

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590257

研究課題名（和文）心肥大における心筋代謝機能とその制御分子に関する研究

研究課題名（英文）The myocardial metabolic function and its control molecules in cardiac hypertrophy

研究代表者

泉 康雄（IZUMI YASUKATSU）

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10347495

研究成果の概要（和文）：カニクイザルにエピネフリンを反復投与することにより、ヒトたこつぼ型心筋症に類似した心不全モデルを作製することに成功した。壁運動が保たれている左心室基部と壁運動の著しく低下した心尖部から抽出したRNAを用いて、マイクロアレイ法にて遺伝子発現解析を行った。心尖部と基部では、遺伝子の発現がかなり異なっており、β遮断薬の有効性についても調べた。また、代謝機能関連遺伝子の発現は壁運動の低下している心尖部でのみ低下していた。

研究成果の概要（英文）：Takotsubo cardiomyopathy is an increasingly recognized clinical syndrome characterized by acute reversible apical ventricular dysfunction. We tried to make a new model of Takotsubo-like cardiomyopathy in non-human primates. Echocardiography revealed that repeated intravenous infusion of epinephrine overdose in cynomolgus monkeys induced Takotsubo-like cardiomyopathy, which is characterized by progressive left ventricle and depressed systolic function with severe hypokinesis in apical regions and hyperkinesis in the basal region. Although this cardiac dysfunction almost normalized after a month even without any treatment, metoprolol, a β-blocker, improved the decreased ejection fraction earlier than the control. This model is valuable in understanding the pathogenesis of Takotsubo cardiomyopathy and effectivity of β-blockers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：基盤（C）

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：心血管、代謝機能、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

様々な病態でみられる心臓の構造変化及びその過程を心臓リモデリングと総称し、その最終段階が心不全である。社会の高齢化に伴って心不全の発症頻度は年々増加しており、薬物治療の進歩にもかかわらず、重症心

不全患者が多数存在している。わが国でも心臓移植が行われるようになってきたが、移植症例は極めて限られており、移植に代わる治療が求められている。近年、胚性幹細胞や人工多能性幹細胞を用いた心筋再生の研究が活発に行われているが、再生治療が日常的な

治療として確立されるまでにはまだかなりの年数が必要と考えられる。

わが国では約 4000 万人が高血圧症であり、特に 50 歳以上では 2 人に 1 人が高血圧症と考えられている。良好な血圧管理下におかれていない患者も多い。高血圧の持続は心肥大を引き起こし、さらに左室機能不全を伴って、やがて心不全を呈するようになる。我々はこれまで、心臓・血管を中心とした臓器のリモデリングに対して細胞内分子機序に焦点を当てた研究を行ってきた。具体的には、心筋リモデリングの細胞内情報伝達系に関して、mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ)ファミリーに属する c-jun amino-terminal kinase (JNK)や p38MAPK (p38)の活性亢進が高血圧性心肥大の進展に関与していることを証明し、また、これらのキナーゼの上流に位置する MAP キナーゼキナーゼの一つである apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)が高血圧性心肥大・心筋梗塞後の心臓リモデリングに重要な役割を演じていることを、組み換え遺伝子の in vivo への遺伝子導入法等や ASK1 遺伝子欠失マウスを用いて、実験動物を用いた病態モデルを作成して証明してきた。ASK1 は活性酸素種依存性のキナーゼであり、この活性酸素種の阻害薬を用いることで、血圧とは非依存性に心肥大を抑制することが出来た。また、高血圧治療において、降圧は重要な因子ではあるが、降圧だけでなく、臓器を保護するという観点から、現在、高血圧治療薬として最もよく用いられているアンジオテンシン受容体遮断薬(ARB)、アンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACEI)、アルドステロン受容体遮断薬およびカルシウムチャネル遮断薬(CCB)を用いて、それぞれの様な細胞内機序を介しているか、また、併用投与した場合の相乗効果やその有効性について研究を行ってきた。ARB と ACEI、ARB と CCB との併用療法は単独投与に比べて相乗効果を発揮できる可能性について報告した。

近年、細胞のアポトーシスを司っているのはミトコンドリアからのシグナルであることがわかってきた。機能不全に陥った心筋組織では組織エネルギー代謝の障害を受けているが、このエネルギー代謝で中心的な役割を演じているのもミトコンドリアである。心筋細胞にはミトコンドリアが豊富に存在し、その機能障害は心機能低下を引き起こす。これまでの研究で、カルシウム過負荷やラジカルによる膜脂質過酸化反応がミトコンドリアの構造障害を惹起し、ミトコンドリア機能を低下させ、このミトコンドリア機能低下によるエネルギー代謝障害が重篤な場合、心筋細胞は壊死し、梗塞巣を形成する(心筋梗塞)ことが知られているが、まだ不明な点も多い。Menage-a-trois 1 (MAT1)はサイクリン依存

