

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790216
 研究課題名（和文） イノシトールリン脂質による心筋カルシウム輸送制御とその病態学的意義
 研究課題名（英文） Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and cardiac hypertrophy

研究代表者
 喜多 紗斗美 (KITA SATOMI)
 福岡大学・医学部・講師
 研究者番号：10461500

研究成果の概要（和文）：心臓に圧負荷が加わると心筋細胞が肥大して収縮力が増大し、心機能を維持しようとする。しかし、負荷が過剰になるとこの代償機能は破綻し、心肥大から心拡大・心不全へと移行する。したがって、心肥大の形成機序の解明は、心不全の予防・治療法の開発に繋がる重要な課題である。私たちは、細胞膜を構成するリン脂質を合成する酵素 PIP5 キナーゼが心肥大・心不全の発症に関わることを見出し、PIP5 キナーゼが心不全治療薬の創薬標的になる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase α , a major cardiac isoform, catalyzes the synthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂), which is a critical cell signal transducer. Although phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling to Akt is involved in physiological cardiac hypertrophy, whether PIP5K α promotes cardiac hypertrophy and functions is largely unknown. To address this issue, we generated a model of cardiac-specific transgenic mice with wild-type (WT) or dominant negative (DN) of PIP5K α .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：脂質キナーゼ、心肥大、シグナル伝達、脂質代謝異常、Na⁺/Ca²⁺交換輸送体

1. 研究開始当初の背景

種々の脂質キナーゼおよびホスファターゼにより触媒されるイノシトールリン脂質

代謝では、イノシトール環の3,4,5位水酸基のリン酸化部位の組合せの異なる7種類のホスホイノシチドが生成される。これらホスホ

イノシチドはそれぞれ固有の機能を有し、多様な生理反応に関与すると考えられている。最近、PI3Kの活性欠失型変異体高発現マウスにおいて、運動による心肥大が抑制されることが見いだされた。一方、このマウスでは圧負荷刺激による心肥大は抑制されなかった(Luo *et al.* Mol. Cell Biol. 2005, McMullen *et al.* PNAS 2007)。また、PI3Kの逆反応を媒介する PTEN の欠損マウスでは内発性の心肥大が認められることが報告されている(Crackower *et al.* Cell 2002)。現在、この機序に関して、PI3Kはセリン・スレオニンキナーゼ Akt を活性化し、さらに GSK3 β および NFAT を介して生理的心肥大を誘導すると推定されている。一方、PI3Kの上流と心肥大については殆ど研究が行われていない。

2. 研究の目的

心臓に圧負荷が加わると心筋細胞の肥大が生じて収縮力が増大し、心機能を維持しようとする。しかし、負荷が過剰になるとこの代償機能は破綻し、心肥大から心拡大・心不全へと移行する。したがって、心肥大の形成機序の解明は、心不全の予防・治療法の開発に繋がる重要な課題である。これまでに、脂質リン酸化酵素 PI3 キナーゼ (PI3K) -Akt 経路が重要であることが分かっているが、PI3Kの上流と心肥大については殆ど研究が行われていない。そこで、PI3Kの基質となる PI(4,5) P_2 量を変動させる目的で、PI(4)P から PI(4,5) P_2 を産生する PIP5K α (心臓型サブタイプ) の野生型ならびに活性欠失型変異体 (ドミナントネガティブ変異体、PIP5K α -DN) を心筋特異的に高発現させたトランスジェニックマウス(Tg)の作製に取り組み、ごく最近、その作出に成功した。興味深いことに、少数例の予備的検討において、PIP5K α -DN-Tg では病的な心肥大が抑制され、野生型 PIP5K α を過剰に導入したマウスでは逆に病的な心肥大が増悪することを見いだした。これは病的な心肥大においてもイノシトールリン脂質代謝が重要な役割を果たすことを示唆している。そこで、本研究では、独自に開発した PIP5K α 遺伝子改変マウスならびに種々心肥大・心不全モデルマウスを用い、生理的および病的な心肥大形成における PIP5K α ならびに各種ホスホイノシチドの役割を解明し、新たな心不全の予防・治療法の開発を目指す。特に、イノシトールリン脂質代謝の異常が引き起こすイオン輸送体・チャネルの制御破綻の関与について詳細に検討する。

