

2009J6052A

# 厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

新規拡張型心筋症モデルマウスを用いた  
拡張型心筋症発症機序の解明

(H20-難治-一般-044)

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	
新規拡張型心筋症モデルマウスを用いた拡張型心筋症発症機序の解明	1
小室 一成	
II. 分担研究報告書	
1. アデノウイルスコンストラクトの作成、in vitro の実験	6
塩島 一朗	
2. 遺伝子改変マウスの作成	7
赤澤 宏	
3. 遺伝子改変マウスの作成	10
東口 治弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	12
IV. 研究成果の刊行物・別刷	14

研究要旨 拡張型心筋症の原因の約30%は遺伝子変異であるが、それらの遺伝子変異により拡張型心筋症を発症する機序に関しては不明である。最近我々が確立した拡張型心筋症モデルマウスを用い、その機序の解明を目的に実験を行った。この拡張型心筋症モデルマウスでは、カルシウム依存性リン酸化酵素 CaMKII $\delta$  の活性が亢進し、癌抑制遺伝子 p53 の発現量が増加していた。CaMKII $\delta$  阻害剤の投与や CaMKII $\delta$  阻害ペプチドである AC-3I 過剰発現マウスとの交配により心機能の改善を認めた。また p53 遺伝子欠損マウスや Bcl-2 過剰発現マウスとの交配により、拡張型心筋症マウスで認めた心筋細胞アポトーシスの増加は減少し、心機能は改善した。以上の結果より、CaMKII $\delta$  活性の亢進と p53 による心筋細胞アポトーシスの増加が遺伝子変異による拡張型心筋症の発症に重要であることが示唆された。

(研究代表者)

の発症機序を明らかにすることを本研究の目的とする。

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

B. 研究方法

(研究分担者)

これまで拡張型心筋症の発症機序が明らかにならなかった理由の一つに、拡張型心筋症を解析するための適切なモデル動物が存在しなかったことが挙げられる。ヒト拡張型心筋症の原因遺伝子のひとつに、心筋  $\alpha$  アクチン遺伝子がある。我々は、ヒトで報告されている変異型心筋  $\alpha$  アクチン遺伝子を心臓特異的に過剰発現させた遺伝子改変マウスを作成し、拡張型心筋症モデルの確立に成功した。初年度の研究では、CaMKII $\delta$  と p53 が遺伝子変異より拡張型心筋症発症にいたる分子機構に非常に重要であることを明らかにした。p53 は多くのアポトーシス関連蛋白の発現を制御していることが知られおり、p53 増加による心機能低下の機序を明らかにするため心筋細胞アポトーシスに関して検討した。さらに心機能低下における心筋細胞アポトーシスの関与を明らかにするために、抗アポトーシス因子である Bcl-2 を過剰発現させたマウスと拡張型心筋症モデルマウスとを交配させた。

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

赤澤宏 千葉大学大学院医学研究院

循環病態医科学 講師

東口治弘 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

拡張型心筋症の予後は非常に不良であり、現在拡張型心筋症の最終的な治療法は心臓移植しかなく、新たな治療法の確立が切望されている。拡張型心筋症の原因の約30%が遺伝子変異であることが明らかとなってきたが、それらの遺伝子変異により収縮機能不全をきたす機序は未だ不明である。この発症機序の解明が新規の治療法の開発に必要であると考え、拡張型心筋症

拡張型心筋症モデルで認めた p53 の発現増加による心筋細胞への影響を、アデノウイルスを用いて p53 を培養心筋細胞に導入し検討した。

#### (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

#### 1) p53 と心筋細胞アポトーシス

p53 は多くのアポトーシス関連蛋白の発現を制御していることが知られている。実際に拡張型心筋症モデルマウスでは心筋細胞アポトーシスの数が増加し、その増加は p53 ヘテロノックアウトマウスとの交配により減少した。また、アデノウイルスを用いて p53 を培養心筋細胞に導入するとアポトーシスが誘導された。

p53 による心筋細胞アポトーシスの増加が、この拡張型心筋症モデルマウスの心機能低下にどの程度重要かを次に検討した。まず、アポトーシス関連蛋白の蛋白発現を検討した。結果、抗アポトーシス因子である Bcl-2 が減少し、逆にアポトーシス誘導因子である Bax の発現が増加していた。次に Bcl-2 過剰発現マウスと拡張型心筋症モデルマウスを交配させた。結果、拡張型心筋症モデルマウスにおいて心筋細胞アポトーシスの数は減少し、さらに心機能も改善した。以上の結果より、拡張型心筋症モデルマウスの心機能低下には心筋細胞アポトーシスが重要であり、p53 の増加がこの心筋細胞アポトーシスの増加に関与している可能性が示唆された。

