

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590928

研究課題名（和文）細胞内封入体を標的とした高齢者心不全治療法の開発

研究課題名（英文）Role of protein homeostasis in cardiac aging

研究代表者

塩井 哲雄（SHIOI TETSUO）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50360095

研究成果の概要（和文）：

【背景】心不全は典型的な加齢関連疾患である。しかし、心臓の加齢に伴う変化（心臓老化）がおこる仕組みについては不明の点が多い。【方法と結果】我々はマウスを用い心臓老化の仕組みを検討した。包括的な遺伝子発現解析により、タンパク質品質管理の異常が心臓老化の特徴であることが分かった。また、加齢に伴い心筋細胞にリポフスチンなどの細胞内封入体の蓄積を認めた。インスリン・シグナル抑制は、タンパク質品質管理を改善し、リポフスチン蓄積と心機能低下を予防した。【結論】心臓老化は介入により予防可能である。また、高齢者の心不全にはタンパク質変性疾患（Proteinopathy）としての側面がある可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Heart failure is a typical age-associated disease. Although age-related changes of heart are likely to predispose aged people to heart failure, little is known about the molecular mechanism of cardiac aging. We analyzed age-associated changes in murine heart and the manner in which suppression of the p110-alpha isoform of phosphoinositide 3-kinase activity modified cardiac aging. Cardiac function declined in old mice associated with the expression of senescence markers. Accumulation of ubiquitinated protein and lipofuscin, as well as comprehensive gene expression profiling, indicated that dysregulation of protein quality control was a characteristic of cardiac aging. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase preserved cardiac function and attenuated expression of the senescence markers associated with enhanced autophagy. Suppression of target of rapamycin, a downstream effector of phosphoinositide 3-kinase, also prevented lipofuscin accumulation in the heart. In conclusion, suppression of phosphoinositide 3-kinase prevented many age-associated changes in the heart and preserved cardiac function of aged mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

心不全は典型的な加齢関連疾患である。米国での疫学データによると心不全の頻度は60歳より増加しはじめ、心不全患者の多数は70歳以上である。一方で心機能は壮年期より低下し運動耐用能が低下する一因となる。心不全が加齢とともに増加する理由として以下の3つが考えられる。①糖尿病、高血圧、高脂血症などの危険因子にさらされる期間が長くなる、②生理的な加齢に伴う心機能の低下により心筋障害がおこったときに心不全を発症しやすくなる、③心臓老化の仕組みが心不全発症の仕組みに関連しており心臓老化が心不全の発症基盤となる。

最近のモデル動物を用いた研究で、老化のメカニズムが明らかになりつつある。特にインスリン/インスリン様増殖因子 (IGF) -1 シグナルが寿命調節に大切であることがわかり、それが契機となり老化の遺伝学的また分子生物学的研究が飛躍的に加速した。一連の研究により、インスリン/IGF-1 シグナルの適度な活性低下が個体寿命を延長することが分かっている。しかし、インスリン/IGF-1 シグナルがどのように個体寿命を調節しているかについては、解決されるべき点が残されている。

特に問題であるのは臓器特異性である。すなわち、特定の臓器におけるインスリン/IGF-1 シグナルが重要であるのか？、または、それぞれの臓器で老化を調節しているのか？、もしそうであれば臓器ごとの老化に同じように作用するのか？、である。脂肪細胞や神経細胞でのインスリンシグナルの低下はマウスで寿命を延長する。このことは特定臓器のインスリン/IGF-1 シグナルが内分泌学的に作用することを意味する。一方、心臓特異的にインスリン/IGF-1 シグナルを抑制したショウジョウバエでは加齢による心機能低下が予防された⁵。このことはインスリン/IGF-1 シグナルは個々の臓器の老化を調節することを示唆する。

2. 研究の目的

心臓老化のメカニズムを解明するため、マウスを用いて加齢に伴う心臓の変化を分子生物学的に検討し、その変化に対するインスリン/IGF-1 シグナル抑制の効果を検討した。

