

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860613

研究課題名(和文) PDE3Aが持つ多面的な心保護作用の探索と心不全治療への応用

研究課題名(英文) Assessment of cardioprotective effect of PDE3A against chronic heart failure

研究代表者

及川 雅啓(Oikawa, Masayoshi)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30457775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：心臓特異的phosphodiesterase3A (PDE3A) 過剰発現マウスに対して、虚血再灌流モデルを作成し、PDE3Aの過剰発現が抗アポトーシス効果を介して心筋梗塞領域を縮小させることを見出した。また、アンジオテンシンII持続負荷モデルにおいても、PDE3Aが心筋細胞肥大および心筋組織線維化を抑制し、その機序としてPDE3AがTG Fの発現を抑制していることを見出した。そしてイソプロテレンール持続負荷による心筋酸化ストレスモデルにおいても、PDE3AがSirt1シグナルを促進させ、酸化ストレスを抑制することで心保護効果を発揮することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We used cardiospecific PDE3A overexpression (PDE3TG) mice to the study. Ischemia-reperfusion injury was subjected to PDE3TG or wild-type (WT) mice. PDE3TG mice showed smaller myocardial infarction area than WT mice. A number of apoptotic cardiomyocytes were lower in PDE3TG mice. We also performed angiotensin II stimulation. PDE3TG mice displayed inhibited cardiac hypertrophy and fibrosis compared to WT mice. The expression levels of transforming growth factor β , which was increased in WT mice after angiotensin II stimulation, was inhibited in PDE3TG mice. Finally we performed Isoproterenol stimulation. PDE3TG mice showed inhibited cardiac hypertrophy compared to WT mice. 8-OHdG positive area, which indicates oxidative damage, was increased in WT mice heart after isoproterenol stimulation, but not in PDE3TG mice heart. Sirt1 protein expression levels were increased in PDE3TG heart. Thus, we conclude PDE3A has cardioprotective effects through various mechanisms.

研究分野：循環器内科

キーワード：Phosphodiesterase Angiotensin II Isoproterenol

1. 研究開始当初の背景

細胞内セカンドメッセンジャーであるcAMPおよびcGMPは、その分解を司るphosphodiesterase(以下PDE)により制御されている。心筋細胞において、PDE3Aは受容体への刺激により生じるcAMPの分解を司り、プロテインキナーゼA(PKA)の活性を介した強心作用を調節していることが知られている。しかし、PDE3阻害薬の長期使用は、心不全患者の予後を悪化させることが知られており、そのメカニズムとして、cAMPの増加によるPKAの活性化が、Inducible cAMP early repressor (ICER)の発現を維持、上昇させ、ICERがBcl-2などの抗アポトーシス効果を持つ蛋白質の発現を抑制すること、また、ICERの発現は、PDE3Aの発現も抑えてしまい、更なるcAMPの増加を引き起こすというポジティブフィードバックが生じることで、アポトーシスを亢進させる機序が報告されている。そのため、急性心不全とは逆に、慢性心不全状態においては、PDE3Aの発現を維持することが、心不全患者の予後改善に役立つことが予想される。これまでの我々の検討においても、PDE3A過剰発現マウスにおいて、心筋虚血再灌流障害が抑制されること、アンジオテンシンII負荷による心筋肥大が抑制されることなどが初期実験データとして得られており、PDE3Aが多面的な心保護作用を持つことが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、慢性心不全状態においてPDE3Aが果たす心保護効果を解明することである。

3. 研究の方法

8週から12週齢雄心臓特異的PDE3A過剰発現マウス(PDE3TGマウス)に対して、心筋虚血再灌流モデル、アンジオテンシンII持続皮下投与モデル、イソプロテレノール持続皮下投与モデルを用いた心不全モデルを作成した。虚血再灌流モデルはマウス心左前下行枝の45分間虚血、24時間再灌流を行い、心エコーを用いた心機能計測、TTC染色による心筋梗塞領域計測、TUNEL染色による心筋細胞アポトーシス評価を行った。また、単離心筋細胞を用いて、低酸素刺激、過酸化水素水刺激により心筋細胞アポトーシスの誘導を行った。アンジオテンシンIIは浸透圧ミニポンプを用いて、800ng/kg/minで10日間刺激を行い、心重量計測、脛骨長計測および心臓超音波検査を用いた心肥大評価を行い、Masson's trichrome染色を用いて心筋組織線維化の評価を行った。また、抗Transforming growth factor- β (TGF- β)抗体を用いて心筋組織におけるTGF- β 発現を評価した。イソプロテレノール負荷は30mg/kg/dayを7日間浸透圧ミニポンプで行い、心重量計測、脛骨長計測および心臓超音波検査を用いた心肥大評価を行った。TUNEL染色により心筋細胞アポトーシス評価を行ない、心筋における酸化ストレス評価として、抗8-

ヒドロキシ-デオキシグアノシン (8-OHdG)抗体による免疫染色を行い陽性細胞領域を計測した。抗酸化メカニズム解析のため、抗Sirt1抗体を用いて、心筋組織でのSirt1タンパク発現を評価した

4. 研究成果

初期実験データにおいても示されているが、PDE3TGマウスはcAMPの分解により野生型マウスと比較して刺激作用が減弱しているために拡張型心筋症と類似した心機能(左室駆出率の低下、左室内腔の拡大)を示しているが、1年の観察による自然予後は野生型マウスと比較して変化が認められず自然予後は良好と考えられた。虚血再灌流モデルにおいて、PDE3TGマウスと野生型マウスでは、急性期死亡率での差は認められなかった。再灌流24時間後のTTC染色からは、PDE3TGマウスにおける心筋梗塞領域の著明な縮小が認められており、その機序として、PDE3TGマウスにおいては、虚血再灌流によるICERの上昇が野生型マウスと比較して明らかに抑制されており、TUNEL染色によるアポトーシス細胞数の減少が認められた。単離心筋細胞モデルにおいても、野生型マウス心筋細胞と比較して、PDE3TG心筋細胞では低酸素負荷および過酸化水素水刺激による心筋細胞アポトーシスは減少することを示された。これらにより、PDE3AはcAMPの分解によりICERの発現を抑制し、抗アポトーシス効果を引き起こすことで、梗塞サイズの減少につながったものと考えられた。また、アンジオテンシンII負荷モデルにおいては、アンジオテンシンII負荷により野生型マウスでは心重量/脛骨長比が増加したのに対して、PDE3TGマウスでは心肥大が抑制され、Masson's trichrome染色による心筋線維化領域面積も縮小していることが示された。その機序として、野生型マウスでは、アンジオテンシンIIにより心筋組織においてTGF- β が増加していることが示されたが、PDE3AマウスではVehicleマウスにおいてもTGF- β の発現が抑制されており、PDE3A過剰発現がTGF- β の基礎的な発現に影響を与えていると考えられた。また、アンジオテンシンII負荷を行っても、PDE3TGマウスではTGF- β 発現が抑制されたままであり、このことが、PDE3TGマウスにおける心筋細胞肥大、心筋組織線維化抑制の機序の一つと考えられた。また、イソプロテレノール持続負荷モデルを作成したところ、PDE3TGマウスではイソプロテレノールにより、左室駆出率の増加や左室内径の縮小といった刺激作用は認められたが、心室壁厚に変化はなく、心重量/脛骨長比の増加は認められておらず心肥大は抑制されていると考えられた。野生型マウスにおいては、TUNEL染色によりイソプロテレノール刺激後に心筋細胞アポトーシスの増加が認められたが、PDE3TGマウス心では増加は認められず、虚血再灌流モデルと同様に心筋アポトーシスが抑制されていることが示された。心筋アポトーシスをもたらす

機序の一つとして酸化ストレスも知られているが、一般にイソプロテレノールは心筋細胞において酸化ストレスを促進することが認められている。酸化ストレスによる心筋障害の評価として、8-OHDG 染色を行ったところ、野生型マウスにおいてはイソプロテレノール負荷により 8-OHDG 陽性細胞領域が増加したのに対して、PDE3TG マウスにおいては有意な増加が認められなかった。抗酸化作用をもたらす機序として、抗酸化作用に関連する Sirt1 タンパクに注目し、その発現を調べたところ、PDE3A マウスにおいては、Vehicle マウスにおいても、Sirt1 発現が上昇していることが示され、PDE3A の過剰発現は Sirt1 シグナルの上昇をもたらしていることが示され、イソプロテレノール刺激後においても Sirt1 の発現上昇は維持されており、心筋酸化ストレスに対する保護効果の一因と考えられた。しかし、PDE3TG マウス心においては、8-OHDG 陽性細胞領域が、Vehicle マウスにおいても、野生型マウスより上昇している傾向が認められた。イソプロテレノールによる刺激がさらなる 8-OHDG 領域増加をもたらしてはいないものの、PDE3TG マウスは心臓における表現型として、拡張型心筋症に類似した心機能、心形態を有していることから、自然予後に影響は与えていないものの、何らかの心負荷を慢性的に与えている可能性もあることから、これらの結果の解釈には注意を要するものと考えられた。しかし、一連の結果は心不全増悪因子となる刺激に対して PDE3A は心保護的に作用することを示しており、PDE3A は多面的な作用により心保護効果を発揮するものと考えられた。

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 2 件)

1. Oikawa M, Wu M, Lim S, Knight WE, Miller CL, Cai Y, Lu Y, Blaxall BC, Takeishi Y, Abe J, Yan C: Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol 64, 11-19, 2013
2. Iwaya S, Oikawa M, Yan C, Takeishi Y: Phosphodiesterase 3A1 protects the heart against angiotensin II-induced cardiac remodeling through regulation of transforming growth factor-expression. Int Heart J 55 (2), 165-168, 2014

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Oikawa M, Iwaya S, Yan C, Takeishi Y: Phosphodiesterase 3A1 protects the heart against angiotensin II-induced cardiac remodeling via regulating

interaction between β -adrenergic and angiotensin II pathways. The 30th Annual Meeting of the International Society for Heart Research (ISHR) Japanese Section (2013.6.29, San Diego, USA)

2. Iwaya S, Oikawa M, Owada T, Takeishi Y: Phosphodiesterase 3A1 protects the heart against angiotensin II-induced cardiac injury via regulating interaction between β -adrenergic and angiotensin II pathways. 第 77 回日本循環器学会学術集会, 横浜, March 2013
3. Oikawa M, Iwaya S, Saitoh S, Takeishi Y: Phosphodiesterase 3A1 protects the heart against isoproterenol-induced cardiac injury via anti-oxidative mechanism. The 31st Annual Meeting of the International Society for Heart Research (ISHR) Japanese Section (2014.12.28-12.29, Nagoya, Japan)

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
福島県立医科大学循環器・血液内科ホームページにおいて、研究成果を報告している。

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
及川雅啓 (OIKAWA Masayoshi)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30457775

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：