

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23963

研究課題名（和文）G α oの新規心不全治療標的としての意義の研究

研究課題名（英文）significance of gnao1 as a novel therapeutic target of heart failure

研究代表者

稲住 英明（Inazumi, Hideaki）

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：10844037

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまでその心血管病における役割が明らかでなかった抑制性Gタンパク サブユニットの一つであるG α oが庄負荷心肥大心不全モデルやヒトトロポニン変異拡張型心筋症モデルなどの病態形成に寄与していることをG α oノックアウトマウスを用いた検討により明らかにした。また心筋特異的G α o過剰発現マウスを作成し、in vivo, ex vivoの検討を行うことで心筋におけるG α o発現上昇が心不全発症、進展につながることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化に伴い、人口減少に関わらず今後ますます心不全患者は増加していくことが予想されている。これまでも心不全に対する治療薬はいくつか開発されているが未だにその予後は不良であり、心不全の分子メカニズムに基づいた新たな治療標的の発見が望まれている。本研究により様々な成因からなる心不全の発症、進展に関わる新たな分子メカニズムの一端が明らかになったため、新規心不全治療法の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We revealed that a subtype of inhibitory GTP binding protein G α o, which role in cardiovascular disease have not been studied before, contributes to the development of heart failure by using multiple mice models of heart failure.

研究分野：循環器内科

キーワード：心不全 Gタンパク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者の所属するグループはこれまでに、心不全進展に関わる心筋胎児型遺伝子の発現を転写抑制因子 NRSF が抑制的に制御すること、また優性抑制変異体 NRSF 心筋特異的過剰発現マウス (dnNRSF-Tg) が進行性の心収縮力低下と心拡大、致死性不整脈による突然死をきたすなどヒト拡張型心筋症類似の表現型を呈することを示し、心筋恒常性維持における NRSF の重要性を明らかにしてきた (Kawahara et al. Mol Cell Biol. 2001, EMBO J. 2003; Nakagawa et al J Mol Cell Cardiol 2006)。しかし NRSF による心機能維持機構の詳細については不明なままであった。最近、申請者は dnNRSF-Tg の心室筋に対してマイクロアレイを用いたスクリーニングを行い、dnNRSF-Tg では抑制性 G タンパク サブユニット G_i サブファミリーに属する G_o の発現が著明に増加していることを見いだした。

G_i は G_s に拮抗する形で短期的には アドレナリン受容体刺激による心筋収縮能亢進に対して抑制的に働くと考えられるものの、正常心室筋での主要サブタイプである G_{i2} の活性化が心保護的に働く可能性も指摘されており、その慢性心不全進行における役割は明確ではなかった。そこで G_o が NRSF の下流で心機能維持に重要な役割を果たすことを検証するための予備的研究として dnNRSF-Tg と G_o ノックアウトマウスを交配したところ、心機能の改善や心室性不整脈の減少、生存率の改善をきたす知見を得た。

さらに圧負荷心不全モデルマウスやトロポニン変異を有するヒト心筋症モデルマウスの不全心でも G_o の発現亢進を確認したことから、G_o が心不全の発症・進展において重要な役割をもち、新規心不全治療・予防標的となりうる可能性が考えられた

2. 研究の目的

心不全は種々の成因が混在する heterogeneous な病態であるため、G_o の機能あるいは発現抑制が様々な成因の心不全モデルの表現系改善につながるかどうかを調べること、さらには G_o の心筋における発現亢進が実際に心不全の進行に寄与するかどうか、またそこに内在する分子メカニズムは何かを明らかにすることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

2種類的心不全モデルと G_o ノックアウトマウスとの交配による、G_o 発現抑制による心不全改善効果の検討: G_o ノックアウトマウスに対し進行性の心肥大、心機能低下を引き起こす横行大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルを作成し、心エコーでの心機能改善や生存率の改善の有無を検討した。

