

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460312

研究課題名(和文) 形質膜イオン輸送体近傍から発信する細胞内シグナル増幅機構の解明

研究課題名(英文) Amplification of intracellular signaling initiated near the plasma membrane transporters

研究代表者

若林 繁夫 (Wakabayashi, Shigeo)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70158583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究開始当初に多くの問題点が明らかになり、NHE1に関連する研究を大幅に軌道修正したが、研究はおおむね順調に進行した。(1)心不全を起すNHE1のTgマウスにおいて、ベータブロッカーは病態の改善傾向があった。(2)培養心筋細胞を用いた研究により、NHE1結合タンパク質CHP3はGSK3betaのリン酸化を抑制することによって、心肥大を負に制御する因子であることが示唆された。(3)CHP3の遺伝子欠損マウスを用いた研究により、CHP3は低酸素刺激によって発現量を調節することで心肥大を制御する重要な分子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Many problems have emerged at the beginning of study, and we changed the direction of study related to NHE1. We proceeded the study successfully for the most part. (1) A beta-blocker were found to have a potential for improvement of the disease in a Tg mouse of NHE1 which causes a heart failure. (2) In vitro study using cultured cells revealed that NHE1-binding protein CHP3 negatively regulates cardiomyocyte hypertrophy via inhibition of GSK3beta. (3) Analysis of CHP3 knockout mice revealed that CHP3 negatively regulates cardiac hypertrophy caused by a chronic hypoxia by regulating the expression level of CHP3.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：心筋リモデリング 細胞内シグナル伝達 Ca<sup>2+</sup>結合蛋白質 心肥大 低酸素刺激 ノックアウトマウス

### 1. 研究開始当初の背景

本研究は、申請時に「形質膜にある Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体 (NHE1) などのイオン輸送体の活性化によって膜近傍で起こるイオン濃度変化が下流の酵素をどのように特異的に活性化し、シグナル伝達を増幅させるか」に主眼を置いた。しかし、平成 26 年度行った予備実験の結果、cAMP やカルシニユリンなどの NHE1 下流の細胞内酵素の活性変化を検出することは、シグナル強度が予想以上に弱く非常に困難であることがわかった。そこで当初の予定を軌道修正し、以下の研究を行った。

### 2. 研究の目的

(1) NHE1 の活性化変異体を心臓特異的に発現し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が持続的に高く、著明な心肥大・心不全を発症するトランスジェニックマウスを用いて、ベータ受容体遮断薬 (カルベジロール) の投与群非投与群と比較し、ベータ受容体遮断薬投与により心不全病態の改善が起こるかどうかを検討する。

(2) NHE1 の C-末端領域は活性の調節に重要な役割を果たしているが、これには様々なタンパク質が関与していることが知られている。その一つに Ca<sup>2+</sup>結合蛋白質であるカルシニユリン B 様蛋白質 (CHP) があり、その一つのアイソフォーム CHP3 は主に心臓に発現しているが、機能は不明である。ラット培養心筋細胞を用いて、siRNA による遺伝子ノックダウンおよび高発現の手法を用いて CHP3 の心筋細胞における機能を解明する。

(3) CHP3 遺伝子の欠損マウス (KO マウス) を作製し、個体における CHP3 の機能を明らかにする。通常飼育時におけるマウスの所見を調べたのち、低酸素などの様々な負荷を加えて、心機能がどのように変化するかを検討する。

### 3. 研究の方法

(1) ベータ受容体遮断薬投与実験。20 日齢の NHE1-Tg マウスを用いて、カルベジロールを 5 週間経口投与し、その有効性を検討する。心エコーならびに心カテーテルによる心機能評価を行う。また常法に従って、組織学的検討を行う。

(2) 新生仔ラット培養心筋細胞を用いた実験。新生仔ラットの心臓から、常法に従って心筋細胞を取り出し、培養を行う。CHP3 遺伝子の siRNA を組み込んだアデノウイルス心筋細胞に投与して、CHP3 遺伝子のノックダウンを行う。また逆に CHP3 遺伝子を組み込んだウイルスによって CHP3 蛋白質の高発現を行う。こうして得られた心筋細胞を用いて、細胞サイズ、リン酸化などの変化を測定する。