#### 2) CaMKII $\delta$ の役割

初年度に CaMKII $\delta$  阻害薬である KN-93 の投与により

拡張型心筋症モデルマウスの心機能低下に CaMKII $\delta$  が重要であることを明らかとしたが、KN-93 の非特異的作用による可能性も否定仕切れなかった。そこで CaMKII $\delta$  阻害ペプチドである AC-3I を過剰発現させた遺伝子改変マウスを入手し、このマウスと拡張型心筋症モデルマウスとを交配させた。結果、KN-93 投与と同様 AC-3I の過剰発現により拡張型心筋症モデルマウスの心機能低下は改善した。

### D. 考察

これまでの結果より、CaMKII $\delta$  と p53 が遺伝子変異より拡張型心筋症発症にいたる分子機構に非常に重要であることが示唆された。また p53 が心筋細胞アポトーシスを増加させることが、心機能低下に重要であると考えられた。しかし、CaMKII $\delta$  を活性化させる機序や p53 を増加させる機序に関しては不明である。今後はこれらの機序を検討していく予定である。

### E. 結論

遺伝子変異による拡張型心筋症の発症に CaMKII $\delta$  の活性化と p53 による心筋細胞アポトーシスの増加が重要であることが明らかとなった。今後、両因子を標的とした治療が拡張型心筋症の治療となり得る可能性が示唆された。

### 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., Molkentin, 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 I 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」

・2010Angiotensin Gordon Conference (Feb 21-26, 2010 California, USA) “Molecular & Therapeutic implications of stretch-sensing by the AT1R”

(赤澤 宏)

・第15回日本遺伝子治療学会年次学術集会(大阪:2009年7月9-11日) PDK1 as a therapeutic target for gene therapy to coordinate survival pathways and b-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」

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

・International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism 2010. (March 31 and April 1, 2010, Nara, Japan) Agonist-independent activation of angiotensin II receptor in cardiovascular remodeling.

(東口 治弘)

・6th Annual Symposium of the American Heart Association's Council on Basic Cardiovascular Sciences 2009/7/20- 7/23 Las Vegas, NV, USA. ER Stress-Response Transcription Factor ATF6 Plays a Critical Role in Maintaining Cardiac Function under Physiological and Pathological Conditions

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
アデノウイルスコンストラクトの作成、in vitro の実験  
分担研究報告書

研究分担者 塩島一郎 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

研究要旨 拡張型心筋症の原因の約 30%は遺伝子変異であるが、それらの遺伝子変異より拡張型心筋症を発症する機序に関しては不明である。この機序を明らかにするために、既にヒトの拡張型心筋症の原因として報告されている変異型心筋  $\alpha$  アクチン遺伝子を培養心筋細胞に導入した。変異型心筋  $\alpha$  アクチンにより、カルシウム依存性リン酸化酵素 CaMKII $\delta$  と癌抑制遺伝子 p53 の発現量が増加した。また、p53 をアデノウイルスで培養心筋細胞に遺伝子導入するとアポトーシスが誘導された。

A. 研究目的

拡張型心筋症の予後は、非常に不良であり、現在拡張型心筋症の最終的な治療法は心臓移植しかなく、新たな治療法の確立が切望されている。拡張型心筋症の原因の約 30%が遺伝子変異であることが明らかとなってきたが、それらの遺伝子変異により収縮機能不全をきたす機序は未だ不明である。この発症機序の解明が新規の治療法の開発に必要であると考え。研究分担者は、新規に確立した拡張型心筋症モデルマウスを用い得られた結果に関して、培養心筋細胞を用いさらに詳細な機序の解明を行うことを目的とする。

B. 研究方法

培養心筋細胞にアデノウイルスを用いて p53 を遺伝子導入し、心筋細胞アポトーシスの変化を検討した。

C. 研究結果

1. p53 が培養心筋細胞に遺伝子導入されていることを免疫染色にて確認した。
2. p53 が遺伝子導入された培養心筋細胞では、TUNEL 陽性細胞が増加した。

D. 考察

p53 の発現増加が直接心筋細胞アポトーシスを誘

導することが明らかとなったが、未だ p53 の増加する機序は不明である。

E. 結論

培養心筋細胞への p53 の遺伝子導入によりアポトーシスが誘導された。

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, 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.