また心肥大や線維化の程度など組織学的所見や病的遺伝子発現についても検討した。

次にヒト拡張型心筋症患者で見られるトロポニン T 変異をノックインして作成され、心機能低下と致死性不整脈にて突然死する拡張型心筋症モデルマウスと G_o ノックアウトマウスを交配し、上記のように生存率、心筋リモデリングの改善の有無についても検討した。

心筋特異的 G_o 過剰発現マウス (G_o-Tg) の表現型解析と内在する分子メカニズムの検討:

心筋における G_o の病態生理学的意義を明らかにするため心臓特異的に G_o を過剰発現する G_o-Tg を作成し、経時的な心機能の変化について検討した。

また申請者は予備的検討から G_o の発現上昇が心筋細胞の Ca²⁺ ハンドリング異常をきたす機

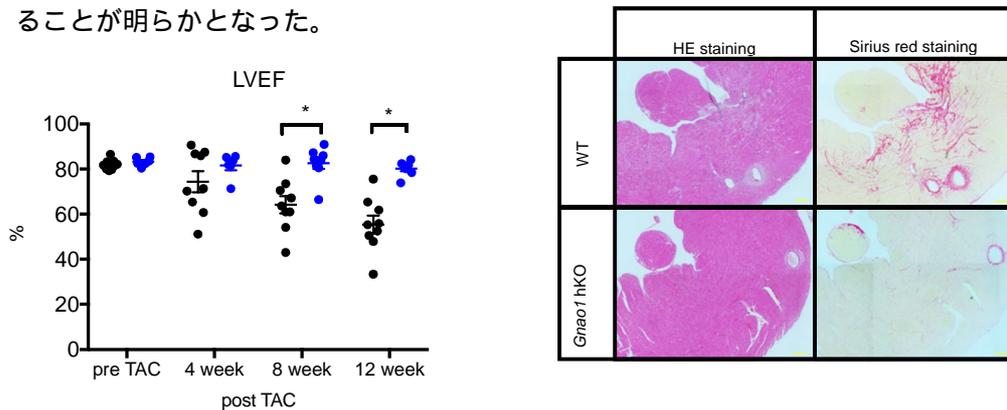
【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

序を想定しているため、若年齢 $G_{\alpha o}$ -Tg からの分離心筋細胞にて電気生理学的解析を行い、 Ca^{2+} チャネル電流密度やその局在、細胞内 Ca^{2+} 濃度などに関して野生型マウスとの差異を比較し $G_{\alpha o}$ 発現亢進が 1 次的に Ca^{2+} 動態に影響を与えるかを検討した。

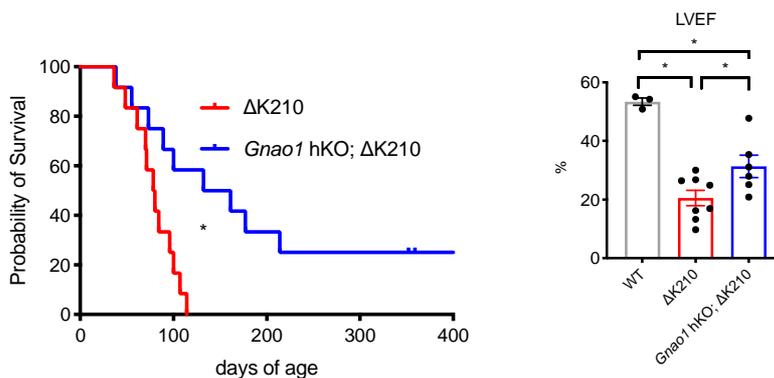
4. 研究成果

$G_{\alpha o}$ ノックアウトマウスに対し進行性の心肥大、心機能低下を引き起こす横行大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルを作成したところ、心肥大期の左室壁厚の増加が野生型と比較して軽減すること、心不全期の心収縮能の低下が軽減することを見出した。

また組織学的な検討で、圧負荷によって生じる線維化についても軽減していることが明らかになった。これらの表現系の変化は心筋における心不全関連遺伝子や線維化関連遺伝子の発現の変化とも合致するものであり、圧負荷により生じる心不全の病態が、 $G_{\alpha o}$ の抑制により改善することが明らかとなった。



