

201024044A

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小室 一成

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告	
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	
1. アデノウイルスコンストラクトの作成、in vitro の実験 -----	5
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解析 -----	9
岡 亨	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	11
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	13

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

研究代表者 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

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 δ の活性亢進、癌抑制遺伝子 p53 の発現量増加、心筋細胞アポトーシスの増加がそれぞれ認められ、CaMKII δ 阻害剤の投与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抑制され、心機能は改善した。さらに単離心筋においてカルシウム感受性と細胞内カルシウム濃度の測定をおこなったところ、細胞内カルシウム濃度には変化がみられなかったものの、カルシウム感受性は低下していることが明らかになった。以上の結果から、カルシウム感受性低下にともなう局所のカルシウム濃度上昇が CaMKII δ の活性亢進をきたし、さらに p53 依存性心筋細胞アポトーシスを増加させることが、遺伝子変異による拡張型心筋症の発症に重要であるものと考えられた。

(研究分担者)

塩島一朗 大阪大学大学院医学系研究科
心血管再生医学 准教授
赤澤 宏 大阪大学大学院医学系研究科
循環器内科学 講師
岡 亨 大阪大学大学院医学系研究科
循環器内科学 講師

新規治療法の開発のためには拡張型心筋症の発症機序解明が必要であると考え、マウスモデルを用いて拡張型心筋症の発症機序を明らかにすることを本研究の目的とした。

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。我々は、ヒトで報告されている変異型心筋 α アクチン遺伝子 (cardiac α -actin R312H) 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、この拡張型心筋症モデルマウスを用いて、心筋症発症機序の解析を行ってきた。昨年度までの結果から、CaMKII δ の活性化とそれにとともなう p53 の発現増加、さらに p53 依存性心筋細

A. 研究目的

拡張型心筋症の予後は、非常に不良である。また、拡張型心筋症の最終的な治療法は現在のところ心臓移植しかなく、新たな治療法の確立が望まれている。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。

胞アポトーシスが拡張型心筋症の発症機序として重要であることが明らかになった。そこで本年度はCaMKII δ 活性化のメカニズムを明らかにするために、単離心筋を用いてカルシウム感受性の測定および心筋細胞内カルシウム動態の解析をおこなった。また、CaMKII δ の過剰発現による表現型を培養細胞を用いて検討した。さらに、p53の分解を促進する薬剤として最近我々が見出した17-AAGの効果について検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、大阪大学の動物実験指針に準拠して研究を実施した。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た。また麻酔等の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) 拡張型心筋症モデルマウス心筋におけるカルシウム感受性

拡張型心筋症モデルマウス心筋におけるカルシウム感受性について検討した。拡張型心筋症モデルマウスおよび野生型マウスからスキンドファイバーを作成し、カルシウム感受性を測定したところ、最大カルシウム張力には両者で変化がみられなかったが、カルシウム感受性は拡張型心筋症モデルマウス由来心筋繊維で低下していることが明らかになった。

(2) 拡張型心筋症モデルマウス心筋における細胞内カルシウム濃度

単離心筋における心筋細胞内カルシウム濃度変化についてカルシウム蛍光指示薬を用いて検討したところ、野生型マウスおよび拡張型心筋症モデルマウス由来の単離心筋では心筋細胞内カルシウム濃度変化については差が

みとめられなかった。

(3) 培養心筋細胞におけるCaMKII δ の過剰発現

培養心筋細胞にアデノウイルスベクターを用いてCaMKII δ を過剰発現し、その表現型について検討した。CaMKII δ の過剰発現によりp53の発現が増加した。

(4) 拡張型心筋症モデルマウスに対する17-AAGの効果

拡張型心筋症モデルマウスに対して17-AAGの投与をおこなって、心機能に対する効果を検討した。拡張型心筋症モデルマウスに対して17-AAGを投与したところ、心拡大および心機能低下の進行が抑えられた。

D. 考察

ヒトで報告されている変異型心筋 α アクチン遺伝子を心臓特異的に過剰発現することにより拡張型心筋症のモデルマウスを確立し、これを用いて心筋症発症機序の解析をおこなってきた。昨年度までの検討によりCaMKII δ の活性化とそれにとまなうp53依存性心筋細胞アポトーシスの増加が心筋症発症の機序として重要であることが明らかとなった。そこで本年度はCaMKII δ 活性化のメカニズムを明らかにするために、単離心筋を用いてカルシウム感受性の測定および心筋細胞内カルシウム動態の解析をおこなった。細胞内カルシウム濃度には変化がみられなかったものの、カルシウム感受性は低下していたことから、カルシウム感受性の低下にとまなう心筋局所のカルシウム濃度が上昇し、CaMKII δ を活性化しているものと考えられた。CaMKII δ を培養細胞に過剰発現した場合にもp53の発現誘導がみられ、CaMKII δ 活性化の病態生理学的意義が確認された。また、p53の分解を促進する効果を持つ17-AAG投与でも心機能の改善がみられ、p53発現誘導の心筋症

発症への関与も確認された。

今回の検討ではカルシウム感受性が低下する原因が明らかにされていない。また、CaMKII δ 活性化による p53発現量増加の機序についても明らかではない。これらについては今後さらに検討を要するものと考えられる。

E. 結論

変異型心筋 α アクチン遺伝子を心臓特異的に過剰発現することにより得られた拡張型心筋症モデルマウスにおいて、心筋症発症機序の検討をおこなった。その結果、カルシウム感受性低下にともなう局所のカルシウム濃度上昇が CaMKII δ の活性亢進をきたし、さらに p53による心筋細胞アポトーシスを増加させることが、心筋症発症の機序として重要であることが明らかになった。

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;120:1506-14.

・ 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;106:1692-702.

・ 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;122:891-9.

・ 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(6):2016-29.

・ Ikeda H, Shiojima I, Oka T, Yoshida M, Maemura K, Walsh K, Igarashi T, Komuro I. Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome in mice. *Mol Cell Biol* 2011;31:1054-65.

・ 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;49:113-20.

・ 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 Gene* 2011;56:47-51.

・ 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;108:664-75.

2. 学会発表

(小室一成)

国内

・小室一成. 第53回日本腎臓学会学術講演会 (平成22年6月16日、兵庫)「心腎連関を考えた ARB による降圧療法の重要性」

・小室一成. 第58回日本心臓病学会学術集会 (平成22年9月17日～9月19日、東京)「心房細動発生の新しい機序をエビデンス」

・小室一成. 第33回日本高血圧学会総会 (平成22年10月15日～10月17日、福岡)「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」

・小室一成. 第18回日本血管生物医学会 (平成22年12月3日、大阪) “Angiogenic Therapy for heart failure”

海外

・Komuro I. Basic Cardiovascular Sciences Scientific Sessions 2010 (Jul 19-22, 2010, Rancho Mirage, USA) “Wnt Signaling and Age-Associated Diseases”

・Komuro I. Keystone Symposia (Feb 22-27, 2011, Keystone, USA) p53 as a Mediator of Cardiovascular Diseases.

