

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300145

研究課題名(和文) 脳内セロトニン低下を伴う拡張型心筋症モデルマウスの心不全発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Pathogenic mechanism of congestive heart failure in a mouse model of dilated cardiomyopathy with brain serotonin dysfunction

研究代表者

森本 幸生 (Morimoto, Sachio)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50202362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,200,000円、(間接経費) 2,160,000円

研究成果の概要(和文)：トリプトファン脱水酵素2遺伝子多型により脳内セロトニン合成能に差をもつ2系統の拡張型心筋症モデルマウスを使って、心不全発症における脳セロトニン機能の役割を検討した。正常な5-HT量をもつC57Bl/6系統は心不全を発症しないのに対して、セロトニン合成能が低下したBALB/c系統はすべて心不全死し、脳セロトニン機能改善薬はその心不全発症を防ぐことができた。うつ病モデルとしても用いられるBALB/c系統マウスで得られた本研究の成果は、うつ病などを引き起こす先天的あるいは後天的セロトニン機能低下が心不全発症において重要な役割を果たしていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored the role of brain serotonin function in the development of congestive heart failure (HF), using knock-in mice bearing a sarcomeric protein mutation that causes dilated cardiomyopathy (DCM) on different genetic backgrounds; BALB/c and C57Bl/6. BALB/c background mice, which have brain serotonin dysfunction due to a single nucleotide polymorphism in tryptophan hydroxylase 2, developed congestive HF before died. In contrast, C57Bl/6 background mice with normal brain serotonin function developed no overt HF symptoms and died suddenly. Brain serotonin dysfunction plays a critical role in depression and anxiety and BALB/c mice exhibit depression- and anxiety-related behaviors. Drugs that could improve the brain serotonin function improved symptoms of severe congestive HF in DCM mice on the BALB/c background. These results strongly suggest that congenital or acquired brain serotonin dysfunction may play an important role in the development of congestive HF in DCM.

研究分野：神経・筋肉生理学

科研費の分科・細目：心筋・平滑筋リモデリング

キーワード：うつ血性心不全 うつ病 不安障害 脳 セロトニン トリプトファン 遺伝的要因 拡張型心筋症

1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症(DCM)は心室拡張と収縮機能障害を特徴とし、うっ血性心不全の主な原因である。その疾患表現型は多様であり、死亡例の半数はうっ血性心不全により死亡するが、残りは明らかな心不全症状を呈する前に不整脈により予期せず死亡する。

心筋トロポニンT遺伝子のLys210欠失突然変異(DK210)はDCMの原因として世界中で頻繁に報告されている。興味深いことに、この単一遺伝子病であるDCMにおいても家族によって臨床表現型が大きく異なっている。Kamisagoらによれば、ある家族では30歳以前に軽度の心不全患者で心臓突然死が頻繁に生じているが、別の家族では20歳以前にうっ血性心不全による死亡が頻繁に生じている¹。これらの知見は、環境要因または未知の遺伝的要因がDCMの疾患表現型を修飾している可能性を示唆している。

うつ病は心不全患者でよくみられ、心不全の予後を悪化させることが知られている。うつ病患者では、脳5-HT合成の律速酵素であるトリプトファンヒドロキシラーゼ2(TPH2)の酵素活性を約80%低下させる一塩基多型(SNP)G1463Aが、コントロール群より高い頻度で同定されている(10.3% vs. 1.3%)。最近、近交系マウス系統において類似のloss-of-function SNP C1473GがマウスTPH2遺伝子にも存在することが明らかになった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、まずBALB/c遺伝的背景の心不全発症DCMノックインマウスにおける病態の詳細なキャラクター化を行い、ヒトDCMとの比較によってヒト疾患モデルとしての妥当性を検証する。BALB/cマウスはC57BL/6など他の系統のマウスに比べて明らかに不安を感じやすく社交性が低い表現型を示すことが分かっている。最近、脳内セロトニン合成に関わるトリプトファン水酸化

