

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390200

研究課題名(和文)自律神経による心機能制御の分子メカニズム

研究課題名(英文)Molecular regulation of cardiac function by the automatic nervous system

研究代表者

石川 義弘 (ISHIKAWA, Yoshihiro)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40305470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：カテコラミンの標的酵素であるアデニル酸シクラーゼは、細胞内cAMPを産生する。このセカンドメッセンジャーは、古典的にはPKAを活性化させるが、近年では、新規G蛋白調節因子であるEpacが第二の標的因子として注目を集めている。そこで、このEpacの役割を、古典的な第一因子であるPKAと比較しながら、心筋細胞におけるcAMPシグナルネットワークの構成因子として、心機能の調節と心不全発症の観点から、他の液性因子とともに網羅的に検討した。本研究によってcAMPシグナルネットワークの心臓における役割を最新の知見として明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Adenylyl cyclase is a target enzyme of catecholamine signal, which produces cAMP in the cell. This second messenger classically is known to activate protein kinase A, which is known as cAMP-dependent kinase. Recently, however, a second target enzyme, known as "Epac", has been widely recognized. This enzyme is distinct from the classic PKA and is known to regulate the activity of various small G proteins. In this study, we compared the role of Epac with that of PKA, in order to understand the cAMP signal network. We particularly carefully examined it from the stand point of the regulation of cardiac function and the development of pathophysiology. This study, accordingly, successfully prevailed new mechanisms of cAMP signaling in the heart.

研究分野：循環制御医学

キーワード：交感神経 セカンドメッセンジャー 心臓 機能制御

1. 研究開始当初の背景

心機能制御の中心は交感神経であり、カテコラミン受容体刺激による心筋細胞内 cAMP の産生は、cAMP 依存性キナーゼである PKA を活性化し、フォスホランパンなどのカルシウム・収縮関連蛋白のリン酸化を促し、心臓の変時性・変力性を増強することは古典的な制御メカニズムとして知られている。アデニル酸シクラーゼは9種のサブタイプを持ち、カテコラミン受容体刺激を受けて cAMP を産生する。申請者の発見した5および6型は心臓型サブタイプを形成するとともに心機能に重要な役割を果たす (*J Pharmacol Sci* 2009; *Circ J* 2011; *Am J Physiol* 2013; *Pharmacol Rev* 2013 など申請者による総説参照)。ところが近年の報告によれば、cAMP シグナルの下流には古典的な PKA 以外に Epac と呼ばれる分子があり、Rap を中心とした低分子 G 蛋白による細胞機能制御に重要な役割を果たすことが知られており、心機能制御を担う。cAMP が活性化するリン酸化酵素が PKA ならば、cAMP で活性化される G 蛋白調節因子が Epac といえる。

2. 研究の目的

cAMP の主要な標的酵素は過去 30 年間にわたって PKA のみと信じられてきたが、近年になって PKA と独立して直接活性化される GTP 交換調節因子 (Epac) が発見され、大きな話題となっている。Epac には2つのサブタイプ (Epac1 および Epac2) が同定されており、今まで PKA では説明困難であった cAMP シグナルのかなりの部分が Epac によるものである。

我々は培養細胞において、同じ cAMP の下流にありながら Epac の果たす役割は PKA とは大きく異なること、さらに個体レベルでの調節も異なることを、すでに多数の学術誌に発表してきた (*J Clin Invest* 2006, *Am J Physiol* 2007 & 2008, *J Biol Chem* 2010 など)。この両サブタイプに対して心臓特異的過大発現マウスおよび欠損マウスを作製し、心機能変化、および各種ストレスに対する反応性を検討した (*J Biol Chem* 2010)。この結果から cAMP シグナルによる調節の全く新しい概念が生まれつつある。たとえば、古典的に cAMP シグナルは神経細胞では保護的に、心筋細胞では非保護的に作用することが知られるがメカニズムは不明であったが、これは Epac 発現が原因であった (*J Biol Chem* 2010)。また心臓

におけるストレス反応性にも重要な役割を果たすことがも最近の研究報告で証明することができた (*J Clin Invest* 2014)。

本申請の基本目的は、心臓の cAMP シグナルの意義を検討することであり、これまで研究してきた受容体・G 蛋白・心臓型アデニル酸シクラーゼサブタイプの知見を発展させ、その下流の Epac の役割を含めて検討していく。とりわけ我々が開発した G 蛋白やアデニル酸シクラーゼ遺伝子操作動物に加えて、Epac 遺伝子操作マウスにおける心機能変化をサブタイプに関して網羅的に解明し、これまで PKA 単独では説明が困難であった cAMP シグナルの分子メカニズムを明らかにしていくことが期間内の到達目標である。