(塩島一朗)

国内

・塩島一朗. 第4回 Vascular Seminar in Kyushu (平成22年4月23日、福岡)「Wnt signaling in heart development and diseases」

・塩島一朗. 北撰 Target Organ Protection

Forum (平成22年11月11日、大阪)「Wnt シグナルの心臓発生および心疾患における役割」 (赤澤 宏)

国内

・赤澤 宏. 第47回日本臨床分子医学会学術集会 (2010年4月10-11日、東京)「アンジオテンシン II 受容体活性化の新しいパラダイム」

・赤澤 宏. 第20回 ISHR 世界大会 (2010年5月13-16日、京都)：“Up-regulation of cardiac angiotensin II receptor induces ventricular remodeling independently of angiotensin II.”

・赤澤 宏. 第33回日本高血圧学会総会 (2010年10月15-17日、福岡)：「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18回日本血管生物医学会学術集会 (2010年12月1-3日、大阪)：“Agonist-independent activation of angiotensin II receptor in the pathogenesis of cardiac remodeling.”

海外

・Akazawa H. Basic Cardiovascular Sciences Scientific Sessions 2010 (Jul 19-22, 2010, Rancho Mirage, USA) “Constitutive activity of angiotensin II receptor contributes to cardiac remodeling independently of angiotensin II.”

(岡 亨)

国内

・岡 亨. 第20回 ISHR 世界大会 (2010年5月13日、京都)：“Hypertrophied heart suffering diastolic dysfunction exhibits impaired coronary flow and altered expression of angiogenic factors.”

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）
分担研究報告書

アデノウイルスコンストラクトの作成、in vitro の実験
研究分担者 塩島一郎 大阪大学大学院医学系研究科心血管再生医学 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。昨年度までの解析によりカルシウム依存性リン酸化酵素 CaMKII δ の活性化が心筋症発症に関与する可能性が示唆されていた。そこで本年度はアデノウイルスベクターを用いて CaMKII δ を培養心筋細胞に過剰発現し、その表現型を解析した。CaMKII δ の過剰発現により心筋細胞において p53 の発現が増加したことから、CaMKII δ 活性化の心筋症発症における病態生理学的意義が in vitro の実験系でも確認された。

A. 研究目的

拡張型心筋症の予後は、非常に不良であり、新たな治療法の確立が望まれている。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。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て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して研究をおこなった。

B. 研究方法

我々は、ヒトで報告されている変異型心筋 α アクチン遺伝子 (cardiac α -actin R312H) 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、この拡張型心筋症モデルマウスを用いて、心筋症発症機序の解析を行ってきた。昨年度までの結果から、CaMKII δ の活性化とそれともなう p53 の発現増加、さらに p53 依存性心筋細胞アポトーシスが拡張型心筋症の発症機序として重要であることが明らかになった。そこで本年度はアデノウイルス

ベクターを用いて CaMKII δ を培養心筋細胞に過剰発現し、その表現型を解析した。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、大阪大学の動物実験指針に準拠して研究を実施した。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た。また麻酔等の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

アデノウイルスベクターを用いて CaMKII δ を培養心筋細胞に過剰発現したところ、p53 の発現が増加していることが確認された。

D. 考察

昨年度までの研究により、CaMKII δ の活性化が心筋症発症に関与する可能性が示唆されていた。本研究により、CaMKII δ 活性化の心筋症発症における病態生理学的意義が in vitro の実験系でも確認された。CaMKII δ 活性化に

よる p53発現量増加の機序については今後の検討課題である。

E. 結論

アデノウイルスベクターを用いて CaMKII δ を培養心筋細胞に過剰発現したところ、p53の発現誘導がみとめられ、CaMKII δ 活性化の心筋症発症における病態生理学的意義が in vitro の実験系でも確認された。

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;120:1506-14.

・ 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;106:1692-702.

・ Ikeda H, Shiojima I, Oka T, Yoshida M, Maemura K, Walsh K, Igarashi T, Komuro I. Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome in mice. **Mol Cell Biol** 2011;31:1054-65.

2. 学会発表

国内

・ 塩島 一朗. 第4回 Vascular Seminar in Kyushu (平成22年4月23日、福岡)「Wnt signaling in heart development and diseases」

・ 塩島一朗. 北摂 Target Organ Protection Forum (平成22年11月11日、大阪)「Wnt シグナルの心臓発生および心疾患における役割」

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）

分担研究報告書

遺伝子改変マウスの作成

研究分担者 赤澤 宏 大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学 講師

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。昨年度までの解析によりカルシウム依存性リン酸化酵素 CaMKII δ の活性化とそれにともなう p53依存性心筋細胞アポトーシスが心筋症発症に関与する可能性が示唆されていた。そこで本年度は p53の分解を促進する薬剤として最近我々が見出した17-AAG の効果について検討した。拡張型心筋症モデルマウスに対して17-AAG を投与したところ、心拡大および心機能低下の進行が抑えられ、p53発現増加の心筋症発症における病態生理学的意義が確認された。

A. 研究目的

拡張型心筋症の予後は、非常に不良であり、新たな治療法の確立が望まれている。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。研究分担者は、解析に必要な遺伝子改変マウスの作成およびその表現型の解析を担当した。

B. 研究方法

我々は、ヒトで報告されている変異型心筋 α アクチン遺伝子 (cardiac α -actin R312H) 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、この拡張型心筋症モデルマウスを用いて、心筋症発症機序の解析を行ってきた。昨年度までの結果から、CaMKII δ の活性化とそれにともなう p53の発現増加、さらに p53依存性心筋細胞アポトーシスが拡張型心筋症の発症機序として重要であることが明らかになった。そこで本年度は p53の分解を促進する薬剤として最近我々が見出した

17-AAG の拡張型心筋症モデルマウスに対する効果について検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、大阪大学の動物実験指針に準拠して研究を実施した。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た。また麻酔等の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

拡張型心筋症モデルマウスに対して17-AAG を投与したところ、心拡大および心機能低下の進行が抑制された。

D. 考察

昨年度までの研究により、p53の発現増加が心筋症発症に関与する可能性が示唆されていた。本研究により、p53発現増加の心筋症発症における病態生理学的意義が確認された。ま

た、17-AAGはp53の関与する他の心疾患においても有効である可能性が示唆された。

E. 結論

p53の分解を促進する薬剤の投与により、拡張型心筋症モデルマウスの心機能改善が改善することが明らかになった。

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;120:1506-14.

