

平成 21 年 4 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390214

研究課題名(和文) 心不全における心筋細胞死の分子機構の解明と臨床への応用

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms underlying cell death in heart failure

研究代表者

大津 欣也 (OTSU KINYA)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20294051

研究成果の概要：

慢性心不全の発症・進展においては細胞死が重要な働きをしている。各種神経体液因子で活性化される MAPKKK の一種である ASK1 の活性化が心筋細胞アポトーシスの惹起に重要であり、下流のキナーゼである JNK 非依存性に関わっていることを見出した。ネクローシスも心不全の発症に関わっていることを明らかにした。さらにオートファジーは細胞死に関わるのではなく外的ストレスに対し細胞保護的に働いていることが明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心不全、細胞死

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全は5年生存率約50%と予後の悪い疾患であり有効な治療法の開発は国民健康を考える上で急務である。心臓に力学的ストレスが加わると神経体液因子が活性化される。この因子の活性化が細胞内情報伝達機構を刺激し、心肥大さらに細胞死やそれに引き続く線維化あるいは興奮収縮連関の異常を惹起し最終的には心臓は拡大、その機能は低下し心不全に陥る。これら心臓の形態的、機能的変化の分子機構の全貌はまだ明らかでなく、その為有効な心不全治療薬の開

発が行われてないのが実情である。細胞死は心不全発症・進展において中心的な役割を担っている。細胞死にはアポトーシス、ネクローシス、オートファジーの3種類があることが知られているが各々の細胞死の病態形成における寄与の程度あるいはその分子機構の解明には至っていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は心不全発症・進展における細胞死の分子制御機構を包括的に検討し、心不全治療薬創薬における分子標的を明らかにすることである。第一に負荷 神経体液因子

活性酸素 ASK1 の情報伝達機構がアポトーシス 心不全を誘導する分子機構を見出し、さらにネクローシスの心不全発症・進展における役割を明らかにし、またオートファジーの心臓リモデリングにおける役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) アポトーシス(ASK1)の解析

CAG プロモーターの下流に loxP 配列に挟まれる CAT 配列を挿入しさらに下流に ASK1 恒常活性体を挿入したトランスジェニックマウス(TG)を作成した(図1)。このマウスと心筋特異的タモキシフェン誘導性 Cre recombinase 発現 TG を交配することにより ASK1 の心筋特異的高発現マウスを得る。

2) ネクローシスの解析

サイクロフィリンD 欠損マウス、心筋特異的カルパイン欠損マウスを作成し心臓におけるネクローシスの in vivo での役割を検討する。

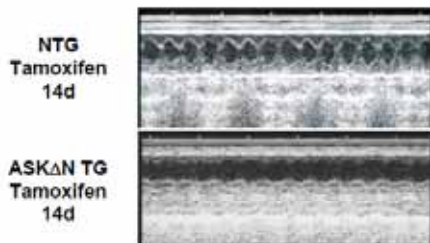
3) オートファジー

心筋特異的 Atg5 欠損マウスを用いてオートファジーの in vivo での役割を検討する。

4. 研究成果

(1) 恒常活性体 ASK1 心筋特異的高発現マウスの解析

タモキシフェンを投与するとに投与後2日より心臓特異的に ASK1 の発現が認められた約4割のマウスが5 - 6日目に死亡しその後は生存する。心重量、肺重量は増加を示し心肥大、心不全を示した。



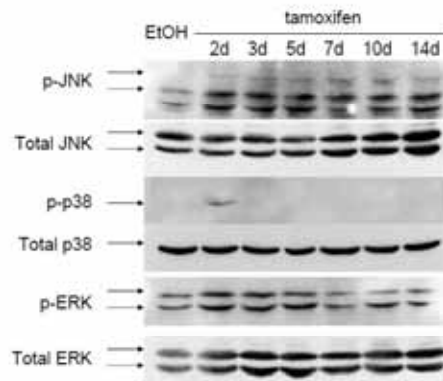
心エコー法で評価したところ心拡大、心機能不全が認められた。

また下図に示すように線維化が観察された。



またアポトーシスの亢進が観察された。

ASK1 の下流の JNK、p38 の活性化を評価したところ p38 の活性化は一過性であるが JNK の活性化は持続していることが明らかとなった。

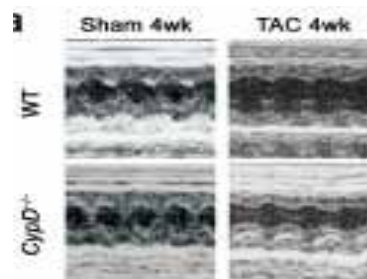


そこで ASK1 による心不全の発症が JNK を介しているかどうか検討するため ASK1 TG を JNK1/2 のドミナントネガティブ体を発現する TG と交配を行った。表現型はレスキューできず ASK1 は JNK 非依存性にアポトーシスを惹起していることが明らかとなった。

