675	2009
Yoshida M, <u>Shiojima I</u> , 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.	<i>J Mol Cell Cardiol.</i>	47	698-705	2009
Liao CH, <u>Akazawa H</u> , 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.	<i>J Clin Invest.</i>	120	242-253	2010
Moriya J, Minamino T, 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.	<i>Circ Res.</i>	106	391-398	2010



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular and Cellular Cardiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjmcc

Editorial

“Change can happen” by PKA: Proteasomes in in vivo hearts

Rudolf Schoenheimer pioneered the technique to tag amino acids with isotope for tracing their metabolism within living animals [1]. The results of his experiments led to a revolutionary view that the proteins within a body are in a dynamic state of synthesis and degradation. Now, after more than 6 decades, the concept of protein turnover is widely accepted. Especially, to maintain cellular homeostasis, the cells carry out protein quality control through ubiquitin-proteasome system (UPS) and autophagy, and eliminate needless or defective intracellular proteins that are of no use and even hazardous. The UPS is a highly selective degradation process occurring in the cytoplasm, but in contrast, autophagy is a non-selective process that degrades bulk proteins and organelles in the lysosomes to recycle [2]. Inasmuch as the UPS participates in proteolysis of thousands of specific proteins, this regulatory system plays an important role in a variety of cellular responses including cell cycle and division, hypoxic response, DNA repair, apoptosis and immune response [3]. Importantly, recent studies have indicated that dysregulation of the UPS is profoundly implicated in human diseases such as inflammatory diseases, neurodegenerative diseases, muscle-wasting disorders, cancer, and cardiovascular diseases [3,4], and the UPS has emerged as a potential therapeutic target for the treatment of these diseases [5].

Postnatal cardiomyocytes scarcely proliferate, and thus are in extraordinary need of removing damaged or misfolded proteins to avoid accumulation of these kinds of garbage within the cells. In addition, since the beating heart is under continuous stress, especially in diseased conditions, myocardial proteins are liable to damaging and misfolding [4]. Furthermore, recent studies have demonstrated that the UPS is dysfunctional in the hearts of rodent models of ischemia/reperfusion (I/R) [6,7] or desmin-related cardiomyopathy [8]. Therefore, elucidation of the regulatory mechanism of the UPS in the heart will be important to understand the pathogenesis of heart diseases. The UPS-mediated proteolysis consists of two sequential steps: covalent attachment of ubiquitin to the protein substrate (ubiquitination) and degradation of the ubiquitinated proteins by 26S proteasome complex [9,10]. Ubiquitination proceed through a series of enzymatic reactions involving ubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzymes (E2), and ubiquitin ligases (E3). Selectivity and specificity of the protein substrate is determined by E3 ligases that have either the RING-finger domain or the HECT domain. Although much knowledge has been accumulated on selective and specific aspects of ubiquitination, the regulatory mechanism of 26S proteasome remains elusive, especially in the heart.

In this issue of Journal of Molecular and Cellular Cardiology, Asai and colleagues have provided unequivocal evidence that protein kinase A (PKA) enhances the assembly and activity of cardiac 26S proteasome both in vitro and in in vivo [11]. The 26S proteasome is a

2.4 MDa multisubunit complex, consisting of a core 670 kDa 20S catalytic subcomplex and two 700 kDa 19S (or PA700) regulatory subcomplexes [9,10,12]. Both ends of the barrel-shaped 20S subunit are capped by 19S regulatory subunits (Fig. 1). The 20S subunit is composed of four axially stacked rings (two identical outer α rings and two identical inner β rings), and each α and β ring contains seven distinct subunits (α 1– α 7, β 1– β 7). Three distinct peptidase (chymotrypsin-like, trypsin-like, and caspase-like) activities have been identified, and assigned to three distinct catalytic subunits (β 5, β 2, and β 1, respectively) lining a central lumen. Polyubiquitinated proteins are recognized and unraveled by 19S subunit, which then facilitates the entry and degradation of unfolded polypeptides in the cavity of the 20S subunit.