・ 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;106:1692-702.

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 (2010年4月10-11日、東京):「アンジオテンシンII受容体活性化の新しいパラダイム」

・ 赤澤 宏. 第20回 ISHR 世界大会 (2010年5月13-16日、京都):“Up-regulation of cardiac angiotensin II receptor induces ventricular

remodeling independently of angiotensin II.”

・ 赤澤 宏. 第33回日本高血圧学会総会 (2010年10月15-17日、福岡):「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18回日本血管生物医学会学術集会 (2010年12月1-3日、大阪):“Agonist-independent activation of angiotensin II receptor in the pathogenesis of cardiac remodeling.”

海外

・ Akazawa H. Basic Cardiovascular Sciences Scientific Sessions 2010 (Jul 19-22, 2010, Rancho Mirage, USA) “Constitutive activity of angiotensin II receptor contributes to cardiac remodeling independently of angiotensin II.”

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）

分担研究報告書

遺伝子改変マウスの解析

研究分担者 岡 亨 大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学 講師

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。昨年度までの解析によりカルシウム依存性リン酸化酵素 CaMKII δ の活性化とそれにともなう p53依存性心筋細胞アポトーシスが心筋症発症に関与する可能性が示唆されていた。そこで本年度は CaMKII δ 活性化の機序を解明するため単離心筋を用いてカルシウム感受性の測定および心筋細胞内カルシウム動態の解析をおこなった。細胞内カルシウム濃度に変化なく、カルシウム感受性は低下していたことから、カルシウム感受性の低下にともなって心筋局所のカルシウム濃度が上昇し、CaMKII δ を活性化しているものと考えられた。

A. 研究目的

拡張型心筋症の予後は、非常に不良であり、新たな治療法の確立が望まれている。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。研究分担者は、細胞内カルシウム動態の解析を担当した。

B. 研究方法

我々は、ヒトで報告されている変異型心筋 α アクチン遺伝子 (cardiac α -actin R312H) 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、この拡張型心筋症モデルマウスを用いて、心筋症発症機序の解析を行ってきた。昨年度までの結果から、CaMKII δ の活性化とそれにともなう p53の発現増加、さらに p53依存性心筋細胞アポトーシスが拡張型心筋症の発症機序として重要であることが明らかになった。そこで本年度は CaMKII δ 活性化の機序を明らかにするために、単離心筋を

用いてカルシウム感受性の測定および心筋細胞内カルシウム動態の解析をおこなった。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる研究については、大阪大学の動物実験指針に準拠して研究を実施した。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た。また麻酔等の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

拡張型心筋症モデルマウス由来単離心筋細胞では、細胞内カルシウム濃度には変化がみられなかったものの、カルシウム感受性は低下していた。

D. 考察

昨年度までの研究により、CaMKII δ の活性化が心筋症発症に関与する可能性が示唆され

ていた。本研究により、カルシウム感受性の低下にともなって心筋局所のカルシウム濃度が上昇し、CaMKII δ を活性化しているものと考えられた。

E. 結論

拡張型心筋症において遺伝子変異が収縮機能不全をきたす機序のひとつとして、カルシウム感受性の低下にともなって心筋局所のカルシウム濃度が上昇し、CaMKII δ を活性化している可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・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;122:891-9.

・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(6):2016-29.

・Ikeda H, Shiojima I, Oka T, Yoshida M, Maemura K, Walsh K, Igarashi T, Komuro I. Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome in mice. *Mol Cell Biol* 2011;31:1054-65.

2. 学会発表

国内

・岡 亨. 第20回 ISHR 世界大会 (2010年5月13日、京都): "Hypertrophied heart suffering diastolic dysfunction exhibits impaired coronary flow and altered expression of angiogenic factors."

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

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, 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	120	1506-1514	2010
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	106	1692-1702	2010
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	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent kinase IIdelta causes heart failure by accumulation of p53 in dilated cardiomyopathy	Circulation	122	891-899	2010
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	120	2016-2029	2010
Ikeda H, Shiojima I, Oka T, Yoshida M, Maemura K, Walsh K, Igarashi T, Komuro I	Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome in mice	Mol Cell Biol	31	1054-1065	2011
Toko H, Takahashi H, Kayama Y, Okada S, Minamino T, Terasaki F, Kitaura Y, Komuro I	ATF6 is important under pathological and physiological states in the heart	J Mol Cell Cardiol	49	113-120	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	J Hum Gene	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
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, <u>Komuro I</u>	Docking Protein Gab1 Is an Essential Component of Postnatal Angiogenesis After Ischemia via HGF/c-Met Signaling	Circ Res	108	664-675	2011



Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents

Ippei Shimizu,¹ Tohru Minamino,^{1,2} Haruhiro Toko,¹ Sho Okada,¹ Hiroyuki Ikeda,¹ Noritaka Yasuda,¹ Kaoru Tateno,¹ Junji Moriya,¹ Masataka Yokoyama,¹ Aika Nojima,¹ Gou Young Koh,³ Hiroshi Akazawa,¹ Ichiro Shiojima,⁴ C. Ronald Kahn,⁵ E. Dale Abel,⁶ and Issei Komuro^{1,4}

¹Department of Cardiovascular Science and Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan. ²PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan. ³Biomedical Research Center and Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon, Korea. ⁴Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University School of Medicine, Osaka, Japan. ⁵Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ⁶Division of Endocrinology, Metabolism and Diabetes and Program in Molecular Medicine, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah, USA.

Although many animal studies indicate insulin has cardioprotective effects, clinical studies suggest a link between insulin resistance (hyperinsulinemia) and heart failure (HF). Here we have demonstrated that excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. Chronic pressure overload induced hepatic insulin resistance and plasma insulin level elevation. In contrast, cardiac insulin signaling was upregulated by chronic pressure overload because of mechanical stretch-induced activation of cardiomyocyte insulin receptors and upregulation of insulin receptor and *Irs1* expression. Chronic pressure overload increased the mismatch between cardiomyocyte size and vascularity, thereby inducing myocardial hypoxia and cardiomyocyte death. Inhibition of hyperinsulinemia substantially improved pressure overload-induced cardiac dysfunction, improving myocardial hypoxia and decreasing cardiomyocyte death. Likewise, the cardiomyocyte-specific reduction of insulin receptor expression prevented cardiac ischemia and hypertrophy and attenuated systolic dysfunction due to pressure overload. Conversely, treatment of type 1 diabetic mice with insulin improved hyperglycemia during pressure overload, but increased myocardial ischemia and cardiomyocyte death, thereby inducing HF. Promoting angiogenesis restored the cardiac dysfunction induced by insulin treatment. We therefore suggest that the use of insulin to control hyperglycemia could be harmful in the setting of pressure overload and that modulation of insulin signaling is crucial for the treatment of HF.

