

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860622

研究課題名(和文) ストレス応答シグナルであるeIF2 の心筋での作用および創薬標的分子の開発

研究課題名(英文) The Relationship between Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alfa and Ischemic Reperfusion Injury

研究代表者

西山 信大 (Nobuhiro, Nishiyama)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：40392500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：虚血再灌流傷害には、心機能低下を伴う途絶心筋および虚血に抵抗性を示す心筋プレコンディショニングという2つの変化が存在する。我々はストレス応答タンパクであるeukaryotic translation initiation factor2 (eIF2) に注目し、心筋においてeIF2 の活性化を自由に操作できる遺伝子改変マウスを用いて、その病態解明を行った。eIF2 を中等度に活性化すると、虚血再灌流傷害に抵抗性を持ち、強く活性化すると一過性の心機能低下をきたした。ゲノムやメタボローム、カルシウム動態、電子顕微鏡検査などを行い、虚血再灌流傷害とeIF2 の関連について研究を行った。

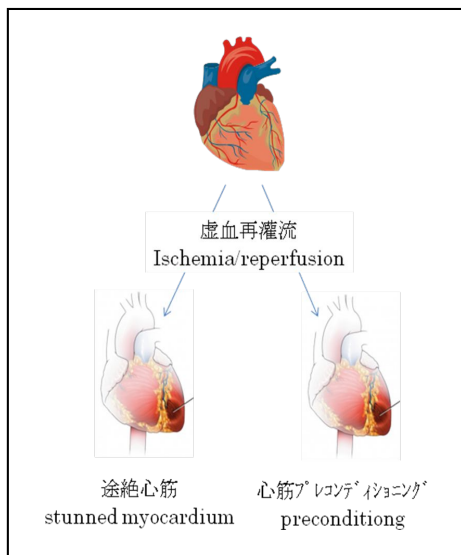
研究成果の概要(英文)：A change of cardiac function after ischemic-perfusion injury has two types; myocardial stunning (transient cardiac dysfunction) and ischemic preconditioning (tolerance to ischemia). We hypothesized that eukaryotic translation initiation factor2 (eIF2) was related to myocardial stunning and ischemic preconditioning. First of all, we made genetically modified mice whose eIF2 in hearts could be controlled at arbitrary level. When eIF2 was moderately activated, the mice hearts showed tolerance to ischemic-perfusion injury. And when eIF2 was highly activated, transient cardiac dysfunction emerged. Then we demonstrated the relationship between eIF2 and ischemic-reperfusion injury with genomic, metabolomic, calcium dynamic analysis and electron microscopes.

研究分野：心筋代謝および臨床不整脈

キーワード：途絶心筋 心筋プレコンディショニング 虚血再灌流障害 ストレス応答ホルモン 小胞体ストレス 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

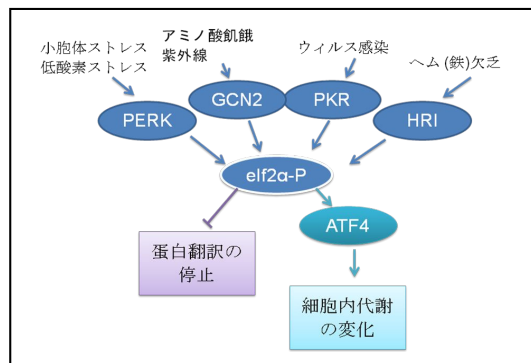
緊急カテーテルインターベンションによる再灌流技術が確立したため、急性心筋梗塞の予後は改善したが、虚血再灌流障害に伴う心筋傷害や致死性の不整脈などに関しては、その機序は十分に解明されておらず、心筋梗塞患者の予後増悪因子となっている。虚血再灌流傷害に伴う心筋傷害の代表的な病態として、「再灌流後に数日から数週間持続する心機能低下」と定義される「途絶心筋 (stunned myocardium)」が有名であるが、小動物での途絶心筋モデルを作製できないことが大きな理由で、詳細な病態メカニズムおよび治療法については解明されていない(Circulation 2001 104 2981)。一方、小さな途絶心筋の繰り返しにより、心筋細胞内の遺伝子発現、代謝、カルシウム動態が変化し、虚血抵抗性を示す虚血プレコンディショニング(ischemic preconditioning)という概念がある。これら二つの概念は臨床的には正反対の病態であるが、いずれも虚血再灌流傷害を原因として生じる現象であり、病態生理学的には連続した病態と考えられる。しかし、これまでの報告では、これら2つの概念を連続した病態として説明した報告はなく、現在の虚血再灌流傷害に伴う患者の不利益に対し研究が発展しない大きな原因と考えられる。



途絶心筋に関してのこれまでの報告から、虚血再灌流傷害時に発生する活性酸素種やカルシウム過負荷などがその原因として考えられている。しかし、虚血再灌流傷害に伴う途絶心筋状態は数時間から1週間近く持続することが臨床で知られており、上記のメカニズムだけでは説明が不可能な現象と考えられている。Robertらは心収縮が回復するまでの時間は虚血時の虚血な長さや虚血の重症度、また再灌流のスピードなどを含む複合的な要素に依存していると報告している