タモキシフェンを投与した ASK1 TG の心臓を、投与前、投与後 2,4,5,7,14 日目の各時点で摘出し、RNA を抽出しマイクロアレイを用いて解析をおこなった。心不全において一般的に認められる変化と一致していた。ASK1 TG は、遺伝子発現の面では個体間のばらつきが少なく、しかも一般的な心不全モデルとしての特徴を有しており、in vivo 評価系として非常に優れていることが示された。

(2) ネクローシスの検討

サイクロフィリンD 欠損マウスは定常状態では心臓に表現型を示さなかった。横行大動脈縮策モデルを用いて圧負荷を心臓にかけると野生型マウスでは心不全を示したが欠損マウスでは心不全の進展は抑制された。したがって心不全にネクローシスが関与していることが明らかとなった。

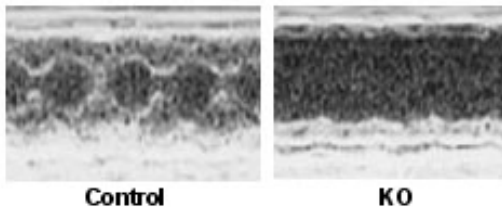


またネクローシスに重要な働きをしていると考えられていたカルパインの心臓特異的欠損マウスを検討した。カルパイン欠損マウス

スは基底状態では表現型を示さなかった。しかし圧負荷後は心不全となりカルパインは心保護的に働いていることが明らかとなった。

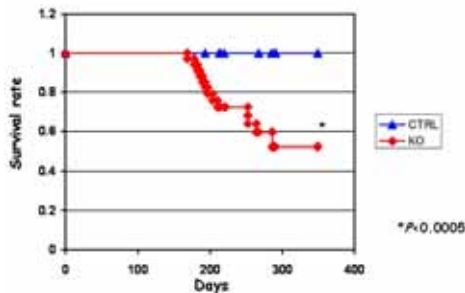
(3)オートファジーの検討

オートファジーに必須である Atg5 の心臓特異的欠損マウスでは定常状態において表現型を示さなかった。そこで圧負荷をかけたところ Atg5 欠損マウスでは心不全を示した。



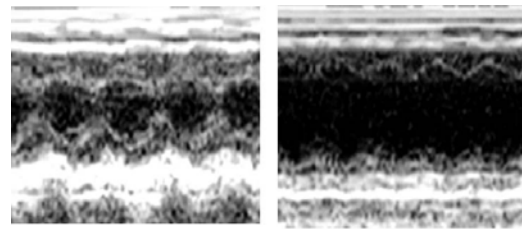
圧負荷だけではなくイソプロテレノール刺激に対しても同様の反応を示した。従ってオートファジーは細胞死に働くのではなく外的ストレスに対するの適応現象であることが明らかとなった。

次に老化におけるオートファジーの役割を検討した。まず野生型マウス心におけるオートファジーは週齢を追うに従って抑制されていた。そこで Atg5 欠損マウスの老化における影響を検討した。



上図に示すように生後 200 日より生存率の低下を認めた。

そこで 10 ヶ月齢における心機能を心エコー法で検討した。

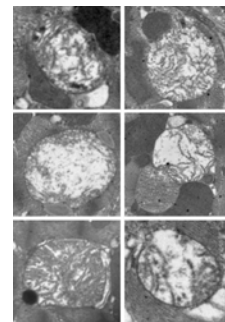


Atg5^{f/f}; α-MHCCre⁻

Atg5^{f/f}; α-MHCCre⁺

Atg5 欠損マウス(右)では心拡大、心機能不全を示した。つまりオートファジーは老化において心臓保護に働いている。

次に欠損マウス心を電子顕微鏡で検討した。



Atg5 欠損心では異常なミトコンドリア像が見られた。さらにミトコンドリア機能の低下そして心臓内酸化ストレスの増加を示した。従ってオートファジーは老化に伴う異常ミトコンドリアの排除に大きな役割を果たしていると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Shigemiki Omiya, Shungo Hikoso, Yukiko Imanishi, Atsuhiko Saito, Osamu Yamaguchi, Toshihiro Takeda, Isamu Mizote, Takafumi Oka, Manabu Taneike, Yuko Nakano, Yasushi Matsumura, Kazuhiko Nishida, Yoshiki Sawa, Masatsugu Hori, Kinya Otsu: Downregulation of ferritin heavy chain increases labile iron pool, oxidative stress and cell death in cardiomyocytes (2009) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46: 59-66. 査読有

