

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591087

研究課題名(和文) 心臓線維化形成における Epac の役割と心不全治療への応用

研究課題名(英文) Role of Epac in cardiac fibrosis and its clinical application for heart failure

研究代表者

奥村 敏 (Okumura, Satoshi)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：60233475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：新規サイクリックAMP (cAMP)で活性化因子Epac の心不全発症にはたす役割を解明するため、Epac1ノックアウトマウス(Epac1KO)を作製し、イソプロテレノールの慢性投与刺激を行ったところ、Epac1KOでは心臓線維化が顕著に抑制された。そこで心臓線維化を1) 線維芽細胞内でのCollagen分子の産生 2)細胞外で成熟したCollagen分子同士の架橋によるCollagen線維の形成 3)コラーゲン分解酵素による老朽化したCollagen線維の分解の3段階に分け検討したところ3)コラーゲン分解酵素によるCollagen線維の分解亢進が主要なメカニズムであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to examine the role of Epac1 (exchange protein directly activated by cyclic AMP) on cardiac fibrosis, chronic isoproterenol (ISO) infusion (60mg/kg/day for 7 days) was performed in Epac1-null mice (Epac1KO) and wild-type controls (WT). Cardiac fibrosis was significantly inhibited in Epac1KO, compared to WT. In order to examine the mechanism, we examined the role of Epac1 in the following 3 steps: Step-1) Production of collagen fiber Step-2) Cross-linking of collagen fiber by lysyl oxidase (LOX) Step-3) Degradation of collagen fiber by matrix metalloproteinase (MMP). Our data in this study shows that cardiac fibrosis was reduced through the inhibition of step-3.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 分子心臓病態学

キーワード：シグナル伝達 循環器高血圧 サイクリックAMP 心不全 遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ベータアドレナリン受容体( $\beta$ -AR)シグナルの主要な構成因子でありアデニル酸シクラーゼ(AC)が産生する cyclic AMP (cAMP)で活性化される分子として従来から知られている Protein kinase A (PKA) は心筋細胞のアポトーシスを誘導することが in vitro の研究で報告されている (*Circulation* 100, 305-311, 1999)。また心臓特異的 PKA 過剰発現マウス (PKA-TG) は、 $\beta_1$ -AR-TG や  $G_{\alpha}$ -TG と同様に、著明な心拡大を伴う不全心を呈したが、 $\beta_1$ -AR-TG や  $G_{\alpha}$ -TG にみられる顕著な心臓線維化は PKA-TG では見られなかった (*Circ Res* 89, 997-1004, 2001)。

以上の実験結果は AC の下流に PKA とは別に心臓線維化に重要な制御因子が存在することを示唆している。

(2) 我々は cAMP により活性化される新しい  $\beta$ -AR シグナル構成因子 Epac (exchange protein activated by cAMP) (*Nature* 396, 474-477, 1998; *Science* 282, 2275-2279, 1998) に着目し、科学研究費補助金(基盤研究C:平成20-22年)の研究助成をうけ、心不全発症における Epac の役割について解析を行ったところ、これまでに神経細胞を Epac 特異的的刺激薬(8-*p*-Methoxyphenylthio-2'-*O*-methyl-cAMP; pMe-cAMP)で刺激するとアポトーシスは誘導されるが、心筋細胞を pMe-cAMP で刺激してもアポトーシスが誘導されないこと、そのメカニズムとして Bcl-2 関連タンパクである Bim の発現が心筋細胞ではきわめて低いことが原因であることを報告した (*J Biol Chem* 285, 24248-24259, 2010)。