Introduction

Cardiac hypertrophy is defined as an increment of ventricular mass resulting from increased cardiomyocyte size and is the adaptive response of the heart to an increased hemodynamic load due to either physiological factors such as exercise or pathological states such as hypertension and valvular diseases (1). Exercise-induced cardiac hypertrophy does not progress to heart failure (HF) (2, 3) and therefore is thought to be “physiological hypertrophy.” On the other hand, pressure overload initially induces “adaptive hypertrophy,” but causes “maladaptive (pathological) hypertrophy” in the chronic phase that results in HF (1).

Several signaling pathways have been implicated in the development of physiological or pathological cardiac hypertrophy. The insulin/PI3K/Akt axis plays a crucial role in the development of physiological hypertrophy as well as in normal cardiac growth, whereas activation of G-protein-coupled receptors in collaboration with PKC and calcineurin/nuclear factor of activated T cells (NFAT) pathways is involved in the development of pathological hypertrophy (4). Although homozygous cardiomyocyte-specific insulin receptor knockout (CIRKO) mice have smaller hearts than WT controls (5), both WT and CIRKO mice have shown a compa-

table increase of cardiac mass in response to pathological hypertrophic stimuli such as pressure overload (6). Overexpression of constitutively active p110 α , a catalytic component of PI3K, in the heart has led to enhanced cardiac growth with preserved systolic function (7). Conversely, myocardial expression of dominant-negative p110 α has inhibited the physiological hypertrophic response during postnatal growth and following exercise in mice, whereas the response to pressure overload has not been altered (8). Likewise, homozygous *Akt1*-deficient mice have shown defective exercise-induced cardiac hypertrophy (9), further supporting a crucial role of the insulin/PI3K/Akt pathway in physiological hypertrophy and growth of the heart.

Besides their role in physiological hypertrophy and normal cardiac growth, insulin signals may induce pathological hypertrophic responses. It has been shown that chronic hyperinsulinemia stimulates angiotensin II signaling that is involved in pathological hypertrophy (10). Mild to moderate activation of Akt was shown to induce cardiac hypertrophy with preservation of function (11, 12), whereas high levels of activated Akt expression in the heart led to pathological hypertrophy (13). Short-term Akt activation induced physiological cardiac hypertrophy, but constitutive activation of this pathway led to cardiac dysfunction (14). In this state, coordinated tissue growth and angiogenesis in the heart were disrupted, leading to myocardial hypoxia (14). Likewise, it has been demonstrated that chronic pressure overload increases the mismatch between cardiomyocyte size and vascularity and therefore induces

Authorship note: Ippei Shimizu and Tohru Minamino contributed equally to this work.

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

Citation for this article: *J Clin Invest*. 2010;120(5):1506–1514. doi:10.1172/JCI40096.

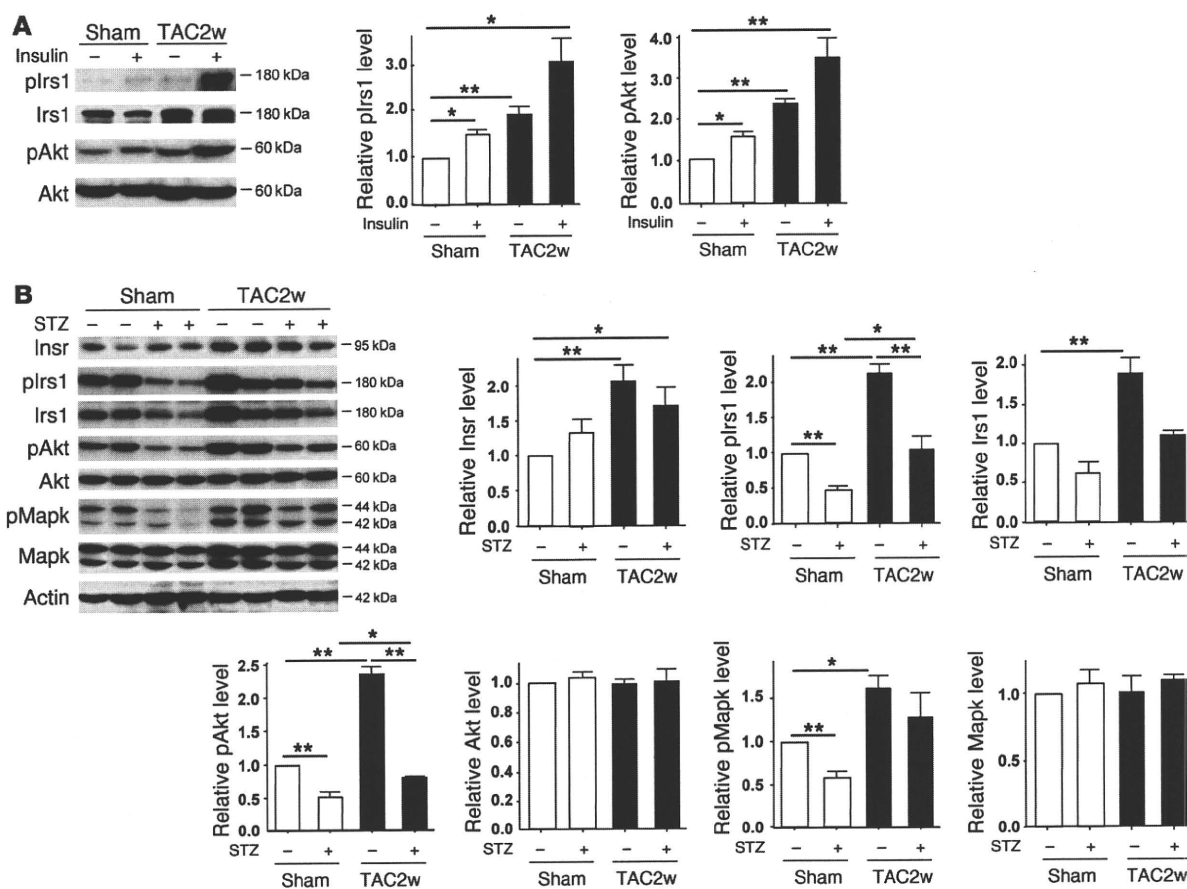


Figure 1

Upregulation of cardiac insulin signals by pressure overload. (A) Mice were subjected to TAC or sham operation (sham), and heart samples were obtained 2 weeks later. Mice were starved for 6 hours, and insulin or PBS was injected before sacrifice. plrs1 and pAkt levels in the heart were examined by Western blot analysis. The graphs indicate relative expression levels of plrs1 and pAkt. $n = 3$. TAC2w, 2 weeks after TAC. (B) Mice were subjected to TAC or sham operation and were sacrificed 2 weeks later. Components of the insulin signaling pathway in the heart were examined by Western blot analysis. The graphs indicate relative expression levels of these signaling molecules. $n = 3$. Data are shown as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

myocardial hypoxia and cardiomyocyte death, leading to cardiac dysfunction (15). Moreover, intensive glycemic control of diabetic patients by insulin treatment has been reported to increase cardiovascular events (16). In the present study, we examined the role of insulin signaling in the development of cardiac dysfunction induced by pressure overload.

