

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：19590844

研究課題名 (和文) 心筋—内皮組織間のパラクラインシグナルネットワークと心不全

研究課題名 (英文) The role of paracrine signal networks between myocardium and endothelium in the prevention of heart failure

研究代表者

中岡 良和 (NAKAOKA YOSHIKAZU)

大阪大学・医学系研究科・特任助教 (常勤)

研究者番号：90393214

研究成果の概要：

Neuregulin-1 (NRG-1) は心臓機能維持に必須の増殖因子であるが、その作用機序の詳細は明らかではなかった。我々は、内皮細胞から分泌される NRG-1 が心筋細胞上の ErbB 受容体に作用して心筋からの Angiopoietin-1 (Ang1) の分泌を誘導して、心臓組織の内皮細胞系を安定化することにより心臓の機能維持に関わることを明らかにした。そこで我々は Ang1 心筋特異的欠損マウスを作成した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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：心不全、心筋—内皮相互作用、Gab ファミリー蛋白質、angiopoietin-1、neuregulin-1、心内膜弾性繊維症

1. 研究開始当初の背景

レセプター型チロシンキナーゼ (RTK) を介したシグナル伝達は心筋の機能維持において重要な役割を担うことがこれまで知られていた。その RTK の下流で、スキップフォールディングアダプター蛋白質の Gab ファミリー蛋白質が重要な役割を担うことが近年報告されていた。そこで、我々は心臓で発現する Gab ファミリータンパク質の Gab1 と Gab2 を欠損させた場合の心機能に対する影響を検討することにした。その目的にそって、心筋特異的 Gab1 欠損マウスと conventional Gab2 欠損マウスを交配して、心筋特異的

Gab1/Gab2 二重欠損マウス (DKO) を作成した。

DKO マウスはメンデル比に従って出生し、出生時には特に心臓の異常を認めなかったが、自然経過で著明な両心室の拡張と収縮能生の低下を伴う拡張型心筋症様の表現型を呈した (図 1)。さらに、心内膜に弾性繊維 (図 2：黒色部分) と膠原線維 (図 2：青色部分) の異常蓄積も見られ「心内膜弾性繊維症」に

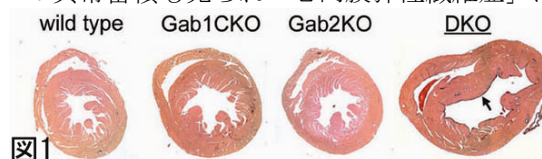
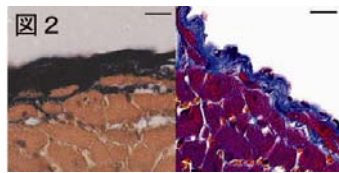


図 1

酷似する病理像を呈していた(図2)。DKOマウスの心臓組織内では、周皮細胞・平滑筋細胞のリクルートが障害された異常拡大血管像も観察され、心内膜と心臓組織毛細血管の成熟安定化障害が存在することも明らかとなっていた(図3)。



また、DKOマウスの心臓では neuregulin-1(NRG-1)/ErbB 依存性の心筋での ERK1/2 及び AKT の活性化が完全に遮断されていることも明らかとなった。NRG-1/ErbB シグナルの異常により心不全が誘発されることはこれまでヒトでも遺伝子改変マウスでも報告されていたが、その異常と心臓組織内の内皮細胞系の障害との関連については明らかではなかった。

2. 研究の目的

我々は、「心臓内の心筋-内皮組織間のシグナルネットワークは心不全予防において必須の機能を有する」という仮説のもとで、心臓組織内パラクラインシグナルネットワークの機能解明を目的として本研究を遂行した。特に、NRG-1/ErbB/Gab シグナルが如何に心臓組織内皮系の安定成熟化に関わるかに焦点を当てて以下の研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 心筋特異的 Gab1/Gab2 欠損マウスで欠落する NRG-1/ErbB 依存性シグナル分子の同定: NRG-1 を経静脈投与した後、心臓で誘導される遺伝子群を、コントロールマウスと DKO マウスの間で DNA マイクロアレイを用いて subtraction する解析を行った。さらに、アレイの結果の確認はノーザンブロットで行った。また、Percol1 密度勾配遠心によりラット新生仔心臓から心筋細胞と非心筋細胞を分離して NRG-1 依存性の Ang1 発現誘導が心筋細胞・非心筋細胞のどちらに由来するかの検討も行った。

