

平成21年5月7日現在

研究種目： 基盤研究（B）  
 研究期間： 2007～2008  
 課題番号： 19390217  
 研究課題名（和文） 自律神経による心機能の分子メカニズム

研究課題名（英文）  
 Molecular mechanism of autonomic regulation of cardiac function

研究代表者  
 石川 義弘（ISHIKAWA YOSHIHIRO）  
 横浜市立大学・医学研究科・教授  
 研究者番号：40305470

## 研究成果の概要：

心臓に発現するアデニル酸シクラーゼサブタイプの生理的意義を、ノックアウト動物などの遺伝子操作、サブタイプ特異的作動薬などの薬理学的手法を用いて、心機能制御に及ぼす影響を中心に検討した。とくに近年になって cAMP シグナルの新しい下流蛋白として同定された Epac と呼ばれる制御蛋白を中心にアデニル酸シクラーゼサブタイプとの関連を中心に検討した。本申請は、心機能の最大の制御メカニズムである自律神経調節の分子メカニズムの解明であり、交感神経刺激は心機能の最大の調節因子であることは数十年にわたって認識されてきたが、本研究によって、その分子メカニズムが cAMP によるシグナルネットワークの制御として解明されつつある。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓病態学

自律神経・心機能・cAMP・カテコラミン・分子

## 1. 研究開始当初の背景

心機能制御の中心は自律神経であり、カテコラミン受容体刺激による心筋細胞内cAMPの産生は、カルシウム・収縮関連蛋白のリン酸化を促し、心臓の変時性・変力性を増強する。アデニル酸シクラーゼはカテコラミン受容体刺激を受けてcAMPを産生する酵素であり、

9種のサブタイプをもち、申請者らの発見した5型サブタイプは6型とともに心臓型ファミリーを形成する。6型が胎児期に最大発現を示し、5型は成人心筋細胞において最大発現を示すことから、前者は胎児型、後者は成人心臓型と称されている。

心不全の治療におけるβ遮断薬が有効性は、すでに多数の大規模臨床試験によって証明されており、カテコラミン過剰刺激から心筋アポトーシスを防止するのが主要なメカニズムであるとされる。しかし導入に当たっての最大の副作用は心機能抑制であり、β受容体遮断を手段とする限り不可避の現象と考えられた。そこで、もしも心機能抑制をおこさないβ受容体シグナル遮断方法があれば、心不全の治療効果は向上すると考えられる。

本申請の特色は、心機能制御におけるアデニル酸シクラーゼサブタイプの意義を検討することを目標としつつ、従来β受容体のレベルでのみ考えられてきた交感神経シグナルの遮断を、アデニル酸シクラーゼサブタイプのレベルで考察することである。ノックアウト動物やサブタイプ選択的遮断剤を用いた我々の最近の実験から、5型サブタイプの抑制は、心機能をそこなわずに心不全の発症を抑制できる可能性が提示されている。

## 2. 研究の目的

本申請では、心臓に発現するアデニル酸シクラーゼサブタイプの生理的意義を、ノックアウト動物などの遺伝子操作、サブタイプ特異的作動薬などの薬理学的手法を用いて、心機能制御に及ぼす影響を中心に検討することである。

そこで現在までに得られた知見から、我々は以下の仮説を立てた。

1. 生理的ないしアポトーシスを起こさない病的交感神経刺激下では6型および中間型が心臓のAC活性の主体をなす。これらのサブタイプのみで心機能維持は十分である。
2. さらに高度の病的交感神経刺激がかかる5型の活性化が主体となるが、同時に心筋細胞のアポトーシスを引き起こし

てしまう。

つまり、5型は過剰な交感神経刺激に反応するための最後のリザーブとして機能するが、これが逆に心不全の原因となってしまうと考える。したがって5型の選択的抑制は、心機能を損なうことなくアポトーシスを抑制できる。我々の培養心筋細胞を用いた実験からは、5型サブタイプの軽度抑制が、著明なアポトーシス抑制をもたらした。このことは、5型の抑制は効率的にアポトーシスを抑制しうることを示唆する。さらに、このアポトーシス抑制効果は、5型の酵素活性の高さのみに由来するのではなく、GSK-Akt系に対する直接効果を含むと考えている。

