

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790541

研究課題名（和文） 糖尿病性心筋症における低分子量 G 蛋白質の役割、意義について

研究課題名（英文） Role of small G protein Rad in diabetic cardiomyopathy

研究代表者

村田 光繁 (Mitsushige Murata)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30317135

研究成果の概要：

低分子量 G 蛋白質 Rad は心筋 L 型カルシウムチャネル発現調節に加えて、細胞内プロテインキナーゼ A を調節することにより間接的に筋小胞体のリアノジン受容体の活性を修飾していることが明らかとなった。これらの結果より、糖尿病性心筋症における Rad 発現増加は、同疾患における心機能低下の原因の一つである可能性がある。

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	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

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：低分子量 G 蛋白質、カルシウムチャネル、細胞内カルシウム濃度

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者では、冠動脈硬化を認めないにもかかわらず心機能低下をきたすことがあり糖尿病性心筋症と言われている。低分子量 G 蛋白質 Rad は、糖尿病患者の骨格筋で発現が増加することが知られており、我々は糖尿病モデルマウスの心臓における発現も増加していることを確認していた。さらに、我々は Rad が心筋 L 型カルシウムチャネル機能を抑制することも報告しており、糖尿病における Rad 発現の上昇が心機能低下の一因であ

る可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は Rad の糖尿病性心筋症における役割・意義を解明することである。

## 3. 研究の方法

(1) ドミナントネガティブ(DN) Rad 強発現トランスジェニックマウス(TG)表現型解析

マウス心室筋細胞を単離し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内カルシウムイメージングを行った。

(2)細胞内情報伝達系解析 PKA, PKC, CaMKII等の細胞内カルシウム濃度調節にかかわる経路の活性をウエスタンブロット法およびキナーゼアッセイ法を用いて検討した。

(3)野生型(WT) Rad および DN Rad 強発現培養細胞における in vitro 解析

アデノウイルスベクターを用いて WT Rad および DN Rad を強発現した成獣心室筋細胞を用いて、 と同様の解析を行った。

(4)ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病マウスモデルの解析

STZ をマウス腹腔内に投与し、血糖値、インスリン濃度と Rad 発現の推移を検討した。さらに心エコーで心機能を検討した。

#### 4 . 研究成果

(1)DN Rad TG マウスでは野生型マウスと比較し、カルシウムトランジェントの振幅およびカルシウムスパークの頻度が有意に増加していた。DN Rad TG では、カルシウムウェーブの出現頻度が有意に増加しておりカルシウム放出チャネル活性の亢進が示唆された。

(2)DN Rad TG マウスでは野生型マウスと比較し、PKA 活性の増加を認めた。また、リアノジン受容体の 2809 番目のセリンリン酸化が有意に増加していた。さらに PKA の上流にある cAMP 濃度も上昇していたことから Rad が PKA 経路の上流を調節することによりリアノジン受容体機能を間接的に制御していると考えられた。

(3)野生型(WT) Rad を強発現した細胞ではイソプロテレノールによる PKA 活性上昇を抑制し、一方 DN Rad 強発現により PKA 活性が促進されたことから、Rad が PKA 経路を調節していることが確認された。

(4)STZ 糖尿病モデルマウスでは、Rad 発現が増加しており、さらに心エコーで評価した左室収縮機能は有意に低下していた。

#### 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)

1.Tokudome S, Sano M, Shinmura K, Matsushashi T, Morizane S, Moriyama H, Tamaki K, Nakanishi H, Yoshikawa N, Shimizu N, Endo J, Katayama T, Murata M, Yuasa S, Kaneda R, Tomita K, Eguchi N, Urade Y, Asano K, Utsunomiya Y, Suzuki T, Taguchi R, Tanaka H, Fukuda K. Glucocorticoid protects heart from ischemia-reperfusion injury through activation of lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 biosynthesis. *J Clin Invest (in press)* 2009. 査読有

2.Katayama T, Murata M, Iwanaga S, Kawamura A, Yoshikawa T, Ogawa S. Left ventricular pseudoaneurysm with peculiar coronary artery collpase. *J Am Coll Cardiol (in press)*.122. 2009.査読有