酵素2遺伝子(*Tph2*)に機能的多型が存在し、C57BL/6では1473Cアレル(Pro⁴⁴⁷)のホモ接合型であるのに対して、BALB/cマウスは1473G(Arg⁴⁴⁷)アレルのホモ接合型であることが明らかにされている(*Science* 305, 217, 2004)。Tph2-Arg⁴⁴⁷のセロトニン合成能はTph2-Pro⁴⁴⁷の約55%であり、そのためBALB/cマウスでは脳内セロトニンレベルがC57BL/6の半分程度しか存在せず不安障害や低社交性をもたらしている可能性が強く示唆されている。脳内セロトニンレベルの低下は人間ではうつ病にも関わっており、しばしば心不全とうつ病の正の相関が報告されている。したがって、BALB/c遺伝的背景のDCMノックインマウスでは*Tph2*遺伝子変異のため脳内セロトニンレベルが低下しているために心不全の発症が促進されている可能性がある。本研究では、この仮説を検証するため脳内セロトニンレベルを上昇させる選択的セロトニン取り込み阻害剤(SSRI)であるパロキセチンと5-HT_{1A}受容体のパーシャルアゴニストで抗不安薬としてヒトで用いられるバスピロンの経口投与がBALB/c遺伝的背景のDCMノックインマウスの心不全病態進行を抑えることができるかどうかを検討する。また、脳内セロトニンが圧受容器反射を調節している可能性が報告されているが、最近の我々の研究はC57BL/6遺伝的背景のDCMノックインマウスにおいて心臓に対する遠心性迷走神経アウトフローの低下が病態形成を促進していることを示している(Zhan *et al. Cardiovasc Res* 84:64-71, 2009)。したがって、BALB/c遺伝的背景のDCMノックインマウスの心不全発症に脳内セロトニンによる圧受容器反射調節のメカニズムの破綻が関与している可能性がある。本研究では、この仮説を検証するためパロキセチン、バスピロン長期経口投与の前後における心臓アセチルコリンレベルとノルアドレナリンレベルをマイクロダイアリシス法によって測定する

ことを試みるとともに心電図 RR 間隔の変動の測定によって心臓に対する遠心性迷走神経アウトフローレベルの間接的な評価を行う。このようにして、DCM における心不全発症における脳内セロトニンと圧受容器反射を介した自律神経活性調節の役割を明らかにする。

(2)本研究では、同時に心肥大の心筋細胞内シグナリングにも注目する。最近の我々の研究では C57BL/6 遺伝的背景の DCM ノックインマウスにおいて自律神経活性の変化が心筋細胞特異的な 2 型ヨードチロニン脱ヨウ素酵素のアップレギュレーションを引き起こし、Akt (protein kinase B) と p38MAPK を活性化することによって心肥大をもたらすことが示されている (Wang *et al. Cardiovasc Res* 87:636-646, 2010)。本研究では心肥大抑制メカニズムに関与し Akt によってその活性が抑制される GSK-3 β の活性化レベルを C57BL/6 と BALB/c 遺伝的背景の DCM ノックインマウスで比較する。さらに、上記パロキセチン、バスピロンに加えて、Akt 活性を阻害することが知られているセレコキシブとその誘導体メチルセレコキシブが GSK-3 β の活性化レベルに与える影響を調べることで心不全発症における GSK-3 β による心肥大抑制メカニズムの役割と重要性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 動物モデル

DCM を引き起こすサルコメア蛋白質の突然変異 (TNNT2 K210/ K210) を導入したノックインマウスを 2 つの異なる遺伝的背景 (C57BL/6 と BALB/c) 上に作製した。

(2) 投薬

1 か月齢から 4 週間、生理食塩水に溶かした Paroxetine と Buspirone を 1 日 1 回マウス腹腔内に投与した。

(3) 組織化学

摘出心臓を 10%ホルマリン緩衝液で固定したのち、心室中央部にて横断切片を作製し

Azan 染色した。NIH ImageJ を用いて線維化レベルを定量した。

(4) 心エコーと血圧測定

診断用超音波システムに装着した 14 MHz リニアプローブとテールカフシステムを用いて、胸部心エコー (M モード) と血圧を測定した。

(5) ウェスタンブロット

特異的抗体を用いて BNP、SERCA2a タンパク質発現量と Akt、p38MAPK リン酸化レベルを測定した。

(6) 脳 5-HT 量測定

全脳を摘出し、0.2M 過塩素酸存在下で超音波によりホモジナイズし、遠心後上清中の 5-HT 量を HPLC-ECD で定量した。

(7) 呼吸性洞性不整脈

麻酔・人工呼吸下 ECG (第 2 誘導) を測定し、呼吸サイクルあたりの RR 間隔の標準偏差 (SD-RR) を測定した。

統計学

データはすべて平均値 \pm 標準誤差で示した。統計学的有意差検定は one-way ANOVA を行った後に、bonferroni test 或は unpaired Student's *t*-test により危険率 5% で行った。

