

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15日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590932

研究課題名（和文） 筋小胞体マイクロドメイン脱リン酸化調節異常を標的にした心不全治療法の開発

研究課題名（英文） Development of novel therapeutic strategy for heart failure which targets aberrant phosphorylation status in the sarcoplasmic reticulum of failing hearts

研究代表者

池田 安宏 (IKEDA YASUHIRO)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00260349

研究成果の概要（和文）：

心不全においては、心筋細胞の筋小胞体(Sarcoplasmic Reticulum: SR)のCa²⁺循環が低下し、心不全悪化の原因となることが知られている。我々は、SRに多く分布するPP1βを標的とした心不全誘導型shRNA発現アデノ随伴ウイルス(Adeno-associated virus-9: AAV9)による治療が心不全進行を抑制するかどうか検討した。AAV9ベクターによる心臓選択的かつ心不全特異的なPP1βshRNA導入は心機能を改善させ、左室リモデリングを抑制した。PP1βは心不全のCa²⁺循環改善治療の標的として有望である。

研究成果の概要（英文）：

The targeting of Ca²⁺ cycling has emerged as a potential therapy for the treatment of severe heart failure. These approaches include gene therapy directed at overexpressing sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺ ATPase, or ablation of phospholamban (PLN) and associated protein phosphatase 1 (PP1) protein complexes. We previously reported that PP1β, one of the PP1 catalytic subunits, predominantly suppresses Ca²⁺ uptake in the SR among the three PP1 isoforms, thereby contributing to Ca²⁺ downregulation in failing hearts. In the present study, we investigated whether heart-failure-inducible PP1β-inhibition by adeno-associated viral-9 (AAV9) vector mediated gene therapy is beneficial for preventing disease progression in genetic cardiomyopathic mice. In the MLPKO mice, inducible PP1βshRNA delivery preferentially ameliorated left ventricular diastolic function and mitigated adverse ventricular remodeling. Heart failure-inducible molecular targeting of PP1β has potential as a novel therapeutic strategy for heart failure.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：心臓病態学

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：protein phosphatase 1β, adeno-associated virus vector, gene therapy, RNAi

1. 研究開始当初の背景

心不全においては、心筋細胞の筋小胞体 (Sarcoplasmic Reticulum: SR) の Ca^{2+} 循環が低下し、心不全悪化の原因となることが知られている。近年、重症心不全での筋小胞体 Ca^{2+} 循環改善を目的とした遺伝子治療が注目されており SERCA, ホスフォランバン (PLN), 蛋白ホスファターゼ 1 (Protein Phosphatase 1: PP1) などが治療標的分子の候補としてあがっている。我々はこれまでに PP1 の 3 つのアイソフォーム (PP1 α , PP1 β / δ , PP1 γ) のなかで、PP1 β が筋小胞体 Ca^{2+} 循環に最も関与することを報告してきた。

2. 研究目的

本研究では、PP1 β を標的とした心不全誘導型 shRNA 発現アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus-9: AAV9) による治療が遺伝的心筋症マウスの心不全進行を抑制するかどうか検討した。

3. 研究の方法

PP1 β 発現を抑制し得る short-hairpin RNA (shRNA) 構造を有した AAV9 と negative control (NC) shRNA を B 型ナトリウム利尿蛋白 (BNP) プロモーターの下流に作成し、emerald-green fluorescence protein (EmGFP) をはさんで遺伝子導入ベクターを作成した (AAV9-BNP-EmGFP-PP1 β shRNA, AAV9-BNP-EmGFP-NCshRNA)。上記 AAV9 ベクターを心筋症マウス (LIM 蛋白欠損マウス: MLPKO) に尾静注 (2×10^{11} GC/mouse) し、1 ヶ月後および 3 ヶ月後に心エコーで心機能評価を行い、3 ヶ月後に左室圧測定後に犠牲死させ、蛋白リン酸化レ

ベルの解析および組織学的解析を行った。

4. 研究成果

心機能の低下した遺伝子導入後の MLPKO マウス心筋では EmGFP の発現がみられ、PP1 β shRNA 導入群では PP1 β 発現が約 25% 抑制された。他臓器での EmGFP 発現は確認されず、心臓選択的で、心機能低下時だけの遺伝子導入が確認できた。PP1 β shRNA 導入群では左室拡張末期径の縮小、左室短縮率の改善がみられ、左室圧測定で評価した左室拡張能は有意に改善していた。セリン 16 番位の PLN リン酸化は増加し、 Ca^{2+} 循環上昇が示唆された。心筋内 BNP mRNA は有意に減少し、心筋間質線維化も有意に抑制されていた。

