

201324/24A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

希少難治性心疾患由来iPS細胞を用いた左心低形成症候
群の予後因子の解明に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 王 英正

平成26（2014）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

希少難治性心疾患由来iPS細胞を用いた左心低形成症候
群の予後因子の解明に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 王 英正

平成26（2014）年 4月

目 次

I. 総括研究報告 希少難治性心疾患由来iPS細胞の樹立に関する研究		
王 英正	-----	3
II. 分担研究報告 術後先天性心疾患の臨床疫学調査に関する研究		
佐野 俊二	-----	9
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	16
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	19

希少難治性心疾患由来iPS細胞の樹立に関する研究

研究代表者 王 英正 岡山大学病院教授

研究要旨

左心低形成症候群における姑息的心臓手術後の長期予後を予測する診断法は確立されていない。臨床的に術後成績を規定する要素として、房室弁逆流や蛋白漏出性腸症の併発があるが、遅発性のため術後早期における予測は困難である。本研究によって、疾患特異的iPS細胞を樹立することにより、病態発症前に初期化し培養細胞系において、経時的に房室弁や心臓の四腔形成に重要な各種転写因子を網羅的に解析することで、術後の遅発性心臓合併症を予測する。

研究分担者：

佐野 俊二

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

きた6株の疾患特異的iPS細胞（左心低形成症候群5株と二心室心1株）を心筋細胞に分化誘導させ、網羅的遺伝子解析で得られた左心低形成症候群に固有な心臓発生転写因子群の発現パターンに注目し、心臓手術後の継続的な臨床疫学調査データと照合することで、術後心不全の再発や心不全死の独立予後規定因子を解明する。

A. 研究目的

単心室循環を示す左心低形成症候群は1万人に1人の頻度で年間約1,000人が出生し、米国では小児心臓移植適応例の約半数が本疾患に属するように極めて予後が不良の希少難治性心疾患である。一方、乳幼児における心臓移植の実績がない我が国では、生後直後より3期にわたる心臓手術が唯一の治療法であり、10年生存率は約60%と限界がある。このため、標準外科的治療後の中長期における生命予後を予測する方法を開発することは、治療戦略上、心臓移植適応候補者を選定する面からも重要な研究課題である。

本研究では、申請者らがこれまでに樹立して

B. 研究方法

1. 疾患特異的iPS細胞の樹立と心臓発生異常の機序解明

- ① 申請者らはこれまでに90症例以上の先天性心疾患由来の心臓内幹細胞を単離培養し、左心低形成症候群固有の転写因子発現様式について明らかにした。しかしながら、すでに病態発症している組織細胞では、ヒト心臓発生初期における転写因子群の異常について大部分において集約することは可能であるが、臨床上孤発性疾患が多い左心低形成症候

群に対しては、前駆細胞を用いた解析法により個々の疾患における起因遺伝子を同定することは困難である。

- ② 一方、iPS細胞作製技術は、既に疾患を発症した患者の体組織細胞を初期化することで、疾患発症前に遺伝子情報をリセットでき、かつ継時的に疾患発症にかかわる遺伝子発現異常を網羅することができる。申請者らは5株の疾患特異的iPS細胞を用いて、単心室心の解剖発生学的異常を規定する4つの転写因子群（NKX2.5, ISL1, TBX5, HAND2）の発現が著明に低下し、収縮能が著しく障害されていることを明らかにした。
- ③ 本研究では、初年度に合計8株以上の左心低形成症候群由来のiPS細胞を樹立し、流入路や流出路閉鎖を伴う重篤性が高い本疾患の心臓発生異常に関わる分子制御機序について網羅的に解明する。
- ④ 本研究で得られたiPS細胞や疾患情報は、「疾患特異的iPS細胞研究事業拠点」に寄託し提供する。

2. 臨床疫学データと同定した転写因子群の異常との連結統合的解析

- ① 心臓手術後における心不全症状の再燃や心不全死の有無を中心に、iPS細胞の機能解析した全症例に関する房室弁逆流の遅発性発症や蛋白漏出性腸症の合併について追跡調査する。
- ② 本研究班を共同研究拠点とし、疫学調査成果を評価後、「次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発」研究班に情報提供し、予後診断ガイドラインを作成する。

(倫理面への配慮)

- ① 本研究に携わるすべての者は、ヒトを対象とする全ての医学研究が準拠すべき「世界医師

会ヘルシンキ宣言」（1964年第18回世界医師会ヘルシンキ総会で起草、2008年10月WMAソウル総会で最新修正）を順守して行う。

- ② 疫学研究の適正な推進のため、「疫学研究に関する倫理指針」（平成20年12月1日一部改正）を順守し、研究対象者の個人の尊厳と人権を守る。
- ③ 各関係者は臨床研究を遂行にあたり、「臨床研究に関する倫理指針」（平成20年厚生労働省告示第415号）を遵守して行う。
- ④ ヒト心臓組織の入手は、外部委員を含めた岡山大学倫理委員会にて審査承認されたプロトコル（承認766号）に従順し、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」（平成10年厚生科学審議会答申）を遵守する。患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、患者さんの同意のもと不要となった余剰組織を研究開発に使用する。
- ⑤ 個人情報の保護を最優先し、ヒト組織の取り扱いに関する資料の提出及び調査には積極的に協力する。また、提供していただいたヒト組織は幹細胞の分離のみに全て使用し、倫理委員会で承認されていない研究目的には一切使用しない。
- ⑥ 患者さん由来末梢血からiPS細胞の樹立は岡山大学倫理委員会で承認され（承認c13003号）、遺伝子組み換え実験（承認9068号）やレトロ及びレンチウイルスの感染はP2レベルの実験室で行い、移植された動物は隔離した遺伝子操作動物管理施設にて飼育を行う。
- ⑦ 動物実験計画書（承認389号）に従い、動物施設への実験動物の導入に当たっては、必要に応じて適切な検疫、隔離飼育等を行うことにより、実験実施者、飼養者及び他の実験動物の健康を損ねることのないように講じる。

