

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18975

研究課題名(和文) Ca²⁺負荷モデルマウスで発症する心肥大心不全に対する効果的な薬物運動療法の研究研究課題名(英文) Study on the drug exercise therapy that is effective for cardiac hypertrophy heart failure that develops in Ca²⁺ load model mouse

研究代表者

金 美花 (JIN, MEIHUA)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：40746773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE1)過大発現させたマウスは繁殖が困難であるため、当初の予定を変更してNHE1とも密接な関連があるカルシニューリンB様蛋白質(CHP)3のKOマウスを用いて解析を行った。通常飼育時においてCHP3欠損マウスの心機能および心臓重量は野生型マウスと変わらなかった。興味深いことに慢性低酸素負荷において、野生型マウスでは右心室のみ肥大したが、CHP3欠損マウスでは左心室にも有意な肥大が確認された。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することから、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である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Since Na⁺ / H⁺ exchanger (NHE1)-overexpressed mice are difficult to reproduce, we modified the original schedule. Using knockout mice, we analyzed the function of calcineurin B-like protein (CHP) 3 which were closely related to NHE1 in vivo. The results indicated that the cardiac function and the cardiac weight of CHP3-deficient mice at the baseline were not different from those of the wild type mice. A chronic hypoxia induced the right ventricle hypertrophy in the wild-type mice. In contrast, interestingly, in addition to the right ventricle it caused a significant left ventricle hypertrophy in the CHP3-deficient mice. In addition, since the expression of CHP3 in the heart of the wild type mice was markedly decreased by hypoxia. Thus, it was suggested that CHP3 could be an important molecule that might negatively regulate cardiac hypertrophy caused by hypoxic stimulation, by controlling the expression level.

研究分野：循環器

キーワード：heart failure hypertrophy hypoxia Ca²⁺-binding protein

1. 研究開始当初の背景

心不全はすべての心疾患の末期像であり、人口の高齢化などを背景にして、全世界で増加していると推定されている。高血圧などにより心臓に力学的負荷がかかると、個々の心筋細胞は肥大する。心肥大はポンプ機能を増強させる適応反応であるが、やがて適応は破綻し、心拡大、細胞死（アポトーシス）、線維化が顕著になり心不全に至る。様々な遺伝子発現変化を伴うこの心筋リモデリングの過程において、細胞内 Ca^{2+} シグナルが極めて重要な役割を果たすことが明らかになっている(Heineke, J, Molkentin, J. D, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006)。しかし、 Ca^{2+} 過負荷に端を発した心肥大から如何にして心不全に至るかはよくわかっていない。本研究は、細胞内 Ca^{2+} 濃度が持続的に高く、それによって明確な心肥大・心不全のフェノタイプを示すモデルマウス、及び Ca^{2+} 結合蛋白質の欠損マウスを用いて、病態解明を試みた。

2. 研究の目的

研究開始当初の目的は、 Na^+/H^+ 交換輸送体(NHE1)の活性化変異体を心臓特異的に発現し、細胞内 Ca^{2+} 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(NHE1-Tgマウス)を用いて、NHE1の阻害以外の方法論(薬物や運動療法)で、このマウスの心不全を抑制する方策を発見することであった。つまり、 Ca^{2+} 過負荷がどのシグナル系に最大限に影響することが心不全発症につながるのかを解明することをめざした。しかし、NHE1-Tgマウスは著しい心不全のために、NHE1-Tgのホモマウス同士の交配では繁殖が困難であった。そこで、NHE1-Tgの雄と野生型(WT)の♀を交配させて、ヘテロTgマウスを実験に用いることにしたが、4分の1という低確率でしかTgマウスが得られないことに加え、NHE1-Tgマウスは20日目から死亡したり、妊娠しても胎児死があった。そのた

め薬理実験に使える同じ週齢のマウスの数をたくさん揃えるのがとても難しく、従って、申請時の計画を期間内に終わらせることが大変困難であることが判明した。このような理由からNHE1とも密接な関連があるCHP3のKOマウスを用いた実験をメインに行うことに方針転換した。

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^{2+} 結合蛋白質であるカルシニユリンB様蛋白質(CHP)があり、三つのアイソフォームが知られている。CHP1はヒトの組織に広く発現し、CHP2はガン細胞に、CHP3は主に心臓に発現している。しかし、CHP3は心臓特異的に発現しているがその機能は不明である。本研究では、CHP3欠損マウスを用い、心臓におけるCHP3の機能を個体レベルおよび細胞レベルで解明し、CHP3という新しいシグナル分子の心臓における機能および病態的意義を明らかにすることをめざした。

3. 研究の方法

CHP3欠損マウスはすでに作製済みであり、まず、CHP3欠損マウスを用いてエコー及びカテーテルによるベースラインの心機能、血行動態を測定した。

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、心肥大の程度及び組織学的へんかの検討を行った。

4. 研究成果

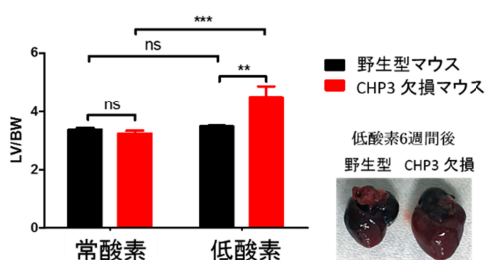
CHP3欠損マウスの生後2週目から28週目までのマウスの心機能及び心臓のサイズを解析したところ、野生型マウスと比べ有意差は見られなかった。そこで、CHP3欠損マウスに様々なストレスを与えて、心機能と組織学的な検討を行ってきた。予備実験の結果、低酸素負荷が最も明白なフェノタイプ変化