かつて心不全時の交感神経活動の亢進は、心機能低下を補うための適応反応と考えられてきたが、近年の大規模臨床試験の結果が示すごとく、過剰亢進は心機能を改善せず増悪させている。そこでβ遮断薬が使用されるが、導入時の心機能低下が問題となり、導入が不可能な場合もある。心臓に発現するすべてのアデニル酸シクラーゼサブタイプ活性を、β遮断薬で抑制してやるのではなく、心不全の増悪により関わりの強いサブタイプを選択的に抑制してやるほうが合理的と仮定する。これはバイアグラがすべてのPDEサブタイプを抑制するのではなく、特定の目的に合致したPDEサブタイプのみを抑制するのと類似する。

我々の仮説では5型サブタイプがその対象であり、その証明のために個体における5型サブタイプの生理的役割を十分理解する必要があると考え、以下の実験をおこなった。

## 3. 研究の方法

主として5型ノックアウトモデルを用いて、慢性

カテコラミン刺激に対する5型欠損による心筋保護作用の分子メカニズムを中心として検討していく。同時に、 $\beta$ 受容体・アデニル酸シクラーゼサブタイプ別の共役や $\beta$ 受容体シグナルのダウンレギュレーションのメカニズムの検討をおこなった。

#### a) 交感神経・副交感神経バランスはどのように変化しているのか

5型ノックアウト動物の定常状態での心機能は低下しておらず、むしろ心拍数の軽度上昇が見られた。心臓におけるムスカリン受容体の数・親和性に変化は見られなかったため、心拍数の上昇は副交感神経機能の変化によると考えられた。従来からの生化学的実験から、心臓に発現するアデニル酸シクラーゼのすべてのサブタイプがGi蛋白による抑制(ムスカリン受容体による抑制制御)を受けるのではなく、5および6型など特定のサブタイプのみが抑制を受けることが知られている。このことは副交感神経による心機能抑制には5型ないし6型の発現が必要であることを意味する。そこで、5型ノックアウトモデルにおける心拍数の上昇は、副交感神経による心拍数抑制の減弱ではないかと考える。つまり、中枢からの副交感刺激があるにもかかわらず、心臓は副交感神経刺激に反応できなくなっていると考える。

#### 心拍数変動はどのように変化するか？

心拍数日内変動の分析とともに、心拍変動解析による高周波成分(HF成分)と低周波成分(LF成分)の解析は、心臓における自律神経制御がどのように変化しているかの指標になる。そこで、テレメトリーを用いて、HF、LFおよび両者の比率をノックアウト動物および野生種で比較する。

心臓自身の副交感神経反応性が減弱しているものであり、むしろ中枢における副交感神

経活動は亢進している可能性がある。これは標的臓器(心臓)における反応低下を補うための代償性上昇と推測される。

#### b) 慢性カテコラミン刺激に対する心筋保護作用の分子メカニズムはなにか？

浸透圧ミニポンプ植え込みによるイソプロテレノールの持続注入によって、マウスにおける心肥大および心機能低下がおこることが知られている。我々の準備実験結果によれば、5型ノックアウトモデルは野生種と同程度以上の心肥大を起こすが、Tunel染色によって比較したアポトーシス細胞数は著明に低下し、さらにGSK-Akt系の亢進が認められた。5型ノックアウトに生じた変化が、5型サブタイプの欠損による酵素活性の低下のみとすると、上記結果の説明は困難であり、同サブタイプに特有な制御メカニズムの存在が示唆されている。そこで以下の実験によって、それを検証していく。

#### GSK-Aktの系がどのように変化するか？

Aktは心筋肥大を制御する信号蛋白として知られるが、PDK-1によって活性化されることが知られている。PDK-1はリン酸化によって細胞膜に移動し、膜分画に存在するAktに作用する。さらに局所のcAMP濃度の上昇は膜に移動するPDK-1量を減少させることが知られている。そこで、我々は5型サブタイプはPDK-1と同じ膜局在性を持つことによって、PDK-1活性と抑制すると考えている。5型欠損は、PDK-1を抑制から解除するため、Aktの活性化を亢進させ、心肥大の進展を増強させるとともに、アポトーシスの進展を阻止するものと考えられる。したがって、GSK-Akt制御にかかわるFKHR、GSK3、p70S6kinase、などの発現量、細胞膜局局性、活性化(リン酸化)を比較検討していく。