Masayuki Taniike, Osamu Yamaguchi, Ikuko Tsujimoto, Shungo Hikoso, Toshihiro Takeda, Atsuko Nakai, Shigemiki Omiya, Isamu Mizote, Yuko Nakano, Yoshiharu Higuchi, Yasushi Matsumura, Kazuhiro Nishida, Masatsugu Hori, Hidenori Ichijo, Kinya Otsu: Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)/p38 signaling pathway

negatively regulates physiological hypertrophy (2008) *Circulation* 117:545-552. 査読有

Tetsuya Watanabe, Toshihiro Takeda, Shigemiki Omiya, Shungo Hikoso, Osamu Yamaguchi, Yuko Nakano, Yoshiharu Higuchi, Atsuko Nakai, Yusuke Abe, Yayoi Aki-Jin, PhD, Masayuki Taniike, Isamu Mizote, Yasushi Matsumura, Takahiko Shimizu, Kazuhiko Nishida, Kiyohiro Imai, Masatsugu Hori, Takuji Shirasawa, Kinya Otsu. Reduction in hemoglobin-oxygen affinity results in the improvement of exercise capacity in mice with chronic heart failure (2008) *J. Am. Coll. Cardiol.* 52: 779-786. 査読有

Atsuko Nakai, Osamu Yamaguchi, Toshihiro Takeda, Yoshiharu Higuchi, Shungo Hikoso, Masayuki Taniike, Shigemiki Omiya, Isamu Mizote, Yasushi Matsumura, Michio Asahi, Kazuhiko Nishida, Masatsugu Hori, Noboru Mizushima, Kinya Otsu: The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress (2007) *Nature Medicine* 13:619-624. 査読有

Shungo Hikoso, Yasuhiro Ikeda, Osamu Yamaguchi, Toshihiro Takeda, Yoshiharu Higuchi, Shinichi Hirotsu, Kazunori Kashiwase, Michio Yamada, Michio Asahi, Yasushi Matsumura, Kazuhiko Nishida, Masunori Matsuzaki, Masatsugu Hori, Kinya Otsu: Progression of heart failure was suppressed by inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 via transcortical gene transfer (2007) *J. Am. Coll. Cardiol.* 50:453-462. 査読有

[学会発表](計10件)

Osamu Yamaguchi, Non-apoptotic cardiomyocyte death as a cause of cardiac remodeling, The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 22, 2009, Osaka, Japan

Isamu Mizote, Cardiac-specific disruption of calpain4 revealed its cardioprotective role in response to pressure overload, The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 21, 2009, Osaka, Japan

Manabu Taneike, Constitutive autophagy is required to maintain cardiac structure and function in aged mouse hearts, The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese

Circulation Society, March 21, 2009, Osaka, Japan

Kinya Otsu, Role of autophagy in heart failure, The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 20, 2009, Osaka, Japan

Kinya Otsu, Altered Autophagy in Cardiomyopathy, European Society of Cardiology, Heart Failure, June 14, 2008, Milano, Italy

Shungo Hikoso, IKK β /NF- κ B pathway protects hearts from hemodynamic stress mediated through regulation of MnSOD expression, The 72nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 29, 2008, Fukuoka, Japan

Masayuki Taniike, Cross-talk between p38 dependent pathological remodeling cascade and cardiac adaptive responses, The 72nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 29, 2008, Fukuoka, Japan

Shigemiki Omiya, Downregulation of ferritin heavy chain is an important trigger of cardiac cell death and progression of heart failure, The 72nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 28, 2008, Fukuoka, Japan

Shungo Hikoso, IKK β /NF- κ B pathway protects hearts from hemodynamic stress mediated through regulation of MnSOD expression, Scientific Sessions, American Heart Association, Nov 7, 2007, Orlando, USA

Toshihiro Takeda, Cardiac-specific activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 leads to cardiac dysfunction with pathological hypertrophy, Scientific Sessions, American Heart Association, Nov 4, 2007, Orlando, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大津 欣也(OTSU KINYA)

大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：20294051

(2) 研究分担者

西田 和彦(NISHIDA KAZUHIKO)

大阪大学・歯学研究科・助教
研究者番号：90362681

彦惣 修吾(HIKOSO SHUNGO)

大阪大学・保健センター・助教

研究者番号：30423164

(3) 連携研究者

なし