

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790791

研究課題名(和文)肥大型心筋症の発症機序解明と治療法開発に関する基礎研究

研究課題名(英文)Knock-in mouse model of hypertrophic cardiomyopathy caused by troponin T mutation

研究代表者

杜 成坤 (Du, Cheng-Kun)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：90590646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は肥大型心筋症を引き起こす心筋トロポニンT突然変異S179Fを内在性ゲノム遺伝子に導入したノックイン(KI)マウスモデルの作製を行った。心筋スキンドファイバー実験において、このKIマウスのミオフィラメントCa²⁺感受性の増大が確認できた。また、長期観察でおよそ一割が死亡し、その約半分は若年死であることが分かった。心臓病理組織学的所見において、重度の錯綜配列と間質繊維化が示された。心エコーによりKIマウス左心室内腔の縮小を伴う左心室の肥大、心臓カテーテル法により左心室拡張機能障害を認めた。このモデルは臨床患者の表現型をよく再現しており、肥大型心筋症のモデルとして有用であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We created knock-in mice with a missense mutation S179F in cardiac troponin T (cTnT), which had been found to be associated with human hypertrophic cardiomyopathy (HCM). Membrane-permeabilized cardiac muscle fibers from these mice showed significantly higher Ca²⁺ sensitivity in force generation than those from wild-type mice. The knock-in mice suffered from sudden death frequently, and histological examination of cardiac sections showed significant displacement fibrosis, myocardial hypertrophy, and myocyte disarray. Echocardiography showed that left ventricular (LV) end-diastolic dimension was significantly decreased with no changes in ejection fraction. In vivo cardiac catheter measurements showed a significant increase in LVdP/dt_{min} with no changes in LVdP/dt_{max}. These results indicate that the knock-in mouse with S179F mutation in cTnT is a useful mouse model of HCM closely recapitulating the clinical phenotypes of human patients.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肥大型心筋症 ノックインマウス 突然死 心筋トロポニンT 遺伝子変異 カルシウム感受性

1. 研究開始当初の背景

肥大型心筋症 (HCM) は、心室中隔の肥大、心筋細胞の錯綜配列と心室の拡張障害を主徴とし、若年者及びアスリートにおける突然死の主な原因となる。現在のところ 1000 人に 5 人の割合で発症している。

ミオシン重鎖の遺伝子異常が家族性 HCM 患者で発見されて以来、最近 20 年余りの間に 10 種類を超える遺伝子で 400 以上の突然変異が同定されている。HCM では 7 割以上が家族性で、原因遺伝子はすべて心筋細胞内にあって収縮力を発生する装置である筋原線維を構成するサルコメアタンパク質をコードしている。心筋 TnT の突然変異はそのうちの約 2 割を占めている。

2000 年、心筋 TnT における S179F 突然変異が重篤な HCM を引き起こすことが報告された (Carolyn Y. Ho et al Circulation, 2000)。そして、今回、そのミスセンス突然変異 S179F を導入した HCM ノックインマウスモデルを作製し、ヒト HCM の病態発現メカニズムの解明を進め、突然死の有効な予防・治療法の開発に繋げることを計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心筋 TnT 遺伝子の突然変異の一つで、重篤な肥大型心筋症を引き起こすミスセンス S179F を導入したノックインマウスを作製し、ヒトの肥大型心筋症の病態発現メカニズムの解明を進め、突然死の予防・治療法の開発に繋げることである。

3. 研究の方法

(1). ノックインマウスの作製

ジーンターゲティングは心筋 TnT 遺伝子のエクソン 9 と 10 の間に、loxP-neo カセット、エクソン 11 にミューテーション S179F を導入したターゲティングベクターを用いて行

った。適切にターゲットされた ES 細胞クローンの生殖細胞系列への伝達を確認した後、Cre トランスジェニックマウスとの交配によりノックインマウスを得た。

(2). 生体中におけるノックインマウス心臓の機械的・電気的变化を明らかにした。

(3). 摘出心臓の肉眼的および病理組織学的な検討を行った。

(4). 心筋 skinned fiber 標本を用いた生理学的解析：心筋 skinned fiber をノックインマウス心臓左心室乳頭筋から作製し、心筋ミオフィラメントの Ca^{2+} 感受性、単位断面積当りの力発生能等の変化を調べた。

(5). 心臓の生化学的解析

筋小胞体 Ca^{2+} ポンプ、ホスホランパン等細胞内 Ca^{2+} ハンドリングに関与する蛋白質の発現レベル、リン酸化レベル等を調べた。

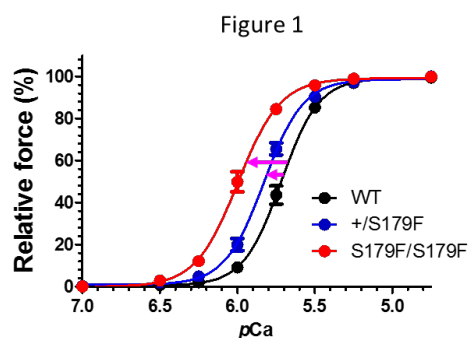
4. 研究成果

(1). 重篤な HCM を引き起こす心筋 TnT 遺伝子突然変異 S179F を ES 細胞に導入し、ES 細胞の胚盤胞へのマイクロインジェクションにより 70%以上のキメラ率を持ったキメラマウスの作成に成功した。得られたキメラマウスから次世代へのジャームライントランスミッションにより、ノックインマウスを得た。長期観察によっておよそ 1 割が死亡し、その半分以上が若年死であることが分かった。

