

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300152

研究課題名(和文) 周産期心筋症モデルマウスの確立と発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on the pathogenesis of peripertum cardiomyopathy using genetically modified mouse model

研究代表者

石田 純治 (Ishida, Junji)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号：30323257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,800,000円、(間接経費) 4,740,000円

研究成果の概要(和文)：心臓特異的 APJ 過剰発現 (MHC-APJ) マウスは、授乳を行った母体において、心機能の低下、心拡大、心臓線維化、心不全マーカー遺伝子の発現亢進などが認められた。妊娠中、または、授乳を行わなかったマウスにおいては、これらの病態は認められず、病態発症には授乳が必須であることが判明した。また、授乳群・非授乳群の、心臓を用いた網羅的遺伝子発現解析の結果、授乳をしている MHC-APJ マウス(病態進展期)においてのみ変化する遺伝子、すなわち、病態進展への関与が考えられる遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established an animal model for "peripertum cardiomyopathy" (MHC-APJ) by cardiomyocyte-specific overexpression of APJ, a member of G-protein coupled receptor superfamily and expressing mainly in cardiovascular system. The lactating MHC-APJ mother exhibited reduced cardiac function, enlargement of the heart, cardiac fibrosis, and enhanced mRNA expression of the marker genes of heart failure. We found that "lactation" is essential for the pathogenesis of above phenotypes in MHC-APJ because those were not observed in non-pregnant or non-lactating MHC-APJ mother. By using an exhaustive gene expression analysis, we identified the several genes that changed only in the heart from lactating MHC-APJ mice. We consider these genes to be the candidates of the pathogenesis of peripertum cardiomyopathy induced by the combined action of enhanced APJ signaling and lactation in mice.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：妊娠恒常性 周産期心筋症 APJ受容体 トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

周産期心筋症 (Peripartum cardiomyopathy)は心疾患既往のない女性が、妊娠期から産褥期にかけて心不全を発症する疾患である。ハイチや南アフリカでは 300 ~1,000 出産に 1 例、米国では 3,000 出産に 1 例と高頻度に発症し、罹患率は増加傾向にある。日本では、約 20,000 出産に 1 例とされているが、ライフスタイルの変化に伴う高齢出産や肥満の増加から、今後の日本における発症率は増加する可能性がある。少子高齢化が問題となっている我が国において個々の出産の健全化は急務であるが、周産期心筋症の発症メカニズムは不明である。

7 回膜貫通型受容体 APJ は心臓や血管、腎臓などの循環器系の組織において発現が認められ、リガンドとしてアペリンが同定されている。申請者は以前に APJ 受容体欠損マウスを作製し、アペリン-APJ 系が血圧降下作用を有する、新規血圧制御系であることを明らかにした。一方で APJ の高発現が認められる心臓においては、アペリン-APJ 系の心収縮能増強作用や虚血再灌流障害に対する心保護作用が報告されているが、疾患発症との関わりは不明であった。そこで我々は心臓 APJ の受容体機能に特化した解析を行うため、心臓特異的 APJ 過剰発現 (MHC-APJ) マウスを作製し、解析を行うこととした。

先行解析の結果、MHC-APJ マウスは、出産後の母親マウスが心肥大と心収縮能の低下をきたす、これら病態は出産回数の増加に伴って増悪化し、最終的に母体は心不全により死亡するといった、周産期心筋症と類似の症状を呈することが判明し、本疾患のモデルマウスとなり得る可能性が考えられた。また、MHC-APJ マウスで認められる周産期心筋症の発症には、授乳が必須であることが示唆され、周産期心筋症の分子メカニズムに迫る突破口と考えた。そこで、この MHC-APJ マウスを周産期心筋症のモデルマ

ウスとして確立するとともに、APJ 受容体と本疾患発症との因果関係の解明を目指すこととした。

2. 研究の目的

ヒトにおける周産期心筋症は、そのメカニズムが未だ不明であり、現時点において有効な治療法も存在しない。そこで、以下の 2 点に焦点を絞り、研究を行うこととする。

- (1) MHC-APJ マウスを周産期心筋症のモデルマウスとして確立
- (2) 周産期心筋症発症メカニズムの解明

3. 研究の方法

(1) MHC-APJ マウスの周産期心筋症のモデルマウスとしての確立

野生型 (WT) マウスと MHC-APJ マウスを、非妊娠群、妊娠群、授乳群、非授乳群に分け、心重量の測定、組織学的解析 (Hematoxylin-Eosin 染色、Masson's trichrome 染色、Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色) を行い、心臓病態を構造の面から評価する。