を示すことがわかった。

1. CHP3欠損マウスの心機能に対する慢性低酸素負荷の影響の検討

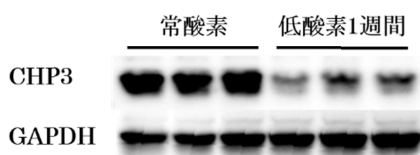
慢性低酸素刺激（8%酸素）4週間後、野生型マウスでは肺高血圧に伴う右心室肥大のみ生じるが、CHP3欠損マウスではこの右心室肥大に加えて、さらに左心室肥大も生じていた（図1）。

図1 慢性低酸素刺激による左心室肥大



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（図2）。

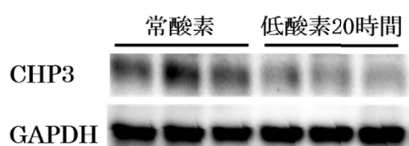
図2 低酸素刺激により左心室でCHP3発現量は低下



2. 培養心筋細胞を用いた、CHP3遺伝子発現に対する低酸素負荷の効果の検討

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（図3）。

図3 低酸素刺激により培養心筋細胞でCHP3発現量は低下



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である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- Huiling Jin, Takayuki Fujita, **Meihua Jin**, Reiko Kurotani, Yuko Hidaka, Wenqian Cai, Kenji Suita, Rajesh Prajapati, Chen Liang, Yoshiki Ohnuki, Yasumasa Mototani, Masanari Umemura, Utako Yokoyama, Motohiko Sato, Satoshi Okumura, Yoshihiro Ishikawa. Epac activation inhibits IL-6-induced cardiac myocyte dysfunction. *J Physiol Sci*. Dec,2016.
- Daisuke Shimura, Yoichiro Kusakari, Tetsuo Sasano, Yasuhiro Nakashima, Gaku Nakai, Qibin Jiao, **Meihua Jin**, Tomohiro Yokota, Yoshihiro Ishikawa, Atsushi Nakano, Nobuhito Goda, Susumu Minamisawa. Heterozygous deletion of sarcolipin maintains normal cardiac function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310(1):92-103 Jan, 2016.
- Qibin Jiao, Qiang Ke, Weiwei Li, **MeiHua Jin**, YanLuo, Linan Zhang, DongYang, Xingwei Zhang. Effect of inflammatory factor-induced cyclo-oxygenase expression on the development of reperfusion-related no-reflow phenomenon in acute myocardial infarction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 42(2):162-70, Feb,2015.
- Satoshi Okumura*, Takayuki Fujita*, Wenqian Cai*, **Meihua Jin*** (*equal contribution), Iyuki Namekata, Yasumasa Mototani, Hui-Ling Jin, Yoshiki Ohnuki, Yayoi Tuneoka, Reiko Kurotani, Kenji Suita, Yuko Kawakami, Shogo Hamaguchi, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Takashi Tsunematsu, Yunzhe

Bai, Sayaka Suzuki, Yuko Hidaka, Masanari Umemura, Yasuhiro Ichikawa, Utako Yokoyama, Motohiko Sato, Fumio Ishikawa, AHiroko Izumi-nakaseko, Satomi Adachi-Akahane, Hikaru Tanaka, Yoshihiro Ishikawa. Disruption of Epac1 decreases Phosphorylation of Phospholamban and protects the against stresses. *J Clin Invest* 124(6):2785–2801, Jun, 2014.

5. Utako Yokoyama, Susumu Minamisawa, Aki Shioda, Ryo Ishiwata, **Mei-Hua Jin**, Munetaka Masuda, Toshihide Asou, Yukihiko Sugimoto, Hiroki Aoki, Tomoyuki Nakamura and Yoshihiro Ishikawa. Prostaglandin E2 Inhibits Elastogenesis in the Ductus Arteriosus via EP4 Signaling. *Circulation* 28;129(4):487-96, Jan, 2014.

[学会発表](計3件)

1. **MeiHua Jin**, Shigeo Wakabayashi, Soushi Kobayashi, Hirotugu 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. **MeiHua Jin**, Shigeo Wakabayashi, Soushi Kobayashi, Hirotugu Tsuchimochi, Mikiyasu Shirai. Production of calcineurin B homologous protein 3 knockout mice and analysis of cardiac function. The 93th Annual Meeting of the Physiological Society. (March 22-24, 2016, Sapporo, Japan).
3. **MeiHua Jin**, Shigeo Wakabayashi, Hirotugu Tsuchimochi, Mikiyasu Shirai.

Effect of Epac-specific inhibitor, ESI-09 on heart failure model mice. The 92th Annual Meeting of the Physiological Society. (March 21-23, 2015, Osaka, Japan).

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 連携研究者

若林 繁夫 (Shigeo Wakabayashi)
大阪医科大学・医学研究科・薬理学教室・研究員
研究者番号：70158583

(3) 研究協力者

白井 幹康 (Mikiyasu Shirai)
国立循環器病研究センター・肺高血圧症先端医学研究部・特任研究員
研究者番号：70162758