- ⑧ 臨床疫学研究に参加する患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、研究内容に関する説明と理解を得る。同意書原本は説明文書と共にカルテに添付して岡山大学病院で保管する。同意の撤回が生じた場合は、同意撤回文書をデータセンターにも提出する。
- ⑨ 症例登録はデータセンターとして臨床研究情報センターにおき中央登録制とする。使用する被験者識別コードは施設において個人情報を含まず、一意となる任意コードを用いる。
- ⑩ マウス及びラットの使用実験は、動物愛護の条約精神に則り、動物を適切な麻酔下で手術及び移植行為を行う。心標本の取り出し等の状況においても、動物の安楽死を最重要事項として守り、動物の虐待を避ける。

C. 研究結果

- ① 患者由来心臓内幹細胞(CPCs)から、合計10株の疾患特異的iPS細胞（うち、左心低形成症候群（HLHS）8株及び二心室心患者（総肺静脈環流異常症、心室中隔欠損症）由来iPS細胞2株）を樹立した。
- ② 樹立したiPS細胞は、各種未分化転写因子群（OCT4、SSEA3、SSEA4、TRA-1-60、TRA-1-81、NANOG）を発現し、アルカリフォスファターゼ染色陽性だった。
- ③ OCT4とNANOGのプロモーター領域におけるDNA脱メチル化解析では、いずれのiPS細胞株においても、初期化前のCPCsに比べ、著明に脱メチル化していた。
- ④ 網羅的遺伝子解析では、樹立したiPS細胞は、OCT4やNANOGをはじめ、胚性幹細胞や京都大学で樹立したiPS細胞である201B7と類似した遺伝子発現パターンを示した。核型解析では、両疾患由来のiPS細胞とも染色体異常は認めなかった。三胚葉成分を伴う奇形腫を形

成した。

- ⑤ 次に、iPS細胞に心筋分化誘導を行った。両疾患由来の株で免疫染色にてサルコメア構造をもつTroponin-T陽性細胞を確認した。さらに、Troponin-Tの発現量をリアルタイムPCRで解析すると、HLHS由来の心筋細胞では、コントロール細胞に比べ、3週目でその発現が有意に低下していた。
- ⑥ この発現量の差の原因を検討するため、ダイレクトシーケンス法にてNKX2-5、HAND1、NOTCH1の遺伝子変異を解析した。結果、NKX2-5で1箇所、NOTCH1で5箇所の同義一塩基多型(SNPs)を認めたが、遺伝子変異は認めなかった。
- ⑦ 次に、iPS細胞からの心筋分化誘導過程における心臓発生関連転写因子群の変化をリアルタイムPCRで経時的に解析した。HLHS由来のiPS細胞は、コントロール細胞に比べ、心臓の初期発生に関与するNKX2-5、HAND1、HAND2、房室管と弁形成に関与するTBX2、NOTCH1、HEY1、HEY2、そして左室流出路形成に関与するNOTCH1、HEY1、HEY2において、その発現量が著明に抑制されていた。
- ⑧ さらに、エピジェネティック機序を介した転写制御を調査するため、CPCs、未分化iPS細胞、iPS由来心筋細胞を用いてクロマチン免疫沈降を行った。CPCsと未分化iPS細胞では差は認めなかったが、HLHS-iPS由来心筋細胞で、NKX2-5のプロモーター領域におけるdimethylated histone H3-lysine 4 (H3K4me2)とacetylated histone H3 (acH3)が二心室心由来心筋細胞に比べ、有意に減少していた。逆に、trimethylated H3-lysine 27 (H3K27me3)は二心室心由来心筋細胞に比べ、有意に増加していた。
- ⑨ 疾患特異的iPS細胞を用いて同定された上記

の病態形成に関わる候補の転写因子群であるNKX2-5、NOTCH1、HAND1について、gain及びloss of functionの検討を加えた。心筋特異的構造蛋白であるTNT2及びNPPAのプロモーター解析では、NKX2-5、NOTCH1、HAND1の一過性過剰発現により活性が相乗的に上昇し、二心室心由来iPS細胞ではこれらを個別に抑制するshRNAの導入により、プロモーター活性が有意に低下した。

D. 考察

- ① 我々は、合計10株の先天性心疾患特異的iPS細胞の樹立に成功した。先天性心疾患は、その多くが孤発性であり、また疾患モデルの形成が困難なことから、病態解析が難渋している。疾患特異的iPS細胞を用いての心筋分化誘導は、心臓発生過程をin vitroで再現でき、疾患発症前からの病態発生を経時的に解析することが可能となる。
- ② ダイレクトシーケンス法により、これらの検体に帰存する各疾患に関して、遺伝子変異は認めず、遺伝的原因は否定的であった。
- ③ 包括的な遺伝子解析により我々は、HLHS疾患特異的iPS細胞からの心筋分化誘導過程で、心臓の初期発生に関与するNKX2-5、HAND1、HAND2、房室管と弁形成に関与するTBX2、NOTCH1、HEY1、HEY2、左室流出路形成に関与するNOTCH1、HEY1、HEY2の発現が著明に抑制されていることを突き止めた。
- ④ そこで行ったエピジェネティック機構解析では、我々はHLHS由来心筋細胞で、NKX2-5のプロモーター領域のヒストン修飾の異常を突き止めた。これらの結果から、左室流出路の低形成や左心室自体の形成不全が原因と言われるHLHSにおいて、心臓発生に関わる各種転写因子群の発現低下と、その転写活性を制御しているヒス

トン修飾の異常が、複雑心奇形疾患の発症における規定因子群であることが示唆された。

- ⑤ さらに詳細な心筋構造蛋白のプロモーター(TNT2, NPPA)解析により、NKX2-5, NOTCH1, HAND1が集約的に病態発症に関わる最も重要な転写因子群であることを突き止めた。これらの転写因子群は相乗的に心臓の器官形成に関わり、心臓の心室流出路、中隔形成や弁形成に必須であることが既知の心臓発生学的知見とよく一致する。