(3) 心臓リモデリング形成に際して、アポトーシスとともに重要な心臓線維化における

Epac の役割については in vivo の解析はこれまで行われていない。

## 2. 研究の目的

我々は 2 種類の Epac のサブタイプ (Epac1, Epac2) のノックアウトマウス (Epac1KO, Epac2KO) を作製した。心臓の主要なサブタイプは Epac1 であり、Epac1 は心筋細胞と線維芽細胞のいずれの細胞にも発現している (*Circ Res* 102, 959-965, 2008; *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 6386-6391, 2008)。Epac1KO に慢性 イソプロテレノール(ISO) 刺激 (60mg/kg/day for 7days) を行ったところ ISO 投与後の心肥大は WT と Epac1KO で有意差は無かった。ところが心機能は WT では投与前後で有意に低下したが、Epac1KO では投与前の心機能が維持されていた。心筋細胞のアポトーシスは WT と Epac1KO のいずれのマウスも ISO 刺激で有意に亢進したが、その程度はわずかではあるが WT に比較して Epac1KO で有意に抑制されていた。大変興味深いことは WT、Epac1KO のいずれのマウスの心筋組織内に、ISO 投与前では心臓線維化はほとんど見られなかったが、ISO 刺激後の WT では心臓線維化領域の顕著な増加がみられた。しかしながら Epac1KO ではほとんどみられなかったことである。以上の実験結果から「Epac1 は心臓リモデリング、とくに心臓線維化を促進させ心不全発症を促進させる」という仮説をたて、本仮説を Epac1KO を用いた慢性 ISO 投与モデルを用いた、in vivo マウスモデルならびに siRNA 法を用いた in vitro 実験系で検証する。

## 3. 研究の方法

**(1) 慢性カテコラミン刺激心不全マウスモデルの作成:** Epac1KO ならびにコントロール (wild-type; WT) (雄 4-6 週令) に Osmotic mini-pump (Alzet 2001) を用いて慢性 ISO (60mg/kg/day) 投与を 7 日間行う。心臓線維化は Step-1) 線維芽細胞内で Procollagen 分子が産生される過程 (産生過程) Step-2) 細胞外に分泌された Procollagen 分子が修飾を受け、Collagen 分子に成熟し、架橋構造を形成して Collagen 線維が形成される過程 (成熟過程) Step-3) 主として線維芽細胞から分泌される Collagen 分解酵素 (MMP: matrix metalloproteinase) により古い Collagen 線維が分解されて新しい Collagen 線維に置換される過程 (分解・代謝系) の大きく 3 段階の過程からなる。これら 3 段階の心臓線維化のいずれの過程を制御して、Epac1 が心臓線維化を促進しているのかを Epac1KO を用いて検討する。

**(2) ラット胎児心臓線維芽細胞を用いた siRNA 実験** ISO (1microM, 10microM) 刺激による心臓線維芽細胞の遊走能における Epac1 の役割を MTT アッセイ検討した。また細胞遊走能に関する細胞内シグナルの活性化 (p44/42 MAPK (ERK1/2), Src) について、ウエスタンブロッティングを用いて検討した。

#### 4. 研究成果

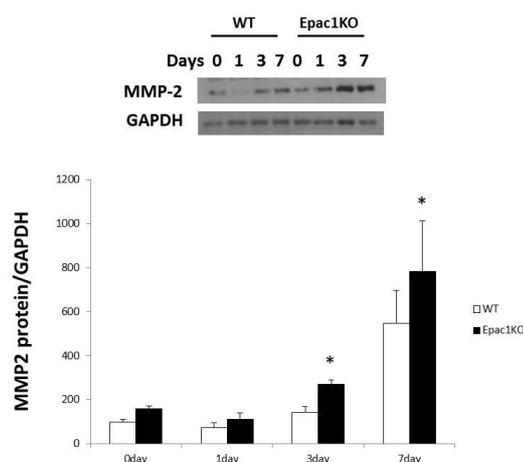
**(1) Epac1KO の慢性カテコラミン刺激による抗線維化作用は MMP による Collagen 分子の分解亢進による。** MMP による Epac1KO に Osmotic mini-pump (Alzet 2001) を用いて慢性 ISO (60mg/kg/day) 投与を行い投与前、投与後 1 日、3 日、7 日の心臓組織を摘出して以下の実験を行った。