3.Hyodo M, Makino S, Awaji Y, Sakurada Y, Ohkubo T, Murata M, Fukuda K, Tsuda M. A novel in vitro system for cardiomyocyte differentiation with embryonic cells of the medaka (*Oryzias latipes*). *Int J Dev Biol (in press)*. 2009. 査読有

4. Chen H, Hattori F, Murata M, Li W, Yuasa S, Onitsuka T, Shimoji K, Ohno Y, Sasaki E, Kimura K, Hakuno D, Sano M, Makino S, Ogawa S, Fukuda K. Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 369: 801-806. 2008. 査読有

5. Murata M, Iwanaga S, Tamura Y, Kondo M, Kouyama K, Murata M, Ogawa S. A real-time 3-dimensional echocardiographic quantitative analysis of left atrial function in left ventricular diastolic dysfunction. *Am J Cardiol*. 102: 1097-1102. 2008. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Murata M, Yamakawa H, Yada H, Makino S, Sano M, Ogawa S, Fukuda K. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak by small G protein Rad in the heart. 第73回日本循環器学会学術集会(シンポジウム) 2009/3/22 大阪

2. Murata M, Yada H, Yamakawa H, Murata M, Ogawa S, Fukuda K. Dominant negative suppression of Rad leads to intracellular Ca<sup>2+</sup> overload via up-regulation of cardiac ryanodine receptor activity. The 25<sup>th</sup> the Annual Meeting of International Society for Heart Research Japanese Section (ISHR). 2008/12/5 横浜

3. Aizawa Y, Murata M, Muraki H, Miyoshi S, Yoshikawa T, Fukuda K, Ogawa S. A common SCN5A polymorphism associated with severe QT prolongation and Torsades de Pointes development after thyroidectomy in a patient with Graves' disease. 1<sup>st</sup> Asia-Pacific Heart Rhythm Society Session (APHR). 2008/11/29 Singapore.

4. Murata M, Yada H, Yamakawa H, Aizawa Y, Yuasa S, Hakuno D, Makino S, Sano M, Murata M, Ogawa S, Fukuda K. Dominant negative suppression of Rad leads to intracellular Ca<sup>2+</sup> overload via up-regulation of cardiac ryanodine receptor activity. 81st American Heart Association scientific meeting. 2008/11/13 (New Orleans, USA).

5. Morikawa T, Murata M, Okuda S, Iwanaga S, Satoh T, Kohsaka S, Nakamizo H, Suzuki K, Matsushita K, Hakuno D, Murata M, Ogawa S. Quantitative analysis of right ventricular function in patients with pulmonary hypertension: three-dimensional echocardiographic study. 81st American Heart Association scientific meeting. 2008/11/13 New Orleans, USA.

6. Hakuno D, Kimura N, Kimura T, Yuasa S, Murata M, Makino S, Sano M, Okada Y, Yozu R, Kudo A, Ogawa S, Fukuda K. The potent angiogenic factor periostin accelerates degeneration and sclerosis of the cardiac valve complex. 81st American Heart

Association scientific meeting. 2008/11/12 New Orleans, USA.

7. Kageyama T, Makino S, Hattori F, Onizuka T, Yun S, Ohno Y, Endo J, Shimoji K, Arai T, Hakuno D, Tanaka T, Kimura K, Hayashida K, Murata M, Katayama T, Sano M, Tokunaga T, Kono T, Ogawa S, Fukuda K. Imprinting gene modified parthenogenic ES cells can be a novel autologous cell source for generating regenerative cardiomyocytes. 81st American Heart Association scientific meeting. 2008/11/11 New Orleans, USA.

8. Yada H, Murata M, Shimoda K, Yuasa S, Kawaguchi H, Ieda M, Adachi T, Murata M, Ogawa S, Fukuda K. Dominant negative suppression of Rad leads to QT prolongation and causes ventricular arrhythmias via modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in the heart. 第25回日本心電学会学術集会 2008/11/11 新潟

9. Murata M, Yada H, Yamakawa H, Murata M, Ogawa S, Fukuda K. Regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis by a ras-related small G-protein Rad in the heart. The International Discussion Forum & the 242<sup>nd</sup> Tokyo Discussion Meeting of the Physiological Society of Japan. 2008/10/26 東京.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 光繁 (Mitsushige Murata)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号: 30317135

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
山川 裕之 (Hiroyuki Yamakawa)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：80465020