E. 結論

これまで各種転写因子群の遺伝子欠損モデルの表現型解析で報告された表現型とは一部類似しているものの、ヒトにおける臨床病態像は単一の遺伝子の発現異常だけでなく、複合的な転写因子群(NKX2-5, HAND1, NOTCH1)の密接で一連の発現調節との相関関係が臨床病態の形成に関与していることが明らかとなった。

今後、各症例の長期臨床像の予後を追跡しつつ、流出路、中隔形成ならびに弁形成などといった心臓内における各種部位の発生に基づく臨床病態像や臨床疫学調査との関連を詳細に探求する。さらに、本研究期間内で樹立した各種疾患特異的iPS細胞を駆使して、難治性疾患の長期的臨床疫学調査研究に応用する革新的予後診断法の開発に向けた研究を行う。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Hayashi YK, Taniguchi T, Miyagawa K, Hamaoka T,

- Maruyama N, Matoba S, Ikeda K, Yamada H, Oh H, Ueyama T. MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by $\alpha 1$ -adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(10):3811-6.
- ② Tarui S, Sano S, Oh H. Stem cell therapy in patients with single ventricle physiology. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*, 2014 (in press).
- ③ 樽井俊、佐野俊二、王 英正 心筋幹細胞を用いた先天性心疾患に対する心筋再生医療 月刊循環器 9月号 3(9):69-76 医学出版(2013)
2. 学会発表
- ① 王 英正 先天性心疾患に対する自己心臓内幹細胞による再生医療 第116回日本小児科学会学術集会 広島 (2013.4.19)
- ② Oh H, Tarui S, Ohtsuki S, Sano S. Intracoronary delivery of cardiac progenitor cells in patients with hypoplastic left heart syndrome. The 30th International Society for Heart Research (2013. 6.29) San Diego.
- ③ 王 英正 心不全への幹細胞移植療法 第3回先端医学研究会 at OU 直島 (2013.8.3)
- ④ 王 英正 心不全への幹細胞移植療法 岡山先端医学研究会 岡山 (2013.7.19)
- ⑤ 王 英正 希少難治性心不全への心臓内幹細胞を用いた再生医療 青森臨床循環器研究会 青森 (2013.10.26)
- ⑥ 王 英正 希少難治性心不全に対する心臓内幹細胞を用いた再生医療 岡山大学知恵の見本市2013 岡山 (2013.11.1)
- ⑦ 王 英正 子どもの難治性心不全に対する幹細胞移植療法の取り組み 公開セミナーはあとネット兵庫 神戸市 (2013.11.24)
- ⑧ Factors-based human cardiomyocytes differentiation exhibits defective maturation and excitation through aberrant calcium handling proteins. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H. *The 21st annual meeting of the Asian society for cardiovascular and thoracic surgery*, Kobe (2013. April. 7)
- ⑨ Patient-specific induced pluripotent stem cells recapitulate the models of hypoplastic left heart syndrome. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H. *The 21st annual meeting of the Asian society for cardiovascular and thoracic surgery*, Kobe (2013. April. 7)
- ⑩ Cardiac progenitor cell therapy in patients with hypoplastic left heart syndrome. Sano S, Oh H, S Tarui, S Ohtsuki, S Kasahara. *American Association for Thoracic Surgery*. Minneapolis. (2013. May 4)
- ⑪ Lineage induction of patient-specific iPS cells identifies the cardiac transcriptional repression during myocardial growth and patterning in HLHS. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H. *TAKAO Symposium* Tokyo (2013. July. 16)
- ⑫ Directed differentiation of patient-specific induced pluripotent stem cells identifies the cardiac transcriptional repression during

- myocardial growth and patterning in hypoplastic left heart syndrome. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H. *American Heart Association Suppl.* (2013). Dallas
- ⑬ 疾患特異的 iPS 細胞の樹立と左心低形成症候群の心臓発生異常の解明 小林純子, 樽井 俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積 功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, 王 英正 日本外科学会 Young Researcher Award (2013)
- ⑭ 樽井俊、佐野俊二、王 英正 左心低形成症候群に対する心臓内幹細胞を用いた自家移植療法 第 13 回心血管再生外科治療研究会 熊本 (2. 19. 2014)
- ⑮ 奥山倫弘, 逢坂大樹, 石神修大, 小林純子, 笠原真悟, 佐野俊二, 王 英正 3D 細胞外マトリックスを利用したヒト幹細胞再播種によるバイオ人工心臓の作成 日本再生医療学会 京都 (3.5.2014)
- ⑯ 樽井俊、石神修大、大月審一、逢坂大樹、栄徳隆裕、近藤麻衣子、小林純子、奥山倫弘、馬場健児、川畑拓也、吉積 功、黒子 洋介、新井禎彦、岩崎達雄、佐藤修平、笠原真悟、佐野俊二、王 英正 左心低形成症候群に対する心臓内幹細胞自家移植療法：第 1 相試験 (TICAP) 日本再生医療学会 京都 (3.5.2014)
- ⑰ 小林純子, 吉田 賢司, 樽井 俊, 永井祐介, 笠原真悟, 成瀬恵治, 伊藤 浩, 佐野俊二, 王 英正 患者由来 iPS 細胞を用いた左心低形成症候群における疾患発症機序の解明 日本再生医療学会 京都 (3. 5. 2014)
- ⑱ Junko Kobayashi, Masashi Yoshida, Suguru Tarui, Yusuke Nagai, Shingo Kasahara, Keiji Naruse, Hiroshi Ito, Shunji Sano, Hidemasa Oh Assessment of genetic and epigenetic modifications in hypoplastic left heart syndrome by disease-specific iPS cells 第 78 回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2014.3.21) 東京
- ⑲ Suguru Tarui, Shinichi Ohtsuki, Daiki Ousaka, Takahiro Eitoku, Maiko Kondo, Junko Kobayashi, Michihiro Okuyama, Shunta Ishigami, Kenji Baba, Sadahiko Arai, Takuya Kawabata, Ko Yoshizumi, Yosuke Kuroko, Tatsuo Iwasaki, Shuhei Sato, Shingo Kasahara, Shunji Sano, and Hidemasa Oh. Intracoronary Cardiac Progenitor Cell Transfer to Treat Univentricular Heart Disease: A Phase 2 Randomized Controlled Clinical Trial (PERSEUS) 第 78 回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2014) 東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- ① Preparation for treating heart disease used in cell therapy. Patent No: US8414924 B2, Apr. 9. 2013.
- ② 細胞移植療法に用いられる心疾患治療薬 特許第5496675号 2014年3月14日登録
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