A couple of studies have shown that PKA can induce serine- or threonine-phosphorylation in 26S proteasome and increase proteolytic activity in vitro [13,14]. The 19S subunit contains six AAA ATPases (Rpt1~6), which contact with outer α rings of the 20S subunit and unfold the polyubiquitinated substrates [12]. According to a recent study, PKA stimulates the proteasome activity by phosphorylating Rpt6 [14]. Ping and colleagues recently delineated a phosphorylation profile of the endogenous 20S subunit of murine hearts and identified phosphorylation in multiple subunits, by using 2-D gel electrophoresis, immunoblotting, and tandem mass spectrometry [13]. In the same study, PKA was identified within the native cardiac 20S complex, and recombinant PKA significantly increased proteasome activity in vitro. The study by Asai et al firstly shows that PKA stimulation enhances the activity of 26S proteasome in in vivo hearts [11]. The proteolytic activities of 26S proteasome in the hearts of anesthetized dogs were significantly increased after PKA stimulation through intracoronary administration of isoproterenol (a β -adrenergic receptor agonist) or forskolin (an activator of adenylate cyclase that increases cyclic AMP and activates PKA) for 30 min. In addition, the 26S proteasome activity was also increased at 30 min after ischemic preconditioning (IP), consisting of 4 cycles of 5 min of ischemia and 5 min of reperfusion. Among a number of signaling pathways involved in IP [15], PKA mediates the enhancement of proteasome activity after IP, because it was attenuated by intracoronary administration of a PKA inhibitor, H-89. As mentioned above, PKA phosphorylates Rpt6 in the 19S subunit and may facilitate diffusion of the polypeptide substrates into the proteolytic cavity of the 20S subunit (Fig. 1), although the precise mechanism remains unclear. The phosphorylations of the 20S subunit may directly or indirectly induce conformational change of the catalytic sites to increase proteolytic activity (Fig. 1).

Alternatively, PKA phosphorylation may be involved in the assembly of proteasome subunits (Fig. 1). Proteasomes with normal function require correct assembly of all subunits, which is orchestrated by multiple proteasome-specific chaperones [16]. Although

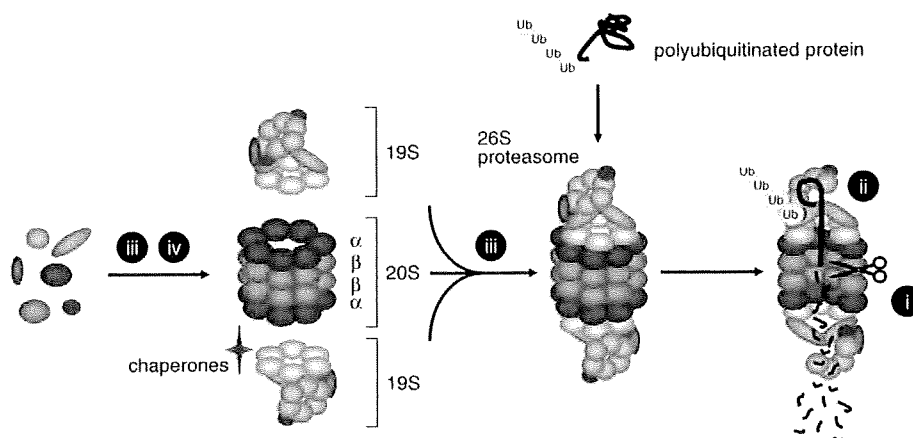


Fig. 1. Potential change in 26S proteasome brought about by PKA. PKA enhances the activity of 26S proteasome potentially i) by increasing proteolytic activity through phosphorylation of 20S subunit, ii) by facilitating translocation of polyubiquitinated substrates through phosphorylation of 19S subunit, iii) by promoting assembly of proteasome subunits through phosphorylation of the subunits or chaperones, or iv) by altering molecular composition of proteasome through an unknown mechanism.