#### Bcl-2/Bax系がどのように変化するか？

アポトーシスを制御するもうひとつのシグナルがBcl-2/Baxの系であり、圧負荷に対して5型ノックアウトマウスで著明なBcl-2の発現増加が認められた。最近の報告によれば、Bcl-2蛋白質の安定性がcAMPによって抑制されるという。またBcl-2の転写レベルでの制御も報告されており、5型ノックアウト動物におけるmRNAおよび蛋白レベルでの変化を検討していく。

#### *β* 受容体シグナルのダウンレギュレーションはどう変化するか？

一般に、慢性的カテコラミン刺激はβ受容体親和性・数の減少、Gs蛋白は不変であるがGi蛋白発現の増加をおこすことが知られている。またアデニル酸シクラーゼレベルの変化は、活性の軽度低下ないしmRNA発現の上昇もしくは低下のいずれも報告されている。

#### 4. 研究成果

##### a) 交感神経・副交感神経バランスはどのように変化しているのか

###### 心拍数変動はどのように変化するか？

心拍数変動解析によってパラボリック刺激など、自律神経調節を変動させる刺激に対して、自律神経の変動インデックスである standard deviation of normal R-R intervals を比較したところ、5型ノックアウト動物において顕著に上昇しており、逆に過大発現モデルにおいて低下していた。これらの所見から、自律神経調節の安定性がノックアウト動物で低下している可能性が考えられた。さらに交感神経の活動指標である低周波数成分と高周波数成分との比を求めたところ、野生種と過大発現モデルでは低下が見られたが、ノックアウトでは見られなかった。逆に副交感神経指標である Normalized HF を比較したところ、野生種で亢進、過大発現でさらに亢進が見られた。逆にノックアウトではそのような変化が見られなかった。これらの結果から5型サブタイ

プの発現量が、交感および吹く交感神経制御における反応の程度を決定するのに重要な役割を果たす可能性が示唆された。

##### b) 慢性カテコラミン刺激に対する心筋保護作用の分子メカニズムはなにか？

###### GSK-Aktの系がどのように変化するか？

カテコラミン刺激剤であるイソプロテレノールを浸透圧ミニポンプでマウスに植え込み (30mg/kg/day)、アデニル酸シクラーゼ5型サブタイプ欠損モデルにおける変化を検討したところ、心肥大の程度には有意差は見られなかったが、心拡大の程度はノックアウトにおいて有意に減少していた。心筋細胞におけるアポトーシスを検討したところ、ミニポンプ植え込み前は両軍に違いは見られなかったが、植え込み後は野生種において4-5倍の増加がみられた。同様にBcl-2の発現上昇とAkt-GSK系の亢進がノックアウトにみられた。後者の亢進は、PDKの膜移動、Aktリン酸化、FKHRの亢進の各レベルにおいて確認された。これらの所見から、ノックアウト動物における心筋保護効果にはBcl-2とAkt-GSKの変化が重要な役割を果たしていると考えられた。

###### *β* 受容体シグナルのダウンレギュレーションはどう変化するか？

アデニル酸シクラーゼ活性はダウンレギュレーションによって低下することが知られているが、ミニポンプ投与後のアデニル酸シクラーゼ活性はノックアウトにおいて低下が顕著であった。アデニル酸シクラーゼサブタイプの発現変化をみたところ、5型サブタイプは野生種でも発現低下が見られなかったが、それ以外のサブタイプは発現が低下しており、5型はダウンレギュレーションに抵抗性のサブタイプであることが推測された。

これらの結果から、我々の当初の仮説である、5型サブタイプは過剰な交感神経刺激に反応するための最後のリザーブとして機能するが、これが逆に心不全の原因となってしまうと考える仮説が指示された。ここに5型サブタイプの心機能調節における独自性が推測された。

