

201008004A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 赤澤 宏

平成23（2011）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. 心不全誘導のプロトコールの検討 ----- 7

塩島 一朗

2. 心不全誘導による心房細動発症モデルの確立 ----- 9

小室 一成

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 ----- 20

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。心筋細胞におけるトランスジーンの発現が 18.8%と十分ではないが、タモキシフェン投与によるジフテリア毒素受容体の発現を誘導した後に、ジフテリア毒素を筋肉内投与し、心筋細胞死誘導が可能であった。また、ジフテリア毒素による心筋細胞死誘導モデルは、心房細動の誘発には適さないが、心室性不整脈の誘発に有用である可能性がある。

(研究代表者)

赤澤 宏 大阪大学大学院医学系研究科
循環器内科学特任講師

(研究分担者)

小室 一成 大阪大学大学院医学系研究科
循環器内科学教授
塩島 一朗 大阪大学大学院医学系研究科
心血管再生医学寄附講座准教授

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。また、心不全では心房細動を高率に併発するが、心房細動の発症によりさらに血行動態が悪化し、心不全を進行させることが知られている。

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による心不全モデルマウスを作製した。ジフテリア毒素受容体

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 はジフテリア毒素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、ジフテリア毒素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%の心筋細胞しかジフテリア毒素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、全ての心筋細胞でジフテリア毒素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

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。Germline transmissionが認められた5ラインの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

することで検討した結果、02-6のラインで最もトランスジーンが発現率が高く18.8%であった。このラインを用いて、以下のようなタモキシフェン投与によるジフテリア毒素受容体の発現誘導、さらにジフテリア毒素を筋肉内投与することで心筋細胞死誘導を行った。

心不全誘導のプロトコールの検討

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。

昨年度までに作成したCAG inducible proHBEGFマウス(02-6ライン)と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マウスを交配して得られた産仔に対して、10週齢で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、心筋細胞死誘導を行った。

心不全誘導による心房細動発症モデルの確立

昨年度までに作成したCAG inducible proHBEGFマウス(02-6ライン)と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マウスを交配して得られた産仔に対して、タモキシフェン投与によるジフテリア毒素受容体の発現を誘導した後に、ジフテリア毒素を筋肉内投与し、心筋細胞死誘導を行った。

ジフテリア毒素投与後7日目にマウス心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流下に右房を電気刺激し、心房細動の誘発を行った。また平行して、横行大動脈縮窄術による圧負荷モデルでも同様に、術後7日目にマウス心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流下に右房を電気刺激し、心房細動の誘発を行っ

た。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、大阪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心不全誘導のプロトコールの検討

昨年度までに作成したCAG inducible proHBEGFマウス)5ラインについて、トランスジーンが発現パターンをX-gal染色により検討した結果、トランスジーンが発現はモザイク状で、発現比率は8.9%~18.8%であった。これらの中でトランスジーンが発現比率が18.8%と最も高かったライン(02-6)のマウスを用いた検討を行った。コーンオイルに溶解したタモキシフェンを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、ジフテリア毒素受容体を発現する心筋細胞を*in situ* hybridization法により同定することができた。ジフテリア毒素受容体発現細胞はトランスジーン発現細胞とほぼ同じ割合であり、タモキシフェンによるジフテリア毒素受容体の発現誘導が効果的に実行できたことが示唆された。

さらに、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(5 µg/kg)、心筋細胞死誘導を行ったところ、ジフテリア毒素受容体発現細胞はすべて消失することが*in situ* hybridization法により確認された。その結果、左室駆出率の有意な低下が心エコー法により認め

られ、心機能低下が生じることが確認された。

心不全誘導による心房細動発症モデルの確立

コントロール実験として行った横行大動脈縮窄術による圧負荷モデルでは、ランゲンドルフ灌流下の電気刺激によって、シャム手術を行ったマウスでは心房細動の誘発が見られなかったが、横行大動脈縮窄術を行ったマウスでは心房細動が再現性よく誘発された。

ジフテリア毒素による心筋細胞死誘導モデルでは、ランゲンドルフ灌流下の電気刺激によって、心室性頻拍および心室細動が先行して生じたために、心房細動の誘発が出来なかった。

D. 考察

実際に、心筋特異的ジフテリア毒素受容体発現マウス (CAG inducible proHBEGF マウス) において、タモキシフェン投与によってジフテリア毒素受容体の発現が誘導された。さらに、ジフテリア毒素を筋肉内投与することで、心筋細胞死による心機能低下を誘導することが可能であった。

