

## 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 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790836

研究課題名（和文） ABCトランスポーター ABCG2 の心血管病における生理的役割の  
解明研究課題名（英文） The Role of ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2 in the  
Pathophysiology of Cardiovascular Diseases

研究代表者

東邦 康智 (HIGASHIKUNI YASUTOMI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10586481

研究成果の概要（和文）：

心疾患における ABC トランスポーター ABCG2 の役割について、マウスの圧負荷心肥大モデルを用いて検討を行った。ABCG2 ノックアウトマウス (KO マウス) では、圧負荷後の心肥大及び心リモデリングの増悪を認めた他、圧負荷後早期の心組織における酸化ストレスの増悪を認めた。圧負荷後の KO マウスにおける表現型は、抗酸化剤の投与により野生型マウスと同等にまで改善した。遺伝子発現パターンの解析から、圧負荷後の KO マウスでは酸化ストレス応答系が障害されていることが示唆された。実際、細胞実験にて、ABCG2 が微小血管内皮細胞からの内因性抗酸化物質であるグルタチオンの輸送を制御していることが分かった。以上から、心臓における酸化ストレス応答には微小血管内皮細胞が重要な役割を果たしており、その機能を制御している ABCG2 が心肥大の新たな治療標的となりうることが示唆された。

また、血管病における ABCG2 の役割について、マウスの下肢虚血モデル、ワイヤー障害モデル、カフ留置モデルを用いて検討を行った。マウスの下肢虚血モデルでは、血管新生において野生型マウスと KO マウスとの間に差を認めなかった。しかし、ワイヤー障害モデルやカフ留置モデルでは、野生型マウスと比較して KO マウスで動脈硬化が抑制された。そのメカニズムに関しては、今後の検討を要する。

以上の結果から、ABCG2 は心臓及び血管における病的刺激に対する応答に重要な役割を果たしており、心血管病の病態生理に深く関与していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the role of ABCG2 in pressure overload-induced cardiac hypertrophy, we induced pressure overload in wild-type and ABCG2 knockout (KO) mice with transverse aortic constriction (TAC). We found that cardiac hypertrophy and ventricular remodeling after TAC were exacerbated in KO mice. Besides, ABCG2 deficiency exacerbated oxidative stress in the heart tissue during pressure overload. Treatment with antioxidant ameliorated the phenotype in KO mice after TAC. Analysis on genetic expression pattern revealed that antioxidant system is impaired in KO mice. In vitro experiments demonstrated that ABCG2 regulates transport of glutathione, an important endogenous antioxidant, from microvascular endothelial cells. These results indicate that ABCG2 protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure by promoting antioxidant response.

Next, we assessed the role of ABCG2 in atherosclerosis by using the ischemic model of lower extremities, the wire injury model and cuff implantation model. Although there was no significant difference in angiogenesis between wild-type and KO mice in the ischemic model of lower extremities, atherosclerosis after wire injury or cuff implantation was suppressed in KO mice compared with wild-type mice. Further analyses are necessary to elucidate the mechanisms involved.

In summary, we demonstrated that ABCG2 plays a pivotal role in stress response against pathological stimuli and the pathophysiology of cardiovascular diseases.

## 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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：心血管病、酸化ストレス、血管新生、炎症、膜輸送蛋白

### 1. 研究開始当初の背景

ABC トランスポーターである ABCG2 は、癌細胞において抗がん剤を排出し薬剤耐性を与える膜輸送蛋白として同定された(Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:15665-15670)。近年、この ABCG2 が正常の臓器にも発現しており、毒物やその代謝産物から臓器を保護していることが示唆されている(Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2006;46:381-410)。また、近年の研究で、ABCG2 が酸化ストレスや低酸素などからの組織保護に重要な役割を果たしている可能性が示唆されており、その生理機能が非常に注目されている(J Pharmacol Exp Ther. 2009;328:3-9.; J Exp Ther Oncol. 2007;6:335-48. など)。酸化ストレスや低酸素は様々な疾患の病態形成に大きな役割を果たしており、その防御機構の解明は非常に重要である。実際、ABCG2 は脳における酸化ストレスを軽減することでアルツハイマー病に保護的役割を果たしている可能性が示唆されている(J. Neurochem. 2010;114:1590-1604)。

現在、生活習慣や食文化の変化に伴い、我が国における心血管病は増加の一途をたどっており、新たな治療法の開発や予後予測の観点からその病態生理の解明が重要である。その心血管病の病態形成においても酸化ストレスや低酸素が重要な役割を果たしていることが示されているが、心血管疾患における ABCG2 の生理的役割についてはまだ十分に解明されていない。

これまで我々は、心臓における ABCG2 の発現を確認し、主に微小血管内皮細胞に発現していることを報告した(Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30:2128-2135)。さらに我々は、ABCG2 ノックアウトマウス(KO マウス)を使用した検討により、ABCG2 が急性心筋梗塞後の生存に大きな影響を及ぼしている他、酸化ストレス下における微小血管内皮細胞の生存や血管新生を制御し、心筋梗塞後の組織修復において保護的に働くことによって心筋梗塞後リモデリングを軽減することを世界で初めて報告した(Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30:2128-2135)。

以上の結果より、高血圧性心臓病や動脈硬化などの他の心血管病においても ABCG2 が重要な役割を果たしていることが予想され、そ

の検討は非常に重要であると考えられる。特に、日本人において ABCG2 の機能低下遺伝子多型の頻度が多いことが報告されており(Mol Cancer Ther. 2002;1:611-6)、ABCG2 の生理機能やその詳細なメカニズムの検討は日本人の心血管病の予後予測や新たな治療標的の開発に非常に重要であると考えられた。