Results

Cardiac insulin signaling is activated by pressure overload. To investigate the role of the insulin signal pathway in failing hearts, we created severe transverse aortic constriction (TAC) in mice at 11 weeks of age. In this model, cardiac hypertrophy gradually progressed and reached a peak on day 7 after TAC (Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI40096DS1). Systolic function was preserved until day 7 but was significantly decreased on day 14 along with left ventricular dilatation (Supplemental Figure 1). Seven and fourteen days after TAC, we treated the mice with insulin (1 IU/kg) before sacrifice and examined the downstream signaling pathway of the insulin receptor (Insr) in the heart. Insulin-induced phosphorylation of insulin receptor

substrate-1 (pIrs1) and Akt (pAkt) was markedly upregulated in the hearts of the TAC group compared with the sham-operated group (Figure 1A and Supplemental Figure 2A). We also found that the insulin signal pathway was constitutively activated in the TAC hearts under fasting conditions (Figure 1B and Supplemental Figure 2B). Expression of Insr and Irs1 protein as well as plrs1 and pAkt protein was significantly increased in the TAC heart. These results suggest that chronic pressure overload upregulates cardiac insulin signaling. Enhanced insulin signaling was also observed in the hearts of spontaneously hypertensive rats (Supplemental Figure 3A).

Reduction of plasma insulin ameliorates systolic dysfunction induced by pressure overload. To determine whether upregulation of cardiac insulin signals has a pathological role in HF, we treated the mice with streptozotocin (STZ) (50 mg/kg i.p. for 5 days) at 4 weeks before TAC. Injection of STZ markedly decreased plasma insulin to below detectable levels, while the plasma glucose level gradually increased (Supplemental Figure 4). Pressure overload led to prominent cardiac hypertrophy along with upregulation of cardiac insulin signaling (Figure 1B and Figure 2, A and B). Systolic function was impaired and the left ventricular systolic dimension

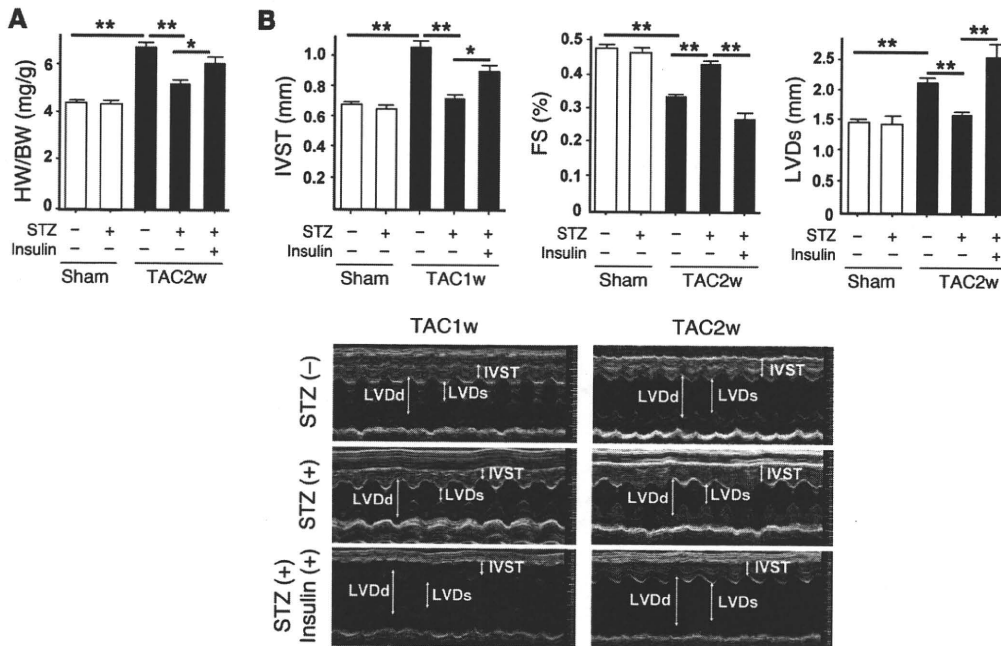


Figure 2

Depletion of plasma insulin attenuates systolic dysfunction induced by pressure overload. (A) STZ- or vehicle-treated mice were subjected to TAC or sham operation. The heart weight/body weight (HW/BW) ratio was measured 2 weeks after operation. In the insulin-treated group, daily i.p. injection of insulin (0.1 IU/g/d) was performed from 9 weeks (2 weeks after STZ treatment) to 13 weeks of age (2 weeks after TAC). *n* = 22–24. (B) Cardiac hypertrophy and systolic function of the animals prepared for A were estimated by echocardiography at 1 week (IVST) or 2 weeks (FS and LVDs) after operation. Photographs show representative results of echocardiography (M-mode). *n* = 6–10. Data are shown as mean ± SEM. **P* < 0.05; ***P* < 0.01. IVST, intraventricular septal thickness; FS, fractional shortening.

(LVDs) was increased at 14 days after TAC (Figure 2, A and B). These alterations were significantly ameliorated in the mice treated with STZ (Figure 1B and Figure 2, A and B). Similar results were obtained at 6 weeks after TAC (Supplemental Figure 2C). We next examined the effect of insulin on cardiac function in this setting. STZ-treated mice were subjected to daily injection of insulin (0.1 IU/g/d from 9 weeks to 13 weeks of age) and to TAC at 11 weeks of age. Insulin treatment significantly improved hyperglycemia (Supplemental Figure 4). However, this treatment significantly enhanced cardiac hypertrophy and decreased systolic function along with left ventricular dilatation (Figure 2, A and B), indicating that insulin signaling influenced the development of systolic dysfunction due to pressure overload.

