

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670130

研究課題名(和文)心不全発症におけるGSK-3 を介した心肥大抑制メカニズムの役割の解明

研究課題名(英文)Role of GSK3b-mediated suppression of cardiac hypertrophy in heart failure

研究代表者

森本 幸生 (Morimoto, Sachio)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50202362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：GSK3 は心臓の生理と病理において中心的役割を果たしている。本研究では、GSK3 ヘテロ接合体ノックアウト突然変異 (GSK3 +/- KO)と同時に家族性DCM の遺伝的原因の一つである心筋トロポニンT (cTnT) K210 ノックイン(KI)突然変異を導入したマウスを作成した。GSK3 +/- KO は、DCMマウスにおいて、心不全を伴う左心室収縮機能の低下を抑えるとともに、心拡大、心筋線維化および心筋細胞アポトーシス等の心臓リモデリングを抑えた。本研究の結果は、K210 cTnT 突然変異による家族性DCM においてGSK3 阻害が心臓保護的であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：GSK3 plays a central role in both cardiac physiology and pathology. Herein we generated a mouse model carrying a heterozygous knock-out mutation of GSK3 (GSK3 +/- KO) together with a K210 knock-in mutation in cardiac troponin T (K210 cTnT KI), which was proved to be one of the genetic causes of familial dilated cardiomyopathy (DCM). GSK3 +/- KO prevented the slow and rapid deterioration in left ventricular systolic function accompanying heart failure (HF) in DCM mice with heterozygous and homozygous K210 cTnT KI mutations, respectively. GSK3 +/- KO also prevented cardiac enlargement, myocardial fibrosis and cardiomyocyte apoptosis and markedly reduced the expression of cardiac β -myosin heavy chain isoform, indicative of HF, in DCM mice with homozygous K210 cTnT KI mutation. GSK3 +/- KO also extended the life-span of these DCM mice. This study suggests that the inhibition of GSK3 is cardioprotective in familial DCM associated with K210 cTnT mutation.

研究分野：心臓生理学

キーワード：拡張型心筋症 GSK3 心臓リモデリング 心臓収縮機能 生命予後 心不全 ノックアウトマウス
ノックインマウス

1. 研究開始当初の背景

心血管病による死亡は全世界における死亡の30%を占めており、そのうちの80%は低・中収入国で発生している(24)。うっ血性心不全は、体が要求する血液を心臓が送り出すことができない状態であり、ほとんどの心血管病の最終ステージである。うっ血性心不全のリスクファクターは高血圧、心筋虚血・梗塞、弁膜症、心筋症などである(21)。拡張型心筋症(DCM)は、心室内腔の拡張と収縮機能不全を特徴とする心筋疾患であり、うっ血性心不全の主要な原因である。DCMは最もよくみられる心筋症であり、遺伝子突然変異、毒、虚血、ウイルス感染、自己免疫など様々な原因で生じる(5, 10, 22)。サルコメア、核膜および細胞骨格の蛋白質をコードする遺伝子における多くの突然変異が家族性DCMを引き起こし、全DCM症例の約40%がそれらによって説明されることが証明されている(7)。サルコメア蛋白質突然変異の1つは、心筋トロポニンT遺伝子のエクソン13に連続してコードされているリジン4残基のうちの1つが除かれるAGA3ヌクレオチドの欠失突然変異によって生じる(Δ K210と命名)(13)。この突然変異によって心筋ミオフィラメントCa²⁺感受性が低下することが証明されており、その結果もたらされる心筋収縮力の低下がDCMの病態形成を導くと考えられる(23)。この突然変異を導入した遺伝性DCMノックインマウスモデルは、進行性の心室内腔拡張を発生し2ヶ月令に達する前に突然死あるいは心不全によって頻繁に死亡する(7, 19)。これは、若令突然死あるいは心不全死の高いリスクを有する同じ突然変異に罹患したヒト家族構成メンバーの臨床表現型に酷似している(13)。グリコーゲン合成キナーゼ3(GSK3)は、 α と β という2つのアイソフォームを持つセリン/スレオニン蛋白質キナーゼである。その名前はグリコーゲン代謝における役割に由来しているが、最近の研究から、遺伝子発現、肥大、発生、増殖、線維化やアポトーシスなどの心臓における多くの生物学的プロセスを制御する多機能酵素であることが明らかにされている(4, 17)。マウスの全身におけるGSK-3 β ノックアウトは重篤な肝臓変性と心筋細胞の過剰増殖による心室腔閉塞により胎生致死となる(14)。しかし、マウスの心臓におけるGSK-3 β コンディショナルノックアウトは、心筋梗塞後の心機能を改善し、心筋細胞の増殖を促進し心筋リモデリングを抑える(27)。マウス圧負荷誘発心不全モデルにおいて、ドミナントネガティブGSK-3 β の心臓特異的過剰発現は、アポトーシスと線維化の減少と収縮機能の増加を伴うよく代償された心筋肥大をもたらす(9)。虚血/薬理学的プレおよびポストコンディショニングの心臓保護的効果は、ミトコンドリアのpermeability transition poreの制御に関わるGSK3 β の阻害に収束するように思われる(3, 11, 12)。さらに、コクサッキーウイルスB3感染は、GSK3 β のチロシンキナーゼ依存性“活性化”によって心筋細胞に細胞毒性効果およびアポトーシスをもたらしてDCMを引き起こすことが報告されている(28)。しかしながら、心筋トロポニンT Δ K210突然変異による家族性DCMの治療においてもGSK3 β 阻害が有益であるのかどうかは不明である。

