

## 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 4 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790697

研究課題名（和文）タンパク質品質管理機構の心不全病態形成への関与

研究課題名（英文）Role of Protein Quality Control in Cardiac Remodeling

研究代表者

薄井 莊一郎 (USUI SOICHIRO)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：50507043

研究成果の概要（和文）：

心不全発症進展には心筋の肥大や細胞死（アポトーシス）といった心臓リモデリングの制御が深くかかわっている。今回我々は、骨格筋のサイズを制御する筋特異的ユビキチン連結酵素 MAFbx の心臓リモデリングにおける役割の検討を行った。圧負荷モデル（大動脈縮窄モデル、イソプロテレノール持続投与）により誘導される心肥大および心機能低下は、MAFbx 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較して抑制されていた。種々の検討から MAFbx 遺伝子欠損マウスでのリモデリング抑制効果に NF- $\kappa$ B 経路の抑制が関与していることが明らかになった。MAFbx を制御することは病的な心筋肥大を減じることにより、心不全への進展を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Under condition of increased hemodynamic load, cardiomyocytes undergo hypertrophy to adapt to increased work load and reduce wall stress. But, the prolonged existence of cardiac hypertrophy is an independent risk factor for cardiac morbidity and mortality. Here, we investigated the role of muscle atrophy F-box (MAFbx/atrogen-1), an E3 ubiquitin ligase, in regulating cardiac hypertrophy and function in response to pressure overload. Transverse aortic constriction (TAC)- and  $\beta$ -adrenergic-induced increases in cardiac hypertrophy and lung congestion were significantly smaller in MAFbx knockout (KO) than in wild-type (WT) mice. Downregulation of MAFbx inhibits cardiac hypertrophy in part through stabilization of I $\kappa$ B and inactivation of nuclear factor- $\kappa$ B. Inhibition of MAFbx attenuates pathological hypertrophy, thereby protecting the heart from progression into heart failure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：循環器内科

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：心不全、心肥大、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

| 本邦で心血管疾患による死亡率が、悪性新生

物（癌）、脳血管障害とならぶ3大死因となつて久しい。生活習慣の欧米化により高血圧、脂質代謝異常、耐糖能障害などのメタボリックシンドロームの罹患数が増加し、それとともに心血管疾患の発症は増加の一途をたどっている。心血管疾患の死亡の6割が急性心筋梗塞に代表される虚血性心疾患に関連している。近年、急性心筋梗塞に対する積極的な再灌流療法により、急性期の死亡は減少してきているが、その死亡者数は、罹患率の増加も伴い依然として多く、介入すべき問題点が残されている。心不全は、急性心筋梗塞・高血圧性心機能障害・糖尿病性心筋障害、さらには弁膜症や心筋症など種々の心疾患の終末像であり、5年生存率は50%と予後不良の症候群である。心血管系の生命予後とQOLを改善するため心不全の発症、増悪をコントロールすることが求められている。心不全の発症、増悪のメカニズムにおいて心筋細胞肥大、アポトーシスといった心臓リモデリングを制御することが重要である。心血管系イベントの独立した危険因子である、心肥大の形成メカニズムを明らかにすることは心不全発症抑制に続くとの仮説のもと多くの研究がなされているがその制御ははまだ解明されていない。血行動態負荷の増加と持続は細胞内情報伝達に変換され、核では新しいタンパク質の形成が開始され、細胞骨格異常、代謝形態の変化を引き起こす。心筋細胞は、神経細胞と同様に終末分化細胞で一度失われるとその自己再生能力の極めて低い細胞であり、細胞レベルでの障害が組織の機能低下をまねく。拍動し続ける心筋細胞は、時々刻々と変化し続ける循環動態にさらされており、交感神経活動や酸化ストレス、機械的ストレスなどに適応し細胞内の恒常性を保つことは必要である。恒常性という視点から細胞内のタンパク質の品質を管理していくことは重要なことである。小胞体ストレス、ユビキチンプロテアソーム、オートファジーといったタンパク質品質管理機構の破綻が糖尿病や神経変性疾患などの病態形成に主要な役割を担っていることが数多く報告されている。心臓では、肥大心・心不全心にてプロテアソームサブユニットの発現亢進およびプロテアソーム活性の増強を認め、プロテアソーム阻害薬の投与により圧負荷による心肥大が抑制される。これらの知見は心臓においても、ユビキチンプロテアソームシステムが病態形成に重要な役割を担っていることを示唆する。ユビキチン連結酵素は選択的タンパク質分解系であるユビキチンプロテアソームシステムの中で、律速酵素で、広範な分子多様性を決定する重要な役割を持っている。近年、筋特異的ユビキチン連結酵素 **MAFbx** が、さまざまな環境やストレスによりおこる骨格筋萎縮を制御することが明