4. 研究成果

(1) C57BL/6 と BALB/c 遺伝的背景 DCM マウスにおける疾患表現型の違い

8 週齢のマウスから摘出した心臓の大きさを比較すると、wild-type マウスでは C57BL/6 マウスと BALB/c マウスのあいだで差はないが、DCM マウスでは BALB/c マウスのほうが C57BL/6 マウスより顕著な心拡大を示した。また、Azan 染色により線維化の程度を調べると、BALB/c DCM マウスは C57BL/6 DCM マウスに比べて繊維化の程度がはるかにひどいことがわかった (図 1)。

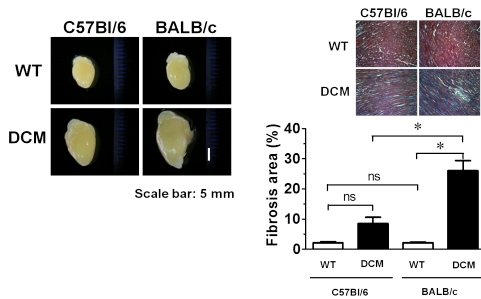


図1. DCM マウス心臓の形態および心筋線維化レベル

次に、DCM マウスにおける心不全のレベルを検討した(図2)。C57Bl/6 DCM mouse の肺重量は wild-type と有意差はなかったが、BALB/c DCM mouse の肺重量は wild-type に比べて著しく増加していた。心不全バイオマーカーである BNP の発現量レベルは C57Bl/6 DCM mouse でも増加していたが、BALB/c DCM mouse ではさらに大きく増加していた。SERCA2a は末期心不全患者において発現量が低下しているが、C57Bl/6 DCM mouse では wild-type と差がなく、BALB/c DCM mouse では著しく減少していた。

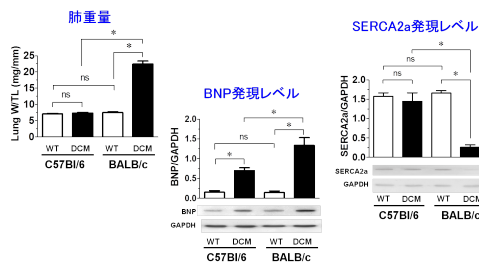


図2. BALB/c 遺伝的背景 DCM マウスにおける重症うつ血性心不全の証拠

(2) BALB/c 遺伝的背景 DCM マウスにおけるうつ血性心不全に対する抗うつ薬と抗不安薬の効果

図3に示すように、セロトニン生合成では、まずトリプトファン水酸化酵素によりトリプトファンが 5-ヒドロキシトリプトファン (5-HTP) に変換され、つぎに 5-HTP は芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素によってすばやくセロトニン (5-HT) に変換される。このセロトニン生合成反応における律速酵素である

トリプトファン水酸化酵素には TPH1 と TPH2 の 2 つのアイソフォームがあり、TPH1 は主に抹消に、TPH2 は主に脳に存在している。マウスでは TPH2 に SNP が存在することが明らかになっており、C57BL/6 マウスは wild-type allele を homozygous で持つのに対して、BALB/c マウスは loss-of-function allele を homozygous で持っていることが知られている。そのため、BALB/c マウスでは脳セロトニン量が C57BL/6 マウスに比べて有意に低下しており、芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素阻害剤であるロキシベンジルヒドラジンの腹腔内投与により増加する 5-HTP の量から推定されるセロトニン合成速度も BALB/c マウスで低下している(図4)。

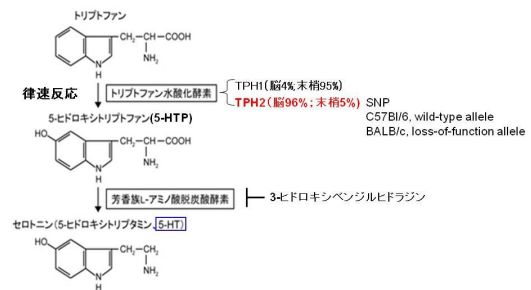


図3. セロトニン生合成

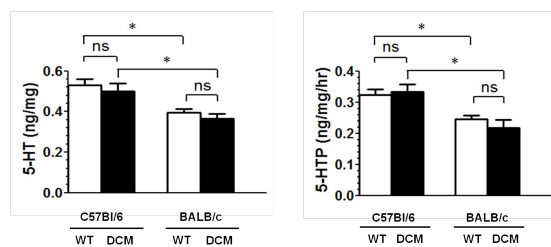


図4. DCM マウスの脳セロトニンレベルとセロトニン合成速度

このような事実と、うつ病が心不全を悪化させることから、TPH2 の loss-of-function SNP による脳セロトニン機能障害が、BALB/c 遺伝的背景 DCM マウスのうつ血性心不全の発症を促進している可能性が考えられた。そこで脳セロトニン機能を改善することが知られている選択的セロトニン再取り込み阻害

