

平成 22 年 5 月 1 日 現 在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590809
 研究課題名（和文） ZAKI-4 トランスジェニックマウスを用いた心筋リモデリング制御機構の解明
 研究課題名（英文） Clarification of regulatory mechanisms for myocardial remodeling in cardiac-specific overexpression of ZAKI-4 in mice
 研究代表者
 永田 浩三 (NAGATA KOHZO)
 名古屋大学・医学部（保健学科）・准教授
 研究者番号：20378227

研究成果の概要：心筋特異的 ZAKI-4 トランスジェニックマウスを用いることにより、肥大刺激に応答した心筋リモデリング形成におけるカルシニューリンの役割とその分子メカニズムを解明することを試みた。結果、肥大刺激におけるカルシニューリン活性化は心筋細胞肥大と心筋間質線維化形成の両方に重要な役割を果たし、さらに拡張機能を制御する可能性があることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：ZAKI-4、トランスジェニックマウス、心筋肥大、心筋線維化、拡張機能

1. 研究開始当初の背景

(1) ZAKI-4 は甲状腺ホルモン応答遺伝子としてヒト皮膚培養線維芽細胞よりクローニングされた。ZAKI-4 タンパク質には 2 アイソフォームが存在し、心臓には主としてアイソフォームが発現していることが明らかにされた。近年、ZAKI-4 がマウスの筋原細胞においてカルシニューリン依存性の転写応答を阻害し、かつ横紋筋に多く発現することが明らかにされたことより、我々は内因性心肥大抑制因子としての ZAKI-4 の可能性に着目するに至った。

(2) 我々は心臓生理学の世界的権威であるニュージャージー医科歯科大学 Stephen F.

Vatner 教授、世界で数少ない内因性心肥大抑制因子研究の専門家である同大学佐渡島純一教授との共同研究において ZAKI-4 を心筋特異的に過剰発現する ZAKI-4 トランスジェニック (TG) マウスを世界で初めて作製した。免疫抑制剤でありカルシニューリン阻害薬である FK506 やサイクロスポリン A は、多くの生物学的作用を有し、他臓器への影響などの問題があるため、ZAKI-4 は内因性心肥大抑制因子として新たな治療標的になり得ると期待される。

2. 研究の目的

(1) ZAKI-4 TG マウスを用いることにより、

肥大刺激に应答した心肥大・心筋線維化形成におけるカルシニューリンの役割とその分子メカニズムを解明すること
 (2) カルシニューリン系と他の内因性心肥大/心筋線維化促進系及び抑制系との相互作用を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 生後 6 ヶ月齢の ZAKI-4 TG マウスに対して、浸透圧ポンプを用いて昇圧量 (432 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$) のアンジオテンシン II (Ang II) または vehicle の持続投与 (4 週間) を行った。同一週齢の野生型 (WT) マウスを対照群として用いた。

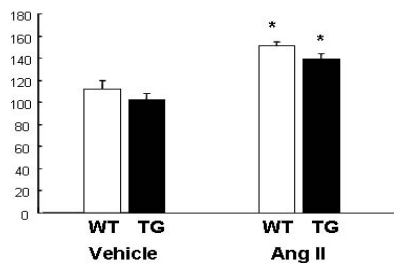
(2) 血圧測定 (tail-cuff)、心エコー、観血的な心機能計測、臓器重量測定、心筋病理解析、心筋遺伝子発現定量を施行した。

4. 研究成果

Ang II 注入 4 週後の主要なデータを下記に示す。(* $p < 0.05$ vs. vehicle, † $p < 0.05$ vs. WT)

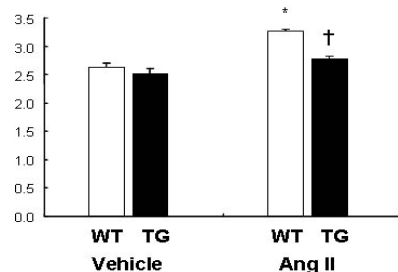
(1) 収縮期血圧 (mmHg)