3. 研究の方法

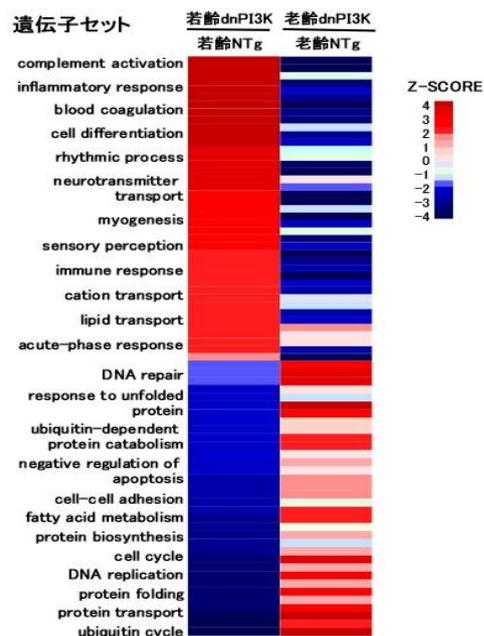
加齢に伴う心臓の変化を解析するため、3ヶ月齢(若齢)と20ヶ月齢(老齢)の野生型マウスの心臓を比較した。

さらに加齢に伴う心臓の変化におけるインスリン/IGF-1 シグナルの役割を検討した。PI3キナーゼ (PI3K) はインスリン/IGF-1 シグナルの情報伝達に大切な脂質リン酸化酵素であり、細胞の増殖・分化・代謝・遊走などに大切である。心臓特異的に抑制型 PI3K

(dnPI3K)を若齢より恒常的に発現させたマウスを3ヶ月齢と20ヶ月齢で比較した。

4. 研究成果

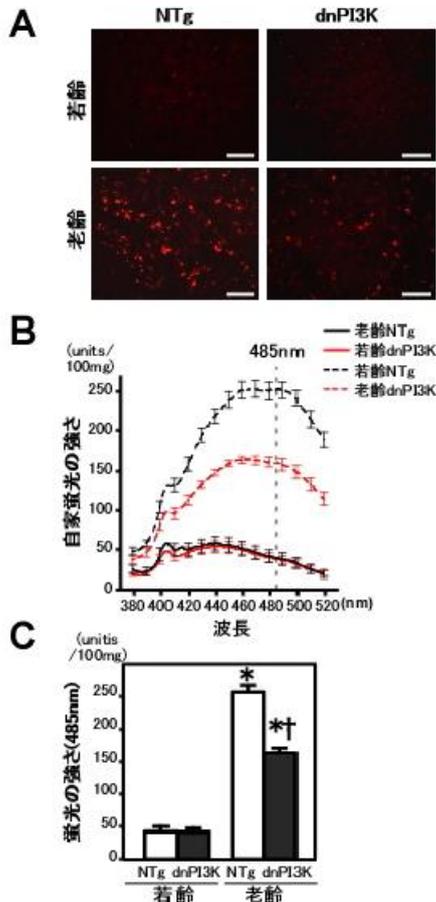
加齢に伴う心臓の変化を解析するため、3ヶ月齢(若齢)と20ヶ月齢(老齢)の野生型マウスの心臓を比較した。DNAチップにより網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、protein folding、ユビキチン・プロテアソーム系などタンパク質品質管理に関する遺伝子の発現が減少していた(図1)。



【図1】PI3Kの抑制は老化に伴い変化した遺伝子を抑制した。老化に伴う遺伝子発現の変化とその変化に対するPI3K抑制の効果を、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を用いて検討した。生物学的な働きごとに遺伝子セットを作成し、遺伝子発現の変化を調べる解析手法 (parametric analysis of gene set enrichment: PAGE) を用いた (各群6個の心臓を使用)。老齢野生型 (Non-Transgenic: NTg) マウスでは若齢野生型マウスに比べ75の経路が変化していた。発現が増加した遺伝子群は赤で、発現が低下した遺伝子群は青で示した。75の遺伝子群のうち主な26経路の名称を示す。右側はPAGE解析によって老齢抑制型PI3K (dnPI3K) マウスと老齢野生型マウスを比較した。PI3K抑制は加齢に伴う心臓の遺伝子発現変化の多くを予防することが分かる。

また、心筋細胞内に細胞内封入体であるリポフスチン封入体の出現を多数認めた(図2)。リポフスチンは加齢に伴い神経細胞、心筋細胞、肝細胞などで蓄積してくる自家蛍光を発する難溶性の物質と定義され種々の細胞内

構成成分がその起源とする。一方で酸化ストレス、DNA 損傷、細胞死に関連する分子については加齢による変化が少なく、タンパク質品質管理の異常が心臓老化の大きな特徴であることがわかった。