### 2. 研究の目的

心血管病の動物モデルを使用して ABCG2 の心血管病における生理学的役割を検討し、さらにそのメカニズムを解明し、心血管病の予後の予測や ABCG2 を標的とした新たな治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 免疫学的手法及び遺伝学的手法を用いて各組織における ABCG2 の発現及びその局在を同定する。

(2) 野生型マウス及び ABCG2 ノックアウトマウスに対し、大動脈縮窄術による圧負荷心肥大や、ワイヤー障害、カフ留置、下肢動脈結紮などによる動脈硬化性病変や下肢虚血を誘発し、その組織学的変化の違いを検討するとともに、酸化ストレスや血管新生などの炎症に関連するマーカーの発現の違いを詳細に検討し、ABCG2 発現が心血管病に与える影響を確認するとともに、その生理的役割及び機能を推測する。

(3) *in vivo* 実験で得られた仮説をもとに、ABCG2 を発現している細胞を詳細に検討し、ABCG2 の生理機能を *in vitro* 実験にて検証していく。さらに、様々な分子生物学的手法を用いて、ABCG2 の発現調節メカニズムやトランスポーター活性制御メカニズムを明らかにしていく。また、ABCG2 の新たな基質の同定を試みる。

### 4. 研究成果

(1) まず、圧負荷心肥大における ABC トランスポーター ABCG2 の役割について検討を行った。

免疫組織染色にて ABCG2 が主に心臓の微小血管内皮細胞に発現していることを確認した。野生型マウス及び ABCG2 ノックアウトマウス(KO マウス)に圧負荷心肥大を誘導する

と、KO マウスでは心肥大及び心リモデリングの増悪を認めた他、圧負荷後早期の心組織における酸化ストレスの増悪を認めた。KO マウスの表現型における酸化ストレスの重要性を評価するために、抗酸化剤をマウスに投与した上で圧負荷心肥大を誘導すると、抗酸化剤の投与により、KO マウスにおける心筋細胞肥大及び心線維化は野生型マウスと同等にまで改善したため、KO マウスの表現型には酸化ストレスが重要な役割を果たしていることが分かった。圧負荷後の酸化ストレス産生系及び応答系遺伝子の発現を評価すると、酸化ストレス産生系遺伝子の発現は野生型マウスと KO マウスとで差を認めなかったが、酸化ストレス応答系遺伝子の発現は KO マウスで亢進しており、KO マウスにおける酸化ストレス応答系の機能障害の存在が疑われた。さらに、酸化ストレス応答系の評価から、内因性抗酸化物質であるグルタチオンが ABCG2 の機能発現に関与している可能性が示唆された。ヒト心臓由来微小血管内皮細胞を用いた細胞実験では、ABCG2 が血管内皮細胞からのグルタチオン輸送を制御していることが分かった。さらに、血管内皮細胞の条件培地での単離心筋細胞の培養実験により、ABCG2 によるグルタチオン輸送が酸化ストレスにより誘導される心肥大の抑制に重要な役割を果たすことが分かった。

以上から、心臓における酸化ストレス応答には、血管内皮細胞が重要な役割を果たしていることが分かった。そして、その機能を制御している ABCG2 は心肥大の新たな治療標的となりうることが示唆される。

(2) 次に、血管病における ABCG2 の役割について、マウスの下肢虚血モデル、ワイヤー障害モデル、カフ留置モデルを用いて検討を行った。マウスの下肢虚血モデルでは、血管新生において野生型マウスと KO マウスとの間に差を認めなかった。しかし、ワイヤー障害モデルやカフ留置モデルでは、野生型マウスと比較して KO マウスで動脈硬化が抑制された。そのメカニズムに関しては、ABCG2 が動脈壁に存在する組織幹細胞の機能を制御している可能性を示唆する結果を得た。今後、その詳細なメカニズムや病態生理における役割の解明が必要である。

(3) 以上の結果から、ABCG2 は心臓及び血管における病的刺激に対する応答に重要な役割を果たしており、心血管病の病態生理に深く関与していることが分かった。

#### 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1件)

(1) Higashikuni Y, Sainz J, Nakamura K, Takaoka M, Enomoto S, Iwata H, Tanaka K, Sahara M, Hirata Y, Nagai R, Sata M. The ATP-binding cassette transporter ABCG2 protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure by promoting angiogenesis and antioxidant response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:654-61.

〔学会発表〕(計5件)

① Higashikuni Y, Nagai R, Sata M. The ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2 Protects Against Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Heart Failure by Promoting Angiogenesis and Antioxidant Response. American Heart Association, Scientific Sessions, Orlando, USA, 2011.

② Higashikuni Y, Ryoza Nagai, Sata M. The ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2 Protects against Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Heart Failure via Regulation of Antioxidant Response. 第76回日本循環器学会学術集会, 福岡, 2012.

③ 東邦康智, 永井良三, 佐田政隆. 心臓での酸化ストレス応答におけるABCトランスポーターABCG2の役割. 第15回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 大阪, 2011.

④ Higashikuni Y, Nagai R, Sata M. The Role of the ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2 in Antioxidant Response in the Heart. 第28回ISHR日本部会総会, 東京, 2011.

⑤ 東邦康智, 永井良三, 佐田政隆. 心臓での酸化ストレス応答における血管内皮細胞の役割. 第8回宮崎サイエンスキャンプ, 宮崎, 2012.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東邦 康智 (HIGASHIKUNI YASUTOMI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：10586481

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：