3. 研究の方法

70年代のKatzらの走駆的な研究によって、カテコラミン刺激は PKA の活性化をおこし、フォスホランパンのリン酸化を起こすことによって心筋機能が制御されることが教科書的な定説となっている。つまり PKA によるフォスホランパンのリン酸化と、引き続き心筋細胞内のカルシウム調節の亢進がおこる。

ところが Epac1 欠損動物では、1) 軽度の心機能低下がみられること、2) フォスホランパンのリン酸化の低下がみられること、が明らかにされた。これは Katz のシグナル系において、PKA だけでなく Epac も重要な役割を果たすことを意味する。ところが Epac1 欠損動物では 3) 慢性カテコラミンストレスや圧負荷ストレス、さらに加齢変化による心不全の発症も低いことが分かった (*J Clin Invest* 2014)。この所見は、むしろ心臓型アデニル酸シクラーゼの欠損モデル (AC5) に酷似する。

そこで我々は、心不全のように慢性的にカテコラミン刺激が亢進した状態では、心筋細胞内の cAMP シグナルが過剰亢進し、AC5 との共役を通じて Epac が活性化される。これは他の AC サブタイプとの共役に優先して起こると考えている。活性化された AC5-Epac 系シグナルは細胞内酸化ストレス反応を惹起し、ROS の産生を亢進させる。慢性期には心筋細胞内カルシウム濃度の上昇とともに、不整脈、細胞死と心機能低下を引き起こすと考えている。

本申請では SOD をはじめとした Epac による心筋細胞内酸化ストレスの変化を検討するとともに、加齢モデルや酸化ストレスマウスモデルにおいて、Epac による ROS 産生、心

機能変化の分子メカニズムの解明を行う。とりわけカテコラミン誘発性の ROS 産生にも Epac が重要な役割を果たすと考えており、これが固体の生存性（長寿性）にも重要な役割を果たすと考える。AC5 を心臓選択的に過大発現させたモデル(AC5TG)においては、各種心臓ストレスによる心機能低下の増悪がみられており、我々はこの増悪ストレスが、Epac 欠損によって不活化できると考えており AC5TG/EpacK0 マウスモデルによる検討による解明を進めた。

4. 研究成果

AC5TG/EpacK0 マウスモデルによる検討による解明を進めた結果、AC5TG においてみられる心不全の発生と心筋細胞死は、カテコラミンストレス時の心筋細胞の変化に一致した。さらにペーシング刺激によって心房細動を引き起こした AC5TG の心臓においては、不整脈の発生が顕著に増加していた。これらの悪性所見は、いずれも EpacK0 と掛け合わせることで、消失乃至減弱することがわかった。

これらの発見から、AC5 の特徴的なシグナルの下流の標的酵素として Epac が作用している可能性が強く示唆された。このことは、将来の薬物治療の標的として、AC5 だけでなく、Epac 自体を想定することが可能であると考えられる。本研究成果は Biochem Biophys Res Commun. 2016 Jun 17;475(1):1-7 として発表された。

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 14 件)

Cai W, Fujita T, Hidaka Y, Jin H, Suita K, Liang C, Prajapati R, Masanari Umemura M, Yokoyama U, Sato M, Okumura S and Ishikawa Y: Disruption of Epac1 protects the heart from adenylyl cyclase type 5-mediated cardiac dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458(3):531-5, 2016 (査読有)
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.123.

Kamide T, Okumura S, Ghosh S, Shinoda Y, Mototani Y, Ohnuki Y, Jin H, Cai W, Suita K, Sato I, Umemura M, Fujita T, Yokoyama U, Sato M, Frutani K, Kitano H, and Ishikawa Y: Oscillation of cAMP and Ca²⁺ in cardiac myocytes: a systems biology approach. *Sci.* 65:95-200, 2015 (査読有)
doi: 10.1007/s12576-014-0354-3.

Tsunematsu T, Okumura S, Mototani Y,

Ohnuki Y, Jin H, Cai W, Suita K, Sato I, Umemura M, Yokoyama U, Sato M, Fujita T, and Ishikawa Y: Coupling of beta1-adrenergic receptor to type 5 adenylyl cyclase and its physiological relevance in cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458(3):531-535, 2015 (査読有)
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.149.

Suita K, Fujita T, Hasegawa N, Cai W, Jin H, Hidaka Y, Prajapati R, Umemura M, Yokoyama U, Sato M, Okumura S, and Ishikawa Y: Norepinephrine-Induced Adrenergic Activation Strikingly Increased the Atrial Fibrillation Duration through 1- and 1-Adrenergic Receptor-Mediated Signaling in Mice. *PLoS One.* 0(7):e0133664. 2015 (査読有)
doi:10.1371/journal.pone.0133664.
eCollection 2015.