(3) CHP3 欠損マウスを用いてエコー及び心カテーテルによるベースラインの心機能、血行動態を測定する。次に、CHP3 欠損マウス

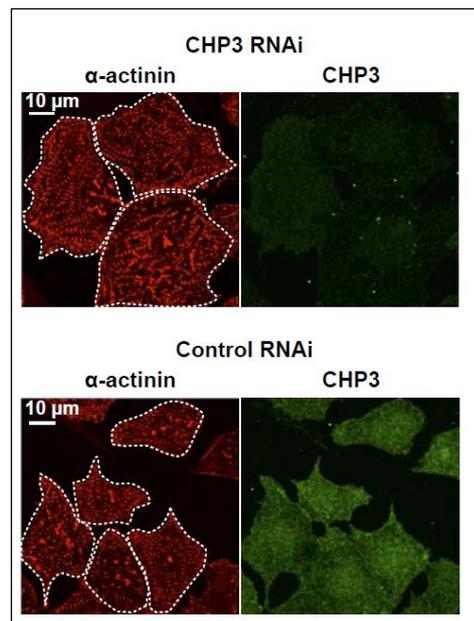
に慢性カテコラミン刺激による心不全モデル、慢性低酸素負荷による肺高血圧モデルを作製し、心肥大程度及び組織学的な検討を行う。

### 4. 研究成果

(1) NHE1-Tg マウスの心臓は 20 日齢から有意な心筋細胞の肥大を示し、心筋細胞の壊死・脱落それに伴う線維化など拡張型心筋症様の形態を呈することから、20 日齢の NHE1-Tg マウスを用いて、カルベジロールを 5 週間経口投与し、その有効性を検討した。心エコーならびに心カテーテルによる心機能評価によりカルベジロールを 5 週間経投与した群では心機能を改善と死亡率を改善する傾向が見られたが、改善効果を確認するにはさらなる実験が必要である。NHE1-Tg マウスを用いた薬理実験は数多くのマウスを用いる必要があり、飼育施設の規模からして NHE1-Tg マウスを交配によって数多く準備することが極めて難しいことが判明した。

(2) CHP3 遺伝子の siRNA を組み込んだ作成し、ラット心筋細胞に導入して CHP3 遺伝子発現を抑制した。これにより、心筋細胞の著明な肥大と肥大マーカー ANP の発現が見られた (図)。リン酸化アレイ解析によって、遺伝子ノックダウンした心筋細胞では、GSK3β のリン酸化が著明に増加し、逆に高発現では減少した。GSK3β は脱リン酸化で活性化されるリン酸化酵素で、心肥大を抑制することが知られている。これらの解析から、CHP3 は GSK3β のリン酸化を抑制することによって、心肥大を負に制御する因子であることが示唆された。

(3) 心筋細胞での実験結果を踏まえて、CHP3 の KO マウスの解析を行った。生後 2



週目から 28 週目までのマウスの心機能及び心臓のサイズを解析したところ、野生型マウスと比べ有意差は見られなかった。そこで、CHP3 欠損マウスに様々なストレスを与えて、心機能と組織学的な検討を行ってみた。予備

実験の結果、低酸素負荷が最も明白なフェノタイプを示すことがわかった。慢性低酸素刺激(8%酸素)4週間後、野生型マウスでは肺高血圧に伴う右心室肥大のみ生じるが、CHP3欠損マウスではこの右心室肥大に加えて、さらに左心室肥大も生じていた。また、野生型マウスの心臓におけるCHP3の発現は低酸素で著しく低下した。新生仔マウス心筋細胞においても、1%低酸素条件下においてCHP3の発現は著明に減少した。これらの結果により、CHP3は低酸素刺激によって発現量を調節することで心肥大を制御する重要な分子となる可能性が示唆された。

