

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 5 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590929

研究課題名（和文） 非アポトーシス性心筋細胞死制御機構の解明

研究課題名（英文） The mechanism of non-apoptotic cardiomyocyte cell death

研究代表者

西田 和彦（NISHIDA KAZUHIKO）

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：90362681

研究成果の概要（和文）：

ネクロシス性細胞死はシクロフィリン D (CypD) 依存性ミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT) を介している。本研究では、アポトーシスとネクロシスとのシグナルクロストークが存在するとの仮説に基づき、それらの心筋細胞死ならびに心不全への細胞内情報伝達機構を、アポトーシス性細胞死に重要な役割を果たす apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) と CypD に注目して検討した。両者間に分子間結合を認め、CypD 依存性 MPT 誘導機構に ASK1 が関与し、両者のクロストークが心不全進展へ関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Necrotic cell death is mediated through the mitochondrial permeability transition (MPT) dependent on cyclophilin D (CypD). The aim in this study is to clarify the intracellular signalling mechanism of the cardiomyocyte cell death and progression of heart failure on the hypothesis that the signal crosstalk between apoptotic and necrotic pathways exists. We took note of CypD and apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). ASK1 can bind to CypD. ASK1 is related to the CypD mediated through the MPT. The crosstalk between ASK1 and CypD may be involved in progression of heart failure.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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

現在、慢性心不全の生命予後は5年生存率50%以下と他の慢性疾患と比しても極めて悪く、主要先進国において最も頻度の高い死因の1つである。慢性心不全症例に対する治療は現在のところ薬物治療が主であるが、重症例は治療抵抗性が高い。これは心不全発症機構が究明されておらず、根本的治療法が確立されていないことに起因する。

心筋細胞死にはアポトーシス、ネクローシス、オートファジー性細胞死が含まれる。アポトーシスの分子機構が広く研究されている一方で、ネクローシス性細胞死は単なる受動的細胞死と捉えられ、その分子制御機構は長らく不明であった。しかし我々は虚血再灌流障害における非アポトーシス性心筋細胞死の分子機構としてシクロフィリンD (cyclophilin D, CypD) が必須分子であることをCypDノックアウトマウスを用いて示してきた。ネクローシス性心筋細胞死は、CypD依存性ミトコンドリア膜透過性遷移(MPT)がその本態と考えられた。また、Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1)はアポトーシス性細胞死だけでなく、ネクローシス性細胞死に関与していることをASK1ノックアウトマウスを用いて示してきた。しかしながら、これまでにネクローシス性心筋細胞死が心不全発症進展に影響を及ぼしていること、その分子機構を明確に証明した研究は殆ど無かった。

2. 研究の目的

本研究は心不全進展に寄与している心筋細胞死の中でも、未だその分子機構が未解明な非アポトーシス性心筋細胞死(ネクローシス)に焦点を当て、アポトーシス性刺激とネクローシスとのシグナルクロストークが存在するとの仮説に基づき、ネクローシス性心

筋細胞死の細胞内情報伝達機構の解明と心不全進展への関与を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、アポトーシスとネクローシスとのシグナルクロストークが存在するとの仮説に基づき、それらの心筋細胞死ならびに心不全への細胞内情報伝達機構を、アポトーシス性細胞死に重要な役割を果たすASK1とCypDに注目して検討した。

(1) 心不全発症におけるCypDの役割についての検討

CypDノックアウトマウスを用いて、圧負荷による心不全モデルを作製し、CypD依存性非アポトーシス性心筋細胞死の心不全発症への関与について明らかにする。心臓超音波法にて観察し心不全発症の有無を評価する。血行動態測定、心重量測定などの生理学的評価を行う。

(2) CypDとASK1の分子間相互作用についての検討

CypDとASK1の分子間相互作用を免疫沈降法にて検討する。今後その相互作用が活性酸素種によるASK1活性化に影響されるか否かを検討する。また種々のASK1変異体を作製しその分子間相互作用を検討する。

(3) マウス心筋細胞におけるASK1依存性非アポトーシス性心筋細胞死の検討

まず野生型、CypDノックアウト、ASK1ノックアウト成獣マウスから心筋細胞を単離培養し、活性酸素種によるMPT誘導を検討する。CypDノックアウト成獣マウスの心筋細胞

に恒常活性体 ASK1 を感染させ、同様の検討を行う。非アポトーシス性細胞死はミトコンドリア膜電位の喪失ならびに核形態により評価する。ミトコンドリア膜電位はMPT依存性の蛍光色素である TMRE を用いた。また核形態は Hoechst33258 を用いて染色を行い評価する。

(4) ASK1 恒常活性体発現による心不全分子機構の検討

薬剤誘導性に ASK1 恒常活性体を心筋特異的に発現する遺伝子改変マウスを既に作成済みである。このマウスはタモキシフェン投与により約2週間で心不全に陥ることを見出しているが、その心不全誘導機構は未だ不明である。この遺伝子改変マウスを CypD ノックアウトマウスと交配し、CypD 依存性心筋細胞死が活性型 ASK1 依存性心不全の原因であるか否かを検討する。作製後、タモキシフェンを投与し、経時的に心臓超音波法で観察検討することで、心不全発症が CypD 依存性であるか否かを検証する。

