

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20日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2013

課題番号：23790860

研究課題名（和文） 心筋症の新たな重症化因子としての apoE の役割の解明

研究課題名（英文） Identification of the apoE for aggravation factor in cardiomyopathy

研究代表者

新井 しのぶ (Arai Shinobu)

九州大学・医学研究院・非常勤研究員

研究者番号：30529970

研究成果の概要（和文）：

日本人の死因のなかで、心疾患はガンに続き2位と大きな割合を占め、中でも心不全はあらゆる心疾患の終末像として極め予後不良である。その重症度の違いは著しく、その重症化に至る因子は未だに解明されていない。心筋症に対して、遺伝子改変動物を用いた研究は急速な進展をもたらし、様々な遺伝子改変による心不全モデル動物も存在するが、実際の臨床で一次的なそれらの個々の遺伝子異常の関与が高くないことも良く知られた事実である。我々は心筋症の新たな重症化因子の特定を目指し、心不全患者の心筋組織内の網羅的遺伝子発現解析を行った。過去の研究と比較し、本研究では重症度と遺伝子発現の相関関係をより詳細に解析するために、心機能マーカーBNPが11-8091 pg/ml、左室駆出率が12-79%と、重症度の異なる多様な心疾患患者36名を対象とした。その結果、左室駆出率の低下、左室の拡大とともに発現が有意に亢進する遺伝子($p < 0.01$, ratio > 1.8)は17 genesあり、BNPや心筋線維化に関与するCTGFをはじめ、既知の遺伝子が含まれていた。それに対し、発現が有意に減少する遺伝子 ($p < 0.01$, ratio < -1.8)は13 genesで、心不全との関連が報告されている遺伝子を認めなかった。一方で、これらの遺伝子の中には、その発現の程度が極めて左室駆出率と良好な相関関係を示すものを含んでいた。これらの結果より、心不全モデルマウスであるtroponin T mutant mouseおよびC2C12細胞を用いた、より詳細な解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Cardiovascular disease is the number 2 cause of death, according to cancer in JAPAN. Cardiac failure has a poor prognosis as ending point of various cardiac disease. The cardiac disease severity in each patients show remarkable differences, however the causes led to sever still unclear. Transgenic mouse techniques have made significant progress for cardiomyopathy, so many cardiac failure model mice were established. On the other hand, these candidate genes could not be the definitive etiology in practical clinical of cardiac cardiomyopathy. To identify the definitive etiology of sever cardiomyopathy, we analyzed the DNA microarray analysis of cardiac muscle obtained from cardiac failure patients. In this study, to reveal the distinct factor of severity, 36 subjectes with different severity grades of cardiac failure were elected (myocardial stress marker BNP 11-8091 pg/ml, left ventricular ejection fraction LVEF 12-79%). In this results, 17 statistically significant increased genes ($p < 0.01$,

ratio > 1.8) were detected in patients decreased LVEF and developed left ventricular dilatation. 17 genes include BNP and fibrosis genes (CTGF, collagen genes and so on). On the other hand, 13 statistically significant increased genes (p<0.01, ratio < -1.8) were detected. These genes have not been focused on relation with cardiac disease until now, however, these shown an excellent correlation with LVEF. We will reports the DNA microarray results of cardiomyopathy patients and the possibility of newly factor as cardiac severity.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：心筋症、遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

心不全は、あらゆる心疾患の週末像として依然予後不良であるが、同じ基礎心疾患や心筋症の中でも、重症度の違いは著しく、その個体差の主たる原因は不明である。心機能障害では心筋細胞のミトコンドリア機能不全が原因の一つであることが知られている。心筋内ミトコンドリアで生成された ATP 量は他の組織に比べて高く、生理的条件下では運動負荷や絶食によって左右されず一定に保たれている。しかし、不全心筋でのミトコンドリア電子伝達系では、ミトコンドリア機能不全によって産生された活性酸素が、心筋細胞のミトコンドリア（特にミトコンドリア DNA(mtDNA)）をターゲットとして、その損傷を引き起こし、さらなる悪循環を生じさせる (Ide T, et al, Circ Res. 2001)。これらのミトコンドリア機能不全と活性酸素により、不全心筋細胞において ATP の枯渇、リモデリングの進行、アポトーシスが惹起されることが想定される。

2. 研究の目的

心不全はその臨床像として、運動耐容能が保たれた軽症例から移植が必要な重症例まで幅広く存在するが、その重症度を規定する因子については未だ不明である。申請者らは、様々な重症度の心不全患者の心筋組織を用いて行った網羅的遺伝子発現解析の結果と、臨床像からの多角的な重症度を比較し、apoE 遺伝子の発現がその重症度と極めて良好に相関することが明らかとなった。apoE の細胞内での役割、とくにミトコンドリア機能不全を来す機序を、細胞レベルおよびトランスジェニックマウスを用いて明らかにし、患者

