

平成 22 年 2 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790529

研究課題名（和文） 心不全病態形成における蛋白質分解機構の関与の検討と治療への応用

研究課題名（英文） The investigation of the role of protein degradation pathway during progression to heart failure, and the application to heart failure treatment.

研究代表者

彦惣 俊吾（HIKOSO SHUNGO）

大阪大学・保健センター・助教

研究者番号：30423164

研究成果の概要（和文）：蛋白分解機構のひとつである calpain 経路の心不全発症機序における役割を、心筋特異的 calpain4 欠損マウスを用いて検討した。欠損マウスでは、圧負荷により心筋細胞のアポトーシスが増加し、心内腔の拡大、心収縮力の低下を来し、心不全を発症した。心筋における calpain 経路は、圧負荷に対してはストレス誘導性のアポトーシスを抑制し心筋保護的に作用することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of calpain pathway which is known as a protein degradation pathway in the pathogenesis of heart failure using cardiac-specific calpain4-deficient mice. We found the increase in apoptotic cardiomyocyte death in deficient mice in response to pressure overload, leading to cardiac dilatation and decreased cardiac contractility. Thus, we concluded that calpain pathway in the heart plays a protective role in response to pressure overload mediated through the inhibition of stress-induced cardiomyocyte apoptosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

心臓に負荷がかかると、当初は肥大反応による代償が働いて心機能は維持されるが、最終的には次第に心収縮力が低下し心不全に至る。この過程において、アポトーシスをはじめとする心筋細胞死が極めて重要な役割を

果たしていることを私はこれまでに報告してきた（*Nature Medicine* 2007;13:619-624、*Journal of Clinical Investigation* 2004;114:937-943、*Circulation* 2004;110:2631-2637）。さらに、Mitogen-activated protein kinase kinase

kinase である apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)のドミナントネガティブ体 (ASKΔN(KR)) を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを心筋症ハムスターに遺伝子導入し外因的に ASK1 を阻害することで、心筋細胞死を抑制して心不全の進展を抑制できること、また不全心筋において calpain が活性化しており ASK1 の阻害によりその活性化を抑制しうることを明らかにした (*Journal of the American College of Cardiology* 2007;50:453-462)。以上の検討から、血行動態的ストレスから心筋細胞死に至る過程では、ASK1 を介して calpain が活性化しており、それに伴うさまざまな蛋白質の分解が心筋細胞死および心不全の進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、心筋細胞におけるストレス応答性 calpain 経路活性化の心不全発症における役割を明らかにし、さらにその活性化メカニズムおよび下流の標的分子を同定することにより、蛋白質分解機構の活性調節による新規心不全治療法を開発することを目的として検討をおこなった。

3. 研究の方法

(1) カルパインによる蛋白分解機構のアポトーシス性心筋細胞死および心不全発症における役割の検討

calpain を介した経路が心不全発症に関与しているか否かを検討するため、心筋特異的 calpain 4 ノックアウトマウスを用いて検討を行なった。心筋特異的 calpain 4 ノックアウトマウスは、calpain 4 flox マウスと α -myosin heavy chain promoter 依存性に cre recombinase を発現するトランスゲニックマウスを交配して作成した。このマウスを用いて以下の検討をおこなった。

定常状態における心形態、心機能、心筋組織像の評価。

圧負荷モデル、心筋梗塞モデルを作成し、経時的に心臓超音波法にて観察し心機能の評価をおこなった。さらに、心重量測定などの生理学的評価をおこなった。

心筋細胞死の程度を TUNEL 法および活性化 caspase3 に対する免疫組織染色法などで評価した。また線維化の程度を Masson-trichrome 染色にて評価した。

calpain による細胞死制御機構の検討を、calpain の基質として報告されている分子を候補としておこなった。また、2 次元電気泳動による網羅的検討もおこなった。

(2) in vivo における calpain 活性化機構の検討

ASK1 を介したシグナルによる calpain 活

性の分子メカニズムについて検討をおこなった。

ASK1 シグナル経路に属する ASK1、および JNK を免疫沈降し、recombinant μ -および m-calpain を基質として *in vitro* immune complex kinase assay をおこない、calpain をリン酸化する責任分子の同定を試みた。

4. 研究成果

生後 10 週齢のノックアウトマウスおよびコントロールマウスの心筋において、calpain4、 μ -および m-calpain の発現は欠損していた。10 週齢のマウスでは、定常状態における心臓の構造、機能にノックアウトマウスとコントロールマウスの間で有意な差を認めず、calpain は心臓の発生、成長および定常状態の維持に必須ではないかもしくは何らかの経路により代償されているものと考えられた。次にストレス応答におけるカルパインの役割を検討するため、このマウスを用いて横行大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルを作成し、経時的な心臓超音波によりその表現型を検討した。圧負荷後 1 週間において、コントロールマウスでは心肥大を呈するが心収縮力は保持されていた。一方、ノックアウトマウスでは圧負荷後 1 週間で心内腔の拡大、心収縮力の低下、肺うっ血を来し心不全を発症した。心筋の線維化はノックアウトマウスで亢進を認めた。負荷後の心筋におけるアポトーシス性心筋細胞死の程度について *in situ* TUNEL assay を用いて検討したところ、ノックアウトマウスでアポトーシスの増加が認められた。圧負荷後のユビキチン化タンパクの蓄積や小胞体ストレスの程度には有意な変化を認めなかった。また、細胞死の制御に關する既知の calpain 標的分子には有意な変化を認めなかった。Calpain の活性化機序について、ASK1 および JNK によるリン酸化を検討したが、有意な所見は得られなかった。現時点では機序不明であるが、calpain は心筋において圧負荷に対し保護的に作用することが明らかになった。