術後先天性心疾患の臨床疫学調査に関する研究

研究分担者 佐野俊二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨

心臓手術を受けた左心低形成症候群の予後経過は年単位での評価が必要で、臨床症状出現時には多くの症例において、既に心不全病態は完成しており、再手術や心臓移植の適応となることが多い。本研究により心臓手術を受けた時に採取した余剰組織を用いて、疾患特異的iPS細胞を樹立することにより、希少で原因不明であり根治的治療法が未確立な小児重症心疾患に対して、手術後早期に予後予測する方法を開発する。

A. 研究目的

機能的単心室症は先天性複雑心奇形の一つで、左心低形成症候群をはじめ、二つの心室のうち一つが正常な発育形態を示さず、二つの心室流入路を持つが、房室弁のどちらか一つが完全に閉鎖している循環動態を示す心臓である。両心室とも通常に発達し、心室中隔の形成が不良の症例は除くと規定されている。兄弟や子孫への遺伝を規定する因子は不明で、その確率は約2~5%とされている。

第1期手術による1年累積生存率は、その術式によってやや異なるが、約80%と報告されているが、術後5年目までに約半数の症例で肺動脈内に狭窄をきたし、stentによる再拡張や肺動脈形成術を必要とする。また、第1期手術に生存した症例の中で、第2期手術(Glenn手術)まで到達できた症例でも、長期予後で見ると、継続的に減少し、8年目での生存率は70%といわれている。

さらに、第3期手術であるFontan術まで行われた症例の中で、心不全死や心臓移植を免れた長期生存率は、最近の手術式の改良により、有意に改善してきてはいるものの、25年の観察期間で見ると、50-70%まで、依然として継続的に低下していることが容易わかる。最も重要なことは、Fontan手術を受けた症例の20歳以降の長期における心事故回避率は極めて不良で、30歳までに約半数の症例で心不全や不整脈などによる心関連事故が発症することになる。

これまで多くの臨床研究の報告により、GlennやFontan手術における予後予測因子が検討されたが、術前ハイリスク群や手術後も心機能が回復しない症例は、最終的に心臓移植に頼らざるを得ないのが現状である。Fontan手術を施行できなかった小児心不全や術後に心機能が改善しなかった症例において、心臓移植を行った症例についての

長期成績を見ると、単心室循環を伴わない心臓移植群に比べ、有意に予後不良であることが明らかになった。

致死性心不全を伴う先天性心疾患に特異的なiPS細胞を用いた研究はこれまでに報告がない。これまでの研究は疾患発症後における染色体や遺伝子変異の解析が中心で、特定の疾患家系が存在しない孤発性の左心低形成症候群において、疾患の発症規定遺伝子の同定は極めて困難であった。本研究によって、これまで原因不明とされてきた左心低形成症候群の本質的病態解明と予後規定因子の同定につながる。

B. 研究方法

先天性心疾患のうち、機能的単心室症は症状が重篤なため、一医療機関当たりの患者数は多くはない。分担研究者らが統括する岡山大学病院心臓血管外科及び小児循環器科における適格基準に該当した年間あたりの手術実績症例数や外来紹介患者数は約30~40例である。

2013年度に心臓手術による余剰組織を提供し得た合計10症例に対して、疾患特異的iPS細胞を樹立し、組織提供者の臨床疫学的追跡調査を行う。

具体的には以下の諸項目について術前ならびに術後長期にわたって詳細に検討する。

1. 第1期手術における長期予後規定因子

左心低形成症候群を含む機能的単心室症は、当初その手術成績は芳しくなかったが、様々な手術方法の改良により、その術後急性期死亡率は10%以下まで低下し、血行動態の改善に伴う全身管理が容易になったが、長期での追跡調査により、以下に示すようないくつかの予後規定因子が明らかとなった。

1) 僧房弁狭窄症と大動脈弁閉鎖症の合併例

- 2) 心駆出率が50%以下の症例
- 3) 右鎖骨下動脈の解剖学的に異常な走行
- 4) 術中における体外循環時間の長さ

2. 第2期手術における長期予後規定因子

二方向性大静脈-肺動脈吻合(Glenn手術)は、機能的単心室症の中期的管理において、有効な第2期シャント術であるが、最終的な修復手術であるFontan手術までの心機能や予後改善を規定するいくつか重要な寄与因子が検討され、これまでに報告されてきた。

- 1) 房室弁逆流の存在
- 2) 心室拡張末期圧 >12mmHg
- 3) 平均肺動脈圧格差 >9mmHg
- 4) 平均肺血管抵抗 >2U m²
- 5) 平均肺動脈圧 >18mmHg
- 6) 肺動脈への側副血行路の存在
- 7) 心室径の拡大

3. 第3期手術における長期予後規定因子

第3期修復術として、Fontan手術は極めて有効なシャント術であるが、一定の症例において本手術実施後においても、心機能が改善せず、死亡または心臓移植の適応となるケースが存在する。いくつかのretrospective studyによって、その重要な予後規定因子が報告されてきた。

- 1) 左心低形成症候群に属する単心室症例
- 2) 蛋白漏出性腸症合併例
- 3) 肺血管抵抗が高い症例
- 4) 右房圧が高い症例
- 5) 右室型の単心室症例
- 6) 術後心室内に血栓形成した症例
- 7) 術後アスピリンなどの抗血小板や抗凝固療法を併用していない症例

これらの既報の予後規定因子を含め、心臓手術後における心不全症状の再燃や心不全死の有無を中心に、iPS細胞の機能解析した全症例に関する房室弁逆流の遅発性発症や蛋白漏出性腸症の合併について追跡調査する。