性キナーゼ 7・サイクリン H とともにヘテロ 3 量体を形成している。MAT1 遺伝子ノックアウトマウスは胎生致死を起こして胎児は生まれてこないが、MAT1 を心筋でのみ特異的に欠失させたマウスでは、正常に生まれる。しかしながら、生後 4 週齢を超えると劇的な心不全を呈して死亡することがわかった。その際、心肥大関連遺伝子の発現は亢進し、さらに、peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1)をはじめとするエネルギー代謝に関連する遺伝子の発現は心不全を発症する以前から既に低下していることがわかった。実際、心筋の代謝能は心機能がまだ保たれている時期からすでにその予備能が低下していた。心臓の代謝機能とその調節分子との関連を明らかにすることで、心肥大から心機能障害・心不全への移行を阻止できる。こうしたことから、ヒトの心不全モデルを作製して、その分子機序を明らかにしていくことが重要である。

2. 研究の目的

心肥大から心機能低下、心不全へと移行する過程において、様々な情報伝達分子が関与しているが、まだ十分に解明されていない。

近年、心機能と心筋代謝との関わりが注目されている。本研究では、心肥大・心不全と心筋代謝機能に関する情報伝達経路について解明する。ミトコンドリア機能の調節に関わっている分子を解明することが出来れば、新たな治療の可能性が生まれる。具体的には、心肥大あるいは心不全モデル動物を用いて、心筋のミトコンドリア機能に関する制御分子を明らかにするとともに、実際の代謝機能についても調べ、心機能低下に対する治療応用を目指す。また、既存の心肥大治療薬が代謝機能に及ぼす効果についても調べる。

3. 研究の方法

(1) 心肥大モデルマウスでの評価

我々はこれまで、高血圧ラットあるいはアンジオテンシン II 持続投与による心肥大モデルを作製して、解析を行ってきた。しかしながら、上述のように、血圧非依存的に心肥大が起こりえることもわかってきた。そこで、本研究では Gαq 遺伝子を心筋でのみ過剰発現させることにより心肥大を引き起こすマウス(Gq-Tg マウス)を用いて解析を行う。このマウスは既に入手済みである。

心機能評価については我々が既に数多く報告しているように心臓超音波検査にて非侵襲的に行うことが可能である。超音波検査では、少なくとも左室壁厚、収縮機能(駆出率)および拡張機能(E/A)を測定して評価する。また、病理組織標本作製し、組織染色により実際の心筋細胞のサイズやその細胞数、さらに血管周囲・間質の線維化等についても評価

する。

Gq-Tg マウスの心臓では、ミトコンドリア数を調整している分子の一つである PGC-1 発現が低下することが報告されている。心肥大関連遺伝子、線維化・心不全に関連する遺伝子だけでなく、エネルギー代謝・ミトコンドリア機能に関連する遺伝子について mRNA 発現を経時的に測定し、心機能評価と併せて評価する。mRNA 測定は定量 RT-PCR 法により行う。

アポトーシスの評価は既に確立されている TUNEL 法による組織染色により評価する。ミトコンドリア機能はその酵素活性を野生型マウスと比較検討する。また、ミトコンドリア DNA 複製数を定量 PCR 法によって調べる。さらに、ミトコンドリアのエネルギー代謝能について酸化リン酸化能等を調べる。

(2) たこつぼ型心筋症モデルでの評価

心不全では、交感神経をはじめとした神経体液性因子の亢進が心機能に影響を与えている。特に、心不全における β 遮断薬療法の分子メカニズムを解明するためには、カテコールアミン過剰による心不全モデルの作製は特に重要である。そこで、雄性カニクイザルにエピネフリンを投与しカテコラミン心不全モデル作製を試みた。また、この心不全モデルに対し、 β 遮断薬を投与した。効果の解析は、心臓超音波検査、血液生化学的検査、網羅的遺伝子発現解析、組織化学的解析、定量 RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) Gq-Tg マウスは、血圧上昇は軽度にとどまったが、超音波検査にて左心肥大をきたした。しかし、6 ヶ月例のマウスにおいて、心機能低下はほとんど認められなかった。冠動脈周囲や左室間質の線維化も軽度であった。PGC-1 α 発現は低下していたが、アポトーシスの程度も軽度であった。酸化リン酸化能の著しい低下は認められず、ミトコンドリアのエネルギー代謝能での評価は困難であった。一年齢以上の Gq-Tg マウスでの評価を予定したが、当大学動物実験施設において病原性ウイルスが発生し、一旦、全てのマウスを処分せざるを得なくなった。

