

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893044

研究課題名(和文) Gqシグナルによる右心臓リモデリングと、その cGMP調節の解明

研究課題名(英文) Gq stress induced right heart remodeling and its modulation by cGMP

研究代表者

灌本 英樹 (Takimoto, Eiki)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20709513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：心肥大、心不全の研究はこれまで左心臓について行われており、右心臓病態の分子生物学的な研究は殆どされていない。我々は心肥大、心不全に中心的な役割を果たす Gq ストレスに対する右左心筋細胞の反応性の相違を明らかにするため、マウスの Gq ストレスモデルの左右心筋細胞を単離して、網羅的トランスクリプトーム解析をおこなった。その結果、非ストレス下においても、また Gq ストレスの反応性においても、左右心筋細胞には興味深い相違が存在することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Right heart hypertrophy/failure is clinically important, but its molecular mechanisms remain largely elusive. We performed comprehensive transcriptome analysis of right heart myocytes and left heart myocytes exposed to Gq stress, and found intriguing differences between right and left cardiac myocytes.

研究分野：循環器内科

キーワード：心不全 心肥大 Gqシグナル cGMP 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでに左心肥大、左心不全の分子機序に関しては精力的に研究されてきたが、右心肥大、右心不全の分子病態については殆ど知られていなかった。

(2) 右心不全においては、左心不全の標準治療である 遮断薬は (肺高血圧を伴う右心不全では) 禁忌であり、また ACE 阻害薬に対する効果も明らかなエビデンスが存在しない。

(3) 胎児期に右心臓と左心臓はそれぞれ隣接する心臓管 (ハートチューブ) から発生するが、その前駆細胞は異なり、成人心臓の解剖学的な形態も異なる。

(4) Gq シグナル (アンジオテンシン II) は左室心筋において心肥大、心不全の形成に中心的な役割を果たしている。このシグナルは cGMP シグナルを活性化することで抑制することができる。

2. 研究の目的

本研究では最先端のトランスクリプトーム解析 (RNA シークエンス) を中心に、正常、および病的状態における右室心筋細胞と左室心筋細胞の分子生物学的な相違を包括的に明らかにすることを目的とする。またサイクリック GMP シグナルによる抗心肥大、心不全作用の相違についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 雄性マウス (C57Bl6J 日本クレア) 8 - 9 週齢を使用。PDE5 阻害薬 (シルデナフィル治療群: 100mg/kg/day) と非治療群にわけて、2 週間のアンジオテンシン II (Sigma-Aldrich) 持続皮下投与 (432 µg/kg/day) をおこなった。対照群は生理食塩水を投与した。アンジオテンシン II、生理食塩水の皮下持続投与は浸透圧ポン

プ (ALZET osmotic pump) の植え込みによる。またシルデナフィルは餌 (Transgenic Dough Diet: Bio-Serv) にミックスすることにより投与した。動物は本研究プロトコルは東京大学動物施設 (IACUC) の承認を得て実施されている。

(2) マウスを安楽死させた後、心臓をとりだし、重量の評価を行った後に大動脈にカニューレーションしてコラゲナーゼ、プロテアーゼを含む HEPES バッファーで 9 分程度灌流した後、右室自由壁、左室自由壁から心筋細胞を単離し、それぞれ細胞ペレットを作成、液体窒素で凍結した。

(3) 凍結ペレットサンプルより TRI reagent (Molecular Research Center) を用いて total RNA を抽出し、そのうち polyA が付加されたものを TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina) で精製してライブラリを作成し、Genome Analyzer II (Illumina) でシークエンスした。また一部の代表的な遺伝子に関しては直接定量的リアルタイム PCR 法で評価をおこなった。得られた raw data は UCSC Genome Informatics で得られる C57Bl6J 由来マウスリファレンスゲノム mm9 にアライメントし、統計解析ソフト R 上で DEGseq (ver. 1.16.0) を用いて mRNA 発現量指標としての RPKM (reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads) を算出した。RPKM で左右心筋細胞、またアンジオテンシン II の反応性に有意な変化を認めたものについてさらに DAVID Bioinformatics Resources 6.7 の functional annotation tool を用いて ontology 解析をおこなった。統計学的解析は RNA-seq のデータについては StataSE 13.1 (Stata Corp LP)

を用い、他に関しては Microsoft Excel 2010 を用いた。2 群の比較には unpaired Student 's t-test、3 群以上の比較には one-way ANOVA を用いた。