また、「難病関連研究分野」のうち、「次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発」の一般研究班と連携し、解析データの提供と共同研究を進める。全国の専門家からなる左心低形成症候群に関する研究班を立ち上げ、研究成果を評価する。

(倫理面への配慮)

- ① 本研究に携わるすべての者は、ヒトを対象とする全ての医学研究が準拠すべき「世界医師会ヘルシンキ宣言」(1964年第18回世界医師会ヘルシンキ総会で起草、2008年10月WMAソウル総会で最新修正)を順守して行う。
- ② 疫学研究の適正な推進のため、「疫学研究に関する倫理指針」(平成20年12月1日一部改正)を順守し、研究対象者の個人の尊厳と人権を守る。
- ③ 各関係者は臨床研究を遂行にあたり、「臨床研究に関する倫理指針」(平成20年厚生労働省告示第415号)を遵守して行う。
- ④ ヒト心臓組織の入手は、外部委員を含めた岡山大学倫理委員会にて審査承認されたプロトコル(承認766号)に従順し、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」(平成10年厚生科学審議会答申)を遵守する。患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、患者さんの同意のもと不要となった余剰組織を研究開発に使用する。

- ⑤ 個人情報の保護を最優先し、ヒト組織の取り扱いに関する資料の提出及び調査には積極的に協力する。また、提供していただいたヒト組織は幹細胞の分離のみに全て使用し、倫理委員会で承認されていない研究目的には一切使用しない。
- ⑥ 臨床疫学研究に参加する患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、研究内容に関する説明と理解を得る。同意書原本は説明文書と共にカルテに添付して岡山大学病院で保管する。同意の撤回が生じた場合は、同意撤回文書を岡山大学病院にも提出する。

C. 研究結果

申請した研究計画通りに、平成25年度内に合計10症例の先天性心疾患由来の術中に入手した余剰組織を提供し疾患特異的iPS細胞の樹立に協力した。

樹立した個々のiPS細胞の機能解析から、心臓の初期発生に関与するNKX2-5、HAND1、HAND2、房室管と弁形成に関与するTBX2、NOTCH1、HEY1、HEY2、左室流出路形成に関与するNOTCH1、HEY1、HEY2の発現が著明に抑制されていることを明らかにした。これらの諸因子群の発現パターンは左心低形成症候群の解剖学的異常と一致しており、病態形成の分子機構について明らかにした。

これらのうち、NKX2-5、HAND1、NOTCH1が心筋構造蛋白の転写制御に深く関わり、心臓手術後に発症する遠隔期心不全や各種合併症の惹起に関与している可能性の知見を得ることができた。今後長期における心臓手術後における心不全症状の再燃や心不全死の有無を中心に、iPS細胞の機

能解析した全症例に関する房室弁逆流の遅発性発症や蛋白漏出性腸症の合併について臨床疫学的追跡調査を行う。

D. 考察

複雑心奇形の病態は単一遺伝子の異常では説明できない疾患が多く、疾患特異的iPS細胞の樹立を用いた病態解析法はこれまでに明らかにできなかった先天性心疾患の発症機序の解明や術後予後を予測することを可能にした。

本研究で同定したNKX2-5, HAND1, NOTCH1といった候補転写因子群を基軸に、心臓手術後の長期予後調査研究とiPS細胞を用いた疾患病態の研究成果を融合させ、新しい医療法の確立および普及を図る。

E. 結論

2013年度に開始した本研究により、先天性心疾患の術後成績に関与し候補となる3つの心臓特異的転写因子群(NKX2-5, HAND1, NOTCH1)の同定に成功した。これらの術後症例に関して、主たる遅発性心不全の起因となる房室弁逆流や蛋白漏出性腸症の合併を臨床疫学的に追跡調査することで、集約的な病態制御の構図を具体的に確定し、難治性疾患の予後診断法として臨床的に確立していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

① Takaya Y, Taniguchi M, Akagi T, Nobusada S, Kusano K, Ito H, Sano S. Long-term effects of transcatheter closure of atrial septal defect on cardiac remodeling and exercise capacity in patients older than 40 years with a

reduction in cardiopulmonary function. *J Interv Cardiol*. 2013 Apr;26(2):195-9.

② Ohno N, Ohtsuki S, Kataoka K, Baba K, Okamoto Y, Kondo M, Sano S, Kasahara S, Honjo O, Morishima T. Usefulness of balloon angioplasty for the right ventricle-pulmonary artery shunt with the modified Norwood procedure. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2013 Apr;81(5):837-42.

③ Takaya Y, Akagi T, Kijima Y, Nakagawa K, Taniguchi M, Ohtani H, Sano S, Ito H. Transcatheter closure of right-to-left atrial shunt in patients with platypnea-orthodeoxia syndrome associated with aortic elongation. *Cardiovasc Interv Ther*. 2014 Jan 31. [Epub ahead of print]

④ Tarui S, Sano S, Oh H. Stem cell therapy in patients with single ventricle physiology. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*, 2014 (in press).

⑤ Ündar A, Wang S, Palanzo D, Weaver B, Pekkan K, Agirbasli M, Zahn JD, Luciani GB, Clark JB, Wilson RP, Kunselman AR, Sano S, Belli E, Pierce WS, Myers JL. Outcomes of the ninth international conference on pediatric mechanical circulatory support systems and pediatric cardiopulmonary perfusion. *Artif Organs*. 2014 Jan;38(1):5-10.

⑥ Sano S, Fujii Y, Kasahara S, Kuroko Y, Tateishi A, Yoshizumi K, Arai S. Repair of Ebstein's anomaly in neonates and small infants: impact of right ventricular exclusion and its indications. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014 Mar;45(3):549-55.