(2). S179F ノックインモデルマウスの心臓組織切片の Azan 染色によってホモマウスでは明らかな間質繊維化が見られ、HE 染色では HCM の重要な特徴の一つである心筋細胞の錯綜配列が観察された。

(3). M-モード心エコーにより、HCM マウスの中隔と左心室壁厚の増加及び左心室拡張末期径と収縮末期径の低下が見られたが、EF は WT とほぼ同じか高い値を示した。心臓カテテルにより左心室 dP/dt を測定した結果、KI マウスの左心室収縮能は WT とほぼ同じであるが、拡張能は低下することが分かった。

(4) 心筋スキンドファイバー実験では、ミュートマウスでは force-pCa relationship (Figure 1)の左方移動から明らかなように、



力発生における Ca^{2+} 感受性の増加がみられた。

(5) ウェスタンブロット解析によって、KI マウスでは心筋細胞内 Ca^{2+} ポンプである SEACA2a の発現レベルは低下し、ホスホランバンのリン酸化レベルも低下していることが明らかになった。

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 7 件)

1. Du CK, Zhan DY, Morimoto S, Akiyama T, Schwenke DO, Hosoda H, Kangawa K Shirai M. Survival benefit of ghrelin in the heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Pharmacol Res Perspect.* 2(5):e00064, Oct, 2014. doi: 10.1002/prp2.64, (査読有).
2. Du CK, Zhan DY, Akiyama T, Sonobe T, Inagaki T, Shirai M. Myocardial interstitial serotonin and its major metabolite, 5-hydroxyindole acetic acid levels determined by

microdialysis technique in rat heart. *Life Sci.* 117(1): 33-9, Nov, 2014. doi: 10.1016/j.lfs.2014.09.019, (査読有).

3. Du CK, Zhan DY, Morimoto S. In vivo effects of propyl gallate, a novel Ca^{2+} sensitizer, in a mouse model of dilated cardiomyopathy caused by cardiac troponin T mutation. *Life Sci.* 109(1):15-9, Jul, 2014. doi: 10.1016/j.lfs.2014.06.004, (査読有).
4. Sonobe T, Akiyama T, Du CK, Zhan DY, Shirai M. Contribution of calpain to myoglobin efflux from cardiomyocytes during ischaemia and after reperfusion in anaesthetized rats. *Acta Physiol (Oxf).* 210(4): 823-31, Apr 2014. doi: 10.1111/apha.12205, (査読有).
5. Zhan DY, Du CK, Akiyama T, Sonobe T, Tsuchimochi H, Shimizu S, Kawada T, Shirai M. In vivo monitoring of acetylcholine release from cardiac vagal nerve endings in anesthetized mice. *Auton Neurosci.* 176(1-2): 91-4, Jun, 2013. doi: 10.1016/j.autneu.2013.02.014, (査読有).
6. Sonobe T, Akiyama T, Du CK, Zhan DY, Shirai M. Contribution of serotonin uptake and degradation to myocardial interstitial serotonin levels during ischaemia- reperfusion in rabbits. *Acta Physiol (Oxf).* 207(2): 260-8, Feb, 2013. doi: 10.1111/j.1748-1716.2012.02461.x, (査読有).
7. Li L, Morimoto S, Take S, Zhan DY, Du CK, Wang YY, Fan XL, Yoshihara T, Takahashi-Yanaga F, Katafuchi T, Sasaguri T. Role of brain serotonin dysfunction in the pathophysiology of congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 53(6): 760-7, Dec, 2012. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.08.006. Epub 2012 Aug 19. (査読有).

[学会発表](計 17 件)

1. Du Cheng-Kun, Zhan DongYun, Morimoto Sachio, Shirai Mikiyasu. Knock-in mouse model of hypertrophic cardiomyopathy caused by troponin T mutation. The 92th annual meeting of the physiological society of Japan. 21-23 March, 2015, Kobe, Japan.