らかになった。さらに心筋にも **MAFbx** は発現しており、内因性の **MAFbx** が運動により誘導される生理的肥大に関与することが報告された。心臓リモデリング、心不全病態形成での筋特異的ユビキチン連結酵素 **MAFbx** の機能を解明し、最終的にはその阻害が心不全治療の新たな介入点となる可能性があると考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

筋特異的ユビキチン連結酵素 **MAFbx** 遺伝子欠損マウスをユビキチンプロテアソームシステムの破綻モデルとし、圧負荷により生じる心筋肥大、細胞死の誘導、心臓リモデリングにタンパク質品質管理機構の障害が関連し、総じて心不全病態形成を制御するという仮説を検討する。

## 3. 研究の方法

### 心不全モデルの作成

対象はマウス **MAFbx** 遺伝子欠損マウスとその同腹のワイルドタイプマウス（12から16週令）。筋特異的ユビキチン連結酵素 **MAFbx** の Exon1-5 を LacZ に置換し作成した **MAFbx** 遺伝子欠損マウスを使用。心不全モデルとして、圧負荷誘導性の心不全を作成し検討した。横行胸部大動脈を結紮し、圧負荷誘導性の心不全モデルを作成。圧負荷が作成されていることを確認するため、上行大動脈圧と腹部大動脈圧を測定し圧較差を評価した。また、薬物学的圧負荷モデルとして、イソプロテロール持続投与モデルを用いた。

### 心機能の評価

術前および4週後の心機能につき現有する心臓超音波装置（電子セクター12-17MHz）をもちい、左室拡張末期径、収縮末期径および、左室短絡率などを比較した。心エコー施行者は、マウスのエコーに精通した者とし、blind label 法で行った。

### 心臓リモデリングの評価

手術後4週目に心臓を摘出し、ホルマリン固定しパラフィンに包埋した。線維化をマツソントリクローム染色、アポトーシスを Tunel 染色で評価し、心臓リモデリングを組織学的に評価した。

また、摘出心の RNA を抽出し心臓リモデリング時に発現が亢進するといわれている胎児型遺伝子の発現を確認した。

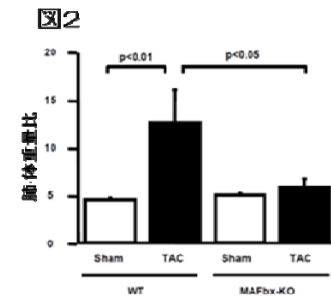
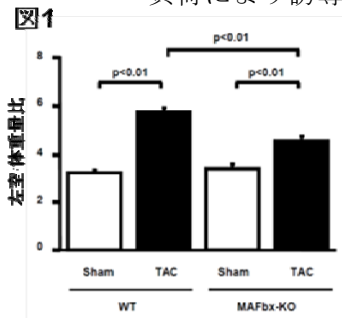
### 心不全モデルにおける遺伝子解析

**MAFbx** のターゲットを同定するためにマイクロアレイを用いて心筋遺伝子発現を網羅的に解析し心臓リモデリングにおける遺伝子発現プロファイルでワイルドタイプ群と **MAFbx** 遺伝子欠損マウス群で異なるか否かを確認した。具体的には、大動脈結紮後1週目で左心室を摘出し、mRNA を抽出しマイクロアレイにかけ検討した。

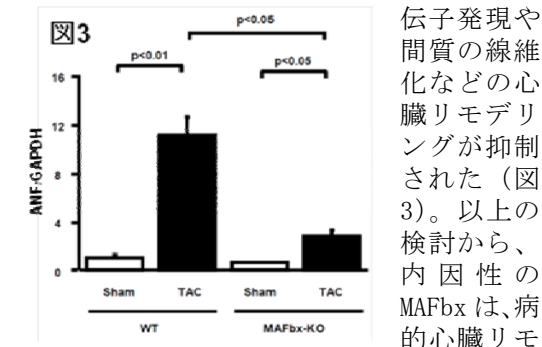
#### 4. 研究成果

1 2 週令の MAFbx 遺伝子欠損マウス (MAFbxKO) を用い、大動脈弓を縮禁し圧負荷モデルを作成し、心筋重量、各種 mRNA や蛋白発現、免疫染色を検討した。