収縮期血圧は WT、TG ともに Ang II 群で高値を示し、WT と TG の間では差を認めなかった。



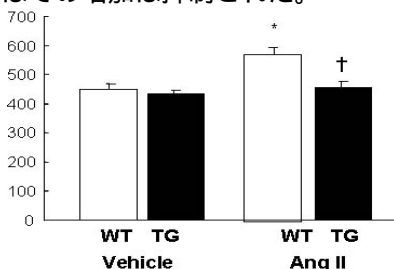
(2) 左室重量/体重比 (g/mg)

左室肥大の指標である左室重量/体重比は WT では Ang II により増加したが、TG ではその増加は抑制された。



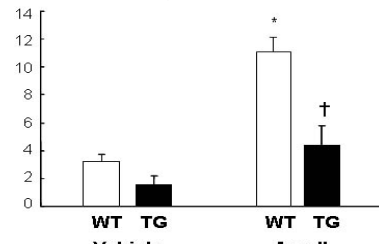
(3) 左室心筋細胞横断面積 (μm^2)

心筋細胞肥大の指標である左室心筋細胞横断面積は WT では Ang II により増加したが、TG ではその増加は抑制された。



(4) 左室心筋線維化

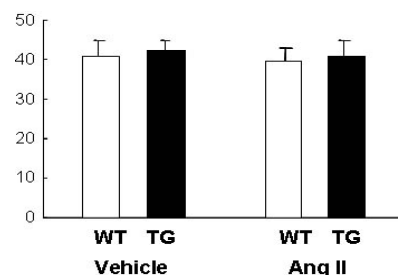
左室心筋間質線維化面積 (%、下図) は WT では Ang II により増加したが、TG ではその増加は抑制された。



一方、左室心筋冠血管周囲線維化については Ang II による冠血管周囲線維化面積比の増加は TG で抑制されなかった。

(5) 左室内径短縮率 (%)

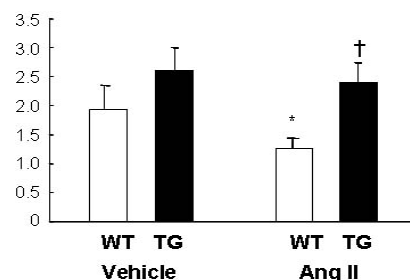
左室短軸 M モード心エコー図では収縮機能の指標である左室内径短縮率は 4 群間で差を認めなかった。



左室拡張末期径は群間で差を認めなかった。

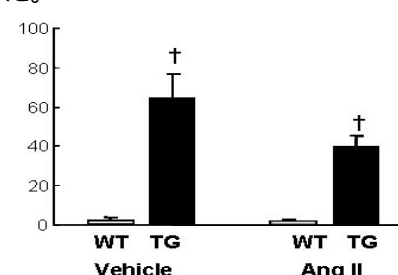
(6) 左室 E/A 比

左室流入血流速波形より求めた拡張機能指標である E/A 比は WT では Ang II により減少したが、TG ではその減少は抑制され、拡張機能の改善が示唆された。