4 . 研究成果

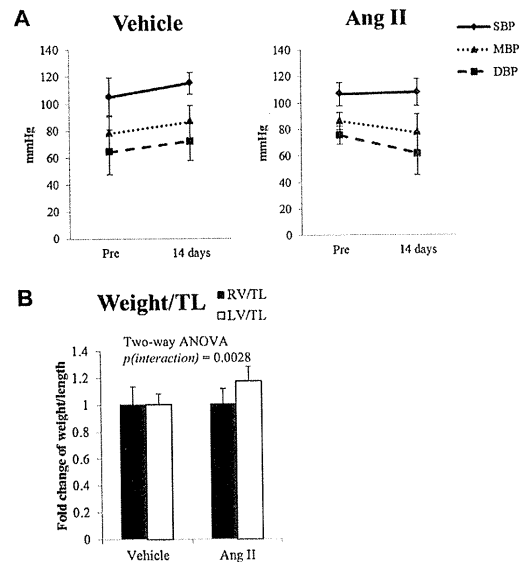
1) 非ストレス下における左右心筋細胞 mRNA 発現プロファイル

マウス単離心筋細胞ペレットから RNA-Seq を行い 22134 遺伝子について検討した。RPKM のを比較した結果、左室に発現量が多い($p < 0.05$)遺伝子は 2112 個、うち 2 倍以上の差がある遺伝子は 14 個であった。Gene ontology 解析では左室心筋細胞で発現の多い遺伝子は "regulator of GTPase mediated signal transduction" "intracellular signaling cascade" のカテゴリーに含まれ、右室心筋細胞で発現の多い遺伝子は "negative regulation of signal transduction" "negative regulation of cell communication", "negative regulation of Wnt receptor signaling" のカテゴリーに含まれた。これらの結果から心筋にストレスがかかっていない状態においても左右心筋細胞には mRNA 発現プロファイルに明確な差があることが示された。

(2) Gq ストレス存在下における左右心筋細胞 mRNA 発現プロファイル

2 週間のアンジオテンシン II (432 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) を行ったマウスでは、これまでの報告どおり、血圧の上昇をきたすことなく(次ページ図 A)、左心臓重量の増加を認めた(図 B)。非ストレス下の左右心筋細胞においてアンジオテンシン II

受容体遺伝子の発現に差は認めないことは確認した。



A. SBP, 収縮期血圧; MBP, 平均血圧; DBP, 拡張期血圧 B. RV, 右室心筋重量; LV, 左室心筋重量

これらの左右心臓から単離した心筋細胞ペレットを用いた RNA-Seq をおこない、ストレス負荷前と比較した増加(1.5倍以上)したもの、減少したもの(0.67倍以下)、変わらないものを検討したところ、以下の9グループに分類された。左右心室筋細胞のいずれかで遺伝子発現が1.5倍以上の変化を示したものは498遺伝子で、解析対象の2.2%に達した。

Angiotensin II 負荷後のマウス右室・左室心筋での遺伝子発現の変化

RPKM の挙動*			遺伝子数	%
右室で	左室で			
増加	不変	(Group 1)	122	0.55
増加	減少	(Group 2)	4	0.02
増加	増加	(Group 3)	66	0.3
不変	不変	(Group 4)	10091	45.59
不変	減少	(Group 5)	105	0.47
不変	増加	(Group 6)	83	0.37
減少	不変	(Group 7)	53	0.24
減少	減少	(Group 8)	61	0.28
減少	増加	(Group 9)	4	0.02
その他			11545	52.16
計			22134	100

Gene ontology 解析では Group 1 には “regulation of apoptosis” “regulation of programmed cell death” に関する遺伝子が多く含まれ、Group 6 には “blood vessel morphogenesis” に含まれる遺伝子が多く含まれた。また Group 3 には “circadian rhythm” “muscle contraction” に関する遺伝子が多く含まれた。これら結果より、右左心筋細胞はGqストレスに対して異なる反応を示すことが示された。PDE5阻害薬の反応性については現在検討中である。

(3) まとめ：心筋細胞は左右で異なる遺伝子発現プロファイルを有しており、心不全誘導ストレスに対する反応性も異なることが示された。右心肥大、右心不全の病態、さらには心肥大、心不全全体の病態理解を深める結果が得られたものと考えている。現在この結果を基にして右、左心筋細胞の相違の鍵となる候補について検討中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Takimoto E. Downstream target of cGMP-dependent protein kinase in heart failure (Las Vegas, NV, USA, Sep 15-17, 2014).

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧本英樹 (TAKIMOTO EIKI)
東京大学大学院医学系研究科
特任准教授
研究者番号：20709513