

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590815
 研究課題名（和文） 心血管リモデリングにおける小胞体—ユビキチン・プロテアソーム系の役割の解明
 研究課題名（英文） Pathophysiological Role of ER-Ubiquitin/Proteasome System in Cardiovascular Remodeling
 研究代表者
 南野 哲男（MINAMINO TETSUO）
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：30379234

研究成果の概要：我が国での心不全患者数は増加しているが、その治療法は確立していない。心不全患者の予後改善・発症予防のためには、1) 心筋細胞死の抑制、2) 冠動脈プラーク破綻の抑制が有効であると考えられる。本研究では、蛋白の修飾・分解をつかさどる小胞体・ユビキチン/プロテアソーム系の異常が心筋細胞死や冠動脈破綻に深く関与することを見出した。本研究の成果は、心不全に対する新たな薬剤開発や臨床指標の確立に役立つことが期待できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：小胞体ストレス、心不全、心不全指標

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性心不全に対する治療法は、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬などの新たな薬剤や両室ペーシングなどの機械的療法の導入により改善したが、未だ満足のいくものではない。我が国の心不全患者数は増加傾向にあり、その治療に要する医療費は高額なため、心不全の有効な治療法の確立は、医学上のみならず社会上からも急務である。心不全患者の予後改善・発症予防のための戦略としては、1) 慢性心不全の病態進展・増悪において重要な役割を果たす心筋細胞アポトーシスの抑制、2) 虚血性心不全の基礎的病態である動脈硬化の進展抑制が考えられる。

ポストゲノム時代を迎え、蛋白の修飾・分解過程の障害と様々な疾患の関連が注目されている。これまで、肥大心・不全心における蛋白合成亢進や動脈硬化部位における平滑筋細胞増殖についての報告はあるが、蛋白の修飾・分解と心血管リモデリングについての検討はほぼ皆無である。新たに合成された分泌蛋白や膜蛋白は小胞体内で糖鎖修飾を受け、正しくフォールド（折りたたみ）されたのち分泌経路に運ばれる。しかしながら、過度な蛋白合成亢進や酸化ストレス/虚血/低酸素等はミスフォールド蛋白（高次構造上の異常タンパク質）の小胞体内蓄積を引き起こす（小胞体ストレス）。この小胞体ストレスに対する細胞応答として、蛋白フォールドを担う小胞

体シャペロンが誘導され、新規蛋白合成が抑制される（小胞体ストレス応答）。これらの細胞応答に加え、過剰蛋白は小胞体より細胞質に引き出され、ユビキチン化された後、プロテアソームにより分解される経路が存在する（小胞体関連分解）。一方、酸化ストレス等の小胞体ストレスを惹起しうる刺激の多くはプロテアソーム活性も低下させることが知られている。このプロテアソーム活性低下は異常蛋白のさらなる小胞体内蓄積を促進し、小胞体ストレスを増強させる。そして、ミスフォールド蛋白蓄積が小胞体応答や小胞体関連分解の対応能力を逸脱した時、小胞体より CHOP、JNK、caspase-12 を介するアポトーシスシグナルが発信される（小胞体発信アポトーシス）。このように小胞体-ユビキチン・プロテアソーム (U/P) 系は、アポトーシスシグナル発信の新たな場（細胞内小器官）として注目されている。現在、糖尿病や神経変性疾患などの発症・進展において、小胞体ストレスやU/P系の異常が重要な役割を果たすことが報告されている。一方、近年、プロテアソーム阻害剤（ボルテゾミブ）が多発性骨髄腫に対する抗がん剤として臨床応用されている。また、“奇跡の抗がん剤”といわれるチロシンキナーゼ阻害薬イマチニブが小胞体ストレスを介して心不全を引き起こすことが報告された（Nature Medicine 2006）。これらのことより、抗がん剤による難治性心不全発症に小胞体-U/P系が関与することが示唆される。さらに、動脈硬化の進展において、マクロファージなどの構成細胞のアポトーシスが重要な働きを果たす。興味深いことに、マクロファージに対するコレステロール負荷は小胞体ストレスを介してアポトーシスを誘導することが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、心血管リモデリングにおける小胞体-U/P系の役割解明、小胞体-U/P系障害に対する薬剤介入の可能性の検討、小胞体アポトーシスシグナル分子を用いた心不全の新たな臨床指標の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 冠動脈プラーク破綻における小胞体ストレス発信アポトーシスの役割