(2) 心筋特異的 angiopoietin-1(Ang1) 欠損マウスの作成: (1) の DNA マイクロアレイの結果、NRG-1/ErbB 依存性シグナルの標的分子として、Angiopoietin-1(Ang1) が同定され

た。NRG-1/ErbB 依存性シグナルによる心筋からの Ang1 分泌の生理的意義を明らかにする目的で、Ang1 心筋特異的欠損マウスを作成した。

第 1 エクソンを loxP 配列で挟んだ targeting vector を作成して、ES 細胞にエレクトロポレーション法で導入し、相同組み換えした細胞をネオマイシン耐性でスクリーニングして得た。さらに CD-1 をホストとして組み換え ES 細胞をインジェクションして Ang1flox キメラマウスを作成した。

4. 研究成果

(1) 心筋特異的 Gab1/Gab2 欠損マウスで欠落する NRG-1/ErbB 依存性シグナル分子の同定: NRG-1 を経静脈投与した後、心臓で誘導される遺伝子群を、コントロールマウスと DKO マウスの間で DNA マイクロアレイを用いて subtraction 解析を行った。

その結果、図 4 に示すような 14 の遺伝子が同定された。これらの遺伝子の中で、内皮細

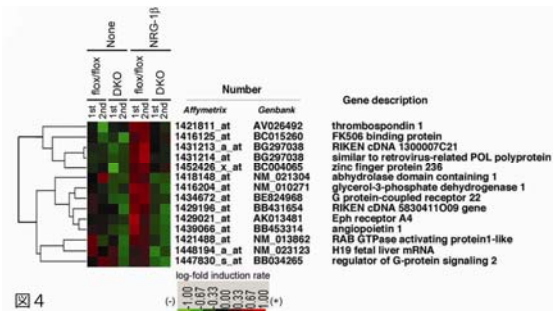


図 4

胞の成熟安定化に関わる遺伝子として Angiopoietin-1(Ang1) が同定された。この DNA マイクロアレイの結果はノーザンブロットでも確認された(図5)。また、Percol1 密

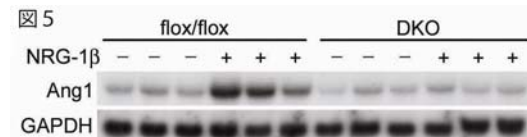
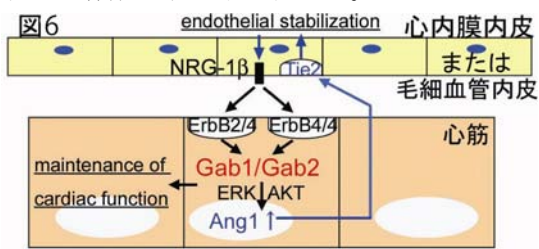


図 5

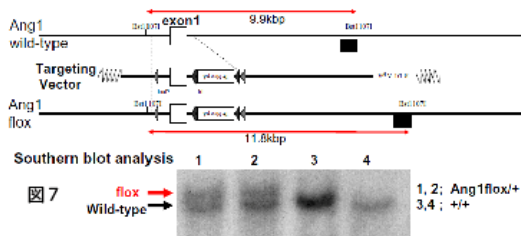
度勾配遠心にてラット新生仔心臓から心筋細胞と非心筋細胞を分離して NRG-1 依存性の Ang1 発現誘導が心筋細胞・非心筋細胞のどちらに由来するものかの検討を行ったところ、心筋細胞でのみ NRG-1 依存性の Ang1 の発現誘導は見られたのに対して、非心筋細胞では Ang1 の発現誘導は全く見られなかった。

以上の結果から、我々は Gab ファミリー蛋白質が心筋-内皮間のサイトカインネットワークに必須のシグナル分子であり、心機能維持に必須であることを明らかにした(*J. Clin. Invest.* 117: 1771-1781, 2007)。図 6 に示すように NRG-1/ErbB シグナルと Ang1/Tie2 シグナルの心筋-内皮間で双方向性に作用することで心臓組織内の恒常性が維持されることが示唆されたため、このシグナルネットワークの生理的意義を明らかに