心エコー法による心機能の測定、心不全マーカー遺伝子の発現レベルを検証し、心臓の機能的な変化を評価する。

- (2) 周産期心筋症発症メカニズムの解明

授乳期心臓における血管新生を、CD31 抗体を用いた免疫染色法により評価する。

授乳期心臓における遺伝子発現の変化を、マイクロアレイ法により検証する。

マイクロアレイ解析により得られた結果を、定量的 PCR 法により検証する。

4. 研究成果

(1) MHC-APJ マウスを周産期心筋症のモデルマウスとして確立

非妊娠群、妊娠群、授乳群、非授乳群のマウスの心重量を測定した結果、WT マウス

では妊娠中、授乳群（離乳時）、非授乳群の間で心重量に大きな差は認められなかったが、MHC-APJ マウスでは授乳群において、心重量が顕著に増加した。

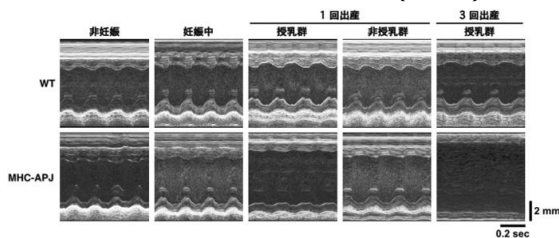
MHC-APJ マウスに関して、出産・授乳回数を重ねると、呼吸の異常や胸水の貯留、肝臓の腫大など、心不全の特徴が認められ、死亡するマウスが認められた。

HE 染色による形態学的解析から、MHC-APJ マウス授乳群の心臓は、心臓内腔の拡大が認められ、これは非授乳群では観察されなかった。

Masson's trichrome 染色の結果、MHC-APJ マウス授乳群の心臓において、著明な線維化が認められた。

MHC-APJ マウス心臓を用いた TUNEL 染色の結果、授乳群において TUNEL 陽性細胞数の増加が認められたが、非授乳群では認められなかった。

心エコー評価の結果、MHC-APJ マウスは、授乳期間中に心機能が低下することが判明した。一方、妊娠中または非授乳群では心機能の低下は認められなかった（下図）。



定量的 PCR 法により心不全マーカー遺伝子の発現を評価した結果、MHC-APJ マウス授乳群は非妊娠時に比べ BNP 遺伝子の有意な発現上昇が認められた。一方、非授乳群ではこの変化は認められなかった。

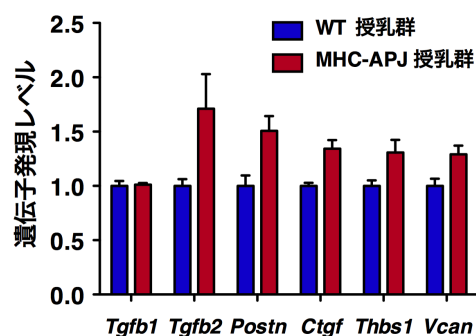
これらの結果から、MHC-APJ マウスはヒト周産期心筋症と類似した病態を示し、本疾患のモデルマウスとなる可能性が強く示唆された。

(2) 周産期心筋症発症メカニズムの解明

授乳期心臓における血管新生を、CD31 抗体を用いた免疫染色法により評価した結果、WT マウスでは非妊娠群に比べ、授乳群

において血管数の増加が認められたが、MHC-APJ マウスではその増加が抑制されていた。

マイクロアレイ解析の結果、MHC-APJ マウス授乳群の病態進展期においてのみ変化する遺伝子 (*Tgfb2*, *Postn*, *Ctgf*, *Thbs1*, *Vcan*) が同定された。またマイクロアレイにより見出した遺伝子の発現変化を、定量的 PCR 法により検証し、実際に MHC-APJ マウス授乳群にて発現が変化していることを確認した（下図）。



これらの結果より、APJ の心臓での過剰発現による周産期心筋症発症には、血管新生抑制や、TGF- β シグナルの増強が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13件)

1. Mizuno, S., Tra, D.T., Mizobuchi, A., Iseki, H., Mizuno-Iijima, S., Kim, J.D., Ishida, J., Matsuda, Y., Kunita, S., Fukamizu, A., Sugiyama, F., and Yagami, K. "Truncated Cables1 causes agenesis of the corpus callosum in mice." *Lab Invest.*, 94, 321-330 (2014), doi: 10.1038/labinvest.2013.146. (査読有)
2. Fukuzawa, T., Ishida, J. (他11名、2番目) "Lung surfactant levels are regulated by Ig-Hepta/GPR116 by monitoring surfactant protein D." *PLoS One.*, 8, e69451 (2013), doi: 10.1371/journal.pone.0069451. (査読有)
3. Inui, Y., Mochida H., Yamairi, F., Okada, M., Ishida, J., Fukamizu, A., and Arakawa, K. "Effects of Aging and Uninephrectomy on Renal Changes in Tsukuba Hypertensive Mice" *Biomed. Reports*, 1, 359-364 (2013), doi: 10.3892/br.2013.74 (査読有)
4. Nagano, K., Ishida, J., Unno, M.,