⑦ Tateishi A, Kasahara S, Kawabata T,

- Kuroko Y, Yoshizumi K, Takagaki M, Arai S, Sano S. The effect of pulmonary root translocation on the left ventricular outflow tract. *Ann Thorac Surg*. 2013 Oct;96(4):1469-71.
- ⑧ Kanamitsu H, Fujii Y, Mitsui H, Sano S. Effects of atrial natriuretic peptide after prolonged hypothermic storage of the isolated rat heart. *Artif Organs*. 2013 Nov;37(11):1003-8.
- ⑨ Kijima Y, Akagi T, Nakagawa K, Taniguchi M, Ueoka A, Deguchi K, Toh N, Oe H, Kusano K, Sano S, Ito H. Catheter closure of patent foramen ovale in patients with cryptogenic cerebrovascular accidents: initial experiences in Japan. *Cardiovasc Interv Ther*. 2014 Jan;29(1):11-7.
- ⑩ 黒子洋介、佐野俊二 先天性心疾患 完全大血管転位症 今日の循環器疾患 治療指針 pp531-532, 2013.
- ⑪ 服部 滋、吉積 功、川畑拓也、新井禎彦、笠原真悟、佐野俊二 先天性右室瘤の外科治療：乳児期に急速な瘤拡大を示した 1 例 日本小児循環器学会雑誌, 29:194-199, 2013.
- ⑫ 樽井俊、佐野俊二、王 英正 心筋幹細胞を用いた先天性心疾患に対する心筋再生医療 月刊循環器 9月号 3(9):69-76 医学出版(2013)
2. 学会発表
- ① Kasahara S, Goto T, Okuyama M, Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Ishigami S, Kawabata T, Kuroko Y, Masuda Z, Zenichi, Yoshizumi K, Arai S, Sano S. SURGICAL RESULTS FOR THE PATIENTS WITH FUNCTIONAL SINGLE VENTRICLE HAVING HIGH PULMONARY ARTERY PRESSURE ASCVTS 2013 2013.4.4.7. 神戸
- ② Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Takahashi K, Iribe G, Naruse K, Kasahara S, Sano S, Oh H Factors-based human cardiomyocytes differentiation exhibits incomplete maturation and excitation through aberrant calcium handling proteins The 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4.4.7 神戸
- ③ Junko Kobayashi, Masashi Yoshida, Suguru Tarui, Masataka Hirata, Ken Takahashi, Shingo Kasahara, Kenji Naruse, Hiroshi Ito, Shinji Sano, Hidemasa Oh. PATIENT-SPECIFIC INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS RECAPITULATE THE MODELS OF HYPOPLASTIC LEFT HEART SYNDROME 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Suregery 2013.4.7 神戸
- ④ Goki T, Miyata H, Murakami A, Tomotaki A, Goki T, Matsumura G, Sano S, Takamoto S DOSE SURGICAL APPROACHES HAVE ANY IMPACT ON MORTALITY AND MORBIDITY AFTER BLALOCK-TAUSSIG SHUNT PROCEDURES. RISK MODELS BASED ON THE JAPAN CONGENITAL CARDIOVASCULAR SURGERY DATABASE 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4.7 神戸
- ⑤ Goto T, Yoshizumi K, Kasahara S, Arai S, Tateishi A, Kuroko Y, Kawabata T, Sano S

- SURGICAL REPAIR FOR DOUBLE
OUTLET RIGHT VENTRICLE WITH
INTACT VENTRICULAR SEPTUM 21st
Annual Meeting of the Asian Society for
Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7
神戸
- ⑥ Ishigami S, Kasahara S, Takagaki M, Arai
S, Sano S SALVAGE PROCEDURE FOR
HIGH RISK PATIENTS WITH COMPLEX
CARDIAC ANOMALY 21st Annual
Meeting of the Asian Society for
Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7
神戸
- ⑦ Sano S, Kasahara S, Yoshizumi K, Tateishi
A, Kawabata T, Kuroko Y, Fujii Y, Arai S
SANO MODIFICATION WITH A RIGHT
VENTRICLE-TO-PULMONARY ARTERY
SHUNT TO THE PATIENTS WITH
HYOPLASTIC LEFT HEART
SYNDROME ASCVTS 2013 2013.4. 7 神
戸
- ⑧ Murakami A, Takamoto S, Miyata H, Morita
N, Sano S JAPAN CONGENITAL
CARDIOVASCULAR SURGERY DATABASE
FOR QUALITY IMPROVEMENT 21st
Annual Meeting of the Asian Society for
Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7 神
戸
- ⑨ Sano S PARACHUTE MITRAL VALVE The
21st Annual Meeting of the Asian Society for
Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7
神戸
- ⑩ Sano S FIRST STAGE PALLIATION UNITY
RU-PA SHUNT TO HLHS The 21st
Annual Meeting of the Asian Society for
Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7
神戸
- ⑪ Douguchi T, Itoh H, Taka H, Yagi T, Sano S
VENO-VEIN BYPASS 中に高カリウム
血症の是正を目的として CHD を使用した脳
死肝腎移植術の 1 症例 The 21st Annual
Meeting of The Asian Society for
Cardiovascular and Thoracic Surgery
2013.4. 7 神戸
- ⑫ 笠原真悟、吉積 功、高垣昌巳、新井禎彦、
佐野俊二 複雑心奇形を有する成人期再手術
例の治療成績ならびに現状の問題点 第
113 回日本外科学会定期学術集会
2013.4.11 福岡
- ⑬ 小林純子、樽井 俊、平田昌敬、川畑拓也、
黒子洋介、立石篤史、吉積 功、新井禎彦、
笠原真悟、佐野俊二、王 英正 疾患特異的
iPS 細胞を用いた左心低形成症候群における
心臓発生異常の解明 第 113 回日本外科学
会定期学術集会 2013.4.11 福岡
- ⑭ Sano S, Kasahara S, Fujii Y, Tateishi A,
Kuroko Y, Yoshizumi K, Arai S
Atrioventricular valve Repair in
Heterotaxy syndrome 2013 AATS Mitral
Conclave 2013.5.2 New York
- ⑮ Sano S, Oh H, Tarui S, Kobayashi J, Hirata
M, Kawabata T, Tateishi A, Kuroko Y,
Yoshizumi K, Arai S, Kasahara S Annual
Meeting of American Association for
Thoracic Surgery 2013.5.4 Minneapolis
- ⑯ Sano S. Stem Cell Therapy In Children
With HLHS 9th International
Conference on Pediatric Mechanical
Circulatory Support System & Pediatric
Cardiopulmonary Perfusion 2013.5.8
Hershey