(2) カニクイザルにエピネフリンを反復(2回)投与することにより、ヒトたこつぼ型心筋症に類似した心不全モデルを作製することに成功した。げっ歯類(ラット・マウス)にエピネフリンを反復投与してもこのモデルは作製することができない、極めて興味深いモデルである。2 回のエピネフリン投与 24 時間後(Day3)に心臓超音波検査を行ったところ、左心室基部は正常壁運動を示したのに対して、心尖部領域では著明な壁運動低下を求めた。急性心不全にて死亡した症例を除く

と、その後は徐々に心機能が回復し、1 ヶ月後には正常マウスの 80%程度にまで駆出率は改善した。

心不全の治療に用いられる β 受容体遮断薬(メトプロロール)を Day3 に投与すると、その後の駆出率改善が促進された。Day4 に壁運動低下をほとんど認めない左室基部、壁運動低下の著しい心尖部およびその中間部の RNA を抽出し、網羅的な遺伝子解析を行った。マイクロアレイ法では、心尖部においてエピネフリンにて 2 倍以上発現が増加した遺伝子が約 2000、0.5 倍以下に低下した遺伝子が約 500 見つかった。基部に比べて心尖部ではエピネフリン投与によって発現が変動する遺伝子が多いこともわかった。正常(未刺激)群の左室において、基部に比べ、心尖部に向けて特異的に発現している遺伝子群としては MAP キナーゼ経路、Wnt 経路、TGF- β 経路、カルシウム関連遺伝子などが認められた。正常左室心尖部で特異的に発現し、かつ、エピネフリン投与により特異的に変動する遺伝子としては、カルシウム関連遺伝子(ADCY7, PDE1A, P2RX4 など)やレニン・アンジオテンシン系遺伝子(AGTR1 など)が認められた。脳性利尿ペプチドやオステオポンチンなどの心不全関連遺伝子も心尖部でより大きく変動した。

メトプロロール投与にて、エピネフリンによる ADCY7 の遺伝子発現増加は抑制され、ミトコンドリア機能に関連する PGC-1 α や TFAM の遺伝子発現も改善傾向を示した。また、エピネフリンで認められた心尖部領域の心筋障害は、メトプロロール投与にて改善した。本研究は、メトプロロール単回投与のための、メトプロロールの心機能改善作用の詳細な機序については明らかにできなかった。本モデルは、たこつぼ型心筋症あるいは心不全に対する β 受容体遮断薬療法の薬理機序を明らかにする上で重要なツールとなると考えられる。

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 11 件)

① Nakao T, Yamane T, Katagami T, Shiota M, Izumi Y, Samori T, Hino M, Iwao H. Severe prekallikrein deficiency due to a homozygous Trp499Stop nonsense mutation. Blood Coagul Fibrinolysis 査読有 22, 2011, 337-339.

② Sugiyama A, Nakamura Y, Akie Y, Saito H, Izumi Y, Yamazaki H, Kaneko N, Itoh K. In Vivo Proarrhythmia Models of Drug-Induced Long QT Syndrome: Development of Chronic Atrioventricular

Block Model of Microminipig. J Pharmacol Sci 査読有 115, 2011, 122-126.

③ Kawaguchi H, Miyoshi N, Miura N, Fujiki M, Horiuchi M, Izumi Y, Miyajima H, Nagata R, Misumi K, Takeuchi T, Tanimoto A, Yoshida H. Microminipig, a Non-Rodent Experimental Animal Optimized for Life Science Research-Novel Atherosclerosis Model induced by High Fat and Cholesterol Diet. J Pharmacol Sci 査読有 115, 2011, 115-121.

④ Kaneko N, Itoh K, Sugiyama A, Izumi Y. Microminipig, a Non-Rodent Experimental Animal Optimized for Life Science Research. J Pharmacol Sci 査読有 115, 2011, 112-114.

⑤ Izumi Y. A new model of Takotsubo-like left ventricular dysfunction in cynomolgus monkey. Nippon Yakurigaku Zasshi 査読無 136, 2010, 103-106.