(5) CypD 依存性 MPT 分子機構の検討

CypD 依存性 MPT 誘導機構に ASK1 が直接的には関与していない可能性も否定できない。そこで CypD をベイトとして yeast two-hybrid 法により CypD 結合タンパク質の検索を行う。

(6) 心筋細胞死に関わるその他の分子機構の検討

心筋細胞に対する IKK beta/NF-kappaB 経路、MTK1 活性化やカルパインの役割、オートファジーと加齢ならびに心不全との関連性

などを検討する。

4. 研究成果

(1) 心不全発症における CypD の役割についての検討

CypD ノックアウトマウスを用いて、圧負荷による心不全モデルを作製した。心臓超音波法等により、圧負荷にて CypD ノックアウトマウスでは野生型に比して心不全が抑制されることを見出した。

(2) CypD と ASK1 の分子間相互作用についての検討

免疫沈降法にて CypD と ASK1 との分子間結合を認め、その結合は過酸化水素負荷依存性に結合が増強された。また、CypD と ASK1 ドミナントネガティブ体との間では、分子間結合を認めなかったことから、活性型 ASK1 が CypD と結合すると考えられた。

(3) マウス心筋細胞における ASK1 依存性非アポトーシス性心筋細胞死の検討

過酸化水素負荷（活性酸素種）による MPT 誘導を検討した。活性酸素種にて野生型成獣マウス単離培養心筋細胞では MPT 誘導を認めるものの、CypD ノックアウトマウス心筋細胞、ASK1 ノックアウトマウス心筋細胞では、MPT 誘導を認めなかった。しかしながら、CypD KO マウス心筋細胞にアデノウイルスにて恒常活性体 ASK1 を過剰発現させると MPT が誘導されたことから、CypD 依存性 MPT 誘導機構に ASK1 が関与する可能性が示唆された。

(4) ASK1 恒常活性体発現による心不全分子機構の検討

In vivo では、圧負荷にて CypD ノックアウトマウスでは野生型に比して心不全が抑制

される。薬剤誘導性に ASK1 恒常活性体を心筋特異的に過剰発現させると約 2 週間で心不全に陥るが、この薬剤誘導 ASK1 恒常活性体過剰発現遺伝マウスと CypD ノックアウトマウスを交配させ、CypD がノックアウトされた状態で、薬剤誘導性に ASK1 恒常活性体を心筋特異的に過剰発現させると、心臓超音波法等によりその心不全発症が抑制されることを見出した。そのことから、その心不全の発症に CypD が関与していることが示唆された。

(5) CypD 依存性 MPT 分子機構の検討

CypD をベイトとして新規 CypD 結合タンパク質検索を試みた。

(6) 心筋細胞死に関わるその他の分子機構の検討

また、IKK beta/NF-kappaB 経路は圧負荷に対して心筋細胞保護に関わること、MTK1 の活性化はアポトーシス、心不全を誘導すること、心筋特異的オートファジーが抑制された Atg5 ノックアウトマウスでは加齢とともに心機能が低下し心不全に至ったことから、オートファジーは細胞死ではなく、細胞機能保持に関わること、心筋特異的カルパイン 4 ノックアウトマウスを用いて、カルパインは心筋保護的に働き、膜の修復に重要な役割を果たすことを明らかにした。

以上、CypD と ASK1 間に分子間結合を認め、CypD 依存性 MPT 誘導機構に ASK1 が関与し、両者のクロストークが心不全進展へ関与する可能性が示唆された。

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 4 件)

- ① Taneike M, Mizote I, Morita T, Watanabe T, Hikoso S, Yamaguchi O, Takeda T, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Nishida K, Takeda J, Mochizuki N, Komuro I, Otsu K. Calpain protects the heart from hemodynamic stress. *J Biol Chem*. 査読 : 有 286:32170-32177, 2011.
- ② Taneike M, Yamaguchi O, Nakai A, Hikoso S, Takeda T, Mizote I, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nishida K, Shimizu T, Hori M, Komuro I, Shirasawa T, Mizushima N, Otsu K. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy*. 査読 : 有 6:600-606, 2010.
- ③ Mizote I, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, Taneike M, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Matsumura Y, Nishida K, Komuro I, Hori M, Otsu K. Activation of MTK1/MEKK4 induces cardiomyocyte death and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 査読 : 有 48:283-285, 2010.
- ④ Hikoso S, Yamaguchi O, Nakano Y, Takeda T, Omiya S, Mizote I, Taneike M, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Uno Y, Matsumura Y, Nishida K, Suzuki K, Kogo M, Hori M, Otsu K. The IkappaB kinase beta/nuclear

factor kappaB signaling pathway protects the heart from hemodynamic stress mediated by the regulation of manganese superoxide dismutase expression.

Circ Res. 査読：有 105:70-79, 2009.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 和彦 (NISHIDA KAZUHIKO)
大阪大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：90362681

(2) 研究分担者

山口 修 (YAMAGUCHI OSAMU)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90467580