2. Zhan DongYun, Du Cheng-Kun, Morimoto Sachio, Akiyama Tsuyoshi, Schenke Daryl O, Hiroshi Hosoda, Kenji Kangawa Mikiyasu Shirai. Survival benefit of ghrelin in the heart failure due to dilated cardiomyopathy. The 92th annual meeting of the physiological society of Japan. 21-23 March, 2015, Kobe, Japan.
3. Inagaki Tadakatsu, Akiyama Tsuyoshi, Zhan DongYun, Du Cheng-Kun, Shirai Mikiyasu. Role of monoamine oxidase on hydroxyl radical production during ischemia /reperfusion in anesthetized rats. The 92th annual meeting of the physiological society of Japan. 21-23 March, 2015, Kobe, Japan.
4. 杜 成坤、戦 冬雲、森本 幸生、白井 幹康 . 心筋トロポニン T 突然変異による肥大型心筋症ノックインマウスモデル . 2015 年 3 月 18 日 ~ 20 日、名古屋国際会議場 .
5. 戦 冬雲、杜 成坤、秋山 剛、白井 幹康 . 中枢を介した迷走神経活性化による拡張型心筋症治療薬 . 第 88 回日本薬理学会年会 . 2015 年 3 月 18 日 ~ 20 日、名古屋国際会議場 .
6. Cheng-Kun Du, Dong-Yun Zhan, Tsuyoshi Akiyama, Takashi Sonobe, Tadakatsu Inagaki, Mikiyasu Shirai. Myocardial interstitial serotonin and its major metabolite, 5-hydroxyindole acetic acid levels determined by microdialysis technique in in vivo rat heart. Biophysical society 59th annual meeting. Feb. 7~11, 2015. Baltimore, Maryland, USA.
7. Dong-Yun Zhan, Cheng-Kun Du, Sachio Morimoto, Tsuyoshi Akiyama, Daryl O. Schwenke, Hiroshi Hosoda, Kenji Kangawa Mikiyasu Shirai. The treatment benefit of ghrelin on a mouse model of inherited dilated cardiomyopathy caused by troponin mutation. Biophysical society 59th annual meeting. Feb. 7~11, 2015. Baltimore, Maryland, USA.
8. 杜 成坤、戦 冬雲、秋山 剛、稲垣 克薫、白井 幹康 . 虚血/再灌流における心筋間質セロトニンの動態 . 第 87 回日本薬理学会年会 . 2014 年 3 月 19 日 ~ 21 日、仙台 .
9. 戦 冬雲、杜 成坤、秋山 剛、森本 幸生、清水 秀二、川田 徹、白井 幹康 . DCM ノックインマウスにおける心臓迷走神経調節機構 . 第 87 回日本薬理学会年会 . 2014 年 3 月 19 日 ~ 21 日、仙台 .
10. 杜 成坤、戦 冬雲、秋山 剛、稲垣 克薫、白井 幹康 . 虚血/再灌流における心筋間質セロトニンの動態 . 第 91 回日本生理学会年会 . 2014 年 3 月 16 日 ~ 18 日、鹿児島 .
11. 戦 冬雲、杜 成坤、秋山 剛、森本 幸生、清水 秀二、川田 徹、白井 幹康 . DCM ノックインマウスにおける心臓迷走神経調節機構 . 第 91 回日本生理学会年会 . 2014 年 3 月 16 日 ~ 18 日、鹿児島 .
12. 稲垣 克薫、秋山 剛、戦 冬雲、杜 成坤、白井 幹康 . 4-HB を用いた心筋虚血再灌流のヒドロキシラジカル測定 . 第 91 回日本生理学会年会 . 2014 年 3 月 16 日 ~ 18 日、鹿児島 .
13. 杜 成坤、戦 冬雲、森本 幸生、秋山 剛、寒川 賢治、白井 幹康 . 拡張型心筋症ノックインマウスに対するグレリンの治療効果 . 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 . 2013 年 11 月 22 日 ~ 23 日、大阪 .
14. 李 蕾、森本 幸生、武 幸子、戦 冬雲、杜 成坤、王 媛媛、範 雪麗、吉原 達也、高橋 富美、片淵 俊彦、笹栗 俊之 . うっ血性心不全の病態生理学における脳セロトニン機能障害の役割 . 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 . 2013 年 11 月 22 日 ~ 23 日、大阪 .
15. Cheng-Kun Du, Dong-Yun Zhan, Sachio Morimoto, Tsuyoshi Akiyama, Kenji Kangawa, Mikiyasu Shirai. Effects of ghrelin on survival and cardiac remodeling of dilated cardiomyopathy mice with troponin mutation. The 86th annual meeting of the pharmacological society of Japan. March 21-23, 2013, Fukuoka, Japan.
16. Dong-Yun Zhan, Cheng-Kun Du, Tsuyoshi Akiyama, Takashi Sonobe, Mikiyasu Shirai. In vivo monitoring of acetylcholine release from cardiac vagal nerve endings in anesthetized mice. The 86th annual meeting of the pharmacological society of Japan. March 21-23, 2013, Fukuoka, Japan.
17. Lei Li, Sachio Morimoto, Sachiko Take, Dong-Yun Zhan, Cheng-Kun Du, Yuan-Yuan

Wang, Xue-Li Fan, Tatsuya Yoshihara,
Fumi Takahashi-Yanaga, Toshihiko
Katafuchi, Toshiyuki Sasaguri. Role of
brain serotonin dysfunction in the
pathophysiology of congestive heart
failure. The 86th annual meeting of the
pharmacological society of Japan.
March 21-23, 2013, Fukuoka, Japan.

〔研究組織〕

研究代表者

杜 成坤 (Du Cheng-Kun)

国立循環器病研究センター・研究所・研究
員

研究者番号 : 24790791