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



研究要旨 拡張型心筋症の原因の約30%は遺伝子変異であるが、それらの遺伝子変異より拡張型心筋症を発症する機序に関しては不明である。最近我々が確立した拡張型心筋症モデルマウスを用い、その機序の解明を目的に実験を行った。この拡張型心筋症モデルマウスでは心筋細胞アポトーシスが増加していた。p53 ノックアウトや Bcl-2 過剰発現マウスとの交配により、拡張型心筋症モデルマウスの心筋細胞アポトーシスは減少し、心機能も改善した。p53 による心筋細胞アポトーシスの増加が遺伝子変異による拡張型心筋症の発症に重要であることが示唆された。

#### A. 研究目的

拡張型心筋症の予後は、非常に不良であり、現在拡張型心筋症の最終的な治療法は心臓移植しかなく、新たな治療法の確立が切望されている。拡張型心筋症の原因の約30%が遺伝子変異であることが明らかとなってきたが、それらの遺伝子変異により収縮機能不全をきたす機序は未だ不明である。この発症機序の解明が研究分担者の目的であり、そのために最近我々が確立した拡張型心筋症モデルマウスを用い実験を行った。

#### B. 研究方法

我々は最近、既にヒト拡張型心筋症の原因遺伝子として報告されている変異型心筋 $\alpha$ アクチン遺伝子を心臓特異的に過剰発現させることにより、ヒトの拡張型心筋症の表現系と非常に類似した拡張型心筋症モデルマウスの確立に成功した。初年度の研究では、p53 が遺伝子変異より拡張型心筋症発症にいたる分子機構に非常に重要であることを明らかにした。p53 は多くのアポトーシス関連蛋白の発現を制御していることが知られおり、p53 増加による心機能低下の機序を明らかにするため心筋細胞アポトーシスに関して検討した。さらに心機能低下における心筋細胞アポトーシスの関与を明らかにするために、抗アポトーシス因子であ

る Bcl-2 を過剰発現させたマウスと拡張型心筋症モデルマウスとを交配させた。

（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

p53 は多くのアポトーシス関連蛋白の発現を制御していることが知られている。実際に拡張型心筋症モデルマウスでは心筋細胞アポトーシスの数が増加し、その増加は p53 ヘテロノックアウトマウスとの交配により減少した。

p53 による心筋細胞アポトーシスの増加が、この拡張型心筋症モデルマウスの心機能低下にどの程度重要かを次に検討した。まず、アポトーシス関連蛋白の蛋白発現を検討した。結果、抗アポトーシス因子である Bcl-2 が減少し、逆にアポトーシス誘導因子である Bax の発現が増加していた。次に Bcl-2 過剰発現マウスと拡張型心筋症モデル

マウスを交配させた。結果、拡張型心筋症モデルマウスにおいて心筋細胞アポトーシスの数は減少し、さらに心機能も改善した。以上の結果より、拡張型心筋症モデルマウスの心機能低下には心筋細胞アポトーシスが重要であり、p53 の増加がこの心筋細胞アポトーシスの増加に関与している可能性が示唆された。

#### D. 考察

遺伝子変異による拡張型心筋症の発症に p53 による心筋細胞アポトーシスの増加が重要であることが明らかとなった。しかし、p53 を増加させる機序に関しては不明である。今後、さらなる詳細な解明が必要と考える。

#### E. 結論

遺伝子変異による拡張型心筋症の発症に p53 による心筋細胞アポトーシスの増加が重要であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・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 CH, Yamamoto R, Sato T, Molkenstein JD, Kasuga M, Noda T, Nakaya H, Komuro I. PDK1 coordinates survival pathways

and b-adrenergic response in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:8689-94.

・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;32:875-883.

・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;120:242-253.

##### 2. 学会発表

・第15回日本遺伝子治療学会年次学術集会（大阪：2009年7月9-11日） PDK1 as a therapeutic target for gene therapy to coordinate survival pathways and b-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」

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

・International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism 2010. (March 31

and April 1, 2010, Nara, Japan)

Agonist-independent activation of angiotensin  
II receptor in cardiovascular remodeling.

#### 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 拡張型心筋症の原因の約 30%は遺伝子変異であるが、それらの遺伝子変異より拡張型心筋症を発症する機序に関しては不明である。最近我々が確立した拡張型心筋症モデルマウスを用い、その機序の解明を目的に実験を行った。この拡張型心筋症モデルマウスでは、カルシウム依存性リン酸化酵素 CaMKII $\delta$  の活性が亢進していた。CaMKII $\delta$  阻害ペプチドである AC-3I の過剰発現マウスとの交配により、拡張型心筋症モデルマウスの心機能低下は改善した。CaMKII $\delta$  が遺伝子変異による拡張型心筋症の発症に重要であることが示唆された。

#### A. 研究目的

拡張型心筋症の予後は、非常に不良であり、現在拡張型心筋症の最終的な治療法は心臓移植しかなく、新たな治療法の確立が切望されている。拡張型心筋症の原因の約 30%が遺伝子変異であることが明らかとなってきたが、それらの遺伝子変異により収縮機能不全をきたす機序は未だ不明である。この発症機序の解明が新規の治療法の開発に必要であると考え。最近我々が確立した拡張型心筋症モデルマウスを用い、拡張型心筋症の発症機序を明らかにすることが研究分担者の目的である。