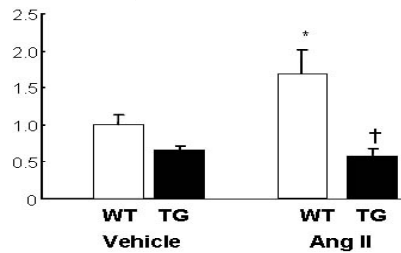


(7) 心筋 ZAKI-4 発現

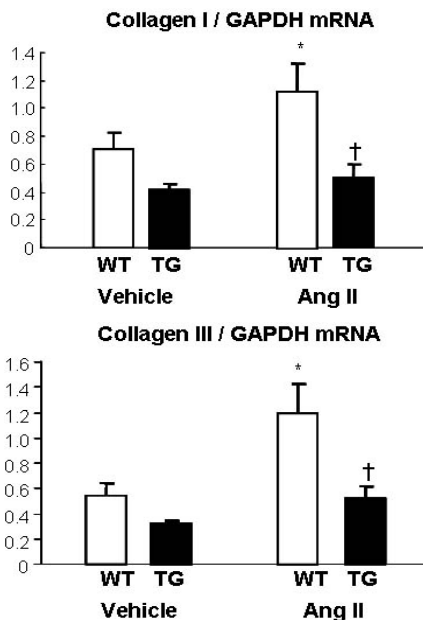
心筋 ZAKI-4 /GAPDH mRNA 比は TG で増加しており、Ang II による有意な影響はみられなかった。



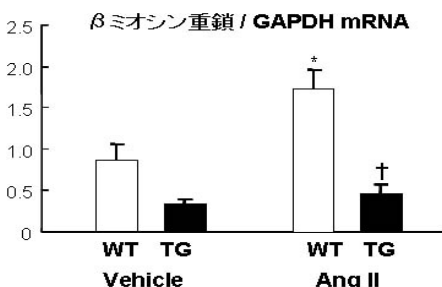
(8) 心筋カルシニューリン発現
心筋カルシニューリン/GAPDH mRNA 比はWT では Ang II により増加したが、TG ではその増加は抑制された。



(9) 心筋コラーゲン発現
心筋 I 型及び III 型コラーゲン/GAPDH mRNA 比はWT では Ang II により増加したが、TG ではそれらの増加は抑制された。



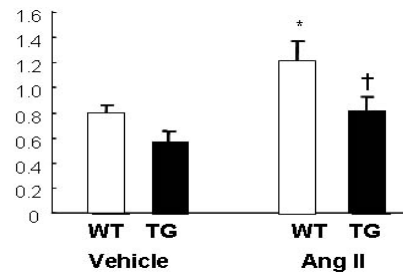
(10) 心筋肥大マーカー遺伝子発現
心筋 ミオシン重鎖/GAPDH mRNA 比はWT では Ang II により増加したが、TG ではそれらの増加は抑制された。



一方、心筋心房利尿ペプチド (ANP) 及び脳性利尿ペプチド (BNP) の mRNA 発現はWT では Ang II により増加したが、TG ではそれらの増加は抑制されなかった。

(11) 心筋 transforming growth factor (TGF)- 1 発現

線維化促進因子である心筋 TGF- 1 の mRNA 発現 (GAPDH 比) はWT では Ang II により増加したが、TG ではその増加は抑制された。



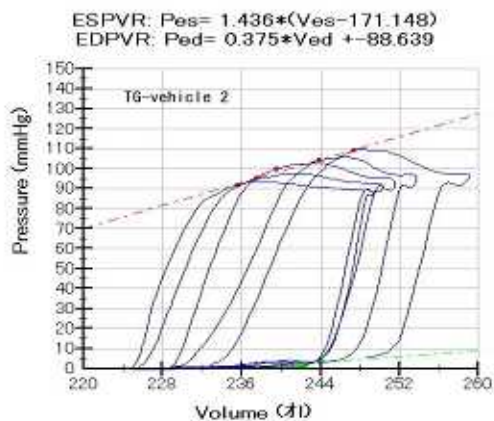
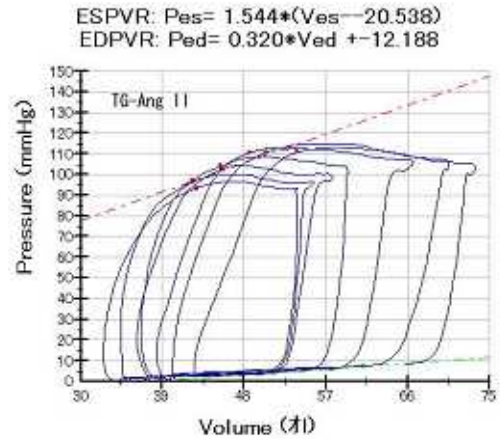
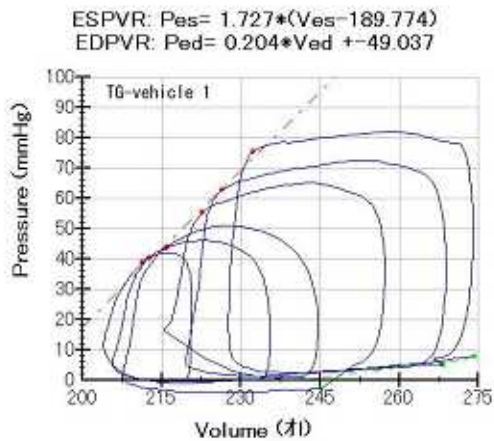
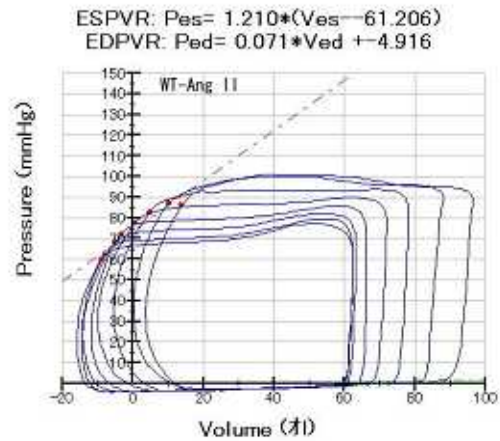
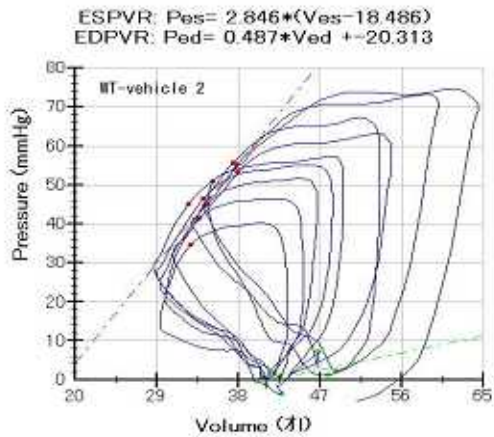
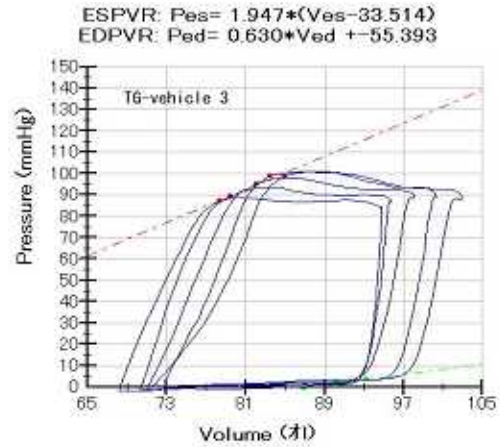
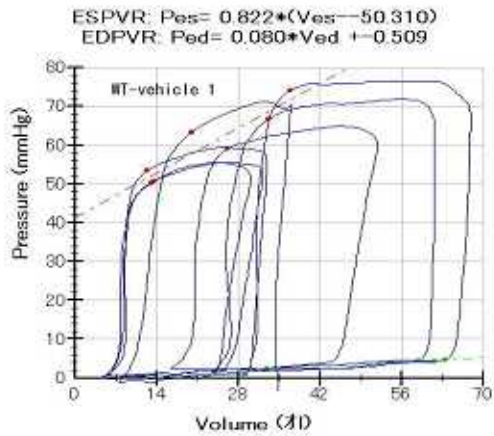
以上の結果をまとめると、ZAKI-4 過剰発現による内因性カルシニューリン阻害は：