#### 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 11件)

1. Nakamura, T. Y., Nakao, S., Nakajo, Y., Takahashi, J. C., Wakabayashi, S., Yanamoto, H.: Possible Signaling Pathways Mediating Neuronal Calcium Sensor-1-Dependent Spatial Learning and Memory in Mice. (2017) *PLoS One* 12 (1), e0170829.
2. Takamatsu, G., Katagiri, C., Tomoyuki, T., Shimizu-Okabe, C., Nakamura, W., Hayakawa, T., Wakabayashi, S., Kondo, T., Takayama, C., Matsushita, M.: Tescalcin is a potential target of class I histone deacetylase inhibitors in neurons. (2016) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 482: 1327-1333.
3. Nakamura, T.Y., Nakao, S., Wakabayashi, S.: Neuronal Ca<sup>2+</sup>-sensor-1 contributes to stress tolerance in cardiomyocytes via activation of mitochondrial detoxification pathways. (2016) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 99: 23-34.
4. Sun, W., Uchida, K., Takahashi, N., Iwata, Y., Wakabayashi, S., Goto, T. Kawada, T., and Tominaga, M.: Activation of TRPV2 negatively regulates the differentiation of mouse brown adipocytes. (2016) *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology.* 468 (9), 1527-1540.
5. Sun, W., Uchida, K., Suzuki, Y., Zhou, Y., Kim, M., Takayama, Y., Takahashi, N., Goto, T., Wakabayashi, S., Kawada, T., Iwata, Y., and Tominaga, M.: Lack of TRPV2 impaired thermogenesis in mouse brown adipose tissue. (2016) *EMBO Report.* 17(3), 383-399. DOI: 10.15252/embr.201540819.
6. Iwata, Y., Suzuki, N., Ohtake, H., Kamauchi, S., Hashimoto, N., Kiyono, T., and Wakabayashi, S.: Cancer cachexia causes skeletal muscle damage via TRPV2-independent mechanism, unlike muscular dystrophy. (2015) *J. Cachexia, Sarcopenia and Muscle.* 7(3) 366-376. DOI: 10.1002/jcsm.12067.
7. Zanou, N., Mondin, L., Fuster, C., Seghers, F., Dufour, I., Clippele, M., Schakman, O., Tajeddine, N., Iwata, Y., Wakabayashi, S., Voets, T., Allard, B., and Gailly, P.: Osmosensation in TRPV2 dominant negative expressing skeletal muscle fibres. (2015) *J. Physiol.* 593 (17), 3849-3863. DOI: 10.1113/JP270522
8. Kobayashi S., Nakamura, T.Y., and Wakabayashi S.: Calcineurin B homologous protein 3 negatively regulates cardiomyocyte hypertrophy via inhibition of glycogen synthase kinase 3 phosphorylation. (2015) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 84: 133-142. DOI: org/10.1016/j.yimcc.2015.04.018.
9. Nakao, S., Wakabayashi, S., and Nakamura, T.Y.: Stimulus-dependent regulation of nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiomyocytes: a role of neuronal calcium sensor-1. (2015) *PLoS One* 10 (4), e0125050, DOI: 10.1371/journal.pone.0125050.
10. Shimada-Shimizu, N., Hisamitsu, T., Nakamura, T.Y., Hirayama, N., and Wakabayashi, S.: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 is regulated via its lipid-interacting domain which functions as a molecular switch: A pharmacological approach using indolocarbazole compounds. *Mol. Pharmacol.* (2014) 85: 18-28.
11. Kuramoto, K., Sakai, F., Yoshinori, N., Nakamura, T.Y., Wakabayashi, S., Kojidani, T., Haraguchi, T., Hirose, F., Osumi, T.: Deficiency of a lipid droplet protein, Perilipin 5, prevents diabetes-induced heart malfunction by suppressing lipid accumulation. (2014) *Mol. Cell Biol.* 34(14):2721-2731.

[学会発表](計 22件)

1. MeiHua Jin, Shigeo Wakabayashi, Soushi Kobayashi, Hirotsugu Tsuchimochi, Mikiyasu Shirai, James T. Pearson, Takeshi Ogo: A Novel Role of Calcineurin B Homologous Protein 3 in Hypoxia-induced Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. The 94th Annual Meeting of the Physiological Society. (March 29-31, 2016, Hamamatu, Japan).
2. 若林繁夫, スクマラン・ビジェヤクマ, 金美花, 稲垣薫克, 土持裕胤, 白井幹康: マウス大動脈狭窄心不全モデルにおける果実に含有するポリフェノール類の病態改善効果の検討. 第 89 回日本生化学会大会 2016 9.25-9.27 仙台
3. 金美花, 若林繁夫, 古林創史, 土持裕胤, 白井幹康: Production of calcineurin B homologous protein 3 knockout mice and analysis of cardiac function. The 93th Annual Meeting of the Physiological Society. 2016/3/22 to 2016/3/24, Sapporo,