しかし、今回用いたマウスにおけるトランスジェンの発現率は18.8%と低く、目的を達成できていない。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ェンの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ェンを用いてトランスジェニックマウス (α MHC inducible proHBEGFマウス) の作成を行っている。また、トランスジェニックマウスでは、トランスジェンの発現が挿入された染色体の近傍のクロマチンの影響を受けるために、遺伝子発現誘導が目的通りに行われぬ可能性がある。そこで、マウスproHBEGF遺伝子をヒトproHBEGF遺伝子に置き換

えるノックインマウスの作成も開始している。今後は α MHC inducible proHBEGFマウスあるいはヒトproHBEGFノックインマウスとMerCreMer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を作成すべく研究を継続していきたい。

E. 結論

心筋特異的ジフテリア毒素受容体発現マウス (CAG inducible proHBEGF マウス) に対して、タモキシフェン投与によるジフテリア毒素受容体の発現を誘導した後に、ジフテリア毒素を筋肉内投与し、心筋細胞死誘導が可能であった。

また、ジフテリア毒素による心筋細胞死誘導モデルは、心房細動の誘発には適さないが、心室性不整脈の誘発に有用である可能性がある。心不全にともなう心房細動の病態研究には、横行大動脈縮窄術による圧負荷モデルを用いることが望ましい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Shimizu I, Minamino T, Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Koh GY, Akazawa H, Shiojima I, Kahn CR, Abel ED, Komuro I. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. *J Clin Invest*. 2010;120:1506-1514.
- Ueda K, Takano H, Niitsuma Y, Hasegawa H, Uchiyama R, Oka T, Miyazaki M, Nakaya H, Komuro I. Sonic hedgehog is a critical mediator of

- erythropoietin-induced cardiac protection in mice. *J Clin Invest.* 2010;120:2016- 2029.
- Sawada T, Minamino T, Fu HY, Asai M, Okuda K, Isomura T, Yamazaki S, Asano Y, Okada K, Tsukamoto O, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Kitakaze M, Komuro I. X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:1280-1289.
 - Naito AT, Okada S, Minamino T, Iwanaga K, Liu ML, Sumida T, Nomura S, Sahara N, Mizoroki T, Takashima A, Akazawa H, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. *Circ Res.* 2010;106:1692-1702.
 - Sandoval JC, Nakagawa-Toyama Y, Masuda D, Tochino Y, Nakaoka H, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Nakatani K, Inagaki M, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Nishida M, Ishigami M, Komuro I, Yamashita S. Fenofibrate reduces postprandial hypertriglyceridemia in CD36 knockout mice. *J Atheroscler Thromb.* 2010;17:610-618.
 - Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Okada S, Minamino T, Terasaki F, Kitaura Y, Komuro I. ATF6 is important under both pathological and physiological states in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49:113-120.
 - Taneike M, Yamaguchi O, Nakai A, Hikoso S, Takeda T, Mizote I, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nishida K, Shimizu T, Hori M, Komuro I, Shirasawa T, Mizushima N, Otsu K. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy.* 2010;6: 600-606.
 - Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, Sawada T, Okuda K, Asano Y, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Komuro I, Kitakaze M, Minamino T. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation.* 2010;122:361- 369.
 - Nakaoka Y, Shioyama W, Kunimoto S, Arita Y, Higuchi K, Yamamoto K, Fujio Y, Nishida K, Kuroda T, Hirota H, Yamauchi-Takahara K, Hirano T, Komuro I, Mochizuki N. SHP2 mediates gp130-dependent cardiomyocyte hypertrophy via negative regulation of skeletal alpha-actin gene. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49:157-164.
 - Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Oka T, Minamino T, Okada S, Morimoto S, Zhan DY, Terasaki F, Anderson ME, Inoue M, Yao A, Nagai R, Kitaura Y, Sasaguri T, Komuro I. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II δ causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2010;122: 891-899.
 - Sandoval JC, Nakagawa-Toyama Y, Masuda D, Tochino Y, Nakaoka H, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Nakatani K, Inagaki M, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Matsuyama A, Nishida M, Ishigami M, Komuro I, Yamashita S. Molecular mechanisms of ezetimibe-induced attenuation of postprandial hypertriglyceridemia. *J Atheroscler Thromb.* 2010; 17:914-924.
 - Higo S, Asano Y, Kato H, Yamazaki S, Nakano A, Tsukamoto O, Seguchi O, Asai M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Minamino T, Komuro I, Kitakaze M, Takashima S. Isoform-specific intermolecular disulfide bond formation of heterochromatin protein 1 (HP1). *J Biol Chem.* 2010;

285:31337-31347.

- Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res*. 2010;107:1071-1082.
- Akazawa H, Yasuda N, Miura S, Komuro I. Assessment of inverse agonism for the angiotensin II type 1 receptor. *Methods Enzymol*. 2010;485:25-35.
- Naito AT, Shiojima I, Komuro I. Wnt signaling and aging-related heart disorders. *Circ Res*. 2010;107:1295-1303.
- Tokunaga M, Liu ML, Nagai T, Iwanaga K, Matsuura K, Takahashi T, Kanda M, Kondo N, Wang P, Naito AT, Komuro I. Implantation of cardiac progenitor cells using self-assembling peptide improves cardiac function after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49:972-983.
- Li L, Zhou N, Gong H, Wu J, Lin L, Komuro I, Ge J, Zou Y. Comparison of angiotensin II type 1-receptor blockers to regress pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice. *Hypertens Res*. 2010;33:1289-1297.
- Aoki A, Ozaki K, Sato H, Takahashi A, Kubo M, Sakata Y, Onouchi Y, Kawaguchi T, Lin TH, Takano H, Yasutake M, Hsu PC, Ikegawa S, Kamatani N, Tsunoda T, Juo SH, Hori M, Komuro I, Mizuno K, Nakamura Y, Tanaka T. SNPs on chromosome 5p15.3 associated with myocardial infarction in Japanese population. *J Hum Genet*. 2011;56:47-51.
- Ohno K, Amano Y, Kakuta H, Niimi T, Takakura S, Orita M, Miyata K, Sakashita H, Takeuchi M, Komuro I, Higaki J, Horiuchi M, Kim-Mitsuyama S, Mori Y, Morishita R, Yamagishi S. Unique "delta lock" structure of telmisartan is involved in its

strongest binding affinity to angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404:434-437.

- Akazawa H, Komuro I. Navigational error in the heart leads to premature ventricular excitation. *J Clin Invest*. 2011;121:513-516.
- Sanada S, Komuro I. Costarring statins with ARBs: going to be a smash hit? *Circ J*. 2011;75:540-541.
- Ikeda H, Shiojima I, Oka T, Yoshida M, Maemura K, Walsh K, Igarashi T, Komuro I. Increased Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome in mice. *Mol Cell Biol*. 2011;31:1054-1065.
- Shioyama W, Nakaoka Y, Higuchi K, Minami T, Taniyama Y, Nishida K, Kidoya H, Sonobe T, Naito H, Arita Y, Hashimoto T, Kuroda T, Fujio Y, Shirai M, Takakura N, Morishita R, Yamauchi-Takahara K, Kodama T, Hirano T, Mochizuki N, Komuro I. Docking protein Gab1 is an essential component of postnatal angiogenesis after ischemia via HGF/c-met signaling. *Circ Res*. 2011;108:664-675.

2. 学会発表

国内

(赤澤 宏)

- 第47回日本臨床分子医学会学術集会（東京：2010年4月10-11日）：「アンジオテンシンII受容体活性化の新しいパラダイム」
- 20th World Congress of the International Society for Heart Research 2010（京都：2010年5月13-16日）：” Up-regulation of cardiac angiotensin II receptor induces ventricular remodeling independently of angiotensin II.”

- ・ 第33回日本高血圧学会総会（福岡：2010年10月15-17日）：「アンジオテンシンII受容体のアゴニスト非依存的活性化と心不全」
- ・ 第33回日本高血圧学会総会（福岡：2010年10月15-17日）：「心臓リモデリングにおけるアンジオテンシンII受容体自律的活性の病因的役割」
- ・ 第18回日本血管生物医学会学術集会（大阪：2010年12月1-3日）：”Agonist-independent activation of angiotensin II receptor in the pathogenesis of cardiac remodeling.”
- ・ 第75回日本循環器学会学術集会（以下の通り開催予定であったが、東日本大震災により中止となった。横浜：2011年3月18-20日）：”Agonist-dependent and -independent activation of angiotensin II receptor in the pathogenesis of cardiovascular remodeling.”