薬(SSRI) Paroxetine 5-HT_{1A}受容体アゴニスト Buspirone の治療効果を検討した。

表 1 に示すように、Paroxetine と Buspirone は、用量依存的に BALB/c DCM マウスの心重量と肺重量を低下させた。次に、遠心性迷走神経活性化レベルの指標である心電図 R-R 間隔の標準偏差 SD-R-R を検討した(図 5)。BALB/c DCM マウスでは WT マウス比べて、SD-R-R が有意に低下していたが、Paroxetine と Buspirone 投与により BALB/c DCM mouse において SD R-R は有意に回復した。一方、C57Bl/6 DCM mouse では両薬の効果は見られなかった。これらの結果は 両薬投与により、BALB/c DCM mouse の迷走神経活性が改善されたことを示している。

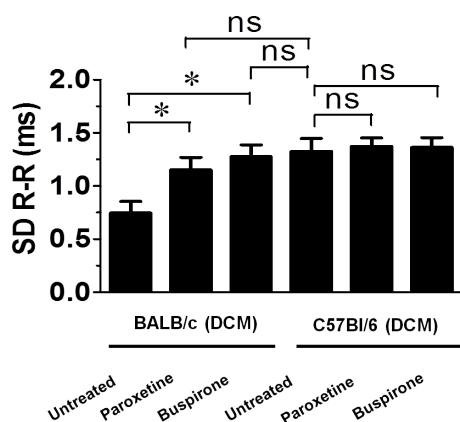


図 5 . BALB/c 遺伝的背景 DCM マウス SD R-R の Paroxetine と Buspirone による改善

心筋トロポニン T ΔK 210 突然変異は、C57Bl/6 遺伝的背景上では明らかな心不全症状を示さない代償性心不全を誘発したが、BALB/c 遺伝的背景上では重篤なうつ血性心不全症状を誘発した。この結果は、遺伝性 DCM は単一遺伝子病であると考えられているにもかかわらず遺伝的背景の違いによって疾患表現型が大きく変化するを示している。

心臓への迷走神経アウトフローの低下が心不全患者の予後の悪化に関与していることが知られている。一方、セロトニンは、延髄疑核に位置する 5-HT_{1A} 受容体を介して心臓

迷走神経節前ニューロン (CVPN) の反射活性化に重要な役割を果たしていることが示されている。本研究では、BALB/c 遺伝的背景 DCM マウスにおいて著しく低下した CVPN 活性化レベルが 5-HT_{1A} 受容体アゴニスト Buspirone によって回復することが証明された。この結果は、脳セロトニン機能の低下は、少なくとも一部は延髄疑核に位置する 5-HT_{1A} 受容体を介する CVPN の反射活性化を障害することによって心不全の発症を促進することを示唆している。

2010 年に報告されたランダム化二重盲検プラセボ比較対照試験において、SSRI であるセルトラリンはプラセボに比べ心不全とうつ病を持つ患者に対してうつ症状を軽減あるいは心血管障害を改善することができなかった。この結果は、心不全におけるうつは伝統的な抗うつ薬治療が効かないようなメカニズムによって引き起こされている可能性があることを示している。しかしながら、抗うつ薬試験によく見られる高いプラセボ効果がセルトラリンの効果を見えなくしている可能性もある。今回のプラセボ効果フリーのマウスを用いた研究は、SSRI あるいは 5-HT_{1A} 受容体アゴニストがうつ病を伴う心不全患者に対して有益な治療効果をもつ可能性を示唆している。

最後に、今回の研究ではうつ血性心不全の発症に対する TPH2 遺伝子以外の遺伝子の関与の可能性を排除することはできない。今後、TPH2 遺伝子 loss-of-function SNP を C57Bl/6 系統に導入することによって、DCM の疾患表現型の決定における TPH2 遺伝子の相対的重要性を明らかにする必要がある。

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 7 件)