#### B. 研究方法

これまで拡張型心筋症の発症機序が明らかにならなかった理由の一つに、拡張型心筋症を解析するための適切なモデル動物が存在しなかったことが挙げられる。ヒト拡張型心筋症の原因遺伝子のひとつに、心筋  $\alpha$  アクチン遺伝子がある。我々は、ヒトで報告されている変異型心筋  $\alpha$  アクチン遺伝子を心臓特異的に過剰発現させた遺伝子改変マウスを作成し、拡張型心筋症モデルの確立に成功した。この拡張型心筋症モデルマウスを用いて実験を行った。

初年度までの検討で、この拡張型心筋症モデルマウスではカルシウム依存性リン酸化酵素 CaMKII $\delta$  が活性されていることを明らかにした。本年度は CaMKII $\delta$  阻害ペプチドである AC-3I の過剰発現マウスと拡張型心筋症モデルマウスを交配し、拡張型心筋症発症に CaMKII $\delta$  の役割を検討した。

#### （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

初年度に CaMKII $\delta$  阻害薬である KN-93 の投与により拡張型心筋症モデルマウスの心機能低下に CaMKII $\delta$  が重要であることを明らかとしたが、KN-93 の非特異的作用による可能性も否定仕切れなかった。そこで CaMKII $\delta$  阻害ペプチドである AC-3I を過剰発現させた遺伝子改変マウスを入手

し、このマウスと拡張型心筋症モデルマウスとを交配させた。結果、KN-93 投与と同様 AC-3I の過剰発現により拡張型心筋症モデルマウスの心機能低下は改善した。

#### D. 考察

遺伝子変異による拡張型心筋症の発症に CaMKII $\delta$  の活性化が重要であることが明らかとなった。しかし、CaMKII $\delta$  を活性する機序や標的因子に関しては不明である。今後、CaMKII $\delta$  の上流、下流の因子の検索を行う予定である。

#### E. 結論

遺伝子変異による拡張型心筋症の発症に CaMKII $\delta$  の活性化が重要であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure. 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. *J Exp Med*. 2009 Jul 6;206(7):1565-74.

##### 2. 学会発表

国内

・ 第 5 回宮崎サイエンスキャンプ (平成 21 年 2 月 20-22 日、宮崎) 小胞体ストレス応答を制御する転写因子 ATF6 の心臓における役割

・ 第 73 回日本循環器学会総会・学術集会 2009/3/20-22 大阪 シンポジウム ER stress-response Transcriptional Factor ATF6 Plays a

Critical Role in Maintaining Cardiac Function under Physiological and Pathological Conditions

海外

・ 6th Annual Symposium of the American Heart Association's Council on Basic Cardiovascular Sciences 2009/7/20- 7/23 Las Vegas, NV, USA. ER Stress-Response Transcription Factor ATF6 Plays a Critical Role in Maintaining Cardiac Function under Physiological and Pathological Conditions

#### 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., <u>Akazawa, H.</u> , 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., <u>Komuro, I</u>	PDK1 coordinates survival pathways and beta-adrenergic response in the heart	Proc Natl Acad Sci USA	106	8689-8694	2009
<u>Akazawa, H.</u> , <u>Komuro, I</u>	Change Can Happen” by PKA: Proteasomes in in vivo Hearts	J Mol Cell Cardiol	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. Mol Cell Endocrinol	Mol Cell Endocrinol	302	140-147	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	Nat Med	15	1082-1087	2009
Qin, Y., Yasuda, N., <u>Akazawa, H.</u> , 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., <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	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., 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	J Exp Med	206	1565-1574	2009
Ikeda, H., <u>Shiojima, I.</u> , 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., <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	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., <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 $\beta$ -adrenergic response in the heart

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

Departments of <sup>a</sup>Cardiovascular Science and Medicine and <sup>b</sup>Pharmacology, Chiba University Graduate School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan; <sup>c</sup>Division 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; <sup>d</sup>Department of Pediatrics, University of Cincinnati, Children's Hospital Medical Center, 3333 Burnet Avenue, Cincinnati, OH 45229; and <sup>e</sup>Department 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  $\beta$ -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 $\gamma$ , leading to robust  $\beta$ -AR internalization by forming complex with  $\beta$ -AR kinase 1 ( $\beta$ ARK1). Interference of  $\beta$ ARK1/PI3-K $\gamma$  complex formation by transgenic overexpression of phosphoinositide kinase domain normalized  $\beta$ -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  $\beta$ -adrenergic response.

AGC kinase | apoptosis | heart failure | receptor internalization

**H**earth 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  $\beta$ -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*<sup>flox/flox</sup> 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  $\alpha$ -myosin heavy chain promoter (9). In the resulting *Pdk1*<sup>flox/flox</sup>/MerCreMer<sup>+</sup> 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

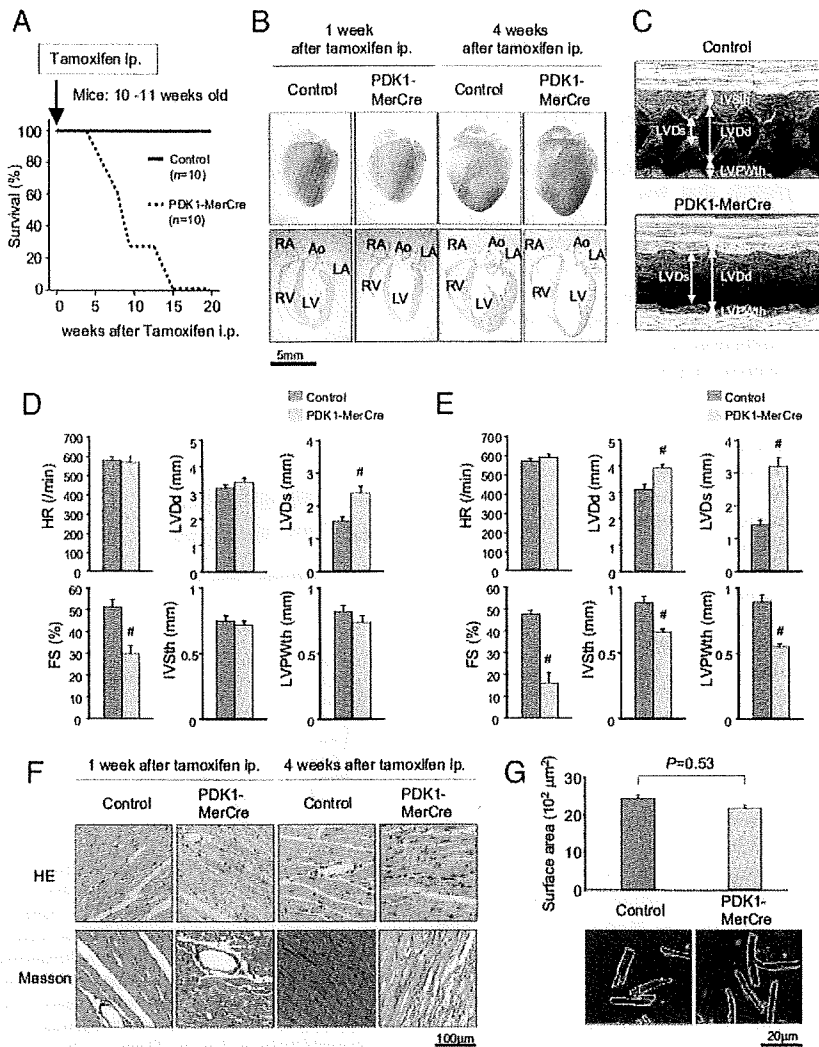
Author contributions: H.A. and I.K. designed research; K.I., M.T., K.F., N.Y., Y.K., C.-h.L., and R.Y. performed research; K.F., J.D.M., and T.N. contributed new reagents/analytic tools; K.I., M.T., W.O., T.S., M.K., and H.N. analyzed data; and K.I., H.A., and I.K. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: komuro-ty@umin.ac.jp.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/090064106/DCSupplemental](http://www.pnas.org/cgi/content/full/090064106/DCSupplemental).



**Fig. 1.** Severe heart failure observed in PDK1-MerCre mice. (A) Kaplan-Meier survival curves of PDK1-MerCre mice ( $n = 10$ ) and control mice ( $n = 10$ ). Mice were injected with tamoxifen at the age of 10–11 weeks. (B) Macroscopic findings and 4-chamber sections of the hearts from PDK1-MerCre and control mice 1 and 4 weeks after the initiation of tamoxifen treatment. Ao, aorta; LA, left atrium; LV, left ventricle; RA, right atrium; RV, right ventricle. (C) Representative M-mode echocardiograms of mice 1 week after tamoxifen treatment. (D) Echocardiographic measurements of PDK1-MerCre and control mice 1 week after tamoxifen treatment. HR, heart rate; LVdD, LV dimension in diastole; LVDs, LV dimension in systole; FS, fractional shortening; IVSth, interventricular septum thickness; LVPWth, LV posterior wall thickness. Values represent the mean  $\pm$  SEM of data from 10 mice in each group. #,  $P < 0.01$  versus control group. (E) Echocardiographic measurements of PDK1-MerCre and control mice 4 weeks after tamoxifen treatment. Values represent the mean  $\pm$  SEM of data from 6 mice in each group. #,  $P < 0.01$  versus control group. (F) Histological sections with hematoxylin and eosin (HE) staining and Masson's trichrome (Masson) staining of PDK1-MerCre and control mice 1 and 4 weeks after tamoxifen treatment. (G) Surface areas of isolated cardiomyocytes (57 individual cardiomyocytes in each group) and sample pictures of isolated cardiomyocytes from PDK1-MerCre and control mice 1 week after tamoxifen treatment. Values represent the mean  $\pm$  SEM.