①ヒト冠動脈剖検サンプルを用いて、冠動脈硬化の程度と小胞体ストレスの関与を検討した。すなわち、小胞体シャペロン GRP78 ならびに小胞体発信アポトーシスシグナルである CHOP の発現と冠動脈破綻の重症度（線維被膜や破綻の有無）の関連を組織学的手法を用いて検討した。

②さらに、培養マクロファージ（THP-1 細

胞）ならびにヒト冠血管平滑筋細胞を用いて、酸化コレステロールによる細胞死における小胞体ストレス発信アポトーシスシグナルである CHOP、JNK、caspase-12 の役割を検討した。

(2) プロテアソーム阻害による心筋障害抑制法の開発

近年、プロテアソーム阻害剤は多発性骨髄腫に対する治療薬として臨床応用されており、その適応は現在も拡大している。しかしながら、その副作用として心不全発症頻度が増大することが明らかになった。そこで、プロテアソーム活性を抑制すると不良蛋白分解抑制による小胞体ストレス応答の活性化が予想される。そこで、ラット培養心筋細胞を用いて、プロテアソーム阻害による心毒性における小胞体ストレス発信アポトーシスの役割を検討した。

(3) 心不全患者の重症度判定の新たな指標としてのCHOP測定の有用性の検討

マウス圧負荷心不全モデルでは、心肥大代償期を経て不全期に移行することが知られている。同モデルにて、私たちは、小胞体発信アポトーシスシグナル CHOP が不全期のみ特異的に誘導が認められたため、心不全患者の重症度の新たな指標としての CHOP 測定の有用性について特許出願した（特願 2006-016514）。この特許出願を受けて、民間企業との CHOP 測定キット開発に成功した。心不全患者より得られた血液サンプルを用いて、血液中 CHOP 濃度と心不全重症度（NYHA 分類）の関連ならびに既存の指標である BNP との相違を検討した。

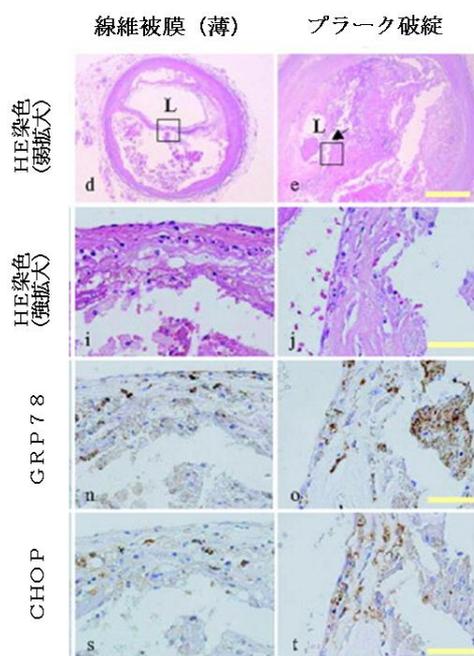
4. 研究成果

(1) 冠動脈プラーク破綻における小胞体ストレス発信アポトーシスの役割

① ヒト冠動脈（71 症例）の剖検例サンプルを用いて、小胞体ストレスシャペロン GRP78 と小胞体ストレス発信アポトーシスシグナル CHOP の発現を免疫組織にて評価し、冠動脈プラークの破綻との関連を検討した。興味深いことに、線維被膜が薄い症例やプラーク破綻した症例において、マクロファージや血管平滑筋細胞において小胞体ストレスに関連する GRP78 や CHOP 発現が誘導されていることが明らかになった（次ページ図）。

② 次に、培養マクロファージ、動脈硬化巣に豊富に存在する酸化コレステロール（7-keto-cholesterol, 7-KC）にて処理した。7-KC により、マクロファージは細胞死が誘導され、同時に、アポトーシスシグナル CHOP 発現が増加した。CHOP に対する siRNA にてアポトーシスが抑制された。したがって、酸化コレステロールによるマクロファージ細胞

死は小胞体ストレス発信シグナル CHOP を介することが明らかになった。培養冠動脈血管平滑筋細胞においても同様の結果が得られた。



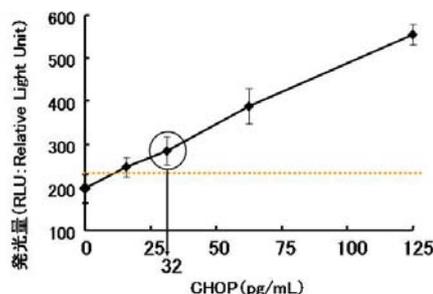
(2) プロテアソーム阻害による心筋障害抑制法の開発

ラット培養心筋細胞にプロテアソーム阻害剤投与すると心筋細胞死が誘導され、同時に、小胞体ストレス発信アポトーシスシグナル CHOP が誘導された。興味深いことに、小胞体シャペロン GRP78 の誘導は認められなかった。不良蛋白の折りたたみを促進し、小胞体ストレスを軽減する役割を有する小胞体シャペロン発現が抑制されていることは、さらに小胞体ストレスを増強させている可能性が考えられた。そこで、培養心筋細胞にアデノウイルスを用いて、小胞体シャペロン GRP78 を過剰発現させると、プロテアソーム阻害剤投与による心筋細胞死が抑制されることを明らかにした。以上より、プロテアソーム阻害による心筋障害抑制には、心臓特異的小胞体シャペロン増強が効果的であることが示唆された。