Okumura S, Fujita T, Cai W, Jin M, Namekata I, Mototani Y, Jin HL, 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, and Ishikawa Y: Disruption of Epac 1 decrease-sphosphorylation of phospholamban and protects the heart against stresses. *J. Clin. Invest.* 124:2785-2801, 2014 (査読有) doi: 10.1172/JCI164784.

Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, Sakima M, Mamun, AA, Yamane Y, Fujita T, Yokoyama U, Okumura S, and Ishikawa Y: Protection of cardiomyocytes from the hypoxia-mediated injury by a peptide targeting the activator of G-protein signaling 8. *PLoS One.* ;e91980, 2014 (査読有)
doi: 10.1371/journal.pone.0091980.
eCollection 2014.

Ohnuki Y, Umeki D, Mototani Y, Jin H, Cai W, Shiozawa K, Suita K, Saeki Y, Fujita T, Ishikawa Y, and Okumura S: Role of Cyclic AMP Sensor Epac1 in Masseter Muscle Hypertrophy and Myosin Heavy Chain Transition Induced by 2-Adrenoceptor Stimulation. *J. Physiol.* 592(Pt24); 5461-5475, 2014, (査読有)
doi: 10.1113/jphysiol.2014.282996.

Yokoyama U, Iwatsubo K, Umemura M, Fujita T, and Ishikawa Y: The prostanoid EP4 receptor and its signaling pathway. *Pharmacol. Rev.* 65:1010-1052, 2013 (査読有)

doi: 10.1124/pr.112.007195.

Lai L, Yan L, Gao S, Hu CL, Hui G, Davidow A, Park M, Bravo C, Iwatsubo K, Ishikawa Y, Auwerx, J, Sinclair D, Vatner SF, and Vatner DE: Type Type 5 Adenylyl Cyclase Increases Oxidative Stress by Transcriptional Regulation of MnSOD via the Sirt1/FoxO3a Pathway. *Circulation*. 127(16);1692-1701, 2013 (査読有)
doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001212.

Eijkelkamp N, Linley JE, Torres JM, Bee L, Dickenson AH, Gringhuis M, Minett MS, Hong GS, Lee E, Oh U, Ishikawa Y, Zwartkuis FJ, Cox JJ, and Wood, JN: A role for Piezo2 in EPAC1-dependent mechanical allodynia. *Nature Commun*. 4;1682, 2013 (査読有)
doi: 10.1038/ncomms2673.

Wang H, Heijnen CJ, van Velthoven CTJ, Willemens HLD, Ishikawa Y, Zhang X, Sood AK, Vroon A, Eijkelkamp N, and Kavelaars A: Balancing GRK2/ Epac1 levels prevents and relieves chronic pain. *J. Clin. Invest*. 123;5023-5034, 2013 (査読有)
doi: 10.1172/JCI66241.

Vatner SF, Park M, Yan L, Lee G, Lai L, Iwatsubo K, Ishikawa Y, Pessin J, and Vatner DE: Adenylyl cyclase type 5 in cardiac disease, metabolism and aging, Adenylyl Cyclase Type 5 in Cardiac Disease, Metabolism and Aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 305;1-8, 2013 (査読有)
doi: 10.1152/ajpheart.00080.2013.

Iwatsubo K, Bravo C, Uechi M, Baljinyam E, Nakamura T, Umemura M, Lai L, Gao S, Yan L, Park M, Qiu H, Okumura S, Iwatsubo M, Vatner DE, Vatner SF, and Ishikawa Y: Prevention of heart failure in mice by an antiviral agent that inhibits type 5 cardiac adenylyl cyclase. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol*. 15;302(12);H2622-2628, 2012 (査読有)
doi: 10.1152/ajpheart.00190.2012.

Bai Y, Tsunematsu T, Jiao Q, Jin M, Cai W, Kurotani R, Yokoyama U, Sato M, Iwatsubo K, Ishikawa Y, and Okumura S: Pharmacological stimulation of type 5 adenylyl cyclase stabilizes heart rate under both micro-gravity and hyper-gravity induced by parabolic flight. *J Pharmacol Sci*. 119(4);381-389, 2012. (査読有)

doi:10.1254/jphs.12102FP

[学会発表](計 21 件)

長谷川希望, 藤田孝之, 吹田憲治, 蔡文情, 金慧玲, 日高祐子, Rajesh Prajapati, 石川義弘: 交感神経活性化による心房細動/心房粗動の延長におけるアドレナリン受容体の役割. 第 36 回循環制御医学会総会, ウィンク愛知(愛知県名古屋), 2015 年 6 月 5 日-6 日

Cai W, Fujita T, Hidaka Y, Jin H, Hasegawa N, Ishikawa Y: Cardiac overexpression of Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) prevents the development of Dihydroartemisinin (DHA)-induced heart failure. The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 大阪国際会議場, リーガロイヤルホテル大阪・堂島リバーフォーラム・A B C ホール(大阪府大阪市), 2015 年 4 月 24 日-26 日

吹田憲治, 藤田孝之, 奥村 敏, 石川義弘: 抗ヘルペス薬による心房細動抑制. 第 131 回日本薬理学会関東部会, 横浜市立大学(神奈川県横浜市), 2014 年 10 月 11 日

Suita K, Fujita T, Cai W, Hidaka Y, Jin H, Jin M, Okumura S, Ishikawa Y: idarabine, an anti-herpesvirus agent, prevents catecholamine-induced atrial fibrillation in mice. European Society of Cardiology Congress, Barcelona(Spain), 2014 年 8 月 30 日-9 月 3 日

Cai W, Fujita T, Hidaka Y, Jin H, K. Sagara S, Kubota K, Suita K, Ishikawa Y: Cardiac overexpression of ure. Chronic Treatment with Dihydroartemisinin, a TCTP Down-regulating Agent, Results in Cardiac Dysfunction in Mice. European Society of Cardiology Congress, Barcelona(Spain), 2014 年 8 月 30 日-9 月 3 日

Jin H, Fujita T, Cai W, Hidaka Y, Sagara S, Kubota K, Suita K, Ishikawa Y: EPAC1 plays an important role in regulation of renin and AQP2 expression in the kidney of mice. European Society of Cardiology Congress, Barcelona (Spain), 2014 年 8 月 30 日-9 月 3 日

吹田憲治, 藤田孝之, 蔡文情, 金慧玲, 奥村 敏, 石川義弘: 心臓型アデニル酸シクラーゼの選択的阻害剤ビダラビによる心房細動抑制. 第 35 回日本循環

御医学会総会,九州大学医学部百年講堂,
(福岡県福岡市),2014年7月4日-5日

Jin H, Fujita T, Cai W, Hidaka Y, Sagara S, Suita K, Ishikawa Y: 体液量調節における EPAC1 の役割についての検討. 第 57 回腎臓学会学術総会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2014 年 7 月 4 日-6 日

Suita K, Fujita T, Jin H, Cai W, Okumura S, Ishikawa Y: Vidarabine, a selective cardiac adenylyl cyclase inhibitor, prevents ventricular arrhythmias in Calsequestrin 2 knockout mice. 第 91 回日本生理学会大会, 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県鹿児島市), 2014 年 3 月 16 日-18 日

Suita K, Cai W, Jin H, Jin M, Fujita T, Okumura S, Ishikawa Y: Vidarabine, an anti-herpesvirus agent, attenuates Ca²⁺ leak from sarcoplasmic reticulum in cardiomyocytes and prevents atrial fibrillation in mice. 第 78 回日本循環器学会学術集会, 東京国際フォーラム・JP タワー・東京商工会議所 (東京都), 2014 年 3 月 21 日-23 日

Cai W, Fujita T, Hidaka Y, Jin H, Ishikawa Y: Doxorubicin-induced Down-regulation Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) is an Important Mechanism in the Development of Heart Failure. 第 78 回日本循環器学会学術集会, 東京国際フォーラム・JP タワー・東京商工会議所 (東京都), 2014 年 3 月 21 日-23 日

吹田憲治, 藤田孝之, 石川義弘: 心臓アデニル酸シクラーゼの選択的阻害剤ピダラピンによる不整脈治療の可能性. 生理学研究所研究会, 心血管膜輸送分子の構造・機能・病態の統合的研究戦略, 自然科学研究機構 生理学研究所 (愛知県岡崎市), 2013 年 11 月 27 日-28 日

Fujita T, Cai W, Hidaka Y, Jin H, Jin M, Suita K, Ishikawa Y: Cardiac overexpression of Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) prevents the development of doxorubicin-induced heart failure. European Society of Cardiology, Amsterdam (Netherlands), 2013.8.30-9.4

Suita K, Cai W, Jin H, Jin M, Fujita T, Okumura S, Ishikawa Y: Inhibitor of cardiac adenylyl cyclase prevents atrial fibrillation in mice. HD Physiology, the

2nd International Symposium, 丸ノ内 MYPLAZA, (東京都), 2013 年 6 月 28-29 日

Kamide T, Sato M, Ishikawa Y: Oscillation model of Ca and cAMP in cardiac myocytes. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, タワーホール船堀 (東京都), 2013 年 3 月 27 日-29 日

Jin H, Okumura S, Jin M, Cai W, Suita K, Bai Y, Tsunematsu T, Fujita T, Ishikawa Y: Pharmacological inhibition of STAT3 protect heart from lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction through the inhibition of Jak2/STAT3/iNOS signaling. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Tokyo, タワーホール船堀 (東京都), 2013 年 3 月 27 日-29 日

Cai W, Okumura S, Fujita T, Jin M, Suita K, Jin H, Hidaka Y, Ishikawa Y: Epac1 pathway plays an important role for the development of heart failure through the activation cAMP. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, タワーホール船堀 (東京都), 2013 年 3 月 27 日-29 日

Suita K, Cai W, Jin H, Jin M, Fujita T, Okumura S, Ishikawa Y: Vidarabine, an anti-herpesvirus agent, prevents atrial fibrillation in mice. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Tokyo, タワーホール船堀 (東京都), 2013 年 3 月 27 日-29 日

Fujita S, Yokoyama U, Nagao K, Jinzu H, Aoki R, Ichikawa Y, Iwasaki S, Nishimaki S, Seki K, Yokota S, Ishikawa Y: Aspartic acid promotes closure of the rat ductus arteriosus. The 90th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Tokyo, タワーホール船堀 (東京都), 2013 年 3 月 27 日-29 日

Jin MH, Yokoyama U, Ishiwata R, Minamisawa S, Ishikawa Y. Oxygenation-induced postnatal remodeling of the ductus arteriosus. The 86th American Heart Association Scientific Sessions, Los Angeles (USA), 2012, 11.3-11.7

②Okumura S, Jin M, Ohnuki Y, Namekata I, Kurotani R, Fujita T, Jin HL, Cai W, Bai Y, Suita K, Tsunematsu T, Tanaka H, Ishikawa Y: Disruption of Epac1 decreases phosphorylation of phospholamban and protects the heart against stress. The 86th

American Heart Association Scientific Sessions, Los Angeles, (USA), 2012.11.3-11.7

〔図書〕(計4件)

Yokoyama U, Ishiwata R, Ishikawa Y. Springer. 「Bioactive Lipid Mediators」 2015年, 426ページ

岡野栄之、鯉淵典之、植村慶一 監訳 丸善出版社. 「オックスフォード・生理学原書4版」2015年, 896ページ

石川義弘 医学書院「標準生理学第8版」 「赤血球」2014年, 1140ページ

石川義弘 医学書院「標準生理学第8版」 「局所循環」2014年, 1140ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計6件)

名称: 動脈硬化を検出するための血中バイオマーカー

発明者: 横山詩子、石川義弘、荒川憲昭
増田 宗孝、石上友章、鈴木伸一
大竹則久

権利者: 公立大学法人横浜市立大学
東ソー株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2016-026494

出願年月日: 2016年2月16日

国内外の別: 国内

名称: 非解離性大動脈瘤の疾患活動性の判定方法

発明者: 横山詩子、石川義弘、荒川憲昭、
吉村耕一

権利者: 公立大学法人横浜市立大学
国立大学法人山口大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-105191

出願年月日: 2015年5月25日

国内外の別: 国内

名称: 三次元細胞集合体の作製方法

発明者: 横山詩子、石川義弘 金子 真、
佐久間臣耶、新井史人

権利者: 公立大学法人横浜市立大学
国立大学法人大阪大学
国立大学法人名古屋大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/077447

出願年月日: 2015年2月23日

国内外の別: 国外

名称: グルタミン酸による動脈管開存症の予防又は治療

発明者: 横山詩子、石川義弘、藤田秀次郎
権利者: 公立大学法人横浜市立大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-507411

出願年月日: 2015年2月17日

国内外の別: 国内

名称: 三次元組織体及びその製造方法

発明者: 横山詩子、石川義弘、明石 満
松崎 典弥

権利者: 公立大学法人横浜市立大学
国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: 15/028,204

出願年月日: 2014年10月9日

国内外の別: 国外

名称: 三次元組織体及びその製造方法

発明者: 横山詩子、石川義弘、明石 満
松崎 典弥

権利者: 公立大学法人横浜市立大学
国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-541635

出願年月日: 2014年10月9日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 義弘 (ISHIKAWA, Yoshihiro)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 40305470

(2) 研究分担者

梅村 将就 (UMEMURA, Masanari)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号: 50595353

(3) 連携研究者

なし