- 1 . Ang II 誘導性高血圧に伴う左室肥大と心筋間質線維化の両方を抑制することが示された。
- 2 . Ang II 誘導性高血圧に伴う拡張障害を改善することが示唆され、心肥大や心不全の治療標的となる可能性が示唆された。
- 3 . Ang II 誘導性高血圧に伴う心筋冠血管周囲線維化を抑制しなかったが、そのメカニズムは不明であり、今後の課題である。
- 4 . Ang II 誘導性高血圧に伴う ANP や BNP の発現増加を抑制しなかったが、そのメカニズムは不明であり、今後の課題である。

また、心エコーでは Ang II 後の左室内径短縮率には差がなかったため、ZAKI-4 過剰発現によるカルシニューリン阻害は Ang II 負荷後の左室収縮性には影響しない可能性があるが、拡張期特性については研究分担者の横田等は TG マウスにおける大動脈結紮による圧負荷後に左室弛緩やスティフネスは WT と比べてかえって悪化するという、本研究の結果と相反する結果を報告した (AHA2005, Am J Physiol, 2009)。

我々はさらに、本モデルを用いて小動物用圧・容積測定用コンダクタンスカテーテルを用いて左室収縮末期圧容積関係 (ESPVR) と拡張末期圧容積関係 (EDPVR) の解析を試みた。吸入麻酔下で気管切開による人工呼吸を実施しつつ手技を行ったが、心尖部よりのカテーテル挿入や下大静脈の閉塞方法など技術的に極めて難しく、術中死亡が多発した。また、コンダクタンスカテーテルが 2 極であるため容積精度が不良であり、かつ、容積補正法も難しかったため信頼するに足る容積値は得られなかった。結局、圧容積ループを描くことができたのは合計 7 例のみ (WT-vehicle 2 例, TG-vehicle 3 例, WT-Ang II 1 例, TG-Ang II 1 例) で、統計解析に耐えられるだけのデータを得ることはできなかった。

以下に、実際に得られた圧容積ループを示す。



- ・ここで、ESPVR の傾きは負荷に依存しない左室収縮性の指標（収縮末期エラストンス）を表す。
- ・一方、EDPVR の傾きは左室拡張期スティフネスの指標（拡張末期エラストンス）を表す。EDPVR は指数関数に近似されることもあるが、本研究では直線近似とした。
- ・TG マウスにおいて Ang II 後に拡張機能が WT と比べて悪化するか否かはさらなる検討が必要である。

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. Gelpi RJ, Yokota M, Vatner SF, Sadoshima J, et al. Genetic inhibition of calcineurin induces diastolic dysfunction in mice with chronic pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有
2009;297:H1814-H1819.

〔学会発表〕(計 1 件)

2. Nishizawa T, Nagata K, Noda A, Cheng XW, Izawa H, Yokota M, et al. Cardiac-specific overexpression of ZAK1-4 attenuates LV hypertrophy and interstitial fibrosis, but not coronary perivascular fibrosis, induced by angiotensin II. 第71回日本循環器学会総会・学術集会。神戸。2007年3月15-17日。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

永田 浩三 (NAGATA KOHZO)
名古屋大学・医学部(保健学科)・准教授
研究者番号：20378227

(2)研究分担者

野田 明子 (NODA AKIKO)
名古屋大学・医学部・助教
研究者番号：80252287

成 憲武 (CHENG XIAN WU)
名古屋大学・医学部・助教
研究者番号：30378228

橋本 克訓 (HASHIMOTO KATSUNORI)
名古屋大学・医学部(保健学科)・助教
研究者番号：70324423

(3)連携研究者

横田 充弘 (YOKOTA MITSUHIRO)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：50201851

井澤 英夫 (IZAWA HIDEO)
名古屋大学・医学系研究科・講師
研究者番号：80402569