（小室 一成）

- ・ 第53回日本腎臓学会学術総会（神戸：2010年6月16-18日）：「心腎連関を考えたARBによる降圧療法の重要性」
- ・ 第58回日本心臓病学会学術集会（東京：2010年9月17-19日）：「心房細動発生の新しい機序とエビデンス」
- ・ 第33回日本高血圧学会総会（福岡：2010年10月15-17日）：「高血圧治療の新たな治療戦略 -ARB/CCB 配合剤への期待- 心肥大の形成を抑制するにはどうしたらよいか」
- ・ 第18回日本血管生物医学会学術集会（大阪：2010年12月3日）：「降圧は心血管病の最高の予防である -併用療法を必要とする高血圧患者の治療戦略」

海外

（赤澤 宏）

- ・ Basic Cardiovascular Sciences Conferences 2010 Scientific Sessions: Technological and Conceptual Advances in Cardiovascular Disease (July 19-22, 2010, Rancho Mirage, USA): “Constitutive activity of angiotensin II receptor contributes to cardiac remodeling independently of angiotensin II.”

（小室 一成）

- ・ Basic Cardiovascular Sciences Conference 2010 Scientific Sessions: Technological and Conceptual Advances in Cardiovascular Disease (Jul 19-22, 2010, Rancho Mirage, USA): “Wnt Signaling and Age-Associated Diseases.”
- ・ Keystone Symposia; Mechanisms of Cardiac Growth, Death and Regeneration (Feb 22-27, 2011, Keystone, USA): “p53 as a Mediator of Cardiovascular Diseases.”

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。

昨年度までに作成した CAG inducible proHBEGF マウス（02-6 ライン）と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 マウスを交配して得られた産仔に対し

て、10 週齢でタモキシフェン投与によるジフテリア毒素受容体の発現を誘導した後に、ジフテリア毒素を筋肉内投与し、心筋細胞死誘導を行った。

（倫理面への配慮）

実験動物を用いる研究については、大阪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

昨年度に作成した心筋特異的ジフテリア毒素受容体発現マウス（CAG inducible proHBEGF マウス）の中でトランスジーン発現比率が 18.8%と最も高かったライン（02-6）のマウスを用いて検討を行った。

コーンオイルに溶解したタモキシフェンを 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、ジフテリア毒素受容体を発現する心筋細胞を *in situ* hybridization 法により同定することができた。ジフテリア毒素受容体発現細胞はトランスジーン発現細胞とほぼ同じ割合であり、タモキシフェンによるジフテリア毒素受容

体の発現誘導が効果的に実行できたことが示唆された。

さらに、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 (5 µg/kg)、心筋細胞死誘導を行ったところ、ジフテリア毒素受容体発現細胞はすべて消失することが *in situ* hybridization 法により確認された。その結果、左室駆出率の有意な低下が心エコー法により認められ、心機能低下が生じることが確認された。

D. 考察

実際に、心筋特異的ジフテリア毒素受容体発現マウス (CAG inducible proHBEGF マウス) において、タモキシフェン投与によってジフテリア毒素受容体の発現が誘導された。さらに、ジフテリア毒素を筋肉内投与することで、心筋細胞死による心機能低下を誘導することが可能であった。

E. 結論

心筋特異的ジフテリア毒素受容体発現マウス (CAG inducible proHBEGF マウス) に対して、タモキシフェン投与によるジフテリア毒素受容体の発現を誘導した後に、ジフテリア毒素を筋肉内投与し、心筋細胞死誘導が可能であった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Shimizu I, Minamino T, Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Koh GY, Akazawa H, Shiojima I, Kahn CR, Abel ED, Komuro I. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in

rodents. *J Clin Invest.* 2010;120:1506-1514.

- Naito AT, Okada S, Minamino T, Iwanaga K, Liu ML, Sumida T, Nomura S, Sahara N, Mizoroki T, Takashima A, Akazawa H, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. *Circ Res.* 2010;106:1692-1702.
- Naito AT, Shiojima I, Komuro I. Wnt signaling and aging-related heart disorders. *Circ Res.* 2010;107:1295-1303.
- Ikeda H, Shiojima I, Oka T, Yoshida M, Maemura K, Walsh K, Igarashi T, Komuro I. Increased Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome in mice. *Mol Cell Biol.* 2011;31:1054-1065.