the regulatory kinases are not specified, the phosphorylation of proteasome subunits or chaperones can affect the status of proteasome assembly. For example, the phosphorylation of Rpt6 in the 19S subunit is required for the incorporation of the 19S subunit into 26S proteasome, possibly through the formation of interaction between Rpt6 and $\alpha 2$ subunit [17]. In addition, the phosphorylation of $\alpha 7$ subunit stabilizes the association of the 19S subunit with the 20S subunit to form 26S proteasome [18]. The study by Asai et al shows that PKA stimulation increases the incorporation of Rpt5, $\alpha 7$, and $\beta 5$ subunits into cardiac 26S proteasome both in vitro and in vivo by immunoblot analysis under non-reducing conditions [11]. Clearly, these results leave many open questions: which subunit phosphorylated by PKA is important in this process? How does the phosphorylation induce an allosteric effect that changes the stability of 26S proteasome? Is the assembly of subunits by PKA critically linked to proteolytic activity of 26S proteasome? Furthermore, recent studies have indicated that certain pathological stress can alter proteasome composition, and that the molecular composition of proteasome is closely related to proteolytic activity [19,20]. It may be possible that PKA alters the proteasome composition, especially in vivo (Fig. 1). Additional studies are necessary to determine the mechanism and consequence of PKA-mediated assembly of 26S proteasome.

Asai et al further investigated the pathophysiological role of proteasome activation by IP in canine hearts subjected to I/R [11]. A significant decrease in the proteasome activity was observed after 90 min of ischemia, which lasted for the following period of reperfusion. It has been reported that free radical-initiated oxidation, such as lipid peroxidation, participates in oxidative modification and inactivation of the 20S proteasome during I/R [6,7]. As a consequence of a decline in the proteasome activity, I/R increased accumulation of ubiquitinated proteins in the hearts. Interestingly, IP counteracted the decline of proteasome activity during I/R, which was associated with a significant reduction in the accumulation of ubiquitinated proteins. Abnormal accumulation of ubiquitinated proteins causes aberrant protein aggregates, and thus is thought to be deleterious to cardiomyocytes [4]. The favorable effect of IP on accumulation of ubiquitinated protein in I/R hearts was abolished by intracoronary administration of a proteasome inhibitor epoxomicin, but surprisingly, the infarct size in I/R hearts was unchanged with or without IP even by epoxomicin at the concentration that reduced proteasome activity by 43%. These results imply that proteasome activation by IP is irrelevant to the alleviative effect of IP on myocardial cell death during I/R. Then, the next question will be whether the beneficial effect of IP on contractile function of viable myocardium is prevented or not by epoxomicin in I/R hearts. Indeed, proteasome inhibitors may lead to

deleterious and beneficial outcomes during myocardial ischemia according to the experimental designs [21]. The intracoronary administration of epoxomicin in anesthetized dogs may mitigate the inflammatory response within the hearts, because the NF- κ B signaling is regulated by the UPS. Given that the UPS tightly controls turnover of regulatory proteins involved in physiological responses such as intracellular signaling and transcriptional regulation [3], the subtle difference in the concentrations or the pharmacokinetics of the proteasome inhibitors may influence the outcomes in in vivo experiments. In addition, it has been reported that autophagy acts as a compensatory degradation system when the UPS is impaired in a *Drosophila* model of neurodegenerative disease [22]. Administration of proteasome inhibitors may induce autophagy in I/R hearts, and thereby prevent myocardial cell death by maintaining organelle turnover and energy homeostasis [23]. Further studies are needed to clarify the functional coupling between the UPS and autophagy, especially in I/R hearts.

The proteasome inhibitor bortezomib shows selective cytotoxicity to cancer cells, and is approved for clinical treatment of refractory multiple myeloma [5]. Insomuch as the proteasome activity is hampered in ischemic hearts, pharmacological restoration of the proteasome function has a potential to become a rational strategy for treatment. The study of Asai et al provides an important clue toward this strategy [11]. Manipulation of proteasome function may be applied to treatment of a wide spectrum of heart diseases such as cardiac hypertrophy. Tsukamoto et al revealed that proteasome was dysfunctional in murine hearts of pressure-overloaded hypertrophy [24]. However, DePre et al argued that proteasome function was upregulated during pressure overload in canine hearts and that administration of proteasome inhibitors attenuated cardiac hypertrophy without altering cardiac function [25]. Of course, in-depth assessment of the pathogenic role of the UPS in heart diseases will be a prerequisite for launching a bench-to-bed approach.

Will pharmacological activation of PKA induce "a change we can believe in" in proteasomes of stressed myocardium and produce a clinical benefit in the treatment of heart diseases? Further studies are required to explore the detailed mechanism of proteasome modification and to develop an optimal way in normalization of proteasome function in diseased hearts.