**Epac1KO ではコラーゲン分解が抑制**

Collagen1 $\alpha$ 1, Collagen1 $\alpha$ 2, Collagen3 $\alpha$ の発現量を q-PCR を用いて定量した。各サブタイプの Collagen 発現量は経時的に増加したが Epac1KO と WT で有意差は認められなかった。

心臓線維芽細胞から分泌される lysyl oxidase (LOX) は Collagen 分子同士の架橋に重要な酵素であるが、LOX の発現量に Epac1KO と WT で有意差は見られなかった。

Collagen 分解酵素 (MMP: matrix metalloproteinase) として重要な MMP-2 の発現量を WB を用いて検討したところ投与前ならびに投与 1 日では Epac1KO と WT で有意差は認められなかったが、投与 3 日、7 日では WT に比較して Epac1KO では MMP-2 の有為な発現上昇が見られた (図 1)。



**図 1** 慢性イソプロテレンール投与後 0, 1, 3, 7 日の心臓組織に発現する MMP2 をウエスタンブロッティングで定量解析した。投与 3 日後ならびに 7 日後 Epac1KO で MMP2 の有為な発現上昇が確認された。(\*P<0.05, N=4)

以上の結果より Epac1KO における慢性カテコラミン刺激モデルにおける心臓線維化抑制機序として MMP による Collagen 分子の分解亢進が示唆された。

**(2) カテコラミン刺激による心臓線維芽細胞**

## の遊走における Epac の役割

ラット胎児心臓線維芽細胞を 24 時間無血清培地で培養後、ISO 刺激(1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M) 後 24 時間の線維芽細胞遊走能を MTT アッセイで検討したが、siRNA により Epac1 をノックダウンした細胞の遊走能はコントロール群と有意差がみられなかった (図 2)。

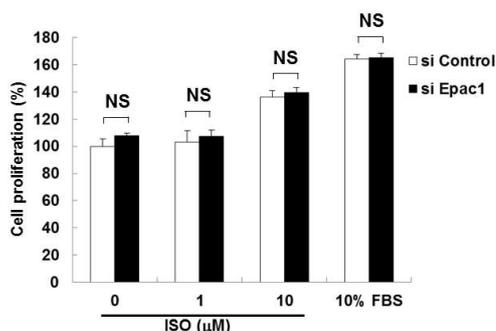


図 2 ラット胎児心臓細胞の Epac1 の発現を siRNA 法によりノックダウンした効果が ISO 刺激(1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M)による遊走能に与える影響 (P=NS, n=8)

カテコラミン刺激による心臓線維芽細胞遊走能には、ERK(tyr202/thr204), Src(tyr416) のリン酸化の亢進が重要であることが報告 (JBC 2002)されている。しかしながら Epac1 を siRNA でノックダウンしても、イソプロテレノール刺激による ERK1/2, Src のリン酸化上昇に影響を与えなかった。すなわち心臓線維芽細胞に発現する Epac1 は、カテコラミン刺激による遊走能亢進に重要な役割を果たしていない可能性が示唆された (図 3)。

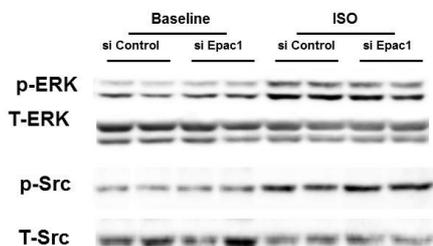


図 3 . ラット胎児心臓線維芽細胞の ERK, Src の発現をウエスタンブロッティングで確認

## 5 . 研究成果

### [雑誌論文] (計 15 件)

**Okumura S**, Fujita T, Cai W, Jin M, Namekata I, Mototani Y, Jin H, Ohnuki Y, Tsuneoka Y, Kurotani R, Suita K, Kawakami Y, Hamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Tsunematsu T, Bai Y, Suzuki S, Hidaka Y, Umemura M, Ichikawa Y, Yokoyama U, Sato m, Ishikawa F, Izumi-Nakaseko H, Adachi-Akahane S, Tanaka H, Ishikawa Y : Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses.