2. 研究の目的

心筋肥大を抑制するGSK3 β は心臓の生理と病理において中心的役割を果たしている。本

研究は、心不全の主な原因である家族性拡張型心筋症におけるGSK3 β の役割を明らかにするために行われた。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、 Δ K210 cTnT 突然変異による家族性 DCM における病態形成と突然変異に対する GSK3 β 阻害の効果を明らかにするために、GSK3 β ヘテロ接合体ノックアウト突然変異 (GSK3 β +/- KO) と心筋トロポニン T Δ K210 ノックイン突然変異(Δ K210 cTnT KI) を C57Bl/6 遺伝的背景上にもつモデルマウスを作成した。そのために、まずヘテロ接合体 Δ K210 cTnT KI 突然変異をもつ DCM マウス (DCM HT) を GSK3 β +/- マウスと交配し、GSK3 β +/- DCM HT マウスを得た。それをさらに DCM HT マウスと交配することで homozygous Δ K210 cTnT KI 突然変異をもつ GSK3 β +/- DCM マウス (GSK3 β +/- DCM HM) を得た。Wild type (WT)、DCM HT および DCM HM グループをそれぞれ GSK3 β +/-, GSK3 β +/- DCM HT および GSK3 β +/- DCM HM グループのコントロールとして用いた。

(2) ウェスタンブロット解析: マウス (n=3-8/group) に 300 μ l ヘパリンを腹腔内投与 (300 IU/mouse) し、10 分後に 3% イソフルレン吸入麻酔下に心臓を摘出した (麻酔深度は後肢、前肢、耳の鈍ピンセットによる不快なつまみ刺激がどのような運動反射の引き起こさないことを確認することでチェックした)。摘出心臓は酸素を通気した Krebs-Henseleit 溶液 (in mM; 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂, 0.5 EDTA-Na₂, HEPES, 11 D-glucose containing 50 2, 3-butanedione monoxime) でランゲンドルフモードにて還流した。左心室約 100mg を心臓から切り出し、1% プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む 600 μ l Laemmli サンプルバッファー中でホモジェナイズし -80°C で保存した。使用直前にサンプルを 2 サイクルの解凍と凍結 (各 15 分) を行ったのち 95°C で 4 分加熱した。上清を 10,000 rpm, 2 min, 4°C で遠心分離し、蛋白質濃度を BIO RAD protein assay で決定後、以前に記載したようにウェスタンブロット解析に供された (25)。 \blacktriangle GSK3 β 発現レベルはモノクローナル抗 GSK3 β 抗体 (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて決定した。GSK3 β の ser9 における相対的リン酸化レベルは、ストリッピング後にポリクローナル抗 pGSK3 β (ser9) 抗体 (Cell Signaling, Danvers, MA) で得られたシグナルをモノクローナル抗 GSK3 β 抗体によるシグナルで正規化して決定した。全 β -catenin 発現レベルはモノクローナル抗 β -catenin 抗体 (BD Bioscience, San Jose, CA) によって決定し、 β -catenin の ser33/ 37/ thr41 相対的リン酸化レベルはポリクローナル抗 p- β -catenin 抗体 (Cell Signaling, Danvers, MA) によるシグナルをモノクローナル抗 β -catenin 抗体によるシグナルで正規化して決定した。Akt の ser473 の相対的リン酸化レベルはポリクローナル抗 pAkt 抗体シグナルを抗 Akt 抗体シグナル (Cell Signaling, Danvers, MA) によるシグナルで正規化して決定した。脳ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の発現レベルは抗 proBNP ポリクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, MA) で決定した。GAPDH を蛋白質ローディングコントロールとして使用し、モノクローナル抗 GAPDH 抗体 (Abcam, Cambridge, MA) で検出した。デー