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 |

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

心不全誘導による心房細動発症モデルの確立

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

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、心不全誘導により発症する心房細動の病態研究に適した動物モデルの作成が可能か検討を行った。

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。また、心不全では心房細動を高率に併発するが、心房細動の発症によりさらに血行動態が悪化し、心不全を進行させることが知られている。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ルの検討とともに、この系を用いて心房細動の病態研究に適したモデルの作成を担当している。

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行っている。

昨年度までに作成した CAG inducible proHBEGF マウス（02-6 ライン）と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 マウスを交配して得られた産仔に対して、タモキシフェン投与によるジフテリア毒素受容体の発現を誘導した後に、ジフテリア毒素を筋肉内投与し、心筋細胞死誘導を行った。

ジフテリア毒素投与後 7 日目にマウス心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流下に右房を電気刺激し、心房細動の誘発を行った。また平行して、横行大動脈縮窄術による圧負荷モデルでも同様に、術後 7 日目にマウス心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流下に右房を電気刺激し、心房細動の誘発を行った。

（倫理面への配慮）

実験動物を用いる研究については、大阪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

コントロール実験として行った横行大動脈縮窄

術による圧負荷モデルでは、ランゲンドルフ灌流下の電気刺激によって、シャム手術を行ったマウスでは心房細動の誘発が見られなかったが、横行大動脈縮窄術を行ったマウスでは心房細動が再現性よく誘発された。

ジフテリア毒素による心筋細胞死誘導モデルでは、ランゲンドルフ灌流下の電気刺激によって、心室性頻拍および心室細動が先行して生じたために、心房細動の誘発が出来なかった。

D. 考察

ジフテリア毒素による心筋細胞死誘導モデルは、右房の電気刺激による心房細動の誘発には適さないことが明らかとなった。心筋細胞死による心室でのリエントリーが生じ、心室性頻拍や心室細動が発症してしまうことがその原因と考えられる。ジフテリア毒素による心筋細胞誘導モデルは、心不全にともなう心室性不整脈の病態研究に有用性を発揮する可能性がある。今後、心筋細胞死を量的、時期的にコントロールすることにより、心室性不整脈の発症がどのように修飾されるか検討を行いたい。

心房細動の誘発には、横行大動脈縮窄術による圧負荷モデルが適していると考えられる。心房細動のアップストリーム治療の治療標的の探索などに有用であると期待される。

E. 結論

ジフテリア毒素による心筋細胞死誘導モデルは、心房細動の誘発には適さないが、心室性不整脈の誘発に有用である可能性がある。心不全にともなう心房細動の病態研究には、横行大動脈縮窄術による圧負荷モデルを用いることが望ましい。

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.
- ## 2. 学会発表
- ### 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尿病治療戦略」