Reduction of plasma insulin inhibits cardiac hypoxia during pressure overload. We have recently demonstrated that cardiac angiogenesis is critically involved in the adaptive mechanism of cardiac hypertrophy and that an increased mismatch between cardiomyocyte size and vascularity is a crucial determinant of the transition from cardiac hypertrophy to HF (15). Consistent with our previous results, chronic pressure overload increased the cross-sectional area (CSA) of cardiomyocytes and decreased the relative vascularity (number of vessels/number of cardiomyocytes/CSA) (Figure 3, A–C), which in turn led to exacerbation of myocardial hypoxia (Figure 3D) and cardiomyocyte death (Figure 3E). In contrast, the increase of CSA after TAC was significantly attenuated by STZ treatment and the relative vascular density was markedly increased (Figure 3, A–C). Consequently, depletion of plasma insulin prevented cardiac hypoxia and cardiomyocyte death during chronic pres-

sure overload (Figure 3, D and E). Conversely, insulin treatment of STZ-treated mice increased CSA and decreased relative vascular density, thereby exacerbating cardiac hypoxia and cardiomyocyte death (Figure 3, A–E). Additional treatment with the proangiogenic factor cartilage oligomeric matrix protein–angiopoietin-1 (COMP–Ang1) (17) increased relative vascular density and thereby improved cardiac hypoxia and systolic dysfunction (Supplemental Figure 5, A–C). We also found that a decrease of relative vascular density was associated with cardiac dysfunction, along with upregulation of insulin signaling in spontaneously hypertensive rats (Supplemental Figure 3, A–G), suggesting that cardiac insulin signaling plays a pathological role in HF by increasing a mismatch between cardiomyocyte size and vascularity.

*Cardiomyocyte-specific reduction of *Insr* expression attenuates systolic dysfunction due to pressure overload.* To further investigate the role of cardiac insulin signaling, we generated CIRKO mice by using the Cre-loxP system. We prepared transgenic mice in which a transgene encoding Cre recombinase was driven by the cardiomyocyte-specific α -myosin heavy chain (MHC) promoter (18). We then crossed these MHC-Cre mice with mice bearing floxed *Insr* alleles (19) and produced TAC in the resulting mice. Since homozygous CIRKO (*Insr^{flax/flax}Cre⁺*) mice have been shown to develop systolic dysfunction in response to pressure overload (6), we utilized heterozygous CIRKO (*Insr^{flax/+}Cre⁺*) mice with reduced cardiac expression of *Insr* (Figure 4A). These mice had a normal heart size and normal systolic function under physiological conditions (Figure 4, B and C). However, cardiac insulin signaling was markedly attenuated in the TAC heart of CIRKO mice (Figure 4B), and therefore chronic pressure

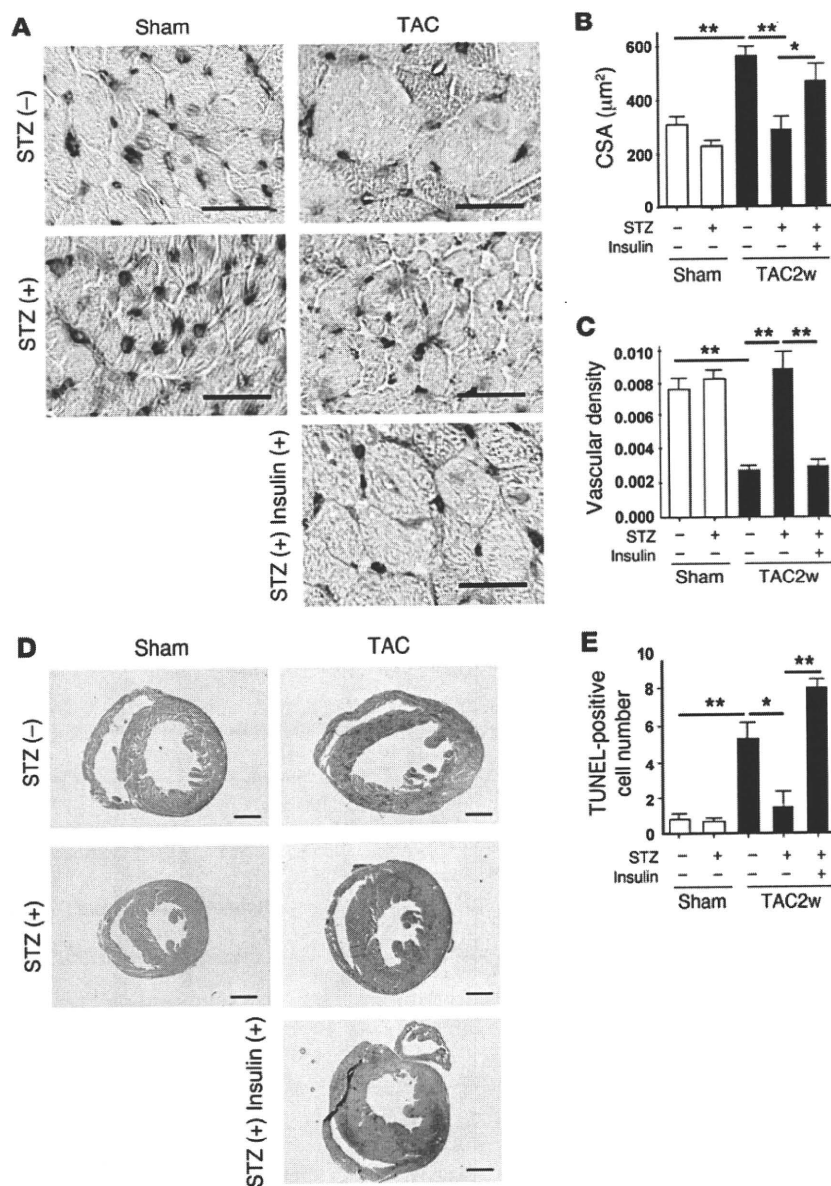


Figure 3 Reduction of plasma insulin inhibits cardiac hypoxia due to pressure overload. (A) Animals were prepared as described for Figure 2A. Immunohistochemistry using antibodies against platelet and endothelial cell adhesion molecule (dark brown) and dystrophin (light brown) was performed at 2 weeks after operation. Scale bars: 20 µm. (B and C) CSA of cardiomyocytes (B) and relative vascular density (C) were estimated as described in Methods. $n = 4-5$. (D) Cardiac ischemia (brown) in mice prepared as described for Figure 2A was estimated with a Hypoxyprobe-1. Scale bars: 1 mm. (E) Number of TUNEL-positive cells per 1×10^4 cardiomyocytes. $n = 4-6$. Data are shown as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

overload caused less severe hypertrophy than in WT mice (Figure 4, C and D). Both systolic dysfunction and left ventricular dilatation were significantly inhibited in CIRKO mice compared with their littermate controls (Figure 4D and Supplemental Figure 6). Histological examination showed that the increase of CSA after TAC was significantly attenuated and relative vascular density was markedly increased in CIRKO mice (Figure 5, A-C). In consequence, the number of dead cardiomyocytes was significantly smaller in CIRKO mice than in their littermate controls (Figure 5D).