- Japan.
4. 若林繁夫、中尾周、稲垣薫克、土持裕胤、中村 西谷友重、白井幹康：継続的な有酸素運動は  $\text{Ca}^{2+}$  センサー蛋白質欠損で起こるマウスの肥満を解消できる BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会および第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 3 日 神戸国際展示場
  5. 久光 隆、若林繁夫、中川 修： $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体 NHE1 とカルシニューリンとの結合に対する G タンパク質共役型受容体刺激の効果 BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会 合同大会 神戸ポートアイランド 2015.12.1-4
  6. 西谷(中村)友重、中尾周、中川修、若林繁夫 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  センサーによる新規代謝調節経路 Novel pathway of energy metabolism by neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  sensor-1 BMB2015 2015 年 1 2 月 1-4 日 神戸国際会議場・展示場
  7. 西谷(中村)友重、中尾周、若林繁夫 (シンポジウム)細胞内カルシウムセンサーによる心筋ストレス防御機構 心血管膜輸送研究会 2015(生理学研究所), 2015 年 10 月
  8. 西谷(中村)友重、中尾周、若林繁夫 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  センサー蛋白質を介した心筋内ストレス防御機構 第 108 回 近畿生理談話会 近畿大学 2015 年 10 月 24
  9. 岩田裕子、鈴木伸之、若林繁夫：癌悪液質における筋傷害に  $\text{Ca}^{2+}$  透過チャネルは関与するか？ 第 1 回日本筋学会学術集会 2015 年 7 月 8 日 国立精神・神経医療研究センター
  10. Sun, W., Uchida, K., Suzuki, Y., Zhou, Y., Kim, M., Takayama, Y., Takahashi, N., Goto, T., Wakabayashi, S., Kawada, T., Y., and Tominaga, M. Absence of TRPV2 impaired BAT thermogenesis in mice. The 5th International Ion Channel Conference June 26-30, 2015 Luzhou, Sichuan, China
  11. Boldt, C., Paliege, A., Jankowski, V., Wakabayashi, S., Hisamitsu, T., Bachmann, S., Mutig, K.: Calcineurin homologous protein 1 interferes with calcineurin-dependent regulation of the renal  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransporter. Experimental Biology meeting, March. 28-Apr, 2015 Boston/USA
  12. Wakabayashi, S., Nakao, S., Inagaki, T., Tsuchimochi, H., Nakamura, T.Y., Shirai, M. : Aerobic treadmill training prevents the obesity caused by gene disruption of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensor protein in mice 第 92 回日本生理学会 2015 年 3 月 23 日 神戸国際展示場
  13. 中村-西谷友重、中尾周、中川修、若林繁夫 (Nakamura-Nishitani, T.Y., Nakao, S., Nakagawa, O., Wakabayashi, S.) 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルによる代謝調節 Regulation of energy metabolism by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals) 第 92 回日本生理学会 2015 年 3 月 23 日 神戸国際展示場
  14. Jin, M., Wakabayashi, S., Tsuchimochi, H., Shirai, M.: Effects of Epac-specific inhibitor, ESI-09 on heart failure model mice 第 92 回日本生理学会 2015 年 3 月 22 日 神戸国際展示場
  15. Kobayashi, S., Wakabayashi, S.: Calcineurin B homologous protein (CHP3) regulates phosphorylation of GSK3beta 第 92 回日本生理学会 2015 年 3 月 21 日 神戸国際展示場
  16. 中尾 周, 中城有香子, 高橋 淳, 中川 修, 若林繁夫, 柳本広二, 中村(西谷)友重 (Nakao, S., Nakajo, Y., Takahashi, J.C., Nakagawa, O., Wakabayashi, S., Yamamoto, H., and Nakamura-Nishitani, T.Y.) カルシウムセンサー NCS-1 はマウスの空間学習・記録に寄与する Role of  $\text{Ca}^{2+}$  sensor-1 in learning and memory in mice 第 92 回日本生理学会 2015 年 3 月 21 日 神戸国際展示場
  17. 岩田裕子、鈴木伸之、大武仁美、若林繁夫：Cancer cachexia produces skeletal muscle damage via TRPV2-independent mechanism unlike muscular dystrophy. 癌悪液質筋萎縮は筋ジストロフィーとは異なり  $\text{Ca}^{2+}$  透過チャネル TRPV2 非依存的な機構で筋変性を起す 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 19 日 名古屋国際会議場
  18. Nakamura, T.Y., Nakao, S., Wakabayashi, S.: Cardioprotective Role of Neuronal  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor -1 during Stress. Biophysical Society 59th Annual Meeting Feb.11, 2015 Baltimore/USA
  19. 古林創史、若林繁夫：calcineurin B homologous protein 3 (CHP3) は Akt-GSK3 $\beta$  シグナルを調節する 第 86 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 18 日 国立京都国際会館
  20. 中尾 周、若林繁夫、中村(西谷)友重：マウス心筋細胞における核内カルシウム動態の生理的役割：細胞内カルシウム動態との関連について (talk) 第 86 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 17 日 国立京都国際会館
  21. 中村(西谷)友重、中尾 周、中城友香子、高橋 淳、若林繁夫、柳本広二：マウスの空間学習・記憶におけるカルシウムセンサー NCS-1 の役割 第 86 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 16 日 国立京都国際会館
  22. 若林繁夫、久光 隆、西谷(中村)友重、白井幹康： $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体のスフィンゴ脂質による活性化 第 86 回日本生化学

学会大会 2014年10月16日 国立京都  
国際会館

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

若林 繁夫 (Shigeo Wakabayashi)  
大阪医科大学・医学部・非常勤講師  
(2016年4月より)

研究者番号：70158583

### (2) 研究分担者

なし

研究者番号：

### (3) 連携研究者

金 美花 (Meihua Jin)  
国立循環器病研究センター・肺高血圧症先端医学研究部・研究員  
研究者番号：40746773