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6件)

I Mizote, O Yamaguchi, S Hikoso, T Takeda, M Taneike, T Oka, T Tamai, J Oyabu, Y Matsumura, K Nishida, I Komuro, M Hori, K Otsu
Activation of MTK1/MEKK4 induces cardiomyocyte death and heart failure

Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2010; 48: 302-209、査読有
S Hikoso, O Yamaguchi, Y Nakano, T Takeda, S Omiya, I Mizote, M Taneike, T Oka, T Tamai, J Oyabu, Y Uno, Y Matsumura, K Nishida, K Suzuki, M Kogo, M Hori, K Otsu
The I κ B kinase β /NF- κ B signaling pathway protects the heart from hemodynamic stress mediated by the regulation of MnSOD expression
Circulation Research, 2009;105:70-79、査読有

T Ohtani, T Mano, S Hikoso, Y Sakata, M Nishio, Y Takeda, K Otsu, T Miwa, T Masuyama, M Hori, K Yamamoto
Cardiac steroidogenesis and glucocorticoid in the development of cardiac hypertrophy during the progression to heart failure

Journal of Hypertensions, 2009; 27: 1074-1083、査読有

S Omiya, S Hikoso, Y Imanishi, A Saito, O Yamaguchi, T Takeda, I Mizote, T Oka, M Taniike, Y Nakano, Y Matsumura, K Nishida, Y Sawa, M Hori, K Otsu

Downregulation of ferritin heavy chain increases labile iron pool, oxidative stress and cell death in cardiomyocytes

Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2009;46:59-66、査読有

T Watanabe, T Takeda, S Omiya, S Hikoso, O Yamaguchi, Y Nakano, Y Higuchi, A Nakai, Y Abe, Y Aki-Jin, M Taniike, I Mizote, Y Matsumura, T Shimizu, K Nishida, K Imai, M Hori, T Shirasawa, K Otsu

Reduction in hemoglobin-oxygen affinity results in the improvement of exercise capacity in mice with chronic heart failure

Journal of the American College of Cardiology, 2008;52:779-786、査読有

M Taniike, O Yamaguchi, I Tsujimoto, S Hikoso, T Takeda, A Nakai, S Omiya, I Mizote, Y Nakano, Y Higuchi, Y Matsumura, K Nishida, H Ichijo, M Hori, K Otsu

Apoptosis signal-regulating kinase 1/p38 signaling pathway negatively regulates physiological hypertrophy

Circulation, 2008; 117:545-52、査読有

[学会発表](計5件)

1. 彦惣俊吾、大津欣也、小室一成、堀正二、第26回国際心臓研究学会日本部会(札幌、2009年12月4-5日)

幌、2009年12月4-5日)

The in vivo Role of IKK β /NF- κ B Signaling Pathway in the Heart

2. 大宮茂幹、彦惣俊吾、大津欣也、第19回日本循環薬理学会(京都、2009年11月27日)

心筋細胞においてフェリチン重鎖の減少は遊離鉄および酸化ストレスの増加をもたらす細胞死を誘導する

3. S Hikoso, O Yamaguchi, T Takeda, S Omiya, K Suzuki, K Nishida, M Karin, K Otsu

The 36th Congress of the International Union of Physiological Science, (Kyoto, Japan, July 27- Aug 1, 2009)

“I κ B Kinase β /NF- κ B Pathway Protects Hearts from Hemodynamic Stress Mediated through Regulating Manganese Superoxide Dismutase Expression”

4. 彦惣俊吾、大津欣也、堀正二、第32回心筋代謝研究会(大阪、2009年7月4-5日)
The I κ B kinase β (IKK β)/NF- κ B signaling pathway protects the heart in response to hemodynamic stress.

5. 溝手勇、山口修、彦惣俊吾、武田理宏、大宮茂幹、松村泰志、西田和彦、堀正二、大津欣也、第73回日本循環器学会学術集会(大阪、2009年3月20-22日)
Cardiac-specific Disruption of Calpain4 Revealed Its Cardioprotective Role in Response to Pressure Overload

6. 種池学、山口修、中井敦子、彦惣俊吾、武田理宏、大宮茂幹、西田和彦、堀正二、水島昇、大津欣也、第73回日本循環器学会学術集会(大阪、2009年3月20-22日)
Constitutive autophagy is required to maintain cardiac structure and function in aged mouse hearts

7. 大宮茂幹、彦惣俊吾、大津欣也、第25回国際心臓研究学会日本部会(横浜、2008年12月5-6日)
Downregulation of ferritin heavy chain increases labile iron pool, oxidative stress and cell death in cardiomyocytes

8. 彦惣俊吾、山口修、堀正二、大津欣也、第25回国際心臓研究学会日本部会(横浜、2008年12月5-6日)
The role of IKK β /NF- κ B pathway in the pathogenesis of heart failure

9. 武田理宏、大津欣也、山口修、廣谷信一、彦惣俊吾、樋口義治、谷池正行、中井敦子、大宮茂幹、種池学、岡崇史、西田和彦、堀正二、American Heart Association Scientific Sessions 2008, (アメリカ合衆国、ニューオーリンズ、2008年11月8-12日)
Cardiac-specific Activation of

Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
Leads to Cardiac Dysfunction with
Pathological Hypertrophy

6 . 研究組織

(1)研究代表者

彦惣 俊吾 (HIKOSO SHUNGO)

大阪大学・保健センター・助教

研究者番号 : 30423164