【図2】PI3K抑制は加齢に伴うリポフスチンの蓄積を予防した。(A) 心臓組織のリポフスチン沈着を蛍光顕微鏡にて分析した。老齢野生型 (Non-Transgenic: NTg) マウスでは若齢マウスに比べ著明なリポフスチン沈着を認めた。(B) 有機溶媒を用いてリポフスチンを抽出し、蛍光強度を測定した。広範な波長にわたるシグナルが検出された。(C) 485nmの波長の自家蛍光の強さを比較した。老化に伴うリポフスチンの増加は dnPI3K マウスで軽減された。* $P < 0.05$ vs 同種の若齢マウス † $P < 0.05$ vs , 同種の NTg マウス。

心臓特異的に抑制型 PI3K (dnPI3K) を若齢より恒常的に発現させたマウスでは、加齢に伴う心機能低下と細胞内封入体の増加が予防された。インスリン/IGF-1 シグナルはタンパク質品質管理に大切であるオートファジーを負に制御することが知られているが、dnPI3K マウスでは若齢よりオートファジーの亢進がみられた。さらに老齢の野生型マウスに PI3K の下流にあるラパマイシン標的

子 (Target of Rapamycin: TOR) の阻害薬であるラパマイシンを投与するとリポフスチンが減少し、リソゾーム阻害薬を投与することによりオートファジーを抑制するとリポフスチンが増加した。よって、リポフスチンの形成にオートファジーが関与しオートファジーの亢進が異常タンパク質蓄積を除去し老化を予防したと思われる。

最近になりタンパク質品質管理の異常が心不全の発症に関与することが示されている。特に、オートファジーは心不全の組織で亢進しており、恒常的オートファジーの低下は心不全を悪化させる。加齢に伴うタンパク質品質管理の異常は心臓老化が高齢者の心不全発症の分子基盤である可能性を示唆する。オートファジーはミトコンドリア機能の維持に大切であることもわかっており 9、10、タンパク質ホメオスタシスの低下がミトコンドリア機能を低下させ、加齢に伴う心機能低下に関与する可能性も考えられる。

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 8 件)

- ① Niizuma S, Inuzuka Y, Okuda J, Kato T, Kawashima T, Tamaki Y, Iwanaga Y, Yoshida Y, Kosugi R, Watanabe-Maeda K, Machida Y, Tsuji S, Aburatani H, Izumi T, Kita T, Kimura T, Shioi T. Effect of persistent activation of phosphoinositide 3-kinase on heart. *Life Sci*. 査読有、in press、2012、DOI: 10.1016/j.lfs.2012.02.010
- ② Kato T, Niizuma S, Inuzuka Y, Kawashima T, Okuda J, Kawamoto A, Tamaki Y, Iwanaga Y, Soga T, Kita T, Kimura T, Shioi T. Analysis of liver metabolism in a rat model of heart failure. *Int J Cardiol*. 査読有、in press、2011、DOI: 10.1016/j.ijcard.2011.07.056
- ③ Kawashima T, Inuzuka Y, Okuda J, Kato T, Niizuma S, Tamaki Y, Iwanaga Y, Kawamoto A, Narazaki M, Matsuda T, Adachi S, Takemura G, Kita T, Kimura T, Shioi T. Constitutive SIRT1 overexpression impairs mitochondria and reduces cardiac function in mice. *J Mol Cell Cardiol*. 査読有、51、2011、1026-1036 DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.09.013
- ④ Kato T, Niizuma S, Inuzuka Y, Kawashima T, Okuda J, Tamaki Y, Iwanaga Y, Narazaki M, Matsuda T, Soga T, Kita T, Kimura T, Shioi T. Analysis

- of Metabolic Remodeling in Compensated Left Ventricular Hypertrophy and Heart Failure. *Circ Heart Fail*. 査読有、3、2010、420-30
- ⑤ Lin RC, Weeks KL, Gao XM, Williams RB, Bernardo BC, Kiriazis H, Matthews VB, Woodcock EA, Bouwman RD, Mollica JP, Speirs HJ, Dawes IW, Daly RJ, Shioi T, Izumo S, Febrario MA, Du XJ, McMullen JR. PI3K (p110alpha) protects against myocardial infarction-induced heart failure: identification of PI3K-regulated miRNA and mRNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 査読有、4、2010、724-32
- ⑥ Inuzuka Y, Okuda J, Kawashima T, Kato T, Niizuma S, Tamaki Y, Iwanaga Y, Yoshida Y, Kosugi R, Watanabe-Maeda K, Machida Y, Tsuji S, Aburatani H, Izumi T, Kita T, Shioi T. Suppression of Phosphoinositide 3-kinase Prevents Cardiac Aging in Mice. *Circulation*. 査読有、120、2009、1695-703
- ⑦ Pretorius L, Du XJ, Woodcock EA, Kiriazis H, Lin RC, Marasco S, Medcalf RL, Ming Z, Head GA, Tan JW, Cemerlang N, Sadoshima J, Shioi T, Izumo S, Lukoshkova EV, Dart AM, Jennings GL, McMullen JR. Reduced Phosphoinositide 3-Kinase (p110{alpha}) Activation Increases the Susceptibility to Atrial Fibrillation. *Am J Pathol*. 査読有、175、2009、998-1009
- ⑧ Rigor DL, Bodyak N, Bae S, Choi JH, Zhang L, Ter-Ovanesyan D, He Z, McMullen JR, Shioi T, Izumo S, King GL, Kang PM. Phosphoinositide 3-kinase Akt signaling pathway interacts with protein kinase Cbeta2 in the regulation of physiologic developmental hypertrophy and heart function. Phosphoinositide 3-kinase Akt signaling pathway interacts with protein kinase Cbeta2 in the regulation of physiologic developmental hypertrophy and heart function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有、296、2009、H566-72
- [学会発表] (計 7 件)
- ① Kato T, Shioi T, Niizuma S, Kawashima T, Okuda J, Kawamoto A, Tamaki Y, Iwanaga Y, Soga T, Kita T, Kimura T. Cardiac cachexia is associated with abnormal liver metabolism and pro-inflammatory responses in a rat model of heart failure. 2011年11月12-16日、Orange County Convention Center(Orlando, USA)
- ② Kawamoto A, Shioi T, Kato T, Niizuma S, Kawashima T, Okuda J, Tanada Y, Tamaki Y, Kimura T. Te-99m sestamibi is a useful noninvasive method to assess cardiac mitochondrial function in vivo. The 83th Scientific Sessions of American Heart Association. 2011年11月12-16日、Orange County Convention Center (Orlando, USA)
- ③ Shioi T. Role of phosphoinositide 3-kinase in cardiac aging. Ninth Annual Scientific Sessions, Society for Heart and Vascular Metabolism (招待講演)、2011年6月18日、Dolce La Hulpe Brussels (ブリュッセル, ベルギー)
- ④ Kawashima T, Inuzuka Y, Okuda J, Kato T, Niizuma S, Tamaki Y, Narazaki M, Matsuda T, Adachi S, Takemura G, Kita T, Kimura T, Shioi T. Constitutive SIRT1 overexpression impairs mitochondrial function in mice. The 82th Scientific Sessions of American Heart Association. 2010年11月13-17日、Chicago (USA)
- ⑤ Niizuma S, Inuzuka Y, Okuda J, Kawashima T, Kato T, Tamaki Y, Kawamoto A, Iwanaga Y, Yoshida Y, Kosugi R, Watanabe-maeda K, Machida Y, Tsuji S, Aburatani H, Izumi T, Kita T, Kimura T, Shioi T. A constitutive activation of phosphoinositide 3-kinase modifies cardiac aging in mice. The 82th Scientific Sessions of American Heart Association. 2010年11月13-17日、McCormick Place(Chicago, USA)
- ⑥ Okuda J, Niizuma S, Kato T, Inuzuka Y, Kawashima T, Tamaki Y, Iwanaga Y, Kita T, Kimura T, Shioi T. Overexpression of phosphoglycerate mutase, a glycolytic enzyme, induces proinflammatory response and impairs cardiac function. The 82th Scientific Sessions of American Heart Association. 2010年11月13-17日、McCormick Place (Chicago, USA)
- ⑦ Kato T, Niizuma S, Inuzuka Y, Kawashima T, Okuda J, Tamaki Y, Iwanaga Y, Narazaki M, Matsuda T, Soga T, Kimura T, Kita T, Shioi T. Analysis of Metabolic Remodeling in the Transition From Cardiac Hypertrophy to Failure. The 81th Scientific

Sessions of American Heart Association. 2009年11月18日、Orange County Convention Center (Orlando, USA)

〔図書〕(計2件)

- ① 塩井哲雄、新妻晋一郎、南山堂、エビデンスに基づく循環器病予防医学、「老化と予防」、2011、76-84
- ② 塩井哲雄、エル・アイ・シー、疾患モデルの作成と利用、循環器疾患、遺伝子改変動物(心肥大・心不全)、2010、86-90

〔その他〕

ホームページ等

<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/sinfuzen/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩井 哲雄 (SHIOI TETSUO)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：50360095

(2) 研究分担者

近藤 祥司 (KONDOH HIROSHI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：80402890