夕は Scion image for windows software (Scion Corporation, Meyer Instruments, Houston, TX, USA)で解析した。

(2)心エコー：胸部心エコー (M-mode) はイソフルラン吸入麻酔下に測定した。麻酔導入は分離チャンバーにて 2% イソフルラン (100% O₂) で行い、小さなノーズコーンをもちいて 1-1.5% (100% O₂) イソフルラン、流速 1 L/min で麻酔を維持し、診断用超音波システム (Nemio SSA-550A) (Toshiba Medical Systems, Ohtawara, Tochigi, Japan) に装着した 14MHz リニアアレイプローブを用いて測定した。各マウスの麻酔への露出時間は約 10 分であった (n=5-15 mice/group)。

(3)組織化学：摘出心臓 (n=3-6 mice/group) を酸素通気した Krebs-Henseleit solution で Langendorff mode 還流したのち、10% ホルマリン中性緩衝溶液で固定した(7)。ホルマリン固定心臓を心室中間レベルで横に切断し、パラフィン包埋したのち 5 μm 切片を作製し Masson trichrome 染色を行った。心筋線維化レベルの測定は、Masson trichrome 染色切片イメージを x20 で Keyence BZ-9000 (Keyence Corporation, Japan) に取り込み、Image J program from NIH にて定量した。

(4)左心室筋アポトーシスの検出：左心室アポトーシスは、2ヶ月令マウスのパラフィン包埋切片を用いて、CardioTacs staining kit (Trevigen, Gaithersburg, MD) を用いた terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色によって検出した (アポトーシスを起こした核は青く染まる) (6 cardiac sections from different mice)。組織は nuclear fast red にて対比染色した。アポトーシスした心筋細胞の数は切片内の心筋細胞総数で正規化した。

(5)ミオシンアイソフォーム含量の解析：左心室筋溶解物(n=4-5 mice/group)中のミオシン重鎖(MyHC) 蛋白質アイソフォームを 6.5% SDS-PAGE にて分離し、coomassie brilliant blue (CBB)染色後、β-アイソフォームの相対的発現レベル(percentage of total MyHC) を決定した(7)。データは Phoretix gel analysis software (Phoretix International, UK)を用いた光学濃度スキャンによって解析した。

(6)統計学：データは mean±SEM で表示した。統計学的有意性は Graph Pad Prism version 5 (Graph Pad Software, Inc., CA, USA) を用いて、3以上のグループ間では two-way ANOVA につづく post-hoc Bonferroni test、2グループ間においては unpaired Student's t-test、生存曲線解析においては Log-rank (Mantel-Cox) test によって判定した。P<0.05 を有意とみなした。

4. 研究成果

(1)左心室筋における GSK3β 蛋白質発現レベルは、WT と DCM マウスの間で有意差はなかった。GSK3β +/- KO は、WT と DCM マウスどちらにおいても GSK3β 蛋白質発現レベルを約 50% 減少させていることが確認された (Figure 1A)。2ヶ月令において、セリン 9 がリン酸化によって不活性化された GSK3β の全 GSK3β に占める割合は、DCM マウスでは WT マウスより有意に小さく、DCM マウスでは WT マウスよりも GSK3β がある程度活性化されていることを示している