WT マウスの圧負荷モデルでは、圧負荷 1 週間後に MAFbx の発現の増加がみられ、2 週間にはさらに増加した。圧負荷モデルによる左室-大動脈間圧較差は、WT と MAFbxKO マウスで差は認められなかった。しかしながら、圧負荷により誘導される心臓重量



は WT に比べて MAFbxKO マウスでは有意に抑制されていた (図 1)。β-adrenergic 刺激であるイソプロテレノール投与による心筋肥大効果も MAFbxKO マウスでは有意に抑制されていた。さらに、4 週間の大動脈縮禁により WT では肺重量

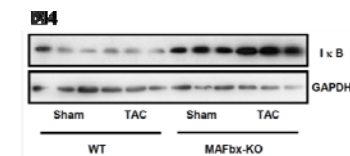


の増加、肺うっ血が認められたが、MAFbx KO マウスでは抑制されていた (図 2)。心臓超音波検査では、圧負荷により誘導された左室短縮率の低下は MAFbxKO では改善した。MAFbxKO マウスでは、圧負荷により誘導される胎児遺伝子発現や間質の線維化などの心臓リモデリングが抑制された (図 3)。以上の検討から、内因性の MAFbx は、病的な心臓リモデリングに対して促進的な作用を持つことが示唆された。MAFbx のターゲットを同定するために、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行った。これらの検討により、圧負荷により誘導される mRNA 発現パターンを WT と MAFbxKO マウスで比較したところ、圧負荷にて WT マウスで誘導される遺伝子群が、MAFbxKO マウスでは抑制されていた。変化のあった遺伝子群で転写因子結合部位解析を行ったところ、転写因子 NF-κB 結合配

列をプロモーター部位にもつ遺伝子群が MAFbxKO マウスで抑制されていた (表 1)。さらに、

表 1. 圧負荷に対する遺伝子発現量の検討

Gene ID	GSB	Description	Fold change	P_value
16193	IL6	interleukin 6	-2.27	4.90E-04
12051	Bcl3	B-cell leukemia/lymphoma 3	-2.08	2.90E-02
16181	Il1m	interleukin 1 receptor antagonist	-1.83	2.50E-02
12983	Cs2rb	colony stimulating factor 2 receptor, beta	-1.79	5.30E-02
21938	Tnfrsf1b	tumor necrosis factor receptor superfamily 1b	-1.77	5.30E-02
16149	CD74	CD74 antigen	-1.72	6.50E-02
12984	Cs2rb2	colony stimulating factor 2 receptor, beta 2	-1.69	2.50E-02
14201	Fh3	four and a half LIM domains 3	-1.68	1.30E-02
16796	Laspl	LIM and SH3 protein 1	-1.51	1.20E-02
59069	Tpm3	tropomyosin 3, gamma	-1.49	9.00E-02



MAFbxKO マウスでは、圧負荷による NF-κB の核移行抑制、プロテアソームを介した I-κB の分解抑制など NF-κB 経路の活性化が抑制されていた (図 4)。以上の検討から、内因性の筋特異的ユビキチン連結酵素 MAFbx は、NF-κB を介して圧負荷に伴う心臓リモデリング、心不全発症に対して促進的に作用してい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 2 件)

- Ohtani K, Usui S, and other 7: Benidipine reduces ischemia reperfusion-induced systemic oxidative stress through suppression of aldosterone production in mice. *Hypertens Res.* 2012;35:287-94. 査読あり  
DOI:10.1038/hr.2011.183
- Usui S, Maejima Y, and other 8: Endogenous muscle atrophy F-box mediates pressure overload-induced cardiac hypertrophy through regulation of nuclear factor-κB. *Circ Res.* 2011; 109: 161 - 71. 査読あり  
DOI:10.1161/CIRCRESAHA.110.238717

[学会発表] (計 1件)

1. Usui S, Kitano K, other 2: Rho-kinase Mediates Myocardial Ischemia Reperfusion Injury by Regulating Leukocyte Responses in Mice, American Heart Association 2011, 2011.11.14. Orange County Convention Cente (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

薄井 莊一郎 (USUI SOICHIRO)  
金沢大学・附属病院・助教  
研究者番号 : 50507043

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし