

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790535

研究課題名（和文） 心不全による HIF-1 の発現の変化とその心筋細胞死への関与

研究課題名（英文） Alteration of HIF-1 expression by heart failure and its involvement in cardiomyocyte survival.

研究代表者

矢野 俊之 (Yano Toshiyuki)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40444913

研究成果の概要：

心筋細胞死は、心筋梗塞や高血圧による心不全の主要な原因の一つであるが、不全心において細胞死がもたらされる機序は明らかにされていない。その原因として本研究では、不全心の細胞障害に対して防御的に働く hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) の内因性保護機構の破綻に注目した。その結果、HIF-1 α の発現量には不全心と健常心で差がなかったが、ミトコンドリアの酸化ストレス亢進により細胞死への受感性が亢進しており、HIF-1 α の作用で発現するエリスロポエチンの心筋保護効果が消失していることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	330,000	3,530,000

研究分野：医師薬学

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：分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

心不全は循環器疾患による死亡原因として最も重要であり、その機序の解析と治療法の開発が大きな課題となっている。最近、不全心では機序の異なる細胞死が生じており、その中でも necrosis が主たる細胞死の原因であることが報告された。しかし、どのような機序で細胞死がもたらされるかについては明らかにされていない。不全心における心

筋細胞死は散在性にみられ、一時点の評価では心筋細胞全体の 0.1%程度に過ぎないが、心不全の増悪が数か月から数年にわたって関序に進行し心筋細胞の脱落像を伴っていることを考慮すると、心不全進行の重要な原因であることが予想される。また、necrosis が主たる細胞死の原因であることを考慮すると虚血再灌流障害に類似した機序があることを予想させる。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて本研究では、「不全心には微小循環障害による虚血障害が存在し、それに対して防衛的に作動する hypoxia inducible factor-1 α 、2 α (HIF-1 α 、2 α) などの内因性保護の破綻が心筋細胞死を惹起する」という仮説を設定した。この仮説の主たる根拠として、心筋梗塞後ならびに高血圧による不全心では肥大した心筋細胞の心筋酸素需要は亢進する一方、間質線維化のため毛細血管から心筋細胞への酸素の拡散距離の増大があり、心筋細胞は慢性的に虚血にさらされ易いと考えられること、低酸素により誘導される転写因子である HIF-1 α 、2 α が心筋梗塞後の不全心において散在性に発現亢進するとの報告、また不全心における細胞死は虚血障害による necrosis と同じ phenotype を示すものが多いとの報告、が挙げられる。HIF-1 α は、サイトカインや成長因子の発現を調節する転写因子であり、中でもエリスロポエチン (EPO) は虚血による細胞死を抑制することを我々を含めた多くの研究者が観察している。本研究では上記の仮説の検証を二種類の心不全モデルを用いて検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)

重症度の異なる心不全を作成するために高血圧性肥大心のモデルである SHR-SP (Spontaneously hypertensive rat-stroke prone) と正常対照群 (Wistar-Kyoto rat: WKY) を用いた。ラットの左冠動脈を麻酔調節呼吸下に結紮することで実験的心筋梗塞を作成した。梗塞作製 4 週後の時点で HIF-1 α の遺伝子及び蛋白発現を RT-PCR 及び免疫染色により検討した。

(2)

(1) の検討の結果、肥大心における内因性の心筋保護機構破綻による細胞死の機序は、HIF-1 α の発現低下ではないことが明らかとなった。そのため次に、肥大心の細胞死への受攻性の変化を検討した。最近、肥大心において necrosis の主要な機序であるミトコンドリア透過性遷移孔 (mPTP) の開口閾値が低下していることが報告されたことに注目して以下の検討を行った。

①

12~15 週齢の SHR-SP 及び WKY に、20 分間冠動脈閉塞/2 時間再灌流を行い、心筋梗塞を作成した。EPO は虚血 15 分前に 5000 単位/kg

を投与した。梗塞サイズは、虚血域体積に対する百分率として表した。

②

摘出灌流心モデルを用いて EPO (10 U/ml) 投与前後で心筋サンプルを採取し、Akt、ERK 及び GSK-3 β のリン酸化、さらに、mPTP の主要な構成蛋白である CyP-D と ANT の蛋白量を定量した。また CyP-D と ANT の結合が mPTP 開口のトリガーとなることが知られているため、虚血/再灌流 5 分後の CyP-D と ANT の結合量を免疫沈降法で測定した。

③

虚血再灌流後のミトコンドリアを抽出し、酸化ストレスの指標としてミトコンドリア蛋白のカルボニル化を測定した。カルボニル化の定量的は、OxyBlot™ protein oxidation detection kit (Chemikon, International, Inc) を使用して行った。

4. 研究成果

(1)

梗塞 4 週間の時点で測定した非梗塞領域の HIF-1 α の遺伝子発現量は、WKY と SHR-SP で差がなかった。また、免疫染色で HIF-1 α の蛋白発現を評価したが、発現の程度や発現している領域に明らかな差はなかった。この結果から重症度の異なる心不全モデルにおいて HIF-1 α の発現に差がないことが明らかとなった。