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
Shimizu I, Minamino T, Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, Teteno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Koh GY, <u>Akazawa H,</u> <u>Shiojima I,</u> Kahn CR, Abel ED, <u>Komuro I</u>	Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents.	<i>J Clin Invest.</i>	120	1506-1514	2010
Ueda K, Takano H, Niituma Y, Hasegawa H, Uchiyama R, Oka T, Miyazaki M, Nakaya H, <u>Komuro I</u>	Sonic hedgehog is a critical mediator of erythropoietin-induced cardiac protection in mice.	<i>J Clin Invest.</i>	120	2016-2029	2010
Sawada T, Minamino T, Fu HY, Asai M, Okuda K, Isomura T, Yamazaki S, Asano Y, Okada K, Tsukamoto O, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Kitakaze M, <u>Komuro I</u>	X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes.	<i>J Mol Cell Cardiol.</i>	48	1280-1289	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Naito AT, Okada S, Minamino T, Iwanaga K, Liu ML, Sumida T, Nomura S, Sahara N, Mizoroki T, Takashima A, <u>Akazawa H,</u> Nagai T, <u>Shiojima I,</u> <u>Komuro I</u>	Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury.	<i>Circ Res.</i>	106	1692-1702	2010
Sandoval JC, Nakagawa-Toyama Y, Masuda D, Tochino Y, Nakaoka H, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Nakatani K, Inagaki M, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Nishida M, Ishigami M, <u>Komuro I,</u> Yamashita S	Fenofibrate reduces postprandial hypertriglyceridemia in CD36 knockout mice.	<i>J Atheroscler Thromb.</i>	17	610-618	2010
Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Okada S, Minamino T, Terasaki F, Kitaura Y, <u>Komuro I</u>	ATF6 is important under both pathological and physiological states in the heart.	<i>J Mol Cell Cardiol.</i>	49	113-120	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Taneike M, Yamaguchi O, Nakai A, Hikoso S, Takeda T, Mizote I, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nishida K, Shimizu T, Hori M, <u>Komuro I</u> , Shirasawa T, Mizushima N, Otsu K	Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy.	<i>J Mol Cell Cardiol.</i>	6	600-606	2010
Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, Sawada T, Okuda K, Asano Y, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, <u>Komuro I</u> , Kitakaze M, Minamino T	Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload.	<i>Circulation</i>	122	361-369	2010
Nakaoka Y, Shioyama W, Kunimoto S, Arita Y, Higuchi K, Yamamoto K, Fujio Y, Nishida K, Kuroda T, Hirota H, Yamauchi-Takahara K, Hirano T, <u>Komuro I</u> , Mochizuki N	SHP2 mediates gp130-dependent cardiomyocyte hypertrophy via negative regulation of skeletal alpha-actin gene.	<i>J Mol Cell Cardiol.</i>	49	157-164	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Oka T, Minamino T, Okada S, Morimoto S, Zhan DY, Terasaki F, Anderson ME, Inoue M, Yao A, Nagai R, Kitaura Y, Sasaguri T, <u>Komuro I</u>	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent kinase II δ causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy.	<i>Circulation</i>	122	891-899	2010
Sandoval JC, Nakagawa-Toyama Y, Masuda D, Tochino Y, Nakaoka H, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Nakatani K, Inagaki M, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Matsuyama A, Nishida M, Ishigami M, <u>Komuro I</u> , Yamashita S	Molecular mechanisms of ezetimibe-induced attenuation of postprandial hypertriglyceridemia.	<i>J Atheroscler Thromb.</i>	17	914-924	2010
Higo S, Asano Y, Kato H, Yamazaki S, Nakano A, Tsukamoto O, Seguchi O, Asai M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Minamino T, <u>Komuro I</u> , Kitakaze M, Takashima S	Isoform-specific intermolecular disulfide bond formation of heterochromatin protein 1 (HP1).	<i>J Biol Chem.</i>	285	31337- 31347	2010
Minamino T, <u>Komuro I</u> , Kitakaze M	Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease.	<i>Circ Res.</i>	107	1071-1082	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Akazawa H, Yasuda N, Miura S, Komuro I	Assessment of inverse agonism for the angiotensin II type 1 receptor.	<i>Methods Enzymol.</i>	485	25-35	2010
Naito AT, Shiojima I, Komuro I	Wnt signaling and aging-related heart disorders.	<i>Circ Res.</i>	107	1295-1303	2010
Tokunaga M, Liu ML, Nagai T, Iwanaga K, Matsuura K, Takahashi T, Kanda M, Kondo N, Wang P, Naito AT, Komuro I	Implantation of cardiac progenitor cells using self-assembling peptide improves cardiac function after myocardial infarction.	<i>J Mol Cell Cardiol.</i>	49	972-983	2010
Li L, Zhou N, Gong H, Wu J, Lin L, Komuro I, Ge J, Zou Y	Comparison of angiotensin II type 1-receptor blockers to regress pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice.	<i>Hypertens Res.</i>	33	1289-1297	2010
Aoki A, Ozaki K, Sato H, Takahashi A, Kubo M, Sakata Y, Onouchi Y, Kawaguchi T, Lin TH, Takano H, Yasutake M, Hsu PC, Ikegawa S, Kamatani N, Tsunoda T, Juo SH, Hori M, Komuro I, Mizuno K, Nakamura Y, Tanaka T	SNPs on chromosome 5p15.3 associated with myocardial infarction in Japanese population.	<i>J Hum Genet.</i>	56	47-51	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohno K, Amano Y, Kakuta H, Niimi T, Takakura S, Orita M, Miyata K, Sakashita H, Takeuchi M, <u>Komuro I</u> , Higaki J, Horiuchi M, Kim-Mitsuyama S, Mori Y, Morishita R, Yamagishi S	Unique "delta lock" structure of telmisartan is involved in its strongest binding affinity to angiotensin II type 1 receptor.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	404	434-437	2011
<u>Akazawa H</u> , Komuro I	Navigational error in the heart leads to premature ventricular excitation.	<i>J Clin Invest.</i>	121	513-516	2011
Sanada S, <u>Komuro I</u>	Costarring statins with ARBs: going to be a smash hit?	<i>Circ J.</i>	75	540-541	2011
Ikeda H, <u>Shiojima I</u> , Oka T, Yoshida M, Maemura K, Walsh K, Igarashi T, <u>Komuro I</u>	Increased Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome in mice.	<i>Mol Cell Biol.</i>	31	1054-1065	2011