mammalian cells, Akt is fully activated through PDK1-dependent phosphorylation of Thr-308 and PDK1-independent phosphorylation of Ser-473 (10). Insulin-induced phosphorylation of Akt at Thr-308 in PDK1-MerCre hearts was significantly attenuated, compared with control hearts, while phosphorylation level at Ser-473 was unchanged (Fig. S2B). As a consequence, Akt kinase activity was markedly reduced in PDK1-MerCre hearts (Fig. S2C). Consistently, insulin-induced phosphorylation levels of glycogen synthase kinase (GSK)  $\beta$  at Ser-9, mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448, and p70S6K at Thr-389 (11) were attenuated in the PDK1-MerCre hearts (Fig. S2B). Collectively, these results indicate that Akt signaling is inhibited in PDK1-MerCre hearts.

**Lethal Heart Failure in PDK1-MerCre Mice.** Without tamoxifen treatment, PDK1-MerCre mice survived normally and were indistin-

guishable in appearance from control littermates. Strikingly, all PDK1-MerCre mice died from 5 to 15 weeks after the initiation of tamoxifen treatment (Fig. 1A).

One week after tamoxifen treatment, cardiac sizes were not significantly different between PDK1-MerCre mice and control mice (Fig. 1B). Echocardiographic examination revealed a significant decrease in the percent of fractional shortening (%FS), a parameter for contractile function, as early as 1 week after tamoxifen treatment in PDK1-MerCre mice (Fig. 1C and D). During this period, there was no increase in LV dimension or thinning of LV wall, which was consistent with the macroscopic findings (Fig. 1B and D). However, 4 weeks after tamoxifen treatment, progression of contractile dysfunction together with global chamber dilatation and wall thinning was observed in PDK1-MerCre mice (Fig. 1B and E). Histologically, interstitial fibrosis was increased at 1 week in

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.

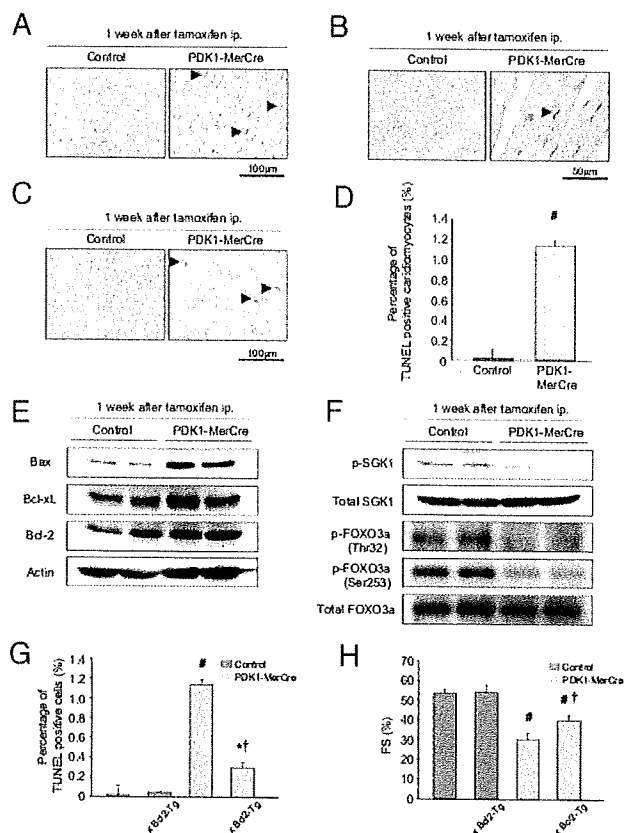
It was reported that PDK1-MCKCre showed marked reduction both in the heart size and in cardiac contractility (5). Since the *MCK* promoter directs expression of Cre recombinase before birth (5, 12), retardation of heart growth that was not proportional to somatic growth after birth might lead to cardiac 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  $\alpha$ -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.