To investigate the role of Akt in HF induced by pressure overload, we utilized heterozygous *Akt1*-deficient (*Akt1*^{+/-}) mice. Two weeks after TAC operation, both systolic dysfunction and left ventricular dilatation were significantly inhibited in *Akt1*^{+/-} mice compared with their littermate controls (Figure 6A). Histological examination showed that the increase of CSA after TAC was significantly attenuated and relative vascular density was markedly increased in *Akt1*^{+/-} mice (Figure 6, B and C), which was associated

with decreased activation of Akt (Figure 6D). These data suggest that sustained activation of Akt could cause cardiac dysfunction under chronic pressure overload.

Mechanism of enhanced cardiac insulin signaling due to pressure overload.

To investigate the additional mechanisms by which chronic pressure overload enhances insulin signaling in the heart, we examined pIrs1 levels immediately after TAC. Western blot analysis revealed that pressure overload markedly increased the pIrs1 level from as early as 1 minute after the operation (Figure 7A). Such activation was significantly attenuated in both heterozygous and homozygous CIRKO mice (Figure 7A and Supplemental Figure 7), suggesting that mechanical stress may also upregulate the insulin signaling pathway via direct activation of *Insr* independent of its ligand. To further investigate the influence of mechanical stress on insulin signaling, we stretched cultured cardiomyocytes by 20% and examined the changes in the pIrs1 level. Consistent with our hypothesis, stretching of cardiomyocytes led to marked activation of insulin sig-

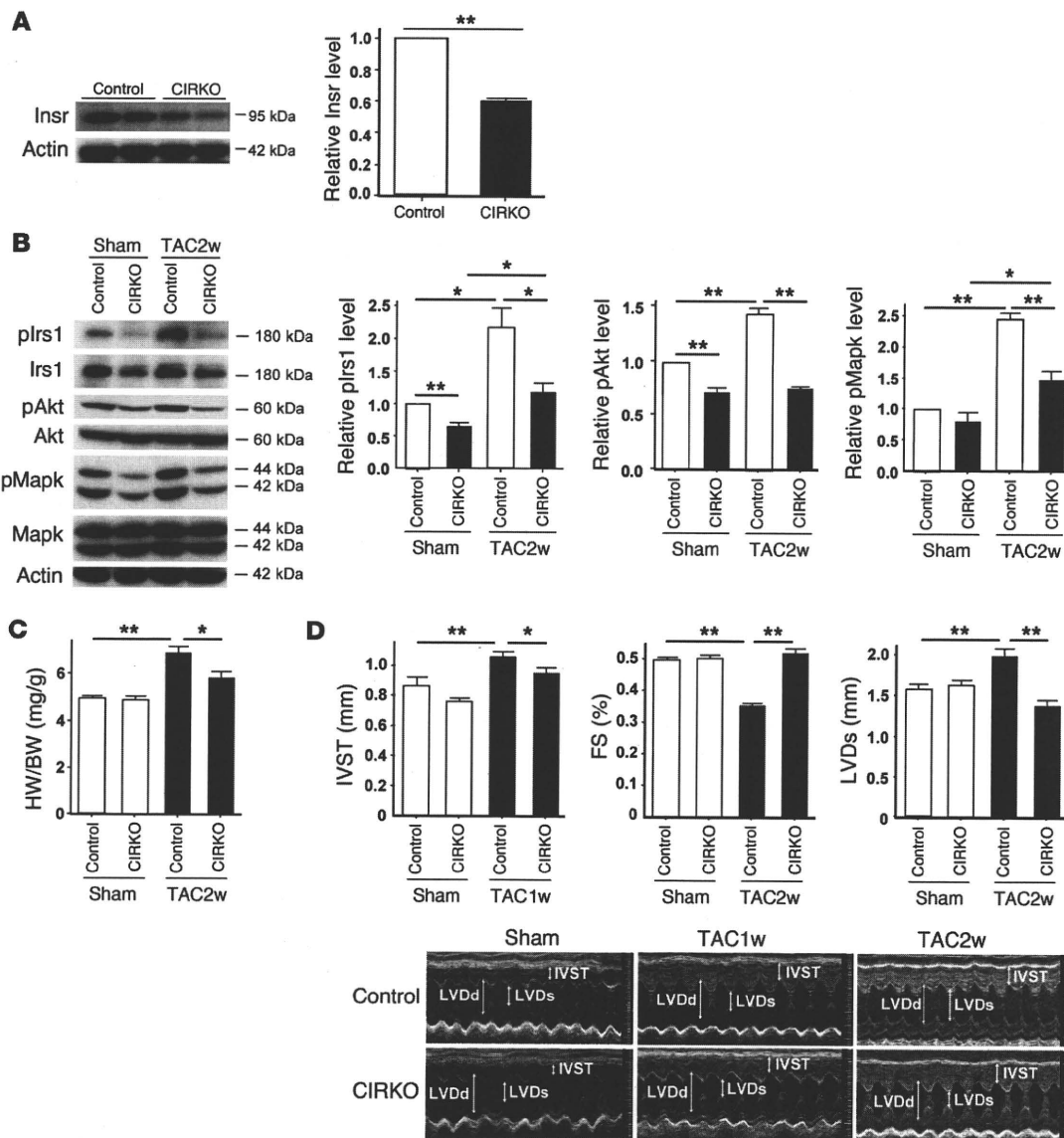
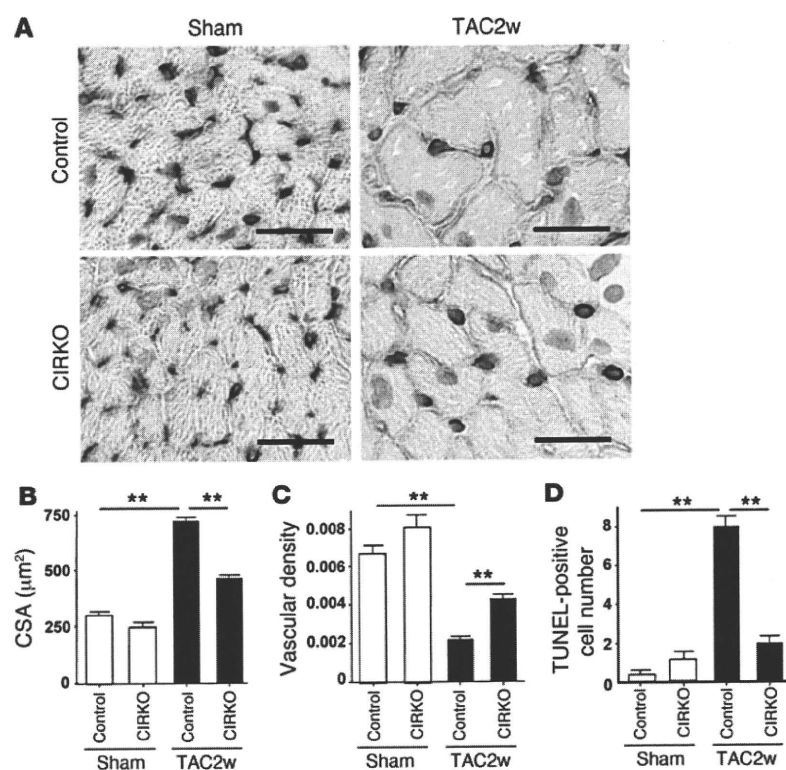


Figure 4

Cardiomyocyte-specific reduction of *Insr* expression attenuates systolic dysfunction due to pressure overload. (A) Western blot analysis of *Insr* expression in the hearts of CIRKO mice (*Insr^{lox1/+Cre+}*) and their littermate controls (control). Graphs indicate relative expression levels of *Insr*. $n = 3$. (B) CIRKO mice (*Insr^{lox1/+Cre+}*) or littermate controls were subjected to TAC or sham operation, and components of the insulin signaling pathway in the heart were examined by Western blot analysis at 2 weeks after operation. Graphs indicate relative expression levels of these signaling molecules. $n = 3$. (C) The heart weight/body weight ratio of animals prepared as described in A was measured at 2 weeks after operation. $n = 7-9$. (D) Cardiac hypertrophy and systolic function of animals prepared as described in A were assessed by echocardiography at 1 week (IVST) or 2 weeks (FS and LVDs) after operation. Photographs show representative results of echocardiography (M-mode). $n = 8-13$. Data are shown as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

naling (Figure 7B). This activation was abolished by knockdown of *Insr* expression (Figure 7C), whereas knockdown of *Igf1* or the *Igf1* receptor showed a marginal effect (Supplemental Figure 8). These results suggest that mechanical stress mainly enhances insulin signaling through *Insr* and that *Igf1* and the *Igf1* receptor contribute to stretch-induced activation of this signaling to a lesser extent. This is similar to the known direct activation of the angiotensin II type I receptor by mechanical stress, which contributes to pathological hypertrophy (20); however, the precise mechanism of how mechanical stress activates insulin signaling needs further investigation.

There is accumulating evidence that suggests a potential relationship between insulin resistance and cardiac hypertrophy (21, 22). Therefore we examined plasma glucose and insulin levels in mice subjected to chronic pressure overload. Both glucose and insulin levels were significantly higher in the TAC group than in the sham-operated group (Figure 7D). More importantly, the homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) index was markedly elevated in the TAC group (Figure 7D). Furthermore, insulin-induced phosphorylation of Akt was impaired in the liver of the TAC group compared with the sham-operated group (Figure 7E).

**Figure 5**

Cardiomyocyte-specific reduction of *Insr* expression attenuates cardiac hypoxia due to pressure overload. (A) CIRKO mice (*Insr^{fllox/+Cre+}*) or littermate controls were subjected to TAC or sham operation. Immunohistochemistry using antibodies against platelet and endothelial cell adhesion molecules (dark brown) and dystrophin (light brown) was performed at 2 weeks after operation. Scale bars: 20 μm. (B and C) CSA of cardiomyocytes (B) and relative vascular density (C) were estimated as described in Methods. $n = 4-5$. (D) Number of TUNEL-positive cells per 1×10^4 cardiomyocytes. $n = 4-5$. Data are shown as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

These results suggest that chronic pressure overload induces hepatic insulin resistance, thereby inducing hyperinsulinemia, whereas there is no cardiac insulin resistance due to direct activation of *Insr* as well as to upregulation of *Insr* and *Irs1*.

Discussion

A number of clinical studies have strongly indicated the link between insulin resistance and nonischemic HF (23–26). Approximately two-thirds of patients with essential hypertension have abnormal glucose metabolism (27), and there is a positive relationship between cardiac hypertrophy and the plasma insulin concentration (28), suggesting that elevation of insulin contributes to myocardial growth in the presence of chronic pressure overload. Consistent with these reports, we found that chronic pressure overload induced hepatic insulin resistance and increased the plasma insulin level. Myocardial stretch activated *Insr*, and chronic pressure overload not only increased the activity of insulin signaling (pIrs1 and pAkt levels), but also upregulated the expression of *Insr* and *Irs1* protein. This in turn facilitated activation of cardiac insulin signals by hyperinsulinemia. Such activation enhanced the mismatch between vascularity and cardiomyocyte size and increased cardiomyocyte death. This increase was associated with systolic dysfunction and may be one of the causes of HF induced by chronic pressure overload. However, we have not excluded other mechanisms by which excessive insulin signals promote cardiac dysfunction during pressure overload. For example, cardiac hypoxia may affect metabolism and contraction of myocytes with their viability being unchanged. Indeed, we only showed evidence for tissue hypoxia in the TAC heart by using pimonidazole, which may not be sufficient. We have not demonstrated that inhibition of cardiomyocyte death attenuates systolic dysfunction of the TAC heart. Accordingly, we cannot definitively conclude that hypoxia-

induced cardiomyocyte death was essential for the development of HF. It has been reported that endothelial cells in the heart release a variety of factors, such as neuregulin and nitric oxide, that regulate survival and function of cardiomyocytes and that endothelial-myocardial interaction plays a crucial role in maintaining systolic function (29). Thus, it is also possible that a decrease of relative vascular density in the TAC heart impairs such paracrine mechanisms, leading to systolic dysfunction.

Our results were similar to those of the study with conditional Akt transgenic animals (14). In this model, Akt signaling could be switched on or off in the heart. These mice developed physiological hypertrophy following short-term induction, but exhibited pathological hypertrophy with longer periods of Akt activation due to an imbalance between cardiac growth and angiogenesis. Interestingly, cardiac dysfunction was further impaired when Akt was switched off after prolonged activation. These results suggest that Akt signaling itself is beneficial for maintenance of systolic function in this model; however, excessive cardiac growth with insufficient angiogenesis causes pathological hypertrophy. Thus, although insulin/Akt signaling has been implicated in the development of physiological hypertrophy, constitutive activation of these signals can induce HF when coordinated tissue growth and angiogenesis are disrupted.

Alterations of myocardial substrate metabolism have been implicated in the pathogenesis of contractile dysfunction and HF (21, 30). Studies on animal models of HF have demonstrated that, during transition from cardiac hypertrophy to ventricular dysfunction, expression of genes encoding for mitochondrial fatty acid (FA) β -oxidation enzymes shows a coordinated decrease, resulting in a shift of myocardial metabolism that recapitulates the fetal heart gene program, with glucose instead of FA becoming the primary energy substrate (31, 32). Clinical studies have revealed that patients with nonischemic cardiomyopathy exhibit alterations of