するために、我々は Ang1 心筋特異的欠損マウスの作成実験に取り組んだ。



(2) 心筋特異的 angiopoietin-1 (Ang1) 欠損マウスの作成：上述の方法に従い、相同組み換えした ES 細胞を得たのち、Ang1flox キメラマウスを作成した。Ang1flox アレルが germline transmission した個体をまず PCR とサザンブロットによってスクリーニングした。その結果、図 7 に示すように Bst1107 I による制限酵素処理で flox アレルを有するマウス 3 系統を得ることに成功した。



Ang1flox アレルが germline transmission した個体を得た後、FRT サイト (黒の▼) で挟まれたネオマイシン耐性遺伝子を外すために CAG プロモーター下で酵母由来 Flippase を発現する CAG-FLPe トランスジェニックマウスと交配した。その結果、ネオマイシン耐性遺伝子を外した Ang1flox マウスを得ることに成功した。

今後、心筋由来 Ang1 の機能を明らかにするために下記の 2 系統の心筋特異的 Cre 発現トランスジェニックマウスとの交配を行い、心臓組織での心筋由来 Ang1 の機能を明らかにする。

α -MHC-Cre-TG マウスでは交配出生後に Cre 発現のドライブがかかるため、出生後の心筋細胞由来 Ang1 分泌が欠損することにより自然経過で心不全と心内膜線維弾性化の病理像が見られるか否かを検討する。

また、 α -MHC-MerCreMer-TG マウスとの交配実験では、タモキシフェン腹腔内投与による処理で、時期特異的に心筋細胞特異的な Cre 活性化を誘導できる (*Circ. Res.*; 89, 20, 2001)。この α -MHC-MerCreMer-TG マウスと Ang1flox マウスを交配して、心筋細胞由来の Ang1 欠損を誘導することで心不全が誘導されるか否かを見る実験系と、NRG-1 を心筋梗塞モデルに投与する治療実験系で Ang1 欠損の影響を見る実験系とを予定している。

これらの実験から、Ang1 とその受容体 Tie2 を介したシグナル伝達経路が心臓組織で果たす役割が明らかになるものと期待される。さらに、NRG-1 による心筋保護効果の発現に心筋由来 Ang1 が必須か否かについても解明されることが期待される。

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 3 件)

① Koyama T¹, Nakaoka Y^{1*}, Fujio Y, Hirota H, Nishida K, Sugiyama S, Okamoto K, Yamauchi-Takahara K, Yoshimura M, Mochizuki S, Hori M, Hirano T, Mochizuki N. Interaction of Scaffolding Adaptor Protein Gab1 with Tyrosine Phosphatase SHP2 Negatively Regulates IGF-I-dependent Myogenic Differentiation via the ERK1/2 Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 283: 24234-24244, 2008 (*corresponding author, ¹co-first author)、査読有り

② サイトカインシグナルによる心不全の制御機構; 瀧原圭子、中岡良和; *心臓* 40:181-186, 2008、査読無し

③ Nakaoka Y*, Nishida K, Narimatsu M, Kamiya A, Minami T, Sawa H, Okawa K, Fujio Y, Koyama T, Maeda M, Sone M, Yamasaki S, Arai Y, Koh GY, Kodama T, Hirota H, Otsu K, Hirano T, and Mochizuki N*. Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function through transmitting neuregulin-1/ErbB signaling. *J. Clin. Invest.* 117: 1771-1781, 2007 (*co-corresponding author)、査読有り

[学会発表] (計 10 件)

(国際学会発表)

① Shioyama W, Higuchi K, Okamoto K, Arita Y, Sanada F, Taniyama Y, Morishita R, Kuroda T, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K, Mochizuki N, Nakaoka Y. Scaffolding Docking Protein Gab1 is Essential for HGF-dependent Endothelial Signaling and Angiogenesis after Hindlimb Ischemia. American Heart Association Scientific Sessions 2008 (November 2008, New Orleans)

