

## 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25年6月10日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21390246

研究課題名（和文）自律神経による心機能制御の分子メカニズム

研究課題名（英文）Molecular mechanism of the heart by the autonomic nervous system

研究代表者

石川 義弘 (ISHIKAWA YOSHIHIRO)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：40305470

研究成果の概要（和文）：心臓に発現するアデニル酸シクラーゼは、自律神経刺激によって cAMP を産生して心機能を制御する。我々は、近年同定された cAMP 標的分子である Epac の心臓限局型過大発現モデルを作成し、本モデルにおける心機能変化の分子メカニズムを検討した。非刺激下では心機能に大きな変化は見られなかったが、エンドトキシンによる心筋ダメージが、保護されており、自律神経調節による心機能調節の新たな調節経路が示された。

研究成果の概要（英文）：Adenylyl cyclase is a membrane bound enzyme that catalyzes the production of cAMP. Epac is a new molecule, which is regulated by cAMP independently from PKA. In the model of Epac overexpression, we found an interesting cross talk between cytokine and cAMP signal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科

キーワード：自律神経、心機能制御、cAMP、カテコラミン、分子

## 1. 研究開始当初の背景

心機能制御の中心は自律神経であり、カテコラミン受容体刺激による心筋細胞内 cAMP の産生は、カルシウム・収縮関連蛋白のリン酸化を促し、心臓の変時性・変力性を増強する事が知られている。アデニル酸シクラーゼはカテコラミン受容体刺激を受けて cAMP を産生する酵素であり、9種のサブタイプを持ち、申請者らの発見した5型および6型は心臓型サブタイプを形成する。

(*Circ. Res.* 1997; *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2003; *Drug Targets* 2006; *Drug and Metabolism Letter* 2007; *Recent Patent on Cardiovascular Drug Discovery* 2008; *J. Pharmacol. Sci.* 2008 など申請者による総説参照)。

これまでの研究成果では、心臓に発現するアデニル酸シクラーゼサブタイプの生理的意義を、ノックアウト動物などの遺伝子操作、

サブタイプ特異的作動薬などの薬理学的手法を用いて、心機能制御に及ぼす影響を中心に検討した。本申請では、近年になって cAMP シグナルの新しい下流蛋白として同定された Epac と呼ばれる制御蛋白を中心にアデニル酸シクラーゼシグナルとの連関を検討した。本申請は、心機能の最大の制御メカニズムである自律神経調節の分子メカニズムの解明であり、交感神経刺激は心機能の最大の調節因子であることは数十年にわたって認識されてきたが、本研究によって、その分子メカニズムが cAMP によるシグナルネットワークの制御として解明される可能性がある。

申請者は現代的アデニル酸シクラーゼ研究に、90年代のクローニングから参加した唯一の日本人である。90年代後半までに酵素サブタイプのクローニングが終結し、2000年には各サブタイプの生化学的性状が明らかにされていった。各サブタイプは cAMP 産生という共通した性質を持つが、組織分布、発育過程での発現、PKC や G $\cdot\cdot$  などによる調節において著明な多様性を示すことがわかった。この多様性はわずか3種の $\cdot$ 受容体サブタイプと対比をなす。2000年以降は各種過大発現モデルやノックアウト動物を用いた実験結果が報告され、各サブタイプにおける固有の役割が次々と明らかにされた。とりわけUCSDのHammondのグループにより、胎児型心臓サブタイプ(6型)の遺伝子操作が心不全治療として有効であることが、一連の動物モデルやアデノウイルスを用いた心臓への注入実験によって証明され注目を集めている。5型ノックアウトモデルは我々のグループから報告され、5型サブタイプの欠損ないし抑制は心機能を低下させず、ストレスに対する心機能保護に有効であり、心不全の発生を抑制する結果が得られている。

cAMP の主要な標的酵素は過去30年間にわたってPKAのみと信じられてきたが、近年になってPKAと独立して直接活性化されるGTP交換調節因子(Epac)が発見され、大きな話題となっている。Epacには2つのサブタイプ(Epac1およびEpac2)が同定されており、今までPKAでは説明困難であったcAMPシグナルのかなりの部分がEpacによるものである可能性が高い。我々は培養細胞において、同じcAMPの下流にありながらPKAとEpacの果たす役割は大きく異なること、さらに個体レベルでの調節も異なることを発表してきた。この両サブタイプに対して心臓特異的過大発現マウスおよび欠損マウスを作製する

ことをおこない、後述の如く、それらの心機能変化、および各種ストレスに対する反応性を世界に先駆けて検討し、サイトカインシグナルとのクロストークなど、cAMPシグナルのまったく新しい概念が生もうとしている。

## 2. 研究の目的

近年アデニル酸シクラーゼによるcAMPシグナルの下流に、これまでのプロテインキナーゼA(PKA)に加えて、EpacとよばれるG蛋白制御因子が存在することがわかった。Epacに関する論文報告はここ数年で爆発的に増加しており、これまでPKAによると考えられていた制御メカニズムの多くが、実はEpacを介する可能性があるが、動物レベルでは未検討であった。我々は、Epacの心血管系における細胞機能に果たす役割を報告するとともに(*J. Biol. Chem.*, 2008; *Am. J. Physiol.*, 2007; *Am. J. Physiol.*, 2008)、世界に先駆けてEpacに関する遺伝子操作動物を開発した。この遺伝子操作モデルを用いて本分子の役割を検討することが目的である。

## 3. 研究の方法

我々の研究室では理化学研究所の協力を得て、Epacの各サブタイプを欠損ないし心臓特異的に過大発現する遺伝子操作動物を完成した。本申請ではこれらのモデル動物を用いて、基底状態およびカテコラミンなどの負荷状態によって、心機能がどのように変化するか、さらに心筋細胞内のシグナル系がどのように変化するかを検討した。

## 4. 研究成果

Epacの過大発現によって、心機能(定常およびカテコラミン刺激状態)に有意な変化はないが、欠損によって定常状態における心機能低下と細胞死の亢進が見られた。過去の報告ではPKAの過大発現は心機能亢進を起こす。このことは、定常生理状態での心機能調節に果たすEpacの役割はPKAとは異なることを意味する。

Epac過大発現マウスの6ヶ月齢で中程度の心肥大が見られた。これは近年フランスのグループが報告した培養心筋細胞を用いた実験結果と類似する。Epacは下流のRapに代表されるG蛋白質の活性調節を行うが、PLCやPKCなどの酵素活性調節や、Akt, ERKなどのキナーゼ活性調節にも関与すると考えられる。

我々は心筋細胞におけるEpacの活性化がどのような下流分子の活性化を起こすのかを検討したところ、Epacはサイトカインと神

経内分泌因子のクロストークとなる可能性を見出した。TNF などのサイトカインの亢進が心不全時の心機能低下の一因であり、敗血症性ショックでは末梢抵抗が低下するにもかかわらず心機能低下を引き起こす。心機能が低下すれば、交感神経が活性化してカテコラミン分泌が亢進するが、カテコラミンがサイトカインにどのように関連するかは不明であった。

野生型のエンドトキシンショックのマウスモデルでは、著名な心機能低下が見られたが、Epac を過大発現させたマウスではこの低下が見られないか、極めて小さい。我々は Epac が SOCS 系の制御を通じてこの系のコントロールを行っていることを証明し、さらに我々の実験結果から、Epac が共役の中心となる事実が示された。

#### 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 10 件)

① Kurotani R, Okumura S, Matsubara T, Yokoyama U, Buckley JR, Tomita T, Kezuka K, Nagano T, Esposito D, Taylor TE, Gillette WK, Ishikawa Y, Abe H, Ward JM, and Kimura S: Secretoglobin 3A2 suppresses pulmonary fibrosis by TGFbeta signaling down-regulation.

J. Biol. Chem., 286(22): 19682-19692, 2011 (査読有)

② Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, Bai Y, Kurotani R, Yokoyama U, Okumura S, Cismowski MJ, Lanier SM, and Ishikawa Y: Identification of transcription factor E3(TFE3) as areceptor-independent activator of G  $\alpha$  16: Gene regulation by nuclear G  $\alpha$  subunit and its activator. J Biol Chem, 286(20): 17766-17776, 2011 (査読有)

③ Fujita T, Ishikawa Y: Apoptosis in heart failure.-The role of the beta-adrenergic receptor-mediated signaling pathway and p53-mediated signaling pathway in the

apoptosis of cardio-myocytes. Circ J, 75: 1811-1818, 2011 (査読有)

④ Sato M, Yokoyama U, Fujita T, Okumura S, and Ishikawa Y: The roles of cytochrome P450 in ischemic heart disease. Curr Drug Metab. 12(6): 526-32, 2011 (査読有)

⑤ Sato M, Ishikawa Y: Accesory proteins for heterotrimeric G protein: Implication in the cardiovascularsystem. Pathophysiology. 17, 89-99, 2010 (査読有)

⑥ Yokoyama U, Minamisawa S, Katayama A, Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, Iwasaki S, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Yokota S, Hammond HK, and Ishikawa Y: Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. Circ. Res. 106, 1882-1892, 2010 (査読有)

⑦ Suzuki S, Yokoyama U, Abe T, Kiyonari H, Yamashita N, Kato Y, Kurotani R, Sato M, Okumura S, and Ishikawa Y: Differential roles of Epac in regulating cell death in

neuronal and myocardial cells. J. Biol Chem, 285, 24248-24259, 2010 (査読有)

⑧ Guellich A, Vatner DE, Gao S, Hong C, Yan L, Wagner TE, Dhar S, Ghalech B, Hittinger L, Iwatsubo K, Ishikawa Y, and Vatner SF: Effect of cardiac overexpression of type 6 adenylyl cyclase affectson the response to chronic pressure overload. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 299, H707-712, 2010 (査読有)

⑨ Baljinnyam E, Iwatsubo K, Kurotani R, Wang X, Ulucan C, Iwatsubo M, Lagunoff D, and Ishikawa Y: Epac Increases Melanoma cell migration by Heparan Sulfate-Related Mechanism. Am. J. Physiol.

Cell Physiol. 297, C802-813, 2009(査読有)  
⑩ Sato M, Jiao Q, Honda T, Kurotani R, Toyota E, Okumura S, Takeya T, Minamisawa S, Lanier SM, and Ishikawa Y: Activator of G protein signaling 8 (AGS8) is required for hypoxia-induced apoptosis of cardio-myocytes: role of G betagamma and connexin 43(CX43). J. Biol. Chem. 284, 31431-31440, 2009 (査読有)

〔学会発表〕(計14件)

① 奥村 敏, 川又史佳, 金慧玲, 蔡文倩, 金美花, 日高祐子, 吹田憲治, 岩坪耕策, 石川義弘: 心臓型アデニル酸シクラーゼ選択的抑制薬を用いた新しい心不全治療. 第6回高血圧と冠動脈疾患研究会, 大手町サンケイプラザ (東京都), 2011, 12. 23 (奨励賞受賞)

② Okumura S, Jin M, Kawamata F, Jin H-L, Cai W, Bai Y, Suita K, Hidaka Y, Tsunematsu T, Ishikawa Y: Epac activation protects heart from interleukin-6-induced cardiac dysfunction by inhibiting STAT/iNOS signaling. The 85<sup>th</sup> American Heart Association, Orlando, USA, 2011. 11. 12-11. 16

③ Sato M, Hiraoka M, Yamane Y, Feng X, Ishikawa Y: Cardiac protection from hypoxic injury by a novel synthetic peptide targeting the activator of G-protein signaling 8-mediated  $G\beta\gamma$  signal. The 85<sup>th</sup> American Heart Association, Orlando, USA, 2011, 11. 12-11. 16

④ Kato Y, Yokoyama U, Okumura S, Minamisawa S, Sata M, Miyajima E, Ishikawa Y: Epac1 Deficiency Inhibit Neointima Formation after Vascular Injury *in vivo*. The 85<sup>th</sup> American Heart Association, Orlando, USA, 2011. 11. 12-11. 16

⑤ 加藤優子, 横山詩子, 奥村敏, 南沢享,

佐田政隆, 宮島栄治, 石川義弘: Epac1は細胞極性を促進し内膜肥厚形成に関与する. The 2<sup>nd</sup> Molecular Cardiovascular Conference II. キロロ ホテルピアノ (北海道), 2011, 9. 2-9. 4

⑥ 加藤 優子, 横山 詩子, 奥村 敏, 南沢 享, 佐田 政隆, 宮島 栄治, 石川 義弘: Epac1は血管障害時の内膜肥厚形成を促進する. 第53回日本平滑筋学会, ゆうぼうと (東京都), 2011, 8. 3-8. 4

⑦ Okumura S, Cai W, Jin M, Bai Y, Tsunematsu T, Hidaka Y, Kurotani R, Ishikawa Y: Disruption of Epac1 Protects Heart from Catecholamine-mediated Cardiac Fibrosis. 第75回日本循環器学会学術集会, パシフィコ横浜 (神奈川県), 2011, 8. 3-8. 4

⑧ Yoshihiro Ishikawa: Targeting Adenyl cyclase Isoforms in Treating Heart Failure. 2010 2<sup>nd</sup> International Congress of Cardiology, Shanghai Heart Failure, Left Ventricular Dysfunction and Preserved Ejection Fraction (招待講演), Shanghai, China, 2010. 12. 7-12. 9

⑨ Yoshihiro Ishikawa: Magnetic anti-cancer drug for hyperthermal and chemotherapy.