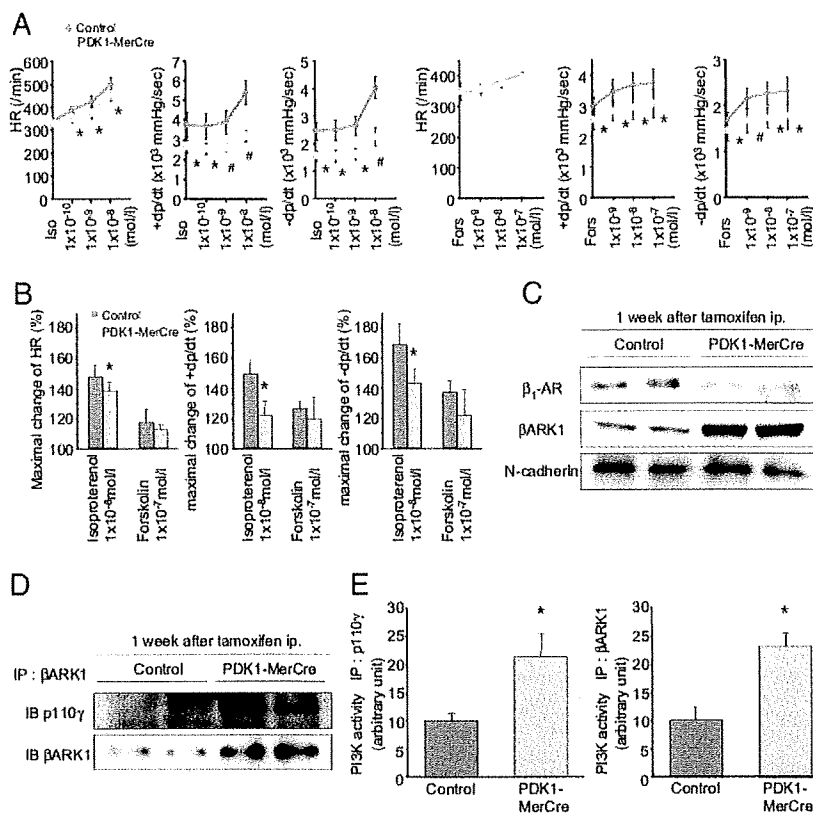
**Impairment of  $\beta$ -adrenergic Responsiveness in PDK1-MerCre Hearts.** Incomplete restoration of cardiac function by prevention of cardiomyocyte apoptosis implies that some functional abnormalities persist in viable cardiomyocytes in PDK1-MerCre mice. To determine whether  $\beta$ -adrenergic responsiveness 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  $\beta$ -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  $\alpha$ -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  $\beta$ -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 ( $1 \times 10^{-8}$  M), compared with control mice (Fig. 3B). In contrast, the maximal changes in these parameters after the stimulation of forskolin ( $1 \times 10^{-7}$  M) did not differ significantly between PDK1-MerCre and control mice (Fig. 3B). These results suggest that the responsiveness of  $\beta$ -AR is impaired in PDK1-MerCre mice.

Next, we measured the amount of  $\beta_1$ -AR in the membrane fraction by immunoblot analysis. In PDK1-MerCre hearts, the expression levels of  $\beta_1$ -AR in membrane fraction were markedly



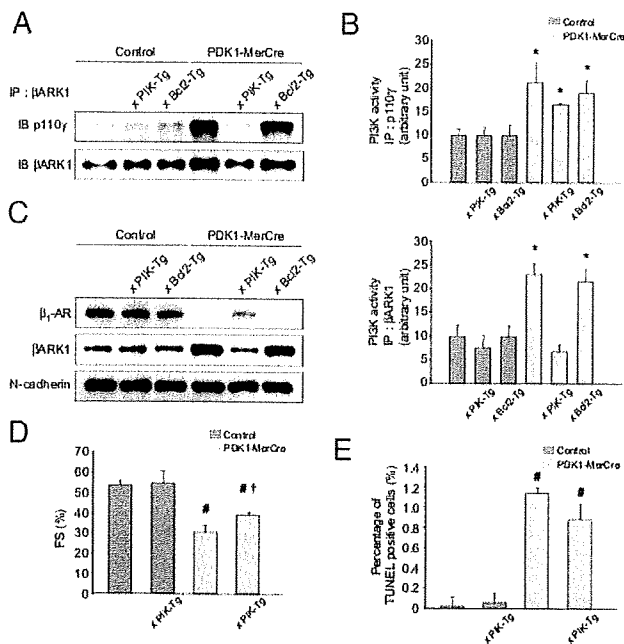
**Fig. 3.** Impaired  $\beta$ -adrenergic responsiveness in PDK1-MerCre mice. (A) Effects of isoproterenol and forskolin on heart rate, contraction, and relaxation in Langendorff-perfused mouse hearts 1 week after tamoxifen treatment. +dp/dt, maximum rate of LV pressure development; -dp/dt, maximum rate 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 ( $1 \times 10^{-8}$  M) or forskolin- ( $1 \times 10^{-7}$  M) were calculated. Values represent the mean  $\pm$  SEM. \*,  $P < 0.05$  versus control group. (C) Immunoblot analysis of  $\beta_1$ -AR and  $\beta$ 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  $\beta$ ARK1-associated p110 $\gamma$  protein in the hearts. (E) Kinase assays for PI3-K activity. The hearts were subjected to immunoprecipitation with antibody to p110 $\gamma$ , or  $\beta$ 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  $\beta_1$ -AR in cytosolic fraction was increased in PDK1-MerCre hearts, compared with control hearts, while the total amount of  $\beta_1$ -AR was unchanged (Fig. S3A and B), suggesting that receptor internalization underlies  $\beta_1$ -AR down-regulation in membrane fraction of PDK1-MerCre hearts. In response to  $\beta$ -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  $\beta_1$ -AR internalization leads to contractile dysfunction.

It has been reported that phosphorylation of  $\beta$ -AR by  $\beta$ -AR kinase 1 ( $\beta$ 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  $\beta$ ARK1 (Fig. 3C) and  $\beta$ ARK1-associated p110 $\gamma$ , a catalytic subunit of PI3-K $\gamma$ , were increased (Fig. 3D). Notably, PI3-K activity immunoprecipitated with antibodies to either p110 $\gamma$  or  $\beta$ ARK1 was enhanced (Fig. 3E) in PDK1-MerCre hearts.  $\beta$ ARK1 forms complex with PI3-K $\gamma$  through the phosphoinositide kinase (PIK) domain, and protein kinase activity of PI3-K $\gamma$  in this complex is required for receptor internalization (17). Therefore, these results suggest that enhanced PI3-K $\gamma$  activity in PDK1-MerCre hearts increases  $\beta$ ARK1/PI3-K $\gamma$  complex formation, and that  $\beta$ ARK1 phosphorylates  $\beta$ -AR to cause robust receptor internalization.

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

nalization by forming complex with  $\beta$ ARK1 and that robust  $\beta$ -AR internalization causes cardiac dysfunction, we examined whether disruption of the  $\beta$ ARK1/PI3-K $\gamma$  complex normalizes  $\beta$ -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  $\beta$ ARK1 and PI3-K $\gamma$ . The amount of  $\beta$ ARK1-associated p110 $\gamma$  protein was significantly decreased in PDK1-MerCre  $\times$  PIK-Tg mice, compared with PDK1-MerCre mice (Fig. 4A). Importantly,  $\beta$ 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 $\gamma$  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  $\beta_1$ -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  $\beta$ -adrenergic response, because the amount of  $\beta$ ARK1-associated p110 $\gamma$  protein (Fig. 4A),  $\beta$ ARK1-associated PI3-K activity (Fig. 4B), the expression levels of membranous  $\beta_1$ -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  $\beta$ ARK1-associated PI3-K $\gamma$  activity induces robust  $\beta$ -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  $\beta$ ARK1-associated p110 $\gamma$  protein in the hearts. (B) Kinase assays for PI3-K activity in the hearts. The hearts were subjected to immunoprecipitation with antibody to p110 $\gamma$  (Upper) or  $\beta$ 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  $\beta_1$ -AR and  $\beta$ 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

$\beta$ -AR signaling plays a pivotal role in the chronotropic and inotropic functions in the hearts (22). In PDK1-MerCre hearts, the activity of  $\beta$ ARK1-associated PI3-K $\gamma$  was enhanced, which enforced robust  $\beta_1$ -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  $\beta_1$ -AR down-regulation by interfering  $\beta$ ARK1/PI3-K $\gamma$  complex formation, and alleviated cardiac dysfunction in PDK1-MerCre mice. A recent report demonstrated that PI3-K $\gamma$  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 $\gamma$  activity (Fig. S7). Therefore, we suppose that impairment of  $\beta$ -adrenergic responsiveness results from intense  $\beta$ -AR down-regulation in PDK1-MerCre hearts.

It remains controversial whether down-regulation and desensitization of  $\beta$ -AR function is beneficial or detrimental in failing hearts. Indeed, clinical trials have indicated that the use of  $\beta$ -AR antagonists improves morbidity and mortality in patients of heart failure (1). Sustained  $\beta$ -AR overstimulation promotes energy consumption and apoptosis in cardiomyocytes (1, 24). But, accumulating evidence has suggested that normalization of  $\beta$ -adrenergic signaling by interfering  $\beta$ 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  $\beta$ -AR signaling may be narrow in failing hearts (22, 28). It has been reported that the proapoptotic effect of  $\beta_1$ -AR stimulation is dependent on  $Ca^{2+}$ /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  $\beta_1$ -AR did not induce excessive activation of CaMKII and cardiomyocyte apoptosis (Fig. 4E and Fig. S4). Thus, the  $\beta_1$ -AR normalization may improve contractile function without evoking a 'fight or flight' reaction, unlike the simple  $\beta_1$ -AR activation. Alternatively, robust  $\beta$ -AR internalization may activate adverse intracellular signaling pathways through  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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*<sup>fllox</sup> allele were previously described (7, 8). Mice expressing MerCreMer under the control of  $\alpha$ -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