(3) 心不全患者の重症度判定の新たな指標としてのCHOP測定の有用性の検討

小胞体発信アポトーシスシグナル CHOP は不全期にのみ誘導が認められたため、心不全患者の重症度の新たな指標としての CHOP 測定の有用性について特許出願した (特願 2006-016514)。この特許出願を受けて、民間企業との CHOP 測定キット開発に成功した (右上図)。心不全患者より得られた血液サンプル

ルを用いて、血液中 CHOP 濃度と心不全重症度 (NYHA 分類) の関連ならびに既存の指標である BNP との相違を検討した。残念ながら、血液中 CHOP 濃度はすべての心不全患者で感度以下であり、新しい指標としての有用性は認められなかった。



CHOP測定キットの開発

GST-マウスCHOPを用いて評価。n=5で測定し、0濃度(プランク)の平均 \pm 2SDと重なりのない濃度を検計→最小検出感度:32pg/mL

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 4 件)

- ①Asai T, Tsukamoto O, Minamino T, 他 10 名, PKA rapidly enhances assembly and Activity in vivo canine hearts, J Mol Cell Cardiol, Vol 46, 452-462, 2009 年、査読有
- ②Fu H, Minamino T, Tsukamoto O, 他 8 名, Overexpression of ER-resident Chaperone Attenuates Cardiomyocyte Death Induced by Proteasome Inhibition, Cardiovas Res, Vol. 79 (4) 600-610 頁、2008 年、査読有
- ③Zhao H, Liao Y, Minamino T, 他 8 名, Inhibition of cardiac remodeling by Pravastatin is associated with amelioration of endoplasmic reticulum stress, Hypertens Res, Vol. 31 (10) 1977-1987 頁、2008 年、査読有
- ④Myoishi M, Hao H, Minamino T, 他 10 名, Increased Endoplasmic Reticulum Stress in Atherosclerotic Plaques Associated With Acute Coronary Syndrome, Circulation, Vol. 116(11):1226-33 頁、2007 年、査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 南野哲男、ミニシンポジウム < Cancer Therapeutics and Cardiotoxicity > 小胞体ケミカルシャペロンによるドキシ

ルビシン心毒性の軽減効果、第88回大阪府立成人病センターセミナーシリーズ、2009年3月23日、大阪

研究者番号：90379272

② 南野哲男、Symposium 10 <Subcellular Remodeling in the Failing Heart> <Ablation of C/EBP Homologous Protein Attenuates ER-mediated Apoptosis and Cardiac Dysfunction Induced by Pressure Overload>、第73回日本循環器学会総会・学術集会、2009年3月20日、大阪

③ 南野哲男、シンポジウム：心不全における心筋バイオマーカー小胞体ストレス誘導分子の心不全マーカーとしての有用性、第12回日本心不全学会学術大会、2008年10月16日、東京

④ 南野哲男、冠動脈プラーク破綻の新しい指標—小胞体ストレス誘導分子の測定キット開発、第56回日本心臓病学会学術集会・パネルディスカッション、2008年9月9日、東京

〔図書〕(計3件)

① 浅井光俊、南野哲男、メディカルレビュー社、心肥大・心不全と小胞体ストレス、2008年、51-59頁

② 塚本蔵、南野哲男、メディカルレビュー社、Cardiac Practice.18、活性酵素と小胞体ストレス、2007年、25-29頁

③ 浅井光俊、南野哲男、北隆館/ニュー・サイエンス社、Medical Science Digest 33、小胞体ストレスと心血管疾患、2007年1221-1224頁

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：心筋の小胞体ストレス抑制剤

発明者：南野哲男ら、他3名

権利者：大阪大学

種類：特願

番号：2007-247227

出願年月日：2007年9月25日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南野 哲男 (MINAMINO TETSUO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30379234

(2) 研究分担者

高島 成二 (TAKASHIMA SEIJI)

大阪大学・医学系研究科・独立准教授