- Matsukura, T., and Fukamizu, A. "Apelin elevates blood pressure in ICR mice with L-NAME-induced endothelial dysfunction." *Mol. Med. Reports*, 7, 1371-1375 (2013), doi: 10.3892/mmr.2013.1378. (査読有)
5. Murata, K., Saito, C., Ishida, J., Hamada, J., Sugiyama, F., Yagami, K.I., and Fukamizu, A. "Effect of Lactation on Postpartum Cardiac Function of Pregnancy-Associated Hypertensive Mice" *Endocrinology*, 154, 597-602 (2013), doi: 10.1210/en.2012-1789. (査読有)
6. Namiki, K., Matsunaga, H., Yoshioka, K., Tanaka, K., Murata, K., Ishida, J. (他 13 名、6 番目) "Mechanism for p38 -mediated experimental autoimmune encephalomyelitis." *J. Biol. Chem.*, 287, 24228-24238 (2012), doi: 10.1074/jbc.M111.338541. (査読有)
7. Ishimaru, T., Ishida, J., Nakamura, S., Hashimoto, M., Matsukura, T., Nakamura, A., Kunita, S., Sugiyama, F., Yagami, K., and Fukamizu, A. "Short-term Suppression of Renin-Angiotensin System in Mice Associated with Hypertension during Pregnancy" *Mol. Med. Reports*, 6, 28-32 (2012), doi: 10.3892/mmr.2012.886. (査読有)
8. Fukuhara, S., Simmons, S. (他 16 名、10 番目) "The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice." *J. Clin. Invest.*, 122, 1416-1426 (2012), doi: 10.1172/JCI60746. (査読有)
9. Kaneko, K., Ito, M., Fumoto, T., Fukuhara, R., Ishida, J., Fukamizu, A., and Ikeda, K. "Physiological function of the angiotensin AT1a receptor in bone remodeling." *J. Bone Miner. Res.*, 26, 2959-2966 (2011) doi: 10.1002/jbmr.501. (査読有)
10. Nakajima, Y., Akaogi, K. (他 14 名、7 番目) "Estrogen Regulates Tumor Growth Through a Nonclassical Pathway that Includes the Transcription Factors ER{beta} and KLF5." *Sci. Signal.* 4, ra22 (2011), doi: 10.1126/scisignal.2001551. (査読有)
11. Shirakawa, T., Kako, K., Shimada, T., Nagashima, Y., Nakamura, A., Ishida, J., and Fukamizu, A. "Production of free methylarginines via the proteasome and autophagy pathways in cultured cells." *Mol. Med. Report* 4, 615-620 (2011), doi:

10.3892/mmr.2011.488. (査読有)

〔学会発表〕(計 45 件)

1. 石田 純治 「血管内皮細胞障害時におけるアペリン-APJ 受容体系による血圧制御機構の解析」第 17 回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2013 年 11 月 22 日、千里ライフサイエンスセンター、大阪府
2. 石田 純治 「妊娠高血圧症候群とレニン・アンジオテンシン系」第 36 回 関東腎研究会、平成 2013 年 6 月 29 日、クラブ関東、東京都
3. 石田 純治 「妊娠高血圧を経た産後心機能と授乳リスク」第 5 回 核内受容体・ホルモン研究会、2013 年 3 月 15 日、霞ヶ関コモンゲート、東京都
4. 石田 純治 「シグナルトランスダクションの破綻としての妊娠高血圧症候群」第一回 基礎・社会・臨床医学の連携による健康長寿の実現シンポジウム、2013 年 2 月 4 日、筑波大学、茨城県

〔図書〕(計 2 件)

1. 村田知弥、石田純治、深水昭吉：東京医学社、腎と透析「遺伝子改変マウスを活用した産前産後の疾患発症メカニズムに関する研究」、2013 年、第 75 巻、第 5 号、725-729 頁
2. 石田純治、濱田樹理、永野克将、村田知弥、中村匠子、松倉頼、齋藤千明、深水昭吉：中山書店、疾患モデルマウス表現型解析指南、「疾患モデルマウス：臓器・疾患別解析・実験法：代謝内分泌系・高血圧」、2011 年、259-265 頁

〔その他〕

ホームページ等
<http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 純治 (ISHIDA, JUNJI)
 筑波大学・生命環境系・講師
 研究者番号：30323257

(2) 連携研究者

八神 健一 (YAGAMI, KEN-ICHI)
 筑波大学・医学医療系・教授
 研究者番号：40166476

杉山 文博 (SUGIYAMA, FUMIHIRO)
 筑波大学・医学医療系・准教授
 研究者番号：90226481