(Figure 1B)。

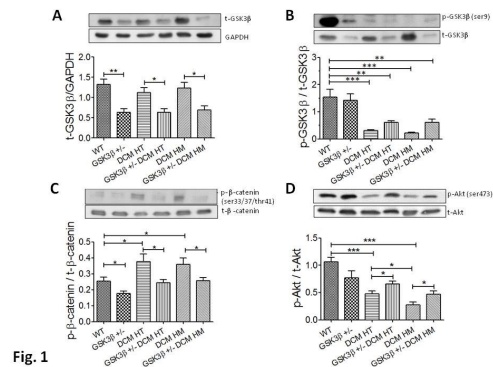


Fig. 1

GSK3β +/- KO は DCM マウスにおける不活性化された GSK3β の割合に有意な影響を与えていないため、DCM マウスでは活性化された GSK3β の絶対量は GSK3β +/- KO によって約 50% 低下しているはずである。これらの知見に一致して、GSK3β の直接の基質である β-catenin のリン酸化レベルが DCM マウスでは WT マウスより有意に高く、GSK3β +/- KO によって有意に低下していた (Figure 1C)。さらに、GSK3β の上流キナーゼである Akt のリン酸化レベル (i.e. 活性化レベル) は、DCM マウスでは WT マウスに比べて有意に低いことから、DCM マウスにおいて GSK3β は PI3K/Akt パスウェイのダウンレギュレーションによって活性化されていることが示唆される (Figure 1D)。1ヶ月令の DCM と WT マウス間においては、GSK3β と β-catenin のリン酸化から推定される GSK3β 活性に有意差は見られなかった。

(2) Fig.2A は、様々な遺伝子型マウスの 1ヶ月令及び 2ヶ月令における左心室 M-モード新エコーの代表的イメージを示している。纏めた心エコーデータは、LVEDD で評価される進行性の左室内腔拡張と EF (あるいは FS) および LVESD で評価される左心室収縮機能の進行性の低下が DCM で見られることを示している (Figure 2B-2G)。GSK3β +/- KO は、DCM マウスにおける左室内腔拡張の進行を止めなかったが左心室収縮機能の進行性の低下を抑えた。GSK3β +/- KO は、非 DCM マウスにおける左心室収縮機能、内径および壁厚に有意な影響を与えず、また DCM

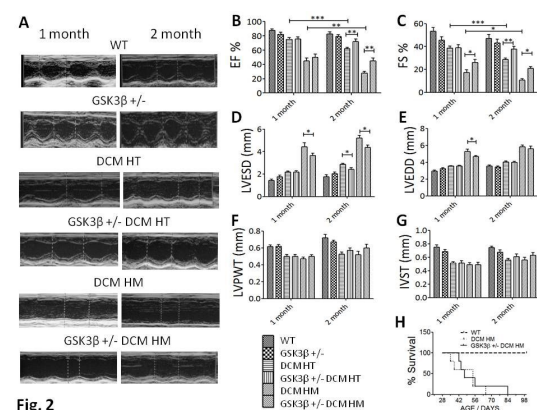


Fig. 2

マウスにおける左心室壁厚 (LVPWT and IVST) にも影響しなかった。

生存曲線に対する Log-rank test は、8 週令前後で頻りに致死的な不整脈を発生するホモ接合体突然変異を有する DCM マウスの生存期間を GSK3β +/- KO がわずかではあるが

有意に延長することを証明した (P=0.0049) (Figure 2H)。

(3) 2ヶ月令においてはすべての遺伝子系グループのマウスの体重は同程度であり、DCM HM グループではオスの体重はメスより有意に重かった (Figure 3A)。