② Nakaoka Y, Koyama T, Okamoto K,

Shioyama W, Fujio Y, Hirano T, Mochizuki N. Interaction of Scaffolding Adaptor Protein Gab1 with Tyrosine Phosphatase SHP2 Negatively Regulates IGF-I-dependent Myogenic Differentiation via ERK1/2 Signaling Pathway. Basic Cardiovascular Sciences Conference 2008 Heart Failure: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets (July 2008, Keystone)

- ③ Nakaoka Y, and Mochizuki N.: Gab Family Scaffolding Adaptors are Essential for Cardiac Maintenance via Transmitting Endothelial-Myocardial Crosstalk. Keystone Symposia Molecular Mechanism of Angiogenesis in Development and Disease (January 2008, Vancouver)
- ④ Nakaoka Y, Minami T, Sawa H, Fujio Y, Koyama T, Hirota H, Yamauchi-Takahara K, Otsu K, Hirano T, and Mochizuki N.: Gab Family Scaffolding Adaptor Proteins are Essential for Postnatal Maintenance of Cardiac Function via Neuregulin-1/ErbB Signaling. American Heart Association Scientific Sessions 2007 (November 2007, Orlando)

(国内学会発表)

- ⑤ Nakaoka Y. The Novel Downstream Target of Neuregulin-1-ErbB Signaling Pathway for Maintenance of Cardiac Function ~ Implication for New Treatment of Heart Failure ~ Symposium 8. (第73回日本循環器学会学術集会 平成21年3月 大阪)
- ⑥ Shioyama W, Higuchi K, Hiramoto Y, Arita Y, Kuroda T, Fujio Y, Sanada F, Taniyama Y, Morishita R, Yamauchi-Takahara K, Hirano T, Hori M, Mochizuki N, and Nakaoka Y. Docking Protein Gab1 is Essential for HGF-dependent Endothelial Signaling and Angiogenesis after Hindlimb Ischemia. (第73回日本循環器学会学術集会 平成21年3月 大阪)
- ⑦ Shioyama W, Nakaoka Y, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K, Mochizuki N. SHP2 Negatively Regulates Skeletal alpha-actin Gene Expression Downstream of LIF-dependent Hypertrophic Signaling in Cardiomyocytes ISHR Japanese Section

(平成20年12月、横浜)

- ⑧ 中岡良和、樋口香織、塩山渉、岡本紀太郎、有田陽、黒田忠、眞田文博、谷山義明、森下竜一、藤尾慈、瀧原圭子、平野俊夫、望月直樹: ドッキング蛋白質 Gab1 は下肢虚血ストレス後の血管新生に必須である 第12回 Molecular Cardiovascular Conference (平成20年9月5日北海道余市郡赤井川村)
- ⑨ Okamoto K, Shioyama W, Higuchi K, Kuroda T, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K, Hori M, Koh GY, Mochizuki N, Nakaoka Y. Essential role of Gab2 for Angiopoietin-1/Tie2-dependent Signaling and Cytoprotection in the Endothelial Cells (第72回日本循環器学会学術集会 平成20年3月 福岡)
- ⑩ 中岡良和、西田圭吾、神谷厚範、澤洋文、小山達也、大津欣也、瀧原圭子、廣田久雄、平野俊夫、望月直樹: 心臓組織内の心筋-内皮細胞間のサイトカインネットワークにおける Gab ファミリーアダプター蛋白質の役割 第11回 Molecular Cardiovascular Conference (平成19年9月15日北海道余市郡赤井川村)

[その他]

- ① 日本循環器学会第17回八木賞を下記論文にて中岡良和が受賞した。(2008年3月) 論文: Nakaoka Y* et al. Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function through transmitting neuregulin-1/ErbB signaling. *J. Clin. Invest.* 117: 1771-1781, 2007
- ② 第34回佐藤賞(第73回日本循環器学会学術集会、2008年3月)を連携研究者の望月直樹が受賞した。タイトルは「循環器疾患病態理解のための分子イメージングによる血管内皮・心筋細胞の情報伝達解明」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中岡 良和 (NAKAOKA YOSHIKAZU)
大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)
研究者番号: 90393214

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

望月 直樹 (MOCHIZUKI NAOKI)

国立循環器病センター研究所・循環器形態
部・部長

研究者番号 : 30311426