(2)

①

SHR-SP は WKY に比べて心重量体重比が高値であり (5.3 \pm 0.2 vs. 4.2 \pm 0.2 mg/g) 心肥大を呈していた。EPO は、WKY において梗塞サイズを 54.8 \pm 3.7% から 44.2 \pm 2.8% へ縮小した。SHR-SP では WKY に比べて梗塞サイズが有意に大きく (71.2 \pm 3.1%)、EPO の投与は梗塞サイズに影響を与えなかった (67.4 \pm 4.7%)。

一方、5 分間虚血・5 分間再灌流を虚血前に 2 回繰り返すことにより誘導された虚血プレコンディショニング (IPC) は、SHR-SP においても梗塞サイズを有意に縮小した (20.8 \pm 1.6%)。

②

EPO 投与後の Akt、ERK1/2 及び GSK-3 β のリン酸化の程度は両群間で差はなかった。CyP-D 及び ANT の蛋白量も WKY と SHR-SP で同様であったが、EPO 投与は WKY において再灌流 5 分後の CyP-D と ANT の結合を 32% 抑制し

た。SHR-SP では、CyP-D と ANT の結合が WKY に比べ約 2 倍に増加しており、EPO の投与はこの結合に影響を与えなかった。一方、IPC は SHR-SP においても CyP-D と ANT の結合を 40%抑制した。

CyP-D と ANT の結合は、酸化ストレスにより増加することが知られているので、フリーラジカル消去薬の効果を検討した。SHR-SP では、フリーラジカル消去薬の虚血前投与により再灌流後の CyP-D と ANT の結合が約 50%低下した。

③

SHR-SP における虚血再灌流後の CyP-D と ANT の結合増加がフリーラジカル消去薬により低下することを考慮すると、EPO と IPC の効果の差異は酸化ストレス軽減効果の差異であることが示唆された。そのため、次に再灌流時のミトコンドリアの酸化ストレスの程度を評価した。

再灌流時のミトコンドリアのカルボニル化は、SHR-SP では WKY と比較して約 20%増加していた。IPC はこの SHR-SP におけるミトコンドリア蛋白のカルボニル化を 18%軽減した。一方、EPO の投与は SHR-SP におけるミトコンドリア蛋白のカルボニル化に影響を与えなかった。

結論

不全心では、HIF-1 α の発現には変化がなかったが、虚血に対する易障害性があり、mPTP の開口閾値低下がその機序であると考えられる。肥大心におけるミトコンドリアの酸化ストレス亢進による mPTP の開口閾値低下が細胞死を惹起し、不全心への進展に関係している可能性が示唆された。肥大心の虚血耐性に対する HIF-1 α の直接的な影響については今後の検討を要する。

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 4 件)

1. Naitoh K, Yano T, (他 8 名). Roles of Cx43-associated protein kinases in suppression of gap junction-mediated chemical coupling by ischemic preconditioning. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009, 296:H396-403 (査読有)
2. Kobayashi H, Miura T, Ishida H, Miki T, Tanno M, Yano T, (他 3 名). Limitation of infarct size by

erythropoietin is associated with translocation of Akt to mitochondria after reperfusion. Clin Exp Pharmacol Physiol 2008, 35:812-9 (査読有)

3. Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, (他 5 名).

Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK3beta-mediated myocardial protection. J Mol Cell Cardiol 2007, 43:564-70 (査読有)

4. Miura T, Yano T, (他 5 名).

Delta-opioid receptor activation before ischemia reduces gap junction permeability in ischemic myocardium by PKC-epsilon-mediated phosphorylation of connexin43. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007, 293:H1425-31 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 代表者：矢野俊之

発表標題：ROS-mediated enhancement of ANT-cyclophilin D interaction underlies reduced anti-infarct tolerance and lack of response of cardiomyocytes to pro-survival signaling in hypertrophied hearts. 日本循環器学会、2009年3月21日、大阪

2. 代表者：矢野俊之

発表演題：Distinct roles of PKC-epsilon and p38MAPK in preconditioning-induced modulation of gap junction permeability during ischemia. 日本循環器学会、2009年3月20日、大阪

3. 代表者：矢野俊之

発表演題：高血圧性肥大心における心筋保護機構破綻の機序 日本高血圧学会、2008年10月11日、札幌

4. 代表者：矢野俊之

発表演題：Impairment of myocardial response to erythropoietin-induced protection in hypertensive hypertrophied hearts. 日本循環器学会、2008年3月28日、福岡

5. 代表者：大堀克彦

発表演題：Suppression of mitochondrial

GSK-3 β activity by its Ser9-phosphorylation contributes to cardiomyocyte protection afforded by erythropoietin against oxidative stress-induced apoptosis. American Heart Association、2007年11月6日、Orlando、Florida、USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野俊之 (Yano Toshiyuki)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号:40444913

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者