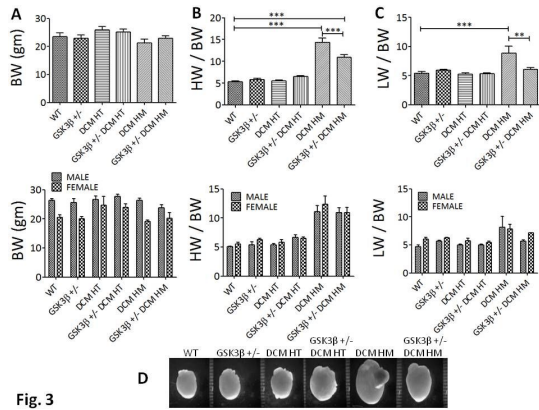


Fig. 3

WT, GSK3 β +/-, DCM HT および GSK3 β +/- DCM HT グループのマウスは同程度の心重量 (HW/BW) と肺重量 (LW/BW) を示した (Figure 3B and 3C). DCM HM と GSK3 β +/- DCM HM マウスは WT マウスより有意に高い心重量を示した (Figure 3B). GSK3 β +/- DCM HM マウスは DCM HM マウスより有意に軽く小さな心臓を持っており、GSK3 β +/- KO が DCM マウスにおける心拡大を抑制することを示している (Figure 3B and 3D). DCM HM マウスは肺重量も WT マウスより有意に重く、うっ血性心不全であることを示している (Figure 3C)。しかし、GSK3 β +/- DCM HM マウスの肺重量は DCM マウスより有意に低く、WT マウスの肺重量と有意差がなかったことから、GSK3 β +/- KO は DCM HM マウスの心臓ポンプ機能を維持することによって心不全の急速な進行を防いでいることを示している。

(4) WT と GSK3 β +/- マウスの心臓では非常に低レベルの線維化しかみられないが、DCM マウスでは心筋線維化レベルの著しい増加がみられた (Figure 4A and 4B)。

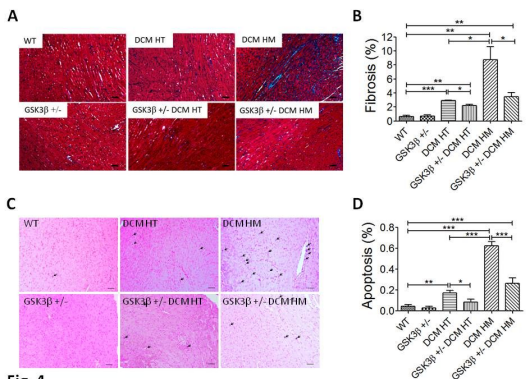


Fig. 4

GSK3 β +/- KO は DCM マウスにおけるこの病態生理学的な心筋リモデリングを抑制した。GSK3 β +/- KO は DCM マウスで頻繁に観察される心筋細胞アポトーシスも有意に抑制した (Figure 4C and 4D)。

(5) 心不全の指標である β -ミオシン重鎖 (β -MyHC) の発現は、WT マウスに比べて DCM HM マウスでは顕著に増加していた。GSK3 β +/- KO は、DCM HM マウスにおける β -MyHC の発現を WT マウスにおける発現と有意差のないレベルまで低下させた (Figure 5A and 5B)。

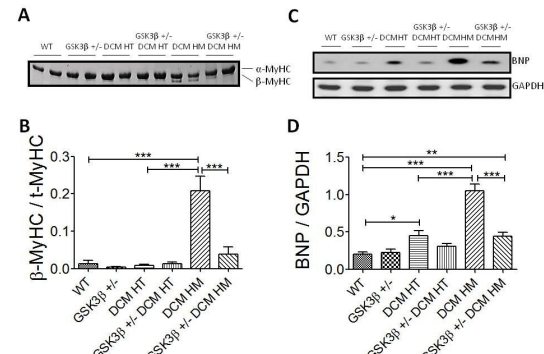


Fig. 5

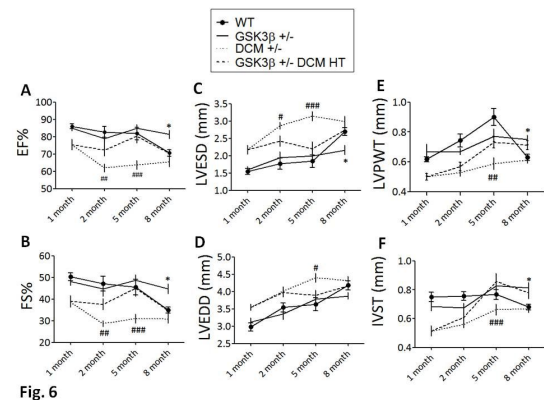


Fig. 6

もう一つの胎児期遺伝子である BNP も WT マウスに比べて DCM マウスでは有意に増加しており、GSK3 β +/- KO は DCM マウスにおける BNP 発現を有意に低下させた (Figure 5C and 5D)。

(6) 長期追跡によって、GSK3 β +/- KO は DCM HT マウスにおける進行性の左室収縮機能低下、左室内腔拡張および左室壁菲薄化を少なくとも5か月令まで抑制することが明らかになった (Figure 6)。我々はまた、GSK3 β +/- KO が非 DCM マウスにおける年令依存性の左室収縮機能低下と左室壁菲薄化を少なくとも8か月令まで抑制することに気づいた。1か月令では、すべてのグループ間では BW, HW および LW に有意差はなかった。

(7) 考察および結論

本研究の主要な知見は、全身にわたる GSK3 β +/- KO が Δ K210 cTnT 突然変異による家族性 DCM に対して心臓保護的に働くということであり、これは GSK3 β の心臓特異的 KO あるいは抑制がマウスの心筋梗塞後モデルおよび圧負荷誘発心不全モデルにおいて有益であることを示した以前の研究と一致している (9, 27)。本研究において我々は、この突然変異をもつヒト患者の臨床表現型をよく再現するノックインマウスモデル (7)

を用いて、GSK3 β +/- KO が有意に左心室収縮機能を改善し、心拡大、心筋線維化、心筋細胞アポトーシスおよび β -MyHC と BNP 発現を低下させることを証明した。本研究において、我々は、GSK3 β +/- KO 突然変異とともに家族性 DCM の遺伝的原因であることが証明された (13) ヘテロあるいはホモ接合体 cTnT Δ K210 KI 突然変異を持つモデルマウスを初めて作成した。ウエスタンブロット解析により証明されたように、GSK3 β +/- KO はこれらの DCM マウスにおいて全 GSK3 β 蛋白質発現を約 50% 低下させた。GSK3 β の抑制性リン酸化を検出する抗 phospho-GSK3 β ser9 抗体 (3) を用いたウエスタンブロット解析により証明されたように、DCM マウスでは GSK3 β 活性が WT マウスより有意に増加していた。DCM マウスでは、GSK3 β の直接の基質であり GSK3 β のキナーゼ活性を反映すると考えられる β -catenin ser33/37/thr41 リン酸化レベル (4, 18) も WT に比べて増加していた。GSK3 β の上流にあるインヒビターである Akt のリン酸化 (i.e., 活性化) レベルも DCM マウスでは有意に低下していた。インシュリンは PI3K/Akt シグナリングの活性化によって GSK3 β を抑制するが、カテコールアミンはインシュリン分泌を直接抑制することができる (6, 8, 20)。心機能の低下は交換神経系を代償的に活性化するため、そのようなメカニズムで間接的に GSK3 β の活性化をもたらしている可能性がある。DCM HM マウスでは、2ヶ月令で左心室収縮機能が急速に低下し、心筋線維化、 β -MyHC と BNP 発現、心重量 および肺重量が WT マウスより有意に増加する。しかし、WT マウスに比した肺重量の増加は高々 30% であり、通常 300% から 400% の肺重量増加をもたらす重症うっ血性心不全の可能性は除外される。この DCM HM マウスは、2ヶ月令前後でおそらく致死的不整脈によって大半が突然死する (7)。GSK3 β +/- KO は、DCM マウスにおける左心室収縮機能を有意に改善し、心筋線維化、心筋細胞アポトーシスおよび肺重量を正常レベルまで低下させた。

DCM マウスにおける GSK3 β +/- KO の心臓保護の効果は、左心室における β -MyHC 発現量の減少という形で現れている。心筋 MyHC は心臓における力発生に關するサルコメア収縮装置における分子モーターであり、93% のアミノ酸配列相同性をもつ α と β と名付けられた 2 つのアイソフォームが存在する (26)。 β -MyHC は α -MyHC に比べて ATPase 活性が格段に低く、滑り速度は遅くパワー出力も低い (1, 16)。この 2 つのアイソフォームの相対的発現レベルは心不全や心肥大などの病的状態によって影響される。 α -MyHC は正常マウス心臓における優勢なアイソフォームであり、 β -MyHC 発現レベルはマウス不全心において有意に増加する (7)。 α -MyHC の相対的発現がほんの少し増加するだけで心筋細胞のパワー出力が大きく増強することが示されている (26)。GSK3 β +/- KO が DCM マウスにおける α -MyHC の相対的発現を直接的に増加させているのか、あるいは間接的に増加させているのかは不明であり今後の課題である。

心筋細胞アポトーシスは家族性 DCM の

顕著な病理学的特徴である (7)。GSK3 β ノックダウンは、抗アポトーシス因子である myeloid cell leukemia-1 をアップレギュレートすることによって、TNF α により誘発される心筋細胞アポトーシスを防ぐことが示されている (9)。虚血再灌流障害において、虚血/薬理的プレおよびポストコンディショニングは、mitochondrial permeability transition pore の開口とそれにつづく心筋細胞アポトーシスを抑制制御する GSK3 β の阻害に収束する (3, 11, 12)。これらの研究に一致して、我々は GSK3 β +/- KO が我々の DCM モデルマウスにおける心筋細胞アポトーシスを抑制することを見出し、心筋細胞アポトーシス抑制が DCM マウスにおける GSK3 β +/- KO の心臓保護の効果に關与している可能性を示唆している。SB216763 あるいは siRNA による GSK-3 の阻害が、TGF- β 1 によって誘導されるヒト肺繊維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を抑制することが示されており、GSK3 β が線維化に対して直接の制御的役割をもつ可能性が示唆されている (2)。我々の DCM マウスにおける GSK3 β +/- KO の心臓保護的效果に線維芽細胞分化の抑制が關与しているかどうか今後の研究で明らかにする必要がある。

最後に、今回の研究は、ヒト患者の臨床表現型をよく再現した Δ K210 cTnT 突然変異による DCM のノックインマウスにおいて全身の GSK3 β +/- KO が心臓保護的であり生存に有益であることを証明した。今回の研究は、心臓保護的效果が心筋細胞を介しているのか、あるいは非心筋細胞を介しているのかを区別することはできない。さらに、メカニズムに関しては、心臓非特異的 GSK3 β +/- KO を考慮して考える必要がある。それにもかかわらず、今回の研究の結果は、この突然変異による家族性 DCM に対して GSK3 β 阻害による治療が期待できることを示している。

<引用文献>

1. **Alpert NR, et al.** Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1446-H1454, 2002.
2. **Baarsma HA, et al.** Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) regulates TGF- β 1-induced differentiation of pulmonary fibroblasts. *Br J Pharmacol* 169: 590-603, 2013.
3. **Chanoit G, et al.** Exogenous zinc protects cardiac cells from reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through inactivation of glycogen synthase kinase-3 β . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H1227-H1233, 2008.
4. **Cohen P, Frame S.** The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol cell Biol* 2: 769-776, 2001.
5. **Dav SM.** The ubiquitin proteasome system in human cardiomyopathies and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304: H1283-H1293, 2013.
6. **Deibert DC, Defronzo RA.** Enkephalin-induced insulin resistance in man. *J Clin Invest* 65: 717, 1980.
7. **Du C-K, et al.** Knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy caused by trononin mutation. *Circ Res* 101: 185-194, 2007.
8. **Florea VG, Cohn JN.** The autonomic