*J Clin Invest* **124**, 2785-2801, 2014 (査読有)

**Sato M**, Hiraoka M, Sakima M, Yamane Y, Fujita T, **Okumura S**, Ishikawa Y :

Protection of cardiomyocytes from the hypoxia-mediated injury by a peptide targeting the G-protein signaling 8

*PLoS One* **14**, e91980, 2014 (査読有)

Sato I, Umemura M, Mitsudo K, Kioi M, Nakashima H, Iwai T, Feng X, Oda K, Miyajima A, Makino A, Iwai M, Fujita T, Yokoyama U, **Okumura S**, **Sato M**, Eguchi H, Tohnai I, Ishikawa Y

*J Physiol Sci* **64**, 177-183, 2014 (査読有)

Hichijo N, Kawai N, Mori H, Sano R, Ohnuki Y, **Okumura S**, langenbach GE, Tanaka E : Effects of the masticatory demand on the rat mandibular development

*J Oral Rehabil* 2014 (in press) (査読有)

Ohnuki Y, Yamada T, Mototani Y, Umeki D, Shiozawa K, Fujita T, Saeki Y, **Okumura S** : Effect of protein kinase A on the phosphorylation status and transverse

stiffness of cardiac myofibrils.

***J Pharmacol Sci* 123, 279-283, 2013(査読有)**

Ohnuki Y, Umeki D, Cai W, Kawai N, Mototani Y, Shiozawa K, Jin HL, Fujita T, Tanaka E, Saeki Y, **Okumura S** : Role of masseter muscle  $\beta_2$ -adrenergic signaling in regulation of muscle activity, myosin heavy chain transition, and hypertrophy.

***J Pharmacol Sci* 123; 36-46, 2013 (査読有)**

Umeki D, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, Fujita T, Nakamura Y, Saeki Y, **Okumura S** : Effects of chronic Akt/mTOR inhibition by rapamycin on mechanical overload-induced hypertrophy and myosin heavy chain transition in masseter muscle.

***J Pharmacol Sci* 122; 278-288, 2013 (査読有)**

Bai Y, Tsunematsu T, Jiao Q, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, Jin M, Cai W, Jin HL, Fujita T, Ichikawa Y, Suita K, Kurotani R, Yokoyama U, **Sato M**, Iwatsubo K, Ishikawa Y, **Okumura S** : Pharmacological stimulation of type 5 adenylyl cyclase stabilizes heart rate under both microgravity and hypergravity induced by parabolic flight.

***J Pharmacol Sci* 119; 381-389, 2012 (査読有)**

Yokoyama U, Ishiwata R, Jin MH, Kato Y, Suzuki O, Jin H, Ichikawa Y, Kumagaya S, Katayama Y, Fujita T, **Okumura S**, **Sato M**, Sugimoto Y, Aoki H, Suzuki S, Masuda M, Minamisawa S, Ishikawa Y : Inhibition of EP4 signaling attenuate aortic aneurysm formation.

***Plos One* 7, e36724, 2012 (査読有)**

Ichikawa Y, Yokoyama U, Iwamoto M, Oshikawa J, **Okumura S**, **Sato M**, Yokota S, Masuda M, Asou T, Ishikawa Y : Inhibition of phosphodiesterase type 3 dilates the rat ductus arteriosus without inducing intimal thickening.

***Circ J* 76; 2456-2464, 2012 (査読有)**

Fukumura H, **Sato M**, Kezuka K, Sato I, Feng X, **Okumura S**, Fujita T, Yokoyama U, Eguchi H, Ishikawa Y, Saito T : Effects of ascorbic acid on reactive oxygen species production in chemotherapy and hyperthermia in prostate cancer cell.