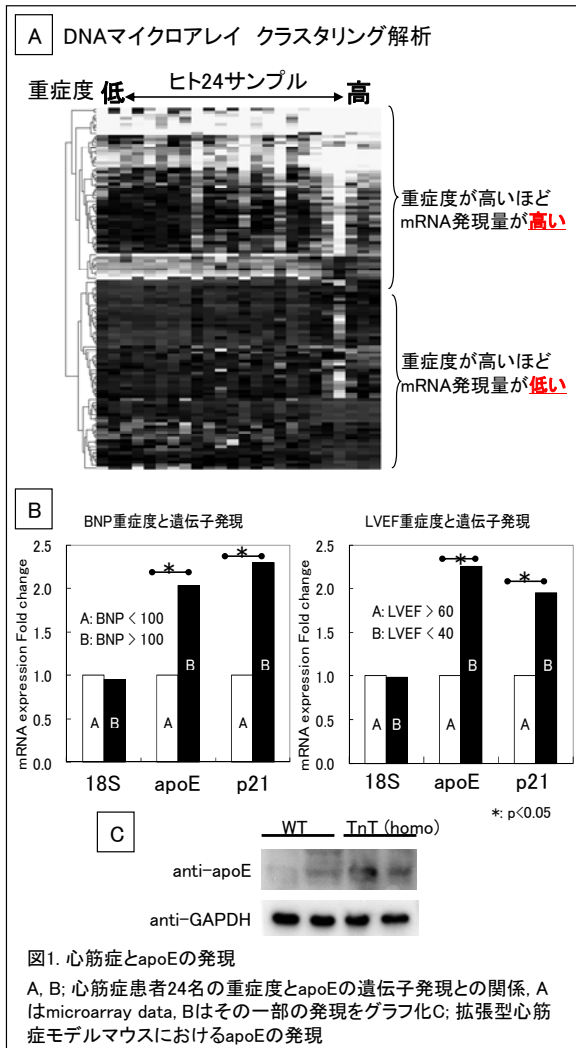
遺伝子多型の関与について明らかにする。これにより apoE を心不全の予後予測因子の確立、新たな治療ターゲットとして、特に現在根本的治療が難しいとされている心筋症への新規治療法の発展を期待する。

3. 研究の方法

(1) 心機能の重症化とともに心筋細胞で発現活性化した apoE の細胞内での役割
 (2) ヒトの心機能の重症度と apoE 遺伝子型との関係
 (3) E3, E4 の心筋特異的過剰発現マウスの発現型を解析することで、apoE の心不全重症化 modifier としての役割を明らかにする。これらについて、マウスを用いた基礎分子細胞学研究と、ヒト遺伝子配列解析による臨床研究の両面から行うことで、『心機能不全の重症化における apoE 関与』の全容を明らかにする。

4. 研究成果

我々は、心筋症患者の心筋組織における遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析し、apoE が心筋症の重症度に非常に相関することを突き止めた(図 1)。apoE の機能は、コレステロールや脂肪運搬、さらに細胞内抗酸化作用にいたるまで、詳細に研究されている。本研究では、心筋細胞での酸化ストレスを apoE が制御することで、心筋症の重症化に関与しているという仮説を立て、まず apoE の抗酸化作用に影響を及ぼす遺伝型解析を行った。その結果心筋症の重症度と apoE の遺伝型には相関が見られなかった。心筋症の発症



および重症化に関与する遺伝子は、Troponin T やジストロフィンなどが既に報告されているが、実際の発症患者においてそれらの遺伝子異常は全ての患者に当てはまらないのが現状である。本研究においても apoE の遺伝型で心筋症の重症度を説明できなかった(図 2)。

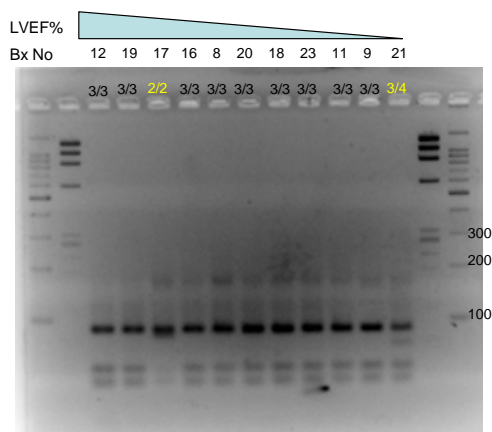


図2. apoE遺伝型と重症度との関係

そこでヒトの臨床に近い心不全モデルマウスを開発することが、apoE の心筋症での動態を正確に解析することが出来ると判断し、遺伝子マイクロアレイで発現変動していた他の因子も視野に入れた細胞内動態の解析を行うことにした。

DNA マイクロアレイを再解析した結果、機能未知である DHR57C が、心筋症重症度に相関していること、また細胞内局在および心筋組織での特異的発現から、apoE と同様に心筋細胞の恒常性に関与している可能性が示唆された。そこで、この機能未知デヒドロゲナーゼである DHR57C の心筋細胞での機能との関係を研究した。その結果、DHR57C が筋小胞に局在し、また細胞骨格の安定化に関与している可能性が示唆された。さらに、DHR57C トランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスを作成が完了しており、よりヒトの臨床に近い心筋症モデルマウスの解析を行っている。現在までに、心不全病態における心筋組織内で発現変動した遺伝子が、直接的に心不全の重症化に関与していることが示唆された。今後は、DHR57C の TG および KO マウスでより臨床に近い心不全モデルマウスの作成を進め、apoE のもつ抗酸化作用がどのように心不全に影響を及ぼすのかを解析していく。

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)

[学会発表] (計 3 件)

1. Shinobu Arai, Tomomi Ide, Masataka Ikeda, Kenji Sunagawa. Identification of the factors associated with structural remodeling of ventricle in cardiomyopathy. (2012) 第 35 回日本分子生物学会年会
2. Onitsuka, K., et. al. (他 13 名, Arai S. (3 番目)) Isolated Pure Systolic Stress Upregulates Hypertrophy-related Genes, Whereas Isolated Diastolic Strain Upregulates Fibrosis-related Genes. Circulation J. 2012, PJ-322. (査読あり)
3. Ide, T., Arai, S., Higo, T., Sunagawa, T. Standard Tapering Regime of Steroid Therapy for Cardiac Sarcoidosis Causes Further LV Dysfunction. Circulation J. 2011, OE-174. (査読あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 しのぶ (Arai Shinobu)

九州大学・医学研究院・非常勤研究員

研究者番号：30529970