3. 研究の方法

(1) PIP5K α 遺伝子改変マウスの作製ならびに心臓における PIP5K α 遺伝子およびタンパ

ク発現量の測定

心筋特異的 PIP5K α (野生型および抑制型) 高発現マウスは既に作製済みである。これらマウスの心臓の PIP5K α 遺伝子発現はリアルタイム RT-PCR により解析を行った。また、PIP5K α タンパク発現量の解析はウエスタンブロット法により行った。

(2) PIP5K α 遺伝子改変マウスの心臓における種々Ca 関連タンパク発現量およびシグナル因子の発現量・活性

20 週齢の PIP5K α -Tg、PIP5K α -DN-Tg および WT より心臓を摘出し、種々Ca 関連タンパク (NCX1, SERCA2, RyR, FKBP12) のタンパク発現量をウエスタンブロット法により測定した。また、心筋細胞の種々シグナル因子 (Akt, p-Akt, NFAT, ERK1/2, p-ERK1/2) の発現量を測定した。NFAT 活性化の測定については、NFAT-luciferase を高発現したマウス (供与: Dr. Molkenkin) を PIP5K α 遺伝子改変マウスと交配して得られたダブルトランスジェニックマウスの心臓の luciferase 活性を測定した。その他の因子は、Western blot 法により測定した。

(3) PIP5K α 遺伝子改変マウスおよび野生型マウスを用いた病的な心肥大モデルの作製

PIP5K α -Tg、PIP5K α -DN-Tg および正常マウス(WT)を用い、大動脈狭窄術による圧負荷モデルを作製した。これらマウスの心肥大形成の程度は心重量/体重比の測定・形態観察・組織標本の HE 染色を比較解析することにより行った。また、心機能の解析は、超音波診断装置を用いて M モード心エコー法により行った。

(4) 圧負荷誘発性心肥大モデルの心臓における心肥大マーカー・繊維化マーカーに対する PIP5K α 活性の影響

PIP5K α -Tg、PIP5K α -DN-Tg および WT に大動脈狭窄術を施し、心筋細胞の心肥大マーカーおよび繊維化マーカーについてリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析を行った。

(5) PIP5K α および NCX1 の心筋特異的ダブル遺伝子改変マウスの作製と心肥大解析

最近、申請者は、心筋特異的な活性型 NCX1 変異体高発現マウス (PI(4,5) P_2 結合親和性を高めた変異体、活性型 NCX1-Tg) を開発し、このマウスが拡張型心筋症を示すことを見いだしている (論文投稿中)。この活性型 NCX1-Tg と PIP5K α -DN-Tg を交配したダブル遺伝子改変マウスを作製し、組織学的解析 (HE 染色、アザン染色)、心機能の測定 (心エコー)、NFAT 活性の測定、心肥大マーカー・繊維化マーカーの解析 (リアルタイム RT-PCR 法) を行った。

4. 研究成果

(1) PIP5K α 遺伝子改変マウスの心臓における PIP5K α 遺伝子およびタンパク発現量

PIP5K α -Tg および PIP5K α -DN-Tg の心臓における PIP5K α の遺伝子発現量は、WT に比べて有意に増加していたが、 \otimes および \odot アイソザイムの発現量は WT と同程度であった。また、PIP5K α タンパク発現量は WT に比べて有意に増加していたが、 \otimes アイソザイムの発現量は WT とほとんど同じであった。

(2) PIP5K α 遺伝子改変マウスの心臓における種々 Ca 関連タンパク発現量およびシグナル因子の発現量・活性

PIP5K α -Tg、PIP5K α -DN-Tg および WT の心臓において、NCX1, SERCA2, PLB, RyR, FKBP12 のいずれのタンパク発現量も変化は見られなかった。また、ERK1/2、p-ERK1/2、および Akt 発現量は全てのマウスのしんぞうにおいて同程度であったが、p-Akt は PIP5K α -Tg の心臓でわずかに増加傾向が見られた。さらに、PIP5K α -Tg の心臓では、WT に比べて NFAT 活性が有意に増加していたが、PIP5K α -DN-Tg では WT と同程度であった。

(3) 圧負荷誘発性心肥大に対する PIP5K α 活性変化の影響

PIP5K α -Tg、PIP5K α -DN-Tg および WT に大動脈狭窄術を施したところ、WT および PIP5K α -Tg では 4 週間後に心肥大がみられたが、PIP5K α -DN-Tg の心臓においては心肥大が有意に抑制されていた。また、WT および PIP5K α -Tg の場合に見られた EF や左室内径短縮率 (FS) など心機能の低下は、PIP5K α -DN-Tg において改善効果が認められた。

(4) 圧負荷誘発性心肥大モデルの心臓における心肥大マーカー・繊維化マーカーに対する PIP5K α 活性の影響

WT を用いて圧負荷モデルを作製し、各種心肥大マーカー・繊維化マーカーの遺伝子発現量を解析したところ、圧負荷刺激によって心肥大マーカーである ANP、BNP が増加し、また、CTGF、MMP2、コラーゲン type3 などの繊維化マーカーの遺伝子発現の増加が見られた。一方、これらのマーカーの遺伝子発現量は、PIP5K α -DN-Tg に圧負荷刺激を加えた場合には有意に抑制されていた。

(5) PIP5K α および NCX1 の心筋特異的ダブル遺伝子改変マウスの作製と心肥大解析

心筋特異的な活性型 NCX1 変異体高発現マウス (XIP-Tg) の心臓では、心室内腔の拡大や心室壁のひ薄化がみられたが、XIP-Tg と PIP5K α -DN-Tg とを交配したダブル遺伝子改変マウス (D-Tg) の心臓では、心室内腔の拡大

や心室壁のひ薄化がほとんど見られなかった。また、XIP-Tg でみられた繊維化も D-Tg では改善されていた。XIP-Tg 心臓の EF や FS の低下も D-Tg では有意に抑制され、心機能の改善効果がみられた。また、XIP-Tg では ANP、BNP などの心肥大マーカーの増加ならびに Osteopontin、MMP2、コラーゲン type3 などの繊維化マーカーの増加がみられたが、これらマーカーの遺伝子発現量は D-Tg の心臓において有意に抑制されていた。

以上の結果より、PIP5K α は病的な心肥大や拡張型心筋症などにおいて重要な役割をしている可能性が示唆された。心臓において PIP5K α 活性を抑制することは、心肥大・心不全の発症の抑制につながることから、PIP5K α はこれら病態に対する治療薬のターゲットとしての可能性が期待される。

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 1 件)

- ① Satomi Kita, Takuya Iyoda, Takahiro Iwamoto. Cardiovascular Na⁺/Ca²⁺ exchanger: Pathophysiologic roles and therapeutic potentials. Med. Bull. Fukuoka Univ. 査読有、35(4), 2008, 211-218.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 喜多紗斗美、交感神経性血管トーン調節における TRPC3/NCX1 共役系の役割、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、岡山
- ② Satomi Kita, Cardiac-specific over-expression of NCX1. I-XIP mutant causes dilated cardiomyopathy in mice. Biophysical Society 54th Annual Meeting, 2010 年 2 月 23 日、サンフランシスコ (米国)
- ③ 喜多紗斗美、Dominant negative mutation in phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase improves cardiac remodeling in mice、第 83 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月 18 日、大阪
- ④ 喜多紗斗美、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼと心肥大、第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16 日、横浜
- ⑤ 喜多紗斗美、心肥大・心不全における心筋 PIP5 キナーゼの役割、トランスポーターワークショップ IN 鶴岡、2008 年 11 月 15 日、鶴岡
- ⑥ 喜多紗斗美、心筋 PIP5 キナーゼ活性制御

による心肥大・心不全の改善効果、トランスporterワークショップ IN 福岡、2008年11月2日、福岡

- ⑦ 喜多紗斗美、心筋PIP5キナーゼ活性制御と心不全：その機序と治療応用、特定領域「生体膜トランスporterソームの分子機構と生理機構」平成20年度第1回班会議、2008年9月24日、淡路島
- ⑧ 喜多紗斗美、ドミナントネガティブ型PIPKI α 遺伝子導入はマウス圧負荷心肥大を抑制する、第3回トランスporter研究会年会、2008年6月8日、京都

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多 紗斗美 (KITA SATOMI)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：10461500

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：