(Circulation 2001 104 2981)。

原生動物から保存されているストレス応答タンパクである eukaryotic translation initiation factor 2  $\alpha$  (eIF2  $\alpha$ )は酸化ストレス、小胞体ストレス、アミノ酸飢餓ストレスなどの多彩なストレスシグナルに反応し、細胞内のストレス応答を制御していると考えられている(下図)。このストレス応答システムの結果、タンパク翻訳過程を一般的に抑制しエネルギーを節約し、一方で転写因子 activating transcription factor 4 (ATF4) の翻訳を選択的に促進して、アミノ酸代謝、グルタチオン代謝、抗酸化ストレス関連遺伝子の発現を誘導する。また、強い細胞ストレスが負荷されると、eIF2  $\alpha$ を強く活性化し、アポトーシスを誘導することが知られている。一般的にストレス応答制御は、中等度のストレスに対しては、臓器保護的に作用するが、重度のストレスに対しては細胞死、臓器障害を誘導すると考えられているが、eIF2  $\alpha$ の活性化も同様のシステムが備わっていると考えられる。心筋においては、ストレス応答タンパクである eIF2  $\alpha$ のリン酸化は、重症の低酸素状態(in vitro)やマウスの心筋梗塞モデルで強く誘導されることを確認している。また、心筋の虚血および虚血再灌流傷害により、ストレス応答蛋白である eIF2 $\alpha$ が活性化され、恒常性を維持するストレス応答機構が誘導されることを報告した(Endo J. Circ Res. 2009)。



2. 研究の目的

本研究では、心筋特異的に eIF2 $\alpha$ リン酸化シグナルの活性化を調整するトランスジェニックマウス( $\alpha$ MHC-Fv2E-PERK)を作製し、eIF2 $\alpha$ リン酸化シグナルの強さの違いによる虚血再灌流傷害および虚血プレコンディショニング状態の分子メカニズムおよび治療ターゲットを解明することを目的としている。

今回我々が作成した遺伝子組換えマウスは、ストレス応答タンパクである eIF2 $\alpha$ のリン酸を、マウスに特定のストレスを与えることなく調整できる点が最大の特徴となる。一

一般的にストレス応答制御は、中等度のストレスに対しては、臓器保護的に作用するが、重度のストレスに対しては細胞死、臓器障害を誘導すると考えられているが、これらの現象は *in vitro* での研究が主体であった。本研究では *in vivo* におけるストレス応答の調整を可能とし、生体でのストレス応答制御を解明することができる。本研究において eIF2 $\alpha$  の中等度の活性化では再灌流障害に抵抗性を示し（心筋プレコンディショニング）、強い活性化では心筋収縮力が一定時間低下した後完全に改善する（途絶心筋）可能性が期待される。これらのモデルを解析することで途絶心筋および心筋プレコンディショニングの機序を解明し、心筋の虚血に対する抵抗性を制御する創薬の開発につなげることを目的とする。

心筋梗塞を中心とした虚血性心筋症は罹患率、死亡率も高く、社会的に重要な疾患であるため、その病態の詳細な解析および創薬の開発は社会的に大きなインパクトを与えると考えている。

### 3. 研究の方法

(1) 心筋特異的な eIF2 $\alpha$  のリン酸化シグナル活性化する遺伝子組み換えマウスの作成

eIF2 $\alpha$  リン酸化シグナルを活性化させる Fv2E-PERK キメラ蛋白を心筋特異的に発現する  $\alpha$  MHC ( $\alpha$ -Myosin heavy chain) プロモーターの下流につないだ Tg マウスを作製し、eIF2 $\alpha$  リン酸化シグナルの心臓特異的な gain-of-function モデルの樹立を目指す。作製したマウスは dimerizer AP20187 を投与すると、その下流の eIF2 $\alpha$  リン酸化シグナルが on となるモデルであり、dimerizer AP20187 の投与量、投与間隔で eIF2 $\alpha$  リン酸化シグナルの程度を制御できる (Oyadomari S. Cell metab 2008)

(2) eIF2a リン酸化シグナルの病態生理学的意義の検討

eIF2a リン酸化シグナルの中等度の活性化モデルマウスでの病態の検証

今回作製した  $\alpha$  MHC-Fv2E-PERK Tg マウスに短期間で少量の AP20187 を投与して eIF2 $\alpha$  を中等度活性化させる。eIF2 $\alpha$  を中等度活性化させたマウスは、ランゲンドルフ虚血再灌流モデルや、*in vivo* での虚血再灌流傷害モデルを作成し、心筋虚血に対する抵抗性を検討する。また、Capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) を使ってメタボローム解析とフラクソーム解析 (13C-glucose から始まる代謝の流れをトレースする) を行い心筋エ

ネルギー代謝経路の変化を観察する。以前に我々は虚血再灌流時に生じる過剰な活性酸素によるミトコンドリア障害により、ストレス応答シグナルである eIF2 $\alpha$  が活性化し、恒常性を維持するストレス応答機構が誘導され、心筋プレコンディショニングを獲得することを報告した (Endo J. Circ Res. 2009)。その際のターゲット遺伝子などとの類似点、相違点を比較する。Microarray 法による網羅的な遺伝子解析を行い、eif2a の活性化に伴う発現遺伝子の変化を解析する。共同研究者の親泊先生らと共同し、eif2a の活性化に伴う遺伝子発現の変化を心臓以外のモデルと比較検討し、心臓で特異的な変化を検証する。

eIF2a リン酸化シグナルの強度の活性化モデルマウスでの病態の検証

今回作製した  $\alpha$  MHC-Fv2E-PERK Tg マウスに長期間で大量の AP20187 を投与して eIF2 $\alpha$  を強く活性化させる。このモデルにおける、生存曲線、心機能の変化を確認する。eIF2a リン酸化シグナルの中等度の活性化モデルマウスと比較し、eIF2a リン酸化シグナルの心機能への影響を検討する。カルシウム動態の変化を検討する。ランゲンドルフ灌流モデルを用いて心筋を単離、カルシウムトランジェント測定等の細胞内カルシウム動態を検討する。電子顕微鏡等を用いて、心筋の形態、ミトコンドリアの形態、細胞内器官の形態を確認する。microarray による網羅的な遺伝子解析を行い、eif2a の活性化に伴う発現遺伝子の変化を解析する。eif2a の活性化と心筋収縮不全をつなぐ因子としての miRNA などの関与を検討する。

### 4. 研究成果

(1) 心筋特異的な eIF2 $\alpha$  のリン酸化シグナル活性化する遺伝子組み換えマウスの作成

心筋特異的な eIF2 $\alpha$  のリン酸化シグナル活性化する遺伝子組み換えマウスの作成に成功した。作製したマウスに dimerizer AP20187 を投与し、投与量依存的下流のシグナルである、eIF2 $\alpha$  のリン酸化が活性化することを、mRNA レベル、タンパクの翻訳レベルで確認した。

(2) eIF2a リン酸化シグナルの病態生理学的意義の検討

eIF2a リン酸化シグナルの中等度の活性化モデルマウスでの病態の検証

今回作製した  $\alpha$  MHC-Fv2E-PERK Tg マ

ウスに短期間で少量の AP20187 を投与して eIF2 $\alpha$  を中等度活性化させる。eIF2 $\alpha$  を中等度活性化させたマウスは、ランゲンドルフ虚血再灌流モデルや、in vivo での虚血再灌流傷害モデルで虚血抵抗性を示した。また、Capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) を用いたメタボローム解析の結果、NADH/NAD が高値である一方、GSSG/GSH が低値であり、酸化ストレスに対する抵抗性を示す表現型を示した。一方、アミノ酸の分布に大きな変化を認めており、虚血再灌流傷害に抵抗性を示す原因の 1 つと考えられた。

#### eIF2a リン酸化シグナルの強度の活性化

今回作製した $\alpha$  MHC-Fv2E-PERK Tg マウスに長期間で大量の AP20187 を投与して eIF2 $\alpha$  を強く活性化させる。このモデルでは、マウスに AP20187 を 3 日間連続で投与すると、マウスの心機能は正常の 1/5 程度(心収縮率 15%程度)まで低下し、ほぼ全例が心収縮低下で死亡した。しかし、AP20187 を 2 日間連続で投与すると、一過性に心収縮は低下(心収縮率 25%程度まで)するものの、10-14 日目には正常の心機能に改善した。この現象は臨床的には途絶心筋と同様の経過を示した。

ランゲンドルフ灌流モデルを用いてマウス心筋を単離し細胞内カルシウム動態を検討したところ、カルシウムトランジェントは低下し、カルシウム濃度の回復が遅れる所見を認めた。カルシウム動態の異常が心機能低下の原因と考えられた。

一方、心収縮低下時に電子顕微鏡での心筋組織を確認したところ、ライソゾームの増加を認めたものの、アクチンなどの心筋骨格は保たれており、ミトコンドリアにも大きな異常を認めなかった。

microarray による網羅的な遺伝子解析では心筋に多く発現している myoglobin などの心筋骨格関連遺伝子や、SERCA2 などのカルシウム動態を制御する重要な遺伝子群が全体的に低下していた。また、心筋に多く発現している miR1a, miR30a などの miRNA も発現を低下させていた。

また、eIF2a リン酸化シグナルが増強するに伴い、autophagy の亢進も確認され、これら複合的な作用を通して、強い eIF2a リン酸化シグナルのもとでは、虚血に対する抵抗性の獲得から心機能低下にシフトしていることが証明された。

#### 5 . 主な発表論文等 なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

西山信大 (Nobuhiro Nishiyama)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：40392500