Acknowledgments

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).

References

- [1] Schoenheimer R. *The Dynamic State of Body Constituents*. Cambridge, Massachusetts, USA: Harvard University Press; 1942.
- [2] Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007;21(22):2861–73.
- [3] Schwartz AL, Ciechanover A. Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009;49:73–96 [February]. doi:10.1146/annurev.pharmtox.051208.165340.
- [4] Wang X, Su H, Ranek MJ. Protein quality control and degradation in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45(1):11–27.
- [5] Nalepa G, Rolfe M, Harper JW. Drug discovery in the ubiquitin–proteasome system. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(7):596–613.
- [6] Bulteau AL, Lundberg KC, Humphries KM, Sadek HA, Szweda PA, Friguet B, et al. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J Biol Chem* 2001;276(32):30057–63.
- [7] Gurusamy N, Goswami S, Malik G, Das DK. Oxidative injury induces selective rather than global inhibition of proteasomal activity. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44(2):419–28.
- [8] Liu J, Chen Q, Huang W, Horak KM, Zheng H, Mestrlil R, et al. Impairment of the ubiquitin–proteasome system in desminopathy mouse hearts. *FASEB J* 2006;20(2):362–4.
- [9] Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 1996;30:405–39.
- [10] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998;67:425–79.
- [11] Asia M, Tsukamoto O, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Asano Y, et al. PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:452–62.
- [12] Pickart CM, Cohen RE. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5(3):177–87.
- [13] Zong C, Gomes AV, Drews O, Li X, Young GW, Berhane B, et al. Regulation of murine cardiac 20S proteasomes: role of associating partners. *Circ Res* 2006;99(4):372–80.
- [14] Zhang F, Hu Y, Huang P, Toleman CA, Paterson AJ, Kudlow JE. Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through phosphorylation of Rpt6. *J Biol Chem* 2007;282(31):22460–71.
- [15] Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia–reperfusion injury. *Physiol Rev* 2008;88(2):581–609.
- [16] Murata S. Multiple chaperone-assisted formation of mammalian 20S proteasomes. *IUBMB Life* 2006;58(5–6):344–8.
- [17] Satoh K, Sasajima H, Nyomura KI, Yokosawa H, Sawada H. Assembly of the 26S proteasome is regulated by phosphorylation of the p45/Rpt6 ATPase subunit. *Biochemistry* 2001;40(2):314–9.
- [18] Bose S, Stratford FL, Broadfoot KI, Mason GG, Rivett AJ. Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem J* 2004;378(Pt 1):177–84.
- [19] Hanna J, Meides A, Zhang DP, Finley D. A ubiquitin stress response induces altered proteasome composition. *Cell* 2007;129(4):747–59.
- [20] Drews O, Wildgruber R, Zong C, Sukop U, Nissum M, Weber G, et al. Mammalian proteasome subpopulations with distinct molecular compositions and proteolytic activities. *Mol Cell Proteomics* 2007;6(11):2021–31.
- [21] Powell SR. The ubiquitin–proteasome system in cardiac physiology and pathology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291(1):H1–H19.
- [22] Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 2007;447(7146):859–63.
- [23] Gustafsson AB, Gottlieb RA. Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44(4):654–61.
- [24] Tsukamoto O, Minamino T, Okada K, Shintani Y, Takashima S, Kato H, et al. Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340(4):1125–33.
- [25] Depre C, Wang Q, Yan L, Hedhli N, Peter P, Chen L, et al. Activation of the cardiac proteasome during pressure overload promotes ventricular hypertrophy. *Circulation* 2006;114(17):1821–8.

Hiroshi Akazawa

*Division of Cardiovascular Pathophysiology,
Chiba University Graduate School of Medicine,
1-8-1 Inohana, Chuoku, Chiba 260-8670, Japan*

Issei Komuro

*Department of Cardiovascular Science and Medicine,
Chiba University Graduate School of Medicine,
1-8-1 Inohana, Chuoku, Chiba 260-8670, Japan*

E-mail address: komuro-tky@umin.ac.jp.

Corresponding author. Tel.: +81 43 226 2097;

fax: +81 43 226 2557.