

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659110

研究課題名（和文） 生体心におけるカルシウム誘導性ネクローシス様細胞死の転写因子による制御

研究課題名（英文） The transcriptional regulation of calcium induced cell death in heart

研究代表者

中山 博之 (NAKAYAMA HIROYUKI)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：40581062

研究成果の概要（和文）：

心不全における転写因子 Runx2 の役割を明らかにするために、心筋特異的 Runx2 過剰発現マウスを作製した。Runx2 の発現は、心筋梗塞及び圧負荷心肥大において上昇を認め、過剰発現マウスは心肥大と心収縮力の低下をきたした。しかしながら、同モデルにおいて明らかなカルシウム誘導性ネクローシス様細胞死の像を認めなかった。一方、Runx2 の心筋特異的欠損マウスを作製すべく Runx2 の flox マウスの作製を施行しヘテロ変異マウスのラインを確立した。

研究成果の概要（英文）：

Recent studies demonstrated that the osteopontin (OPN), an acid phosphoprotein plays pivotal roles in cardiac hypertrophy and failure. An osteogenic transcription factor Runx2 regulates the expression of OPN in osteoblasts. In the present study, we attempted to examine the pathological role of Runx2 in cardiac hypertrophy and failure. We generated transgenic mice (TG) overexpressing Runx2. Two TG lines (low and high) were obtained and high-expressing TG (HE-TG) showed cardiac hypertrophy and premature death within 8 weeks of age. In addition, HE-TG mice demonstrated decreased fractional shortening assessed by echocardiography. In response to pressure overload, low expressing TG (LE-TG) demonstrated higher mortality and enhanced cardiac hypertrophic response after TAC. In conclusion, targeted expression of Runx2 in heart mediates cardiac dysfunction and hypertrophy in mice. Thus, Runx2 could be a novel therapeutic target for heart failure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：カルシウム、細胞死、転写因子、心不全

## 1. 研究開始当初の背景

細胞死は形態学的にアポトーシス、オートファジーを伴う細胞死及びネクローシス様細

胞死の3種類に分類され、前2者の分子機序の研究は進んでいる。しかしながらネクロー

シス様細胞死の分子機序やその詳細な分類に関しては依然明らかではない。申請者は、不全心筋におけるカルシウムの役割の解析する過程で、L型カルシウムチャネル(以下LTCC)からのCa<sup>2+</sup>流入を増大させたマウスにおいてβアドレナリン受容体(以下β受容体)刺激によりvon Kossa染色陽性像を特徴とする心筋細胞死像を観察した。von Kossa染色はカルシウム塩を茶色に染色し、これは心筋細胞がカルシウム塩沈着物に変容している事を示している。この細胞死像を伴う組織はTUNEL陽性心筋細胞が観察されず、また抗アポトーシス蛋白質であるbcl2の過剰発現では表現型が救済されない事から非アポトーシス細胞死であると考えられる。またオートファジーによる細胞死にかような組織所見は報告されておらず、ネクローシス様細胞死であると考えられる。同様の心筋異常組織像は他に3種の遺伝子改変マウスにおいて報告されており、かような組織像を呈する心臓において骨形成転写因子Runx2の発現上昇が報告され石灰化との関連が示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は生体心において観察されるvon Kossa染色陽性像を呈するネクローシス様細胞死における転写因子Runx2の役割を解明する事である。すなわちvon Kossa染色陽性像を呈するネクローシス様細胞死におけるRunx2の関与を以下のgain-及びloss-of-function解析により同定する。

(1) Runx2心筋特異的過剰発現によるvon Kossa染色陽性細胞死像の同定(gain-of-function解析)。

(2) Runx2心筋特異的遺伝子欠失によるvon Kossa染色陽性細胞死の抑制(loss-of-function解析)。

## 3. 研究の方法

本研究において以下のように新規の遺伝子改変マウスの作成と解析によりvon Kossa染色陽性像を呈するネクローシス様細胞死におけるRunx2の関与を明らかにする。

1) Runx2心筋過剰発現マウスの作成と解析によりvon Kossa陽性細胞死像が生理条件下もしくはストレス下において観察されるかどうかをin vivoにおいて明らかにする(gain-of-function解析)。また心筋細胞でのRunx2発現により詳細な細胞死の機序を同定する。具体的には作成したRunx2心筋特異的過剰発現マウスに大動脈縮窄術を施し圧負荷モデルを作成し、圧負荷ストレスに対する心肥大反応や心不全の評価を施行する。また浸透圧ポンプを用いたイソプロテレノール持続投与による表現型をvon Kossa染色を含めた組織学的解析により施行する。

2) Runx2の心筋特異的欠失モデルの作成と解析を施行する。von Kossa陽性細胞死の誘導モデルであるLTCCβ2a subunit過剰発現マウス(TG)においてβ受容体刺激によるvon Kossa陽性細胞死の誘導がRunx2の欠失により抑制できるかどうかを明らかにする(loss-of-function解析)。そのため、心筋特異的Runx2欠失マウスを作成する。

## 4. 研究成果

(1) 心臓におけるRunx2発現変化の検討:  
初めに心筋におけるRunx2の成長に伴う発現量の推移を検討した。生後1日(0週齢)、2週齢、4週齢および8週齢の野生型(WT)マウスの心臓組織からRNAを精製し、Runx2のmRNA発現量をReal-time PCR法により解析した。その結果、生後2週齢をピークに成長に伴い発現量が低下する事が明らかとなった。また心臓に発現するRunx2のアイソフォームを確認するために生後1日におけるRunx2(Type-I)とRunx2