***J Physiol Sci* 62; 251-257, 2012 (査読有)**

Iwatsubo K, Brav C, Uechi M, Baljinniyam E, Nakamura T, Umemura M, Lai L, gao S, Yan L, Zhao X, Park M, Qiu H, **Okumura S**, Iwatsubo M, Vatner DE, Vatner SF, Ishikawa Y :

***Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302; H2622-H2628, 2012 (査読有)**

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, Kimura S : Secretoglobin 3A2 suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by transforming growth factor  $\beta$  signaling down-regulation (査読有)

***J Biol Chem* 286, 19682-19692, 2011.**

**Sato M**, Hiraoka M, Suzuki H, Bai Y, Kurotani R, Yokoyama U, **Okumura S**, Cismowski MJ, Lanier SM, Ishikawa Y: Identification of transforming factor E3 (TFE3) as a receptor-independent activator

of  $G\alpha_{16}$  (査読有)

*J Biol Chem* **286**, 17766-17776, 2011.

Sato M, Yokoyama U, Fujita T, Okumura S, Ishikawa Y: The role of cytochrome p450 in ischemic heart disease.

*Curr Drug Metab* **12**, 526-532, 2011 (査読有)

[学会発表] (計 8 件)  
国際学会 (2 件)

Okumura S et al 「George E Brown Memorial Lecture and Molecular Mechanism of Heart Failure」 (Oral presentation)

Disruption of Epac1 decreases phosphorylation of phospholamban and protects the heart against stress

American Heart Association Scientific Scission 2012 (November 3-7, 2012, Los Angeles in USA)

Okumura S, et al. (Oral presentation)  
Epac activation protects heart from interleukin-6-induced cardiac dysfunction by inhibiting STAT/iNOS signaling

American Heart Association Scientific Sessions

2011(November 12-16, 2011, Orlando in USA)

国内学会(6件)

Suita K, Okumura S et al. Vidarabine, a selective cardiac adenylyl cyclase inhibitor, prevents ventricular arrhythmia in Calsequestrin 2 knockout mouse

第 91 回日本生理学会大会 (3 月 16-18 日 2014 年 鹿児島大学)

Ohnuki Y, Okumura S et al. Roles of Epac in masseter muscle hypertrophy induced by chronic stimulation of beta 2 adorenoreceptor

第 91 回日本生理学会大会 (3 月 16-18 日 2014 年 鹿児島大学)

Suita K, Okumura S et al. Vidarabine, a selective cardiac adenylyl cyclase inhibitor, prevents ventricular arrhythmia in Calsequestrin 2 knockout mouse

第 78 回日本循環器学会学術集会 (3 月 21-23 日 2014 年 東京国際フォーラム)

Ohnuki Y, Okumura S et al. Effects of beta-2 adrenoceptor agonists on function and phenotype of rat masseter muscle

第 51 回歯科基礎医学会総会 (9 月 20 日-23 日 岡山大学)

Shiozawa K, Okumura S  
Relationship between natural bite size and

body mass size

第 51 回歯科基礎医学会総会 (9 月 20 日-23 日 岡山大学)

Okumura S et al.  
Disruption of Epac1 protects heart from catecholamine-mediated cardiac fibrosis  
第 75 回日本循環器学会学術集会 (8 月 3-4 日 2011 年 東京国際フォーラム)

[図書]

歯科基礎生理学 第 6 版  
2014 年 2 月 10 日発行 共著

[産業財産権] 出願計 3 件

名称: ビダラピ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: 国際特許

番号: PCT/JP2012/069540

出願日: 2012 年 8 月 1 日

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: 国際特許

番号: PCT/JP2011/074098

出願日: 2011 年 10 月 20 日

名称: ビダラピ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

出願日: 2011 年 10 月 7 日

[その他]

ホームページ

鶴見大学 歯学部 生理学講座  
<http://dent.tsurumi-u.ac.jp/guide/course/basic/331>

横浜市立大学 医学部 循環制御医学  
<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiri1/>  
愛知医科大学 医学部 生理学  
<http://www.aichi-med-u.ac.jp/physio2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者(2011-2013 年度)

奥村 敏 (OKUMURA, Satoshi)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号: 60233475

(2) 研究分担者 (2011 年度)

佐藤 元彦 (SATO, Motohiko)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40292122