The 8<sup>th</sup> International Drug Discovery Science and Technology oncology and Drug Discovery. (招待講演) Beijing, China, 2010. 10. 23-10. 26

⑩ 石川義弘: 心不全と交感神経の分子メカニズム, 第33回日本高血圧学会 (招待講演) 福岡国際会議場 (福岡県), 2010. 10. 15-10. 17

⑪ Minamisawa S, Yokoyama U, Akaike T, Hammond K, Ishikawa Y: Counteracting regulation of vascular remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cy

clases in the ductus arteriosus. The 16<sup>t</sup>  
<sup>h</sup> International Vascular Biology Meeting.  
Los Angeles, USA, 2010. 6. 20-6. 24

⑫ Jin MH, Okumura S, Cai W, Hidaka Y, Ishikawa Y: Disruption of Epacl genes preserves cardiac function against pressure overload and chronic catecholamine stress. The 87<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. いわて県民情報交流センター (岩手県), 2010. 5. 19-5. 21  
⑬ Okumura S, Jin M, Bai Y, Suzuki S, Xuan X, Cai W, Hidaka Y, Kurotani R, Yokoyama U, Ishikawa Y: Epacl Protects Heart From Lipopolysaccharide-induced Cardiac Dysfunction By Inhibiting The Toll-like Receptor4 Signaling Pathway. American Heart Association Scientific Sessions, Orlando, USA, 2009. 11. 14-11. 18

⑭ Katayama A, Yokoyama U, Tang T, Akaikiet, Hammond HK, Minamisawa S, Ishikawa Y: Adenylyl Cyclase Type2 and 6 Differentially Promote Vascular Tone and Remodeling in Ductus Arteriosus. 36th International Congress of Physiological Sciences, 京都国際会議場 (京都府)、2009. 7. 27-8. 1

[図書] (計1件)

① 総監訳 泉井亮, 監訳 河南洋, 久保川学, 訳 青木史暁, 赤池紀生, 石川義弘, 石山延吉, 上田陽一, 上野伸哉, 大野忠雄, 河原克雅, 河南洋, 北村竜一, 久保川学, 桑木共之, 小島至, 佐々木和彦, 高瀬堅吉, 槌田成紀, 照井直人, 中村晃, 花森隆充, 福田康一郎, 藤原広明, 船橋利也, 山崎将生, 山田聡子, 山本頼綱, 泉井亮: ボロン・ブルーペーパー 生理学 2005. 西村書店, 14-24 章, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計4件)

① 名称: アデニル酸シクラーゼの活性調整剤  
発明者: 石川義弘、奥村敏、星野雄二郎、井上誠一  
権利者: 横浜市立大学・横浜国立大学  
種類: 国内特許

番号: 特願 2010-240301  
出願年月日: 2010年10月27日  
国内外の別: 国内

② 名称: アデニル酸シクラーゼの活性調節剤  
発明者: 石川義弘、奥村敏、星野雄二郎、井上誠一  
権利者: 横浜市立大学・横浜国立大学  
種類: PCT 国際出願  
番号: PCT/JP2011/74098  
出願年月日: 2011年10月20日  
国内外の別: 国外

③ 名称: ビダラビンによる心房細動治療  
発明者: 石川義弘、奥村敏、吹田憲治  
権利者: 横浜市立大学  
種類: PCT 国際出願  
番号: PCT/JP2012/069540  
出願年月日: 2011年10月7日  
国内外の別: 国外

④ 名称: ビダラビンによる心房細動治療  
発明者: 石川義弘、奥村敏、吹田憲治  
権利者: 横浜市立大学  
種類: 国内特許  
番号: 特願 2011-222421  
出願年月日: 2011年10月7日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 義弘 (ISHIKAWA YOSHIHIRO)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 40305470

(2) 研究分担者

佐藤 元彦 (SATO MOTOHIKO)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40292122

(3) 連携研究者

奥村 敏 (OKUMURA SATOSHI)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号: 60233475