- ⑰ Yoshizumi K, Kasahara S, Tateishi A, Kawabata T, Kuroko Y, Arai S, Sano S The influence of Lower Body Circulatory Arrest on the Acute Kidney Injury after Surgery for Congenital Heart Disease in Neonate 9th International Conference on Pediatric Mechanical Circulatory Support Systems & Pediatric Cardiopulmonary Perfusion 2013.5.8 Hershey
- ⑱ 佐野俊二 先天性心疾患治療の最前線 第6回先天性心疾患シンポジウムイン岡山 2013.5.18 岡山
- ⑲ Sano S 日本における心疾患治療の最新状況について International contribution of Cardio Surgery starts with training young surgeon Medical Excellence JAPAN Seminar -Vietnam~Japan Medical Collaboration- 2013.8.26 Hanoi
- ⑳ Sano S RV-PA conduit for Stage I Hypoplastic Heart Syndrome The 5th Congress of Asia Pacific Oediatric Cardiac Society 2014.3.6. New Delhi.
- G. 知的財産の出願・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

書籍 (王 英正)

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
樽井俊、 佐野俊二、 王 英正	心筋幹細胞を用いた先天性心疾患に対する心筋再生医療	福田恵一	月刊循環器	医学出版	東京	2013	69-76

書籍 (佐野俊二)

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
黒子洋介、 佐野俊二	先天性心疾患完全大血管転位症	井上 博、 許 俊鋭、 檜垣實男、 代田浩之、 筒井裕之	今日の循環器疾患	医学書院	東京	2013	531-532
服部 滋、吉積 功、川畑拓也、新井禎彦、笠原真悟、佐野俊二	先天性右室瘤の外科治療：乳児期に急速な瘤拡大を示した1例	中西敏雄	日本小児循環器学会雑誌	株式会社協和企画	東京	2013	194-199
樽井俊、 佐野俊二、 王 英正	心筋幹細胞を用いた先天性心疾患に対する心筋再生医療	福田恵一	月刊循環器	医学出版	東京	2013	69-76

雑誌 (王 英正)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Hayashi YK, Taniguchi T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Matoba S, Ikeda K, Yamada H, Oh H, Ueyama T.	MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by $\alpha 1$ -adrenergic receptors.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i>	111	3811-3816	2014

Tarui S, Sano S, Oh H.	Stem cell therapy in patients with single ventricle physiology.	<i>Methodist DeBakey Cardiovascular Journal</i> ,	in press		2014
------------------------	---	---	----------	--	------

雑誌 (佐野俊二)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takaya Y, Taniguchi M, Akagi T, Nobusada S, Kusano K, Ito H, Sano S.	Long-term effects of transcatheter closure of atrial septal defect on cardiac remodeling and exercise capacity in patients older than 40 years with a reduction in cardiopulmonary function	<i>J Interv Cardiol</i>	26	195-199	2013
Ohno N, Ohtsuki S, Kataoka K, Baba K, Okamoto Y, Kondou M, Sano S, Kasahara S, Honjo O, Morishima T	Usefulness of balloon angioplasty for the right ventricle-pulmonary artery shunt with the modified Norwood procedure	<i>Catheter Cardiovasc Interv</i>	81	837-842	2013
Tarui S, Sano S, Oh H.	Stem cell therapy in patients with single ventricle physiology.	<i>Methodist DeBakey Cardiovascular Journal</i> ,	in press		2014
Takaya Y, Akagi T, Kijima Y, Nakagawa K, Taniguchi M, Ohtani H, Sano S, Ito H.	Transcatheter closure of right-to-left atrial shunt in patients with platypnea-orthodeoxia syndrome associated with aortic elongation.	<i>Cardiovasc Interv Ther.</i>	Epub ahead of print		2014
Ündar A, Wang S, Palanzo D, Weaver B, Pekkan K, Agirbasli M, Zahn JD, Luciani GB, Clark JB, Wilson RP, Kunselman AR, Sano S, Belli E, Pierce WS, Meyers JL.	Outcomes of the ninth international conference on pediatric mechanical circulatory support systems and pediatric cardiopulmonary perfusion.	<i>Artif Organs.</i>	38	5-10	2014

Sano S, Fujii Y, Kasahara S, Kuroko Y, Tateishi A, Yoshizumi K, Arai S.	Repair of Ebstein's anomaly in neonates and small infants: impact of right ventricular exclusion and its indications.	<i>Eur J Cardiothorac Surg.</i>	45	549-555	2014
Tateishi A, Kasahara S, Kawabata T, Kuroko Y, Yoshizumi K, Takagaki M, Arai S, Sano S.	The effect of pulmonary root translocation on the left ventricular outflow tract.	<i>Ann Thorac Surg.</i>	96	1469-1471	2013
Kijima Y, Akagi T, Nakagawa K, Taniguchi M, Ueoka A, Deguchi K, Toh N, Oe H, Kusano K, Sano S, Ito H.	Catheter closure of patent foramen ovale in patients with cryptogenic cerebrovascular accidents: initial experiences in Japan.	<i>Cardiovasc Interv Ther.</i>	29	11-17	2014
Kanamitsu H, Fujii Y, Mitsui H, Sano S.	Effects of atrial natriuretic peptide after prolonged hypothermic storage of the isolated rat heart.	<i>Artif Organs.</i>	37	1003-1008	2013

MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by α 1-adrenergic receptors

Takehiro Ogata^a, Daisuke Naito^a, Naohiko Nakanishi^a, Yukiko K. Hayashi^b, Takuya Taniguchi^a, Kotaro Miyagawa^a, Tetsuro Hamaoka^a, Naoki Maruyama^a, Satoaki Matoba^a, Koji Ikeda^a, Hiroyuki Yamada^a, Hidemasa Oh^c, and Tomomi Ueyama^{a,1}

