

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：34605

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20590215

研究課題名（和文） 遺伝子治療による運動パフォーマンスの改善

研究課題名（英文） Improvement of exercise performance by gene therapy

研究代表者

坂田 進（SAKATA SUSUMU）

畿央大学・健康科学部・教授

研究者番号：20142383

研究成果の概要（和文）：心不全モデルラットにおいて、術後6ヶ月以降の血圧は徐々に減少し、シャム手術ラットの値より低下した。また、術後1年半の心不全モデルラットにおいて、トレッドミルでの持久的運動能は、明らかに低下していた。しかし、3週間の自発的運動により心不全モデルラットの最大血圧の上昇・改善と持久的運動能の向上が認められた。これらの結果は、心不全患者において日常的な軽い運動は血圧と持久力の改善に有効であることを示唆する。

研究成果の概要（英文）： Systolic/diastolic blood pressures (BP) in aortic-banding (Band) group were lower than those in sham-operation (Sham) group 6-18 months after the operation. Likewise, endurance capacity was lower in “Band” than in “Sham” 18 months after the operation. However, systolic BP and endurance capacity in “Band” could be increased by 3 week-voluntary wheel-running exercise. To conclude, these results suggest that daily light exercise is a potential strategy for improving BP and endurance capacity in patients with heart failure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	300,000	90,000	390,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：遺伝子治療、SERCA2a、不全心、再生医学、運動生理学、ラット、
運動パフォーマンス

1. 研究開始当初の背景

大動脈弓狭窄誘発性心不全モデルラット

への SERCA2a 遺伝子導入は、不全心の心機能を完全に健常レベルに回復させた。すなわち、

機械的心機能の改善 (eEmax の増大、ESPVR の上方移動、左室収縮期末圧の増加、左室拡張期末圧の低下、拡張期の時定数の減少、等) と興奮収縮連関におけるエネルギー利用効率の向上が見られた (Sakata S. et al. Molecular Therapy 2006;13:987-996, Sakata S. et al. J Mol Cell Cardiol 2007;42:852-861)。このように SERCA2a を過剰発現する不全心は、健常な心機能を有するので、運動負荷により心拍数の増加と 1 回拍出量の増加、すなわち毎分心拍出量が増加し、運動中における骨格筋の循環血液量は増加すると予想される。その結果、この骨格筋への酸素供給量の増大により、運動パフォーマンスの向上が期待される。

2. 研究の目的

大動脈弓狭窄誘発性心不全モデルラットの心臓は左室肥厚性肥大心であり、筋小胞体カルシウムポンプ (SERCA2a) の mRNA および蛋白の発現は低下している。これが主原因で左室の収縮/拡張不全を引き起こすことが知られている。本研究は、この心不全モデルラットの心臓に SERCA2a 遺伝子を *in vivo* 導入することで、不全心の心機能を改善させると同時に、不全心ラットの運動パフォーマンスが、健常レベルに回復するかどうか、について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大動脈弓狭窄ラットの作製

全身麻酔下での生後 4-5 週令の Wistar 雄ラットの第 2 肋骨と第 3 肋骨の間を切開し、上行性大動脈弓を単離し、ヘモクリップにて大動脈弓を狭窄した。同様に、ヘモクリップによる大動脈弓狭窄を施さないで、開胸のみ行った Sham 手術ラットも作製した。

(2) 大動脈弓狭窄ラットの血圧と心拍数の測定

大動脈弓狭窄ラットと Sham 手術ラットにおいて、術後定期的に血圧と心拍数を非観血血圧測定装置にて測定した。

(3) 運動パフォーマンスの測定

① 自発的運動---回転式運動量測定器 SN-451 によりラットの自発的運動量を測定した。

② 強制的な持久的運動---トレッドミルでの強制的走行運動前後における血中乳酸濃度を簡易血中乳酸測定機にて測定した。運動直後の血中乳酸濃度の増加率を持久的運動能の指標に用いた。

(4) 心機能測定

イソフルラン吸入麻酔下において、左心室内に圧カテーテルを挿入し、左心室圧を計測する。左室圧波形の解析により左室収縮機能 (+dP/dt、収縮期圧) と左室拡張機能 (-dP/dt、拡張期圧、時定数 Tau) を求める。

(5) SERCA2a 蛋白発現量の測定

ウェスタンブロット法により左心室の SERCA2a 蛋白質発現量を測定する。

4. 研究成果

(1) 血圧と心拍数の経時的変化

大動脈弓狭窄誘発性心不全モデルラット 12 匹およびシャム手術ラット 8 匹を作製し、術後 2 ヶ月、4 ヶ月、6 ヶ月、9 ヶ月、1 年、1 年半で心拍数と血圧(最大血圧、最小血圧)、を測定した。両手術ラットは、術後ケアを施された後に、12 時間の明暗サイクルの動物実験施設内ラット飼育室(温度 23 度)にて、水と餌を自由摂取で飼育された。血圧と心拍数を非観血血圧測定装置 (BP-98A, ソフトロン) にて測定した。術後 2 ヶ月~1 年半において、心不全モデルラットとシャム手術ラットの心拍数はほぼ同じ値であり有意な差が認められなかった。一方、術後 2 ヶ月と 4 ヶ月において、心不全モデルラットとシャム手術ラットの血圧は、ほぼ同じ値であり有意な差が認められなかった。しかし、術後 6 ヶ月以降において、心不全モデルラットの最大血圧と最小血圧は経時的に徐々に減少し、シャム手術ラットの値より有意に低下した。

(2) 自発的運動量の経時的変化

血圧・心拍数の経時的測定と同様に、術後 2 ヶ月、4 ヶ月、6 ヶ月、9 ヶ月、1 年、1 年半で両手術ラットの自発的運動量を測定した

。自発的運動量を測定するため、ラットを回転式運動量測定ケージに水と餌を自由摂取で10日間飼育し、毎日、回転数（走行距離）を測定した。両手術ラットの10日間の自発的運動量は加齢とともに徐々に減少したが、両群に有意な差は認められなかった。

（3）強制的な持久的運動能

術後1年半の両手術ラットにおいて、トレッドミルを用いての強制運動による持久力を検討した。10分間のトレッドミル走行前後での血中乳酸濃度を測定したところ、心不全モデルラットの乳酸増加率はシャム手術ラットに比較して有意に増加した。この結果から心不全モデルラットの持久的運動能は、明らかに低下していた。

（4）血圧・持久的運動能に及ぼす自発的運動の効果

本研究計画では、不全心にSERCA2a遺伝子を導入することにより、運動パフォーマンス（持久的運動能）の改善を検討することになっているが、現在、本研究機関の動物実験施設ではAAV-SERCA2aを使用できないので、甲状腺ホルモン（T3）投与によるSERCA2a遺伝子発現の増大を試みた。しかし、T3投与の予備実験において、心不全モデルラットが死亡したので本実験を中止した。そこで、自発的運動によりSERCA2a遺伝子発現が増大し、運動パフォーマンス（持久的運動能）や血圧が改善するかを検討した。両手術ラットを3週間にわたり回転式運動量測定ケージで飼育して、飼育前後での持久力と血圧を測定した。その結果、3週間の自発的運動により心不全モデルラットの最大血圧の上昇・改善とトレッドミルでの持久的運動能の向上が認められた。これらの結果は、心不全患者において日常的な軽い運動は血圧と持久力の改善に有効であることを示唆する。現在、圧カテーテル法による心機能データの解析と左心室でのSERCA2a蛋白質発現量の解析を行っている。

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 Ishikawa K, Ladage D, Takewa Y, Yaniz E, Chen J, Tilemann L, Sakata S, Badimon JJ, Hajjar RJ & Kawase Y
Development of a pre-clinical model of ischemic cardiomyopathy in swine.
Am J Physiol Heart Circ Physiol, 301: H530-H537, 2011.

Doi:10.1152/ajpheart.01103.2010.

査読有

② Karakikes I, Kim M, Hadri L, Sakata S, Sun Y, Zhang W, Chemaly ER, Hajjar RJ & Lebeche D
Gene remodeling in type 2 diabetic cardiomyopathy and its phenotypic rescue with SERCA2a.
PLoS ONE, 4(7): e6474, 2009.

doi:10.1371/journal.pone.0006474.

査読有

③ Kim M, Oh JK, Sakata S, Liang LF, Park WJ, Hajjar RJ & Lebeche D
Role of resistin in cardiac contractility and hypertrophy. *J Mol & Cell Cardiol* 45: 270-280, 2008.

doi:10.1016/j.yjmcc.2008.05.006.

査読有

④ Kawase Y, Ly HQ, Prunier F, Lebeche D, Shi Y, Jin H, Hadri L, Yoneyama R, Hoshino K, Takewa Y, Sakata S, Peluso R, Zsebo K, Gwathmey JK, Tardif J-C, Tanguay J-F & Hajjar RJ
Reversal of cardiac dysfunction following long term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure.
J Am Coll Cardiol 51: 1112-1119, 2008.

doi:10.1016/j.jacc.2007.12.014.

査読有

〔学会発表〕（計6件）

① Nishii Y, Hanaoka T, Iwami K, Imagita H, Minematsu A, Waki H, Nakatani A, Kaneko A & Sakata S
Voluntary wheel-running lowers blood pressure and

elevates endurance capacity in rats. The 7th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies, September 2011, Taipei, Taiwan.

② Ishizawa R, Sakata S & Nakatani A
Effects of different high fat diets on FABP content in rat skeletal muscles. 58th Annual Meeting of American College of Sports Medicine, June 2011, Denver, USA.

③ Chemaly ER, Chaanine A, Sakata S & Hajjar RJ
Assessing myocardial systolic function: are we moving beyond the end-systolic elastance of the left ventricle? 2011 North American Section Meeting International Society for Heart Research, May 2011, Philadelphia, USA.

④ Sakata S, Nishii Y, Hanaoka T, Ishizawa R, Iwami K, Minematsu A, Imagita H, Itou A, Waki H & Nakatani A
Voluntary wheel running decreases blood pressure and increases endurance capacity in rats. The Joint Meeting of The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan and The 116th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists, March 2011, Japan

⑤ Sakata S, Sakata N, Sakata Y, Lebeche D, Hanaoka T, Nishii Y, Chemaly ER, Kawase Y, Takaki M & Hajjar RJ
Left ventricular mechanoenergetics during development of cardiac hypertrophy and failure. 20th World Congress of the International Society for Heart Research, May 2010, Kyoto, Japan

⑥ Sakata S, Sakata N, Sakata Y, Lebeche D, Hanaoka T, Chemaly ER, Takaki M & Hajjar RJ
Dynamic changes in left ventricular mechanoenergetics during development of cardiac hypertrophy and failure. 36th International Congress of

Physiological Sciences, July-August 2009, Kyoto, Japan

[その他]
ホームページ
<http://www.kio.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 進 (SAKATA SUSUMU)
畿央大学・健康科学部・教授
研究者番号：20142383

(2) 研究分担者

中谷 昭 (NAKATANI AKIRA)
奈良教育大学・教育学部・教授
研究者番号：70116284

(3) 研究分担者

高木 都 (TAKAKI MIYAKO)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：00033358