(Type-II) の発現を心臓および単離心筋細胞を RT-PCR 法により用いて検討した。その結果、生後 1 日の心臓では両アイソフォームの発現が確認できたのに対して、新生児マウス心筋細胞においては Runx2 (Type-I) の発現のみを認めた。さらに心病態モデルにおける Runx2 発現の変化について詳細な検討を行った。まず、心筋梗塞(MI)の病態における Runx2 の発現変動について検討した。その方法として野生型 C57 Bl/6 (WT) マウスにおいて左冠動脈結紮により MI を作製し、MI 1 日後 (MI1d) および 14 日後 (MI14d) の心臓組織を infarct area, remote area に分けて回収し、Runx2 の mRNA 発現量を Real-time PCR 法により解析した。その結果、MI 14 日後の心臓において infarct area では Runx2 の mRNA 発現量が非手術型の約 25 倍、sham の約 9 倍、remote area では非手術型の約 3 倍に増加している事が明らかとなった。次に圧負荷における Runx2 の発現変化について検討した。TAC 及び sham 手術をマウスに施し、術後 7 日の心臓組織を回収し、Runx2 の mRNA 発現量を Real-time PCR 法により解析した。その結果、TAC 7 日後の心臓において Runx2 の発現量が、sham の約 3 倍に増加している事が明らかとなった。以上の検討より生理条件下及び心病態における Runx2 の発現の変化が明らかとなった。

(2) 心筋特異的 Runx2 過剰発現マウスの作製と解析: 生体において、心筋細胞における Runx2 の機能を解明するために、 $\alpha$ MHC プロモーター制御下に Runx2 (Type I) の遺伝子を発現させる TG マウスを作製し、2 ラインの germ line transmission を確認した。本 TG マウスは、 $\alpha$ MHC tetO (tTA) をドライバー遺伝子として用いる事により、テトラ

サイクリンによる遺伝子発現制御が可能であり、DTG ( $\alpha$ MHC tetO Runx2 TG マウス  $\times$  tTA TG マウス) マウスで心筋特異的に Runx2 が過剰発現する。本研究ではまず、DTG マウスにテトラサイクリンを投与せず恒常的に Runx2 を発現させた。この DTG マウスの心筋において Runx2 が過剰発現されている事をウェスタンブロットによりタンパク質レベルで確認した。Positive control として、ラット新生児由来心筋細胞にアデノウイルス (adenovirus Runx2) を 100 MOI で 24 時間感染させたサンプルを用いた。その結果、作製した 2 ラインの DTG で Runx2 発現が確認された。生後 9 週齢において高発現の DTG マウスは心肥大を呈し、Runx2 過剰発現により心病態が惹起される事が示された。

続いて、生後 8 週齢の雄性 tTA マウスおよび 2 ラインの DTG マウスの心機能を心エコー法により解析した。その結果 tTA 群と比較して、DTG high 群では左室拡張末期径 (LVVIDd)、左室収縮末期径 (LVVIDs) の増加、左室内径短縮率 (FS)、の低下を認め心拡大と収縮機能の低下が示唆された。さらに分子生物学的に心肥大を評価するために、雄性 DTG マウス (生後 9 週齢) の心臓組織を回収した。またコントロールとして雄性 tTA マウス (生後 9 週齢) の心臓組織を回収し、それぞれ RNA を精製した。そして心肥大の分子マーカーである atrial natriuretic factor (ANF)、brain natriuretic peptide (BNP)、 $\alpha$ -skeletal actin の遺伝子発現量を Real-time PCR 法により解析した。その結果、いずれの遺伝子も発現レベルの上昇を認め、分子生物学的観点からも DTG high マウスにおいて心肥大反応が生じている事が示唆された。以上より、Runx2 の発現上昇が心筋において心肥大を誘導する事が示された。

また、生後 8 週齢の雄性 tTA マウスおよび DTG high マウスにおいて、テレメトリー法により長時間心電図を記録した。結果、tTA 群と比較して、DTG high 群において房室ブロックに伴う心拍数の低下が認められた。最後に、持続  $\beta$  受容体刺激モデル及び圧負荷モデルを用いて心筋における von Kossa 染色を施行したが、予想に反していずれのモデルにおいても von Kossa 陽性細胞死像を見出すことはできなかった。

### (3) Runx2 flox マウスの作成:

心筋及び血管平滑筋における転写因子 Runx2 の機能を解析する事を目的に臓器特異的 Runx2 欠損を可能とする Runx2 flox マウスのターゲティングベクターを作成した。さらにキメラマウスを作成後野生型マウスとの交配により得られたマウスにより germ line transmission を確認した。またサザンブロットにてヘテロマウスによる相同組み換えを確認した。次いで Flp transgenic マウスとの交配による neomycin 耐性遺伝子除去を施行しそのラインを確立した。ヘテロ変異マウスである Runx2<sup>flox/+</sup> 同士の交配により Runx2<sup>flox/flox</sup> の作成を試みたが、現在のところ得られた約 30 匹の新生仔において Runx2<sup>flox/flox</sup> が得られていない。今後なんらかのトラブルによる胎生致死の可能性も含めて検討していく。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 濱谷辰斗、中山博之、松浪佐知、松尾玲男、藤尾慈、心筋特異的 Runx2 過剰発現マウスは心肥大を惹起する、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、京都国際会議場(京都府)
- (2) 中山博之、濱谷辰斗、熊谷渉平、舎川洸太、山下朋美、藤尾慈、Cardiac-specific overexpression of Runx2 mediates

cardiac hypertrophy and dysfunction in mice. American Heart Association, Basic Cardiovascular Sciences 2012 (New Orleans, USA)

[産業財産権]  
○出願状況 (計 件)

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 博之 (NAKAYAMA HIROYUKI)  
大阪大学・薬学研究科・准教授  
研究者番号：40581062