- nervous system and heart failure. *Circ Res* 114: 1815-1826, 2014.
9. **Hirotsu S, et al.** Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β during heart failure is protective. *Circ Res* 101:1164-1174, 2007.
 10. **Jefferies JL, Towbin JA.** Dilated cardiomyopathy. *Lancet* 375: 752-762, 2010.
 11. **Juhászova M, et al.** Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 113: 1535-49, 2004.
 12. **Juhászova M, et al.** Role of glycogen synthase kinase-3 β in cardioprotection. *Circ Res* 104: 1240-1252, 2009.
 13. **Kamisago M, et al.** Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 343: 1688-1696, 2000.
 14. **Kerkela R, et al.** Deletion of GSK-3 β in mice leads to hypertrrophic cardiomyopathy secondary to cardiomyoblast hyperproliferation. *J Clin Invest* 118: 3609-3618, 2008.
 15. **Kimura T, et al.** GSK-3 β is required for memory reconsolidation in adult brain. *PLoS One* 3: e3540, 2008.
 16. **Korte FS, et al.** Power output is linearly related to MyHC content in rat skinned myocytes and isolated working hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H801-H812, 2005.
 17. **Lal H, et al.** The GSK-3 family as therapeutic target for myocardial diseases. *Circ Res* 116: 138-149, 2015.
 18. **Lam JB, et al.** Adiponectin deficiency promotes mammary tumor development in MMTV-PvVT mice by modulation of phosphatase and tensin homolog activities. *PloS one*, 4: e4968, 2009.
 19. **Li L, et al.** Role of brain serotonin dysfunction in the pathophysiology of congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 53: 760-767, 2012.
 20. **McManus BJ, et al.** Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO J*, 24: 1571-1583, 2005.
 21. **McMurray JJ, et al.** ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *Eur J Heart Fail* 14: 803-869, 2012.
 22. **Morimoto S.** Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovasc Res* 77: 659-666, 2008.
 23. **Morimoto S, et al.** Ca²⁺-desensitizing effect of a deletion mutation Δ K210 in cardiac troponin T that causes familial dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 913-918, 2002.
 24. **Mozaffarian D, et al.** American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2015 update: a report from the American heart association. *Circulation* 131: e29, 2015.
 25. **Nakaura H, et al.** Functional changes in troponin T by a splice donor site mutation that causes hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol Cell Physiol* 277: C225-C232, 1999.
 26. **Reiser PJ, Moravec CS.** Sex differences in myosin heavy chain isoforms of human failing and nonfailing atria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307: H265-H272, 2014.
 27. **Woulfe KC, et al.** Glycogen synthase kinase-3 β regulates post-myocardial

infarction remodeling and stress-induced cardiomyocyte proliferation in vivo. *Circ Res* 106: 1635-1645, 2010.

28. **Yuan J, et al.** Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β suppresses coxsackievirus-induced cytopathic effect and apoptosis via stabilization of β -catenin. *Cell Death Differ* 12: 1097-1106, 2005.

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)

Mohamed R, Morimoto S, Ibrahim I, Zhan DY, Du CK, Arioka M, Yoshihara T, Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T (2016) GSK3 heterozygous knockout is cardioprotective in a knock-in mouse model of familial dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (in press) doi: 10.1152/ajpheart.00771.2015

[学会発表](計 2件)

第 68 回 日本薬理学会 西南部会 (2015/11/21:下関)

GSK3 heterozygous knockout is cardioprotective in familial dilated cardiomyopathy mouse model (口演) Mohamed R, Morimoto S, Ibrahim I, Arioka M, Yoshihara T, Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T.

第 89 回 日本薬理学会年会 (2016/3/9-11: 横浜)

GSK3 heterozygous knockout is cardioprotective in familial dilated cardiomyopathy mouse model <GSK3 ヘテロノックアウトは家族性拡張型心筋症モデルマウスにおいて心臓保護的に働く> (口演) Mohamed R, 森本 幸生, Ibrahim I, 有岡 将基, 吉原 達也, 高橋 富美, 笹栗 俊之

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 幸生 (MORIMOTO Sachio)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 50202362

(2) 連携研究者

高橋 富美 (TAKAHASHI Fumi)
九州大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号: 50274436

(3) 研究協力者

Rasha Mohamed