#### 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8件)

Ulucan C, Wang X, Baljinnayam E, Bai Y-Z, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Hirotani S, and Ishikawa Y, Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy, *Am . J.Physiol.Heart Circ.Physiol*, 293,H1662-1672,2007.査読有

Iwatsubo K, Suzuki S, Li C, Tsunematsu T, Nakamura F, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Toya Y, Umemura S, and Ishikawa Y, Dopamine induces apoptosis in young, but not in neonatal, neurons via Ca(2+)-dependent signal, *Am . J.Physiol. Cell.Physiol*, 293, C1498-1508, 2007,査読有

Eguchi H,Iwatsubo K, and Ishikawa Y,Isoform-selective regulation of adenylyl cyclase by forskolin derivatives: Prediction of selectivity by computer-based analysis,*Letters in Drug Design & Discovery*, 4, 434-441,2007,査読有

Okumura S, Vanter DE, Kurotani R, Bai Y, Gao S, Yuan Z, Iwatsubo K, Ulucan C, Kawabe J, Ghosh K, Vanter FS, and Ishikawa Y, Disruption of Type 5 adenylyl cyclase enhances desensitization of the cyclic adenosine monophosphate signal and increases the Akt signal with chronic catecholamine stress, *Circulation*, 116, 1776-1783,2007, 査読有.

Okumura S, et al, Type 5 adenylyl cyclase plays a major role in stabilizing heart rate in response to microgravity induced by parabolic flight, *J Appl Physiol*, 105, 173-179, 2008,査読有.

Shimura M, et al, Sarcalumenin alleviates stress-induced cardiac dysfunction by improving Ca<sup>2+</sup> handling of the

sarcoplasmic reticulum, *Cardiovasc Res*, 77, 362-370, 2008.

Yokoyama U, et al, Epac 1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*, 295, H1547-55,2008.

Yokoyama U, et al,PGE<sub>2</sub>-activated Epac promotes neointimal cushion formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of PKA, *J. Biol. Chem*, 283, 28702-28709,2008.

[学会発表] (計6件)

Okumura S, Minamisawa S,Ishikawa Y, Disruption of type 5 adenylyl cyclase preserves cardiac function against chronic catecholamine stress,第11回日本心不全学会,2007,9,東京

赤池 徹,横山詩子,全 紅,岩本眞理,石川義弘,南沢享, Epac1 promotes intimal cushion formation of the rat ductus arteriosus by enhancing smooth muscle cell migration. 第71回日本循環器学会総会,2007,3,神戸

佐藤元彦,本多崇,ラニアー ステファン,豊田英嗣,シスモウスキー マリー,スマッカ アラン,チリアン ウィリアム,石川義弘, 虚血心筋に発現する新たなG蛋白活性調整因子の同定,第84回日本生理学会大会,2007,3,大阪

Sato M, et al,An Involvement of a Novel G-protein Activator on Hypoxia-Induced Apoptosis of Cardiomyocytes and its Interaction with Connexin 43,American Heart Association's Scientific Sessions 2008, New Orleans, 2008.

Okumura S,et al, Activation of Epac1-specific Signaling Protects Heart form Cytokine-Mediated Cardiac Dysfunction through the inhibition of Proinflammatory Cytokine Signaling(Oral presentation), American Heart Association's Scientific Sessions 2008, New Orleans, 2008.

Qibin J, et al, Sarcalumenin plays a critical role in age-dependent reduction in cardiac function and SERCA2a activity, *Experimental Biology*, San Diego, 2008.

[その他]  
ホームページ等  
[http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/  
~seiril/index.html](http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiril/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石川 義弘 (ISHIKAWA YOSHIHIRO)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：40305470

### (2) 研究分担者

佐藤 元彦 (SATO MOTOHIKO)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号：40292122

奥村 敏 (OKUMURA SATOSHI)  
横浜市立大学・医学部・准教授  
研究者番号：60233475

### (3) 連携研究者

南沢 享 (MINAMISAWA SUSUMU)  
横浜市立大学・医学研究科・客員教授  
研究者番号：40257332