^aDepartment of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 602-8566, Japan; ^bDepartment of Neurophysiology, Tokyo Medical University, Tokyo 160-8402, Japan; and ^cDepartment of Regenerative Medicine, Center for Innovative Clinical Medicine, Okayama University Hospital, Okayama 700-8558, Japan

Edited by J. G. Seidman, Harvard Medical School, Boston, MA, and approved February 3, 2014 (received for review August 13, 2013)

The actions of catecholamines on adrenergic receptors (ARs) induce sympathetic responses, and sustained activation of the sympathetic nervous system results in disrupted circulatory homeostasis. In cardiomyocytes, α 1-ARs localize to flask-shaped membrane microdomains known as “caveolae.” Caveolae require both caveolin and cavin proteins for their biogenesis and function. However, the functional roles and molecular interactions of caveolar components in cardiomyocytes are poorly understood. Here, we showed that muscle-restricted coiled-coil protein (MURC)/Cavin-4 regulated α 1-AR-induced cardiomyocyte hypertrophy through enhancement of ERK1/2 activation in caveolae. MURC/Cavin-4 was expressed in the caveolae and T tubules of cardiomyocytes. MURC/Cavin-4 overexpression distended the caveolae, whereas MURC/Cavin-4 was not essential for their formation. MURC/Cavin-4 deficiency attenuated cardiac hypertrophy induced by α 1-AR stimulation in the presence of caveolae. Interestingly, MURC/Cavin-4 bound to α 1A- and α 1B-ARs as well as ERK1/2 in caveolae, and spatiotemporally modulated MEK/ERK signaling in response to α 1-AR stimulation. Thus, MURC/Cavin-4 facilitates ERK1/2 recruitment to caveolae and efficient α 1-AR signaling mediated by caveolae in cardiomyocytes, which provides a unique insight into the molecular mechanisms underlying caveola-mediated signaling in cardiac hypertrophy.

caveola | signal transduction | heart | plasma membrane

Caveolae are plasmalemmal invaginations enriched in cholesterol, glycosphingolipids, and lipid-anchored proteins relative to the bulk of the plasma membrane (1, 2). Owing to their specific lipid composition, caveolae concentrate several signaling molecules involved in cellular processes or trafficking events from the cell surface; therefore, they are recognized as a platform for preassembled complexes of receptors, signal components, and their targets, facilitating efficient and specific cellular responses (3–5). Accumulating evidence has demonstrated that caveola biogenesis and function depend on two distinct caveolar components: caveolins and cavins (6, 7). Caveolin (Cav)-1 and Cav-2 are expressed in most cell types, including adipocytes, endothelial cells, fibroblasts, and smooth myocytes, whereas Cav-3 is expressed exclusively in smooth, skeletal, and cardiac myocytes. Caveolin deficiency leads to caveolar loss, which is accompanied by alterations in signaling responses (8, 9). Cavins are also structural components of caveolae and assume four isoforms, namely, polymerase I and transcript release factor (PTRF)/Cavin-1, serum deprivation protein response (SDPR)/Cavin-2, SDR-related gene product that binds to C kinase (SRBC)/Cavin-3, and muscle-related coiled-coil protein (MURC) (6), which is also known as “Cavin-4” because of its sequence homology with other cavins and localization to the caveolae (10). Previously, we reported the association of MURC/Cavin-4 with SDPR/Cavin-2 and identified MURC/Cavin-4 mutations in dilated cardiomyopathy patients (11, 12). PTRF/Cavin-1

and SDPR/Cavin-2 are expressed in various cell types, including myocytes (10, 11), and SRBC/Cavin-3 is expressed in many cell types except for muscle cells (13), whereas MURC/Cavin-4 is expressed exclusively in myocytes, similar to Cav-3 (11). Recent studies have shown that cavins and caveolins form a complex, called the “caveolin–cavin complex,” which modifies caveolar biogenesis and function (14, 15). PTRF/Cavin-1 and SDPR/Cavin-2 are required for caveolar invagination and SRBC/Cavin-3 for caveolar budding to form caveolar vesicles (13, 16, 17). However, the functional role of MURC/Cavin-4 in caveolar morphology is not known.

α 1-Adrenergic receptors (α 1-ARs) are members of the G protein-coupled receptor (GPCR) family and have been demonstrated to accumulate in caveolar fractions of the myocardium (5). GPCRs are well-known representatives of receptors concentrated in caveolae and transduce several signals from substrates to downstream effectors in caveolae (18). Because disruption of the caveolae affects the response to several GPCRs, caveolae are considered important plasma membrane structures that coordinate GPCRs and their downstream signaling components (5). In our previous study, we showed that MURC/Cavin-4 knockdown suppressed α 1-AR agonist-induced atrial natriuretic peptide expression and myofibrillar organization in cardiomyocytes and that transgenic mice overexpressing MURC/Cavin-4 in cardiac tissue

Significance

Caveolae are recognized as a platform for preassembled complexes of receptors, signal components, and their targets, facilitating efficient and specific cellular responses at the plasma membrane. ERK is activated at the plasma membrane and an important molecule that has been well studied for its integral role in signal transduction events during physiological adaptation and pathological manifestation. Here we show that although muscle-restricted coiled-coil protein (MURC)/Cavin-4, a muscle-specific caveola component, is dispensable for caveolar formation in cardiomyocytes, MURC/Cavin-4 serves as an ERK-recruiting protein in the caveolae within cardiomyocytes. The recruiting function of MURC/Cavin-4 is necessary to elicit efficient signaling of the α 1-adrenergic receptor–ERK cascade in concentric cardiac hypertrophy. Our findings provide unique insight into the molecular mechanisms underlying caveola-mediated signaling in cardiac hypertrophy.

Author contributions: T.O. and T.U. designed research; T.O., D.N., N.N., T.T., K.M., T.H., and N.M. performed research; T.O., Y.K.H., S.M., K.I., H.Y., H.O., and T.U. analyzed data; and T.O. and T.U. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

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

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1315359111/-/DCSupplemental.