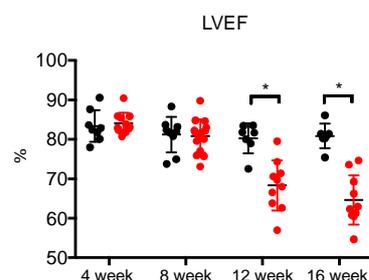
またヒト拡張型心筋症患者で見られるトロポニン T 変異をノックインして作成され、心機能低下と致死性不整脈にて突然死する拡張型心筋症モデルマウスと $G_{\alpha o}$ ノックアウトマウスを交配したところ、心エコーで計測した心機能が改善するとともに生存率までもが改善することがわかった。また上記圧負荷モデルと同様に組織学的な所見や、遺伝子発現についても改善していることが明らかになった。



心筋特異的に $G_{\alpha o}$ を過剰発現するマウスを MHC プロモーターを用いることで作成した。

できた複数ラインのマウスを経時的に心エコーで心機能をフォローしたところ、加齢に伴い心機能が落ちることを見出した。

また心機能が落ちる前の段階の心臓を取り出し、遺伝子発現を検討したところ、 $G_{\alpha o}$ をコードする G_{nao1} の発現がマウスの生体内で亢進していることから、 $G_{\alpha o}$



【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

は positive feedback loop を形成していることが示唆された。(G_o はアミノ酸配列がヒトとマウスで保存されている一方、コードする遺伝子は塩基レベルで少し違いがあるため、マウスの生体内で自身が発現する *Gnao1* を強制発現したヒト *GNAO1* と分けて解析することができる。)

なお心筋細胞を単離して電気生理学的解析を行うことで、心機能が低下する前から L 型 Ca²⁺チャネル電流密度の局在が変化していることが明らかになった。

以上の実験結果から心筋における G_o の発現亢進が L 型 Ca²⁺チャネル電流密度の局在の変化を介して心機能の低下に寄与していることが明らかになった。(論文準備中)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 稲住 英明
2. 発表標題 抑制性G蛋白サブユニットG β の発現亢進はCa $^{2+}$ handlingの異常を介して心不全進展にかかわる
3. 学会等名 第56回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Inazumi
2. 発表標題 Increased G β expression plays a pivotal role in the progression of heart failure by impairing Ca $^{2+}$ handling
3. 学会等名 BCVS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Inazumi
2. 発表標題 Increased G β expression underlies cardiac dysfunction and lethal arrhythmias accompanied with abnormal Ca $^{2+}$ handling
3. 学会等名 ESC congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲住 英明
2. 発表標題 Increased expression of G β plays a pivotal role in the progression of heart failure by impairing Ca $^{2+}$ homeostasis
3. 学会等名 第36回国際心臓研究学会日本部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Inazumi
2. 発表標題 CaMK-NRSF-GNAO1 transcriptional circuits participates in the pathological cardiac remodeling
3. 学会等名 BCVS2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideaki Inazumi, Yasuaki Nakagawa, Kenji Moriuchi, Koichiro Kuwahara
2. 発表標題 Increased G o Expression Regulated by NRSF Plays a Key Role in the Development of Heart Failure Through the Impairment of Ca2+ Homeostasis
3. 学会等名 BCVS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideaki Inazumi, Yoshihiro Kuwabara, Koichiro Kuwahara, Yasuaki Nakagawa, Hideyuki Kinoshita, Kenji Moriuchi, Hiromu Yanagisawa, Toshio Nishikimi, Miku Oya, Mitsuhiko Yamada, Toshihide Kashihara, Nagomi Kurebayashi, Masami Sugihara, Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura
2. 発表標題 NRSF-GNAO1-CaMK2 axis exacerbates cardiac remodeling and progresses heart failure by impairing Ca2+ homeostasis
3. 学会等名 ESC congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------