Celecoxib and 2,5-dimethyl-celecoxib prevent cardiac remodeling inhibiting

Akt-mediated signal transduction in an inherited dilated cardiomyopathy mouse model. Fan X, Takahashi-Yanaga F, Morimoto S, Zhan D-Y, Igawa K, Tomooka K, Sasaguri T. *J Pharmacol Exp Ther*. **338**, 2-11 (2011)

doi:10.1124/jpet.111.179325

Role of brain serotonin dysfunction in the pathophysiology of congestive heart failure. Li L, Morimoto S, Take S, Zhan D.-Y, Du C.-K, Wang Y.-Y, Fan X.-L, Yoshihara T, Takahashi-Yanaga F, Katafuchi T, Sasaguri T. *J Mol Cell Cardiol*. **53**, 760-767 (2012)

doi:10.1016/j.yjmcc.2012.08.006

Multistep ion channel remodeling and lethal arrhythmia precede heart failure in a mouse model of inherited dilated cardiomyopathy. Suzuki T, Shioya T, Murayama T, Sugihara M, Odagiri F, Nakazato Y, Nishizawa H, Chugun A, Sakurai T, Daida H, Morimoto S, Kurebayashi N. *PLoS ONE* **7**(4), e35353 (2012)

Inherited cardiomyopathies caused by troponin mutations. Lu Q-W, Wu X-Y, Morimoto S. *J Geriatr Cardiol*. **10**, 91-101
doi.org/10.3969%2Fj.issn.1671-5411.2013.01.014

Depressed Frank-Starling mechanism in the left ventricular muscle of the knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy with troponin T deletion mutation $\Delta K210$. Inoue T, Kobirumaki-Shimozawa F, Kagemoto T, Fujii T, Terui T, Kusakari Y, Hongo K, Morimoto S, Ohtsuki I, Hashimoto K, Fukuda N. *J Mol Cell Cardiol*. **63**, 69-78 (2013)

Familial dilated cardiomyopathy mutations uncouple Troponin I phosphorylation from changes in myofibrillar Ca^{2+} -sensitivity. Memo M, Leung MC, Ward DG, Dos Remedios C, Morimoto S, Zhang L, Ravenscroft G, McNamara E, Nowak KJ, Marston SB, Messer AE. *Cardiovasc Res*. **99**, 65-73 (2013)

doi:10.1093/cvr/cvt071

Usefulness of Running Wheel for Detection of Congestive Heart Failure in Dilated Cardiomyopathy Mouse Model. Sugihara, M, Odagiri F, Suzuki T, Murayama T, Nakazato Y, Unuma K, Yoshida K, Daida H, Sakurai, T, Morimoto S, Kurebayashi N. *PLoS ONE* **8**(1), e55514 (2013)

doi:10.1371/journal.pone.0055514

[学会発表](計 4件)

拡張型心筋症モデルマウスの心不全発症における脳内セロトニンレベルの役割 (口演) 李 蕾, 森本 幸生, 戦 冬雲, 王 媛媛, 杜 成坤, 範 雪麗, 笹栗 俊之

第 84 回 日本薬理学会年会 (3/22-24 : 横浜)

C57B.1/6 と BALB/c 背景の遺伝性拡張型心筋症モデルマウス疾患表現型の比較 (口演) 李 蕾, 森本 幸生, 戦 冬雲, 杜 成坤, 王 媛媛, 範 雪麗, 吉原 達也, 高橋 富美, 笹栗 俊之

第 85 回 日本薬理学会年会 (3/14-16 : 京都)

Role of Brain Serotonin Dysfunction in the Pathophysiology of Congestive Heart Failure (poster) Li L, Nonaka M, Morimoto S

第 29 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会 (10/26-27:福岡)

うつ血性心不全の病態生理学における脳セロトニン機能障害の役割 (口演) 李 蕾, 森本 幸生, 武 幸子, 戦 冬雲, 杜 成坤, 王 媛媛, 範 雪麗, 吉原 達也, 高橋 富美, 片淵 俊彦, 笹栗 俊之

第 86 回 日本薬理学会年会 (3/21-23 : 福岡)

[図書](計 1件)

Troponin. In Encyclopedia of Biological Chemistry (Editors-in-Chief: Lennarz WJ and Lane MD, Academic Press) Ohtsuki I, Morimoto S pp.445-449 (2013)

[産業財産権]

出願状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/clipharm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 幸生 (MORIMOTO, Sachio)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号 : 50202362

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

片淵 俊彦 (KATAFUCHI, Toshihiko)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号 : 80177401

武 幸子 (TAKE, Sachiko)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号 : 80253425

呉林 なごみ (KUREBAYASHI, Nagomi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号 : 50133335