⑥ Miyoshi N, Horiuchi M, Inokuchi Y, Miyamoto Y, Miura N, Tokunaga S, Fujiki M, Izumi Y, Miyajima H, Nagata R, Misumi K, Takeuchi T, Tanimoto A, Yasuda N, Yoshida H, Kawaguchi H. Novel microminipig model of atherosclerosis by high fat and high cholesterol diet, established in Japan. In Vivo 査読有 24, 2010, 671-680.

⑦ Shiota M, Kusakabe H, Izumi Y, Hikita Y, Nakao T, Funae Y, Miura K, Iwao H. Heat shock cognate protein 70 (Hsc70) is essential for Akt signaling in endothelial function. Arterioscler Thromb Vasc Biol 査読有 30, 2010, 491-497.

⑧ Kitamoto K, Machida Y, Uchida J, Izumi Y, Shiota M, Nakao T, Iwao H, Yukimura T, Nakatani T, Miura K. Effects of liposome clodronate on renal leukocyte populations and renal fibrosis in murine obstructive nephropathy. J Pharmacol Sci 査読有 111, 2009, 285-292.

⑨ Izumi Y, Shiota M, Kusakabe H, Hikita Y, Nakao T, Nakamura Y, Muro T, Miura K, Yoshiyama M, Iwao H. Pravastatin accelerates ischemia-induced angiogenesis through AMP-activated protein kinase. Hypertens Res 査読有 32, 2009, 675-679.

⑩ Izumi Y, Okatani H, Shiota M, Nakao T, Ise R, Kito G, Miura K, Iwao H. Effects of metoprolol on epinephrine-induced Takotsubo-like left ventricular dysfunction in non-human primates. Hypertens Res 査読有 32, 2009, 339-346.

⑪ Shiota M, Kusakabe H, Hikita Y, Nakao T, Izumi Y, Iwao H. Pharmacogenomics of cardiovascular pharmacology: molecular

network analysis in pleiotropic effects of statin -- an experimental elucidation of the pharmacologic action from protein-protein interaction analysis. J Pharmacol Sci 査読有 107, 2008, 15-19.

〔学会発表〕(計 11 件)

① 泉康雄、炭酸ガスミストによる虚血性疾患に対する新たな治療法の探索、第 31 回日本臨床薬理学会年会、2010 年 12 月 1 日、京都

② 泉康雄、虚血性疾患に対する炭酸ガスの血流および代謝機能改善効果、第 20 回日本循環薬理学会、2010 年 11 月 11 日、札幌

③ 泉康雄、高血圧性心肥大に対する抗線維化薬の効果、第 33 回日本高血圧学会総会、2010 年 10 月 15 日、福岡

④ 泉康雄、Role of c-Jun on rat cardiac hypertrophy induced by angiotensinII, The XXth World Congress of the Internal Society for Heart Research, 2010 年 5 月 16 日 Kyoto

⑤ 泉康雄、Pravastatin accelerates ischemia-induced angiogenesis through AMP-activated protein kinase、第 74 回日本循環器学会学術集会、2010 年 3 月 6 日、京都

⑥ 泉康雄、カニクイザルを用いたタコツボ心筋症モデル作製と B 遮断薬の効果、第 19 回日本循環薬理学会、2009 年 11 月 27 日、京都

⑦ 泉康雄、Heat shock cognate protein 70 は Akt を介した血管新生に関与する、第 32 回日本高血圧学会総会、2009 年 10 月 3 日、大津

⑧ 泉康雄、血管新生におけるプラバスタチンの効果、第 115 回日本薬理学会近畿部会、2009 年 6 月 26 日、金沢

⑨ 泉康雄、Heat shock cognate protein 70 (Hsc70) is essential for Akt signaling in endothelial functions、第 73 回日本循環器学会学術集会 2009 年 3 月 20 日、大阪

⑩ 泉康雄、新しい生活習慣病モデルの薬理ゲノミクス研究 -サル心不全モデルにおける薬理ゲノミクス-、第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 17 日、横浜

⑪ 泉康雄、カニクイザルを用いたタコツボ心筋症モデル作成とメトプロロールの効果、第 31 回日本高血圧学会総会、2008 年 10 月 11 日、札幌

〔図書〕(計 3 件)

① 泉康雄他、日本臨床社、高血圧(上)-日本における最新の研究動向-基礎編 薬剤の多面的作用と血管保護、2009、680-684

② 泉康雄他、日本臨床社、高血圧(下)-日

本における最新の研究動向- 臨床編 ARB
の新たなエビデンス・展開、2009、687-691
③ 泉康雄、日本薬理学会誌、PPAR γ
coactivator-1 経路による心筋代謝制御機構、
2009、362

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉 康雄 (IZUMI YASUKATSU)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：10347495

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし