

機関番号：11101  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590855  
 研究課題名（和文）新規昇圧物質カップリングファクター6の心肥大・心不全病態形成の役割  
 研究課題名（英文）Role of novel vasoconstrictor coupling factor 6 in the pathogenesis of cardiac hypertrophy and cardiac failure  
 研究代表者  
 佐々木 真吾（SASAKI SINGO）  
 弘前大学・大学院医学研究科・准教授  
 研究者番号：20344591

研究成果の概要（和文）：Coupling factor 6 (CF6) 過剰発現 (TG) マウスと野生型 (WT) マウスを対象とし、運動負荷の施行と胸部上行大動脈と総頸動脈の分岐部に狭窄 (TAC) を作成した。運動負荷により WT マウスでは心肥大と左室短縮率の増加が認められたが、CF6 TG マウスでは不変であった。一方、TAC により WT マウスでは心肥大が認められ、左室短縮率は軽度減少したが、CF6 TG マウスでは WT マウスに比較してより著明な心肥大の形成とより著明な左室短縮率の減少が認められた。以上から、CF6 は生理的心肥大を抑制し、病的な心肥大を促進することにより、心不全の発症・進展に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To investigate the influence of coupling factor 6 (CF6) to the progression of cardiac hypertrophy and dysfunction, we subjected CF6-overexpressing transgenic mice (TG) to exercise or persistent pressure overload by transverse aortic constriction (TAC) and compared the results with those in wild type mice (WT). Overexpression of CF6 attenuated exercise-induced physiological cardiac hypertrophy and increase in fractional shortening by down-regulating Akt signaling, whereas it exacerbated pressure overload-induced LV hypertrophy and systolic dysfunction. These suggest that CF6 may contribute to the onset and development of congestive heart failure by the suppression of physiological hypertrophy and the exacerbation of pathological hypertrophy.

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	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
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

キーワード：Coupling factor 6, exercise, transverse aortic constriction, hypertrophy, heart failure, transgenic mouse

#### 1. 研究開始当初の背景

プロスタサイクリンは強力な血管拡張作

用と血小板凝集抑制作用を有する生理活性物質である。高血圧自然発症ラット (SHR) ではプロスタサイクリンの内因性産生は低下

している。しかし、血液を除去した摘出標本（血管、臓器）での産生は内因性に反して著明に亢進している。この矛盾は SHR においてプロスタサイクリン産生を抑制する内因性物質が流血中に存在するという仮説によって説明可能と考えた。近年我々は coupling factor 6 (CF6) がプロスタサイクリンの産生を阻害する内因性ペプチドであることを発見した (J Biol Chem 1998)。CF6 は phospholipase A2 を阻害することによりプロスタサイクリン産生を阻害する。COX とプロスタサイクリン合成酵素には影響しない (J Biol Chem 1998)。さらに、CF6 は血管内皮細胞の表面に存在し、そこから放出され、ずり応力により分泌はさらに亢進する (Circulation, 2001)。ラットに recombinant CF6 を静注すると、昇圧活性を有し、その昇圧反応は SHR で WKY に比較して亢進していることも明らかにした (J Clin Invest, 2001)。また、CF6 は SHR の血中で高値を呈し、中和抗体の投与により降圧が認められ、その反応は WKY に比較して亢進していた (J Clin Invest, 2001)。CF6 はヒト血中にも存在し、本態性高血圧症患者において高値を示すこと、また、血中 CF6 濃度は食塩負荷により増加し、アスコルビン酸投与によりその増加反応は消失することを報告した (J Hypertens 2003)。さらに、最近我々は血液透析患者では血中 CF6 濃度は高値を示し、内因性 nitric oxide synthase (NOS) 阻害物質である asymmetric dimethylarginine (ADMA) と正相関すること、虚血性心疾患の発症と密接な関係を有することを明らかにした (Kidney Int, 2003)。

CF6 産生に関する基礎的検討では、tumor necrosis factor- $\alpha$  とずり応力により CF6 mRNA 発現と分泌は亢進し、その反応は NF- $\kappa$ B の dominant negative により阻害されること

を明らかにした (Cardiovas Res, 2004 and 2005)。さらに、CF6 のプロモーター解析では、ラット CF6 プロモーター領域に 1 ヶ所の NF- $\kappa$ B 結合部位が存在し、NF- $\kappa$ B 結合部位の deletion 並びに double mutation により、ずり応力によるルシフェラーゼ活性の亢進は完全に阻害された (Cardiovas Res, 2005)。

CF6 の細胞内情報伝達機構に関しては、最近その受容体が血管内皮細胞表面に存在する ATP 合成酵素の  $\beta$ -subunit であることを明らかにした (Hypertension, 2005)。受容体に結合した CF6 は ATPase 活性を亢進させ、Fo を介して水素イオンを細胞内に流入させ、それに伴って細胞内酸性化を引き起こす。Efrapeptin により ATPase を阻害すると、CF6 による細胞内酸性化は抑制され、CF6 によるプロスタサイクリン産生の抑制作用が消失する (Hypertension, 2005)。

CF6 の生理作用に関しては、最近血管内皮細胞の NO 産生と内皮依存性過分極因子 (EDHF) 産生も抑制することが明らかとなった (J Hypertens, 2006)。血管内皮細胞に CF6 を投与し、cDNA microarray で増減する遺伝子を検討すると、内因性 NOS 阻害物質 ADMA の産生酵素 (PRMT-1) の亢進並びに分解酵素 (DDAH-2) の低下が認められ、ADMA の分泌亢進も証明された。さらに、動脈硬化の促進因子であるエストロゲン受容体、ウロキナーゼ受容体の発現亢進、並びに心不全関連ペプチドである relaxin、neuregulin の発現亢進も認められた (J Hypertens, 2006)。また、ラット冠細小動脈の収縮実験では、NO とプロスタサイクリンを阻害しても、CF6 は強力な収縮を惹起させ、epoxyeicosatrienoic acid (EET) を初めとした EDHF の産生を阻害して、血管収縮をきたすことも明らかとなった (AHA, 2005)。

以上、CF6 の生理作用は明らかとなってき

たが、CF6 の心血管病の病態形成、特に心肥大と心不全の病態形成に及ぼす影響は不明である。

## 2. 研究の目的

最近我々は CF6 を投与すると血管内皮細胞内の pH が低下することを発見した。通常の生理活性物質が細胞内 pH を上昇させるのと対照的である。心肥大は心筋虚血・酸性化を招来し、心不全へと進展するが、CF6 の作用機序と循環器疾患の病態形成における役割は依然として不明である。そのため、CF6 過剰発現マウスに水泳による運動負荷・胸部上行大動脈結紮の大動脈狭窄による圧負荷を行い、心肥大の病態形成への関与並びに心不全発症における CF6 の役割を個体レベルで解明し、循環器疾患における病態生理学的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### CF6 過剰発現モデルに対する運動負荷の影響

CF6は通常ミトコンドリアにsortingされる。そこで血中CF6濃度が高値を呈するCF6過剰発現マウスを作製するために、CF6 は直接 mature formで産生され、直ちに細胞外に分泌されるように、ヒトカルシトニンの promoterとmature CF6 cDNAを接続した発現ユニットを作製した。筑波大学生命科学動物資源センターに依頼し遺伝子導入マウス(ヘテロ)を3匹作製してもらった。現在その内の1系統でCF6 過剰発現マウス(ホモ)(雌雄)を作製済みで繁殖中である。

1) 生理的心肥大モデルとして、生後約 7 週の CF6 過剰発現マウスと Wild type(WT)マウスに運動負荷として水泳を 1 日 2 回(午前、

午後)1 回 10 分程度を 8 週間月曜日～金曜日まで行う。非観血的血圧並びに心拍測定、各種臓器重量の測定、心血管系の組織学的観察を経時的に行い、CF6 過剰発現マウスと wild の動脈硬化の程度・心肥大、心拡大の程度を比較検討する。また心エコーも施行し、経時的变化を記録し分析する。

2) 心臓を摘出し、遺伝子発現、蛋白発現を RT-PCR 並びに Western blot 法にて検討する。

### CF6 過剰発現モデルに対する大動脈狭窄の影響

1) 病的な心肥大モデルとして、生後約 7 週のそれぞれに対してケタミン、キシラジンによる腹腔麻酔を行い、その後挿管して人工呼吸器にて呼吸管理し、恒温マットにて体温管理をしたのち、左胸骨切開による開胸手術を行う。実体顕微鏡下にて胸部上行大動脈～横行大動脈を露出させた後に右総頸動脈の走行を確認したのち胸部上行大動脈と総頸動脈の分岐部より末梢側で左総頸動脈より手前を 7-0 ナイロンと金属を利用して狭窄を作成する。その後、閉胸して自発呼吸を確認後に抜管して呼吸状態を確認して手術終了とする。

2) 心エコー、血圧測定を施行する。

3) 術後 8 週間後に心臓を摘出し組織学的、免疫学的に評価する。また臓器をホモジネーションして、心肥大関連分子の発現を検討する。

## 4. 研究成果

### CF6 過剰発現モデルに対する運動負荷の影響

結果：WT では運動負荷により心室中隔壁厚 ( $0.88 \pm 0.01 \text{ mm}$  vs  $0.75 \pm 0.02 \text{ mm}$ ,  $p < 0.01$ )、

左室後壁厚 ( $0.88 \pm 0.01 \text{mm}$  vs  $0.72 \pm 0.03 \text{mm}$ ,  $p < 0.01$ ) は増加、TG では不変であった。左室短縮率は WT では増加 ( $41 \pm 1$  vs  $37 \pm 1\%$ ,  $p < 0.01$ )、TG では不変であった。また左室のインスリン様成長因子 1 (IGF1) 遺伝子発現は各グループで差は認めなかったが、インスリン様成長因子 1 受容体 (IGF1-R) 蛋白の発現と、IGF1-R 蛋白のリン酸化率は WT でそれぞれ  $1.83 \pm 0.23$  倍、 $1.83 \pm 0.09$  倍の上昇が認められ ( $p < 0.05$ )、TG は不変であった。IGF1-R の下流シグナルであるインスリンレセプター基質 1 (IRS1)、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI3K) p85、Akt は、p-IRS1/IRS1 蛋白比、PI3Kp85/GAPDH 蛋白比、p-Akt/Akt 蛋白比のいずれも WT でそれぞれ  $2.22 \pm 0.22$  倍、 $1.78 \pm 0.31$  倍、 $2.24 \pm 0.49$  倍、上昇を認めたが ( $p < 0.05$ )、TG では不変であった。以上より、CF6 は、IGF1/PI3K/Akt 経路を介した生理的心肥大を抑制することが示され、心不全治療の標的因子となりうる。

#### CF 6 過剰発現モデルに対する大動脈狭窄の影響

結果：5 週後の心エコーでは WT マウスでは TAC により有意な心肥大が認められ、左室短縮率は軽度減少した。また、心組織で mitogen-activated protein kinase (MAPK) のリン酸化の亢進が認められた。一方、CF6 TG マウスでは TAC により WT マウスに比較してより著明な心肥大の形成とより著明な左室短縮率の減少が認められた。MAPK のリン酸化は更に亢進していた。組織学的検討では、CF6 過剰発現マウスの TAC 群では野生型 (WT) マウスの TAC 群に比較して個々の心筋細胞の面積は有意に大であった。以上より、CF6 は病的な心肥大を促進することにより心不全の発症・進展に関与する可能性が示唆された。

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 Ashitate T, Osanai T, Tanaka M, Magota K, Echizen T, Izumiyama K, Yokoyama H, Shibutani S, Hanada K, Tomita H, Okumura K. Overexpression of coupling factor 6 causes cardiac dysfunction under high salt diet in mice. *J Hypertens* 2010;28:2243-2251. 査読有
- ② Osanai T, Fujiwara N, Sasaki S, Metoki N, Saitoh G, Tomita H, Nishimura T, Shibitani S, Yokoyama H, Konta Y, Magota K, Okumura K. Novel pro-atherogenic molecule coupling factor 6 is elevated in patients with stroke: A possible linkage to homocysteine. *Ann Med*. 2010;42:79-86. 査読有
- ③ Osanai T, Magota K, Okumura K. Coupling factor 6 as a novel vasoactive and proatherogenic peptide in vascular endothelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2009;380:205-214. 査読有
- ④ sanai T, Tomita H, Yamada M, Tanaka M, Ashidate T, Echizen T, Katoh C, Magota K, Okumura K. Coupling factor 6-induced prostacyclin inhibition is enhanced in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2009;27:1823-1828. 査読有
- ⑤ Osanai T, Tomita H, Kushibiki M, Yamada M, Tanaka M, Ashitate T, Echizen T, Katoh C, Magota K, Okumura K. Coupling factor 6 enhances Src-mediated responsiveness to angiotensin II in resistance arterioles and cells. *Cardiovasc Res*. 2009;81:780-787. 査読有

- ⑥ Echizen T, Osanai T, Ashitate T, Yokoyama H, Shibutani S, Tanaka M, Tomita H, Koji Magota K, Okumura K. Upregulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor type 1 by endogenous prostacyclin inhibitor coupling factor 6 in the vascular endothelial cells: A role of acidosis-induced c-Src activation. *Hypertens Res* 2009;32:182-187. 査読有
- ⑦ Asitate T, Osanai T, Tanaka M, Magota K, Echizen T, Tomita T, Okumura K. Generation and characterization of coupling factor 6-overexpressing transgenic mice. *Hirosaki Medical Journal* 2009;60:18-26. 査読有
- ⑧ Kumagai A, Osanai T, Katoh C, Tanaka M, Tomita H, Morimoto T, Murakami R, Magota K, Okumura K. Coupling factor 6 downregulates platelet endothelial cell adhesion molecule-1 via c-Src activation and acts as a proatherogenic molecule. *Atherosclerosis*. 2008;200:45-50. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Osanai T, Okumura K: Interaction between coupling factor 6 and ecto F1F<sub>o</sub> complex induces hypertension and diabetes by tissue acidosis. *Scientific Sessions 2008 (American Heart Association)*, Chicago (USA), November 14-17, 2008.
- ② 長内智宏、渋谷修司、花田賢二、泉山圭、相楽繁樹、山本祐子、奥村謙：新規の細胞内 pH 調節機構 F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> complex は coupling factor 6 で活性化され血圧並びに糖代謝を調節する。第 33 回日本高血圧学会総会 平成 22 年 10 月 15-17 日、福岡
- ③ Osanai T, Okumura K: Coupling factor 6 enhances the action of angiotensin II and causes insulin resistance in

mice. *Scientific Sessions 2009 (American Heart Association)*, Orland (USA), November 15-18, 2009

- ④ 長内智宏、榎引基、山田雅大、奥村謙：新規の昇圧物質 coupling factor 6 は cSrc の活性化を介して angiotensin II の収縮反応を亢進させる。第 32 回日本高血圧学会総会、平成 21 年 10 月 1-3 日
- ⑤ Osanai T, Tanaka M, Echizen T, Ashitate T, Tomita H, Okumura K. Overexpression of coupling factor 6 links hypertension to diabetes by c-Src-mediated signaling pathway in mice. *Scientific Sessions 2008 (American Heart Association)*, New Orleans (USA), November 9-12, 2008.
- ⑥ 長内智宏、芦立俊宗、越前 崇、山田雅大、奥村謙：高血圧と糖尿病の病態形成における細胞内酸性化の意義：Coupling factor 6 過剰発現マウスを用いた解析、第 31 回日本高血圧学会総会、平成 20 年 10 月 9-11 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  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 真吾 (SASAKI SHINGO)  
弘前大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：20344591

(2) 研究分担者

長内 智宏 (OSANAI TOMOHIRO)  
弘前大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：00169278

奥村 謙 (OKUMURA KEN)  
弘前大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：20185549

(3) 連携研究者 なし  
( )

研究者番号：