AAV9 ベクターによる心臓選択的な、BNP プロモーターによる心不全特異的な PP1 β shRNA 導入は遺伝的心筋症マウスにおいて、心機能を改善させ、左室リモデリングを抑制した。PP1 β は心不全の Ca^{2+} 循環改善治療の標的として有望であり、BNP プロモーターを利用した心不全誘導型発現システムは病的な心臓でのみの治療を可能にする。

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 18 件)

- ① Miyazaki Y, Ikeda Y, Shiraishi K, Fujimoto N.S., Aoyama H, Yoshimura K, Inui M, Hoshijima M, Kasahara H, Aoki H, and Matsuzaki M Heart Failure-Inducible Gene Therapy Targeting Protein Phosphatase 1 Prevents Progressive Left Ventricular Remodeling PLoS ONE 7(4): e35875, 2012

- doi:10.1371/journal.pone.0035875 (equal contribution, corresponding author) 査読有
- ② 松崎益徳, 斎藤能彦, 池田安宏. わが国の慢性心不全治療におけるメインテートの効能追加のインパクト 臨床のあゆみ, 田辺三菱製薬 89 : 21-24, 2011. 査読無
- ③ Kimura T, Yoshimura K, Aoki H, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Ikeda Y, Morikage N, Endo H, Hamano K, Imaizumi T, Hiroe M, Aonuma K, Matsuzaki M. Tenascin-C is expressed in abdominal aortic aneurysm tissue with an active degradation process. *Pathol Int.* 2011 Oct;61(10):559-564. 査読有
- ④ Suetomi T, Yano M, Uchinoumi H, Fukuda M, Hino A, Ono M, Xu X, Tateishi H, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Mutation-linked defective interdomain interactions within ryanodine receptor cause aberrant Ca channel release leading to catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 2011 Aug 9;124(6):682-94. 査読有
- ⑤ Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, Ikeda Y, Nakaya M, Ide T, Mori Y, Kurose H. TRPC3-mediated Ca²⁺ influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 May 27;409(1):108-13. Epub 2011 May 3. 査読有
- ⑥ Aoyama H, Ikeda Y, Miyazaki Y, Yoshimura K, Nishino S, Yamamoto T, Yano M, Inui M, Aoki H, Matsuzaki M. Isoform-Specific Roles of Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunits in Sarcoplasmic Reticulum-Mediated Ca²⁺ Cycling. *Cardiovasc Res.* 2011 Jan 1;89(1):79-88. Epub 2010 Jul 31. Ikeda Y corresponding author, (*equal contribution) 査読有
- ⑦ 松崎益徳, 池田安宏, 大草知子, 矢野雅文. 【ガイドラインに基づいた心不全の非薬物療法】トピックス 慢性心不全治療ガイドライン 2010 年改訂版における改訂ポイント *CARDIAC PRACTICE*, メディカルレビュー社 22(1) : 15-20, 2011. 査読無
- ⑧ 池田安宏, 松崎益徳. 慢性心不全治療ガイドライン 2010 の改訂ポイント循環器内科, 科学評論社 70(1) : 91-97, 2011. 査読無
- ⑨ 池田安宏, 宮崎要介, 松崎益徳. 特集□第 74 回日本循環器学会学術集会 4. 拡張不全とリモデリングの分子機序 不全心の収縮・拡張性を規定する細胞内リン酸化調節異常と治療標的 循環器専門医, 日本循環器学会 19(1) : 73-79, 2011. 査読無
- ⑩ Shibuya M, Miura T, Fukagawa Y, Akashi S, Oda T, Kawamura S, Ikeda Y, Matsuzaki M. Tongue Muscle-Derived Stem Cells Express Connexin 43 and Improve Cardiac Remodeling and Survival After Myocardial Infarction in Mice. *Circ J.* 2010 Jun;74(6):1219-26. Epub 2010 Apr 10. 査読有
- ⑪ Uchinoumi H, Yano M, Suetomi T, Ono M, Xu X, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ohkusa T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked

defective conformational regulation of the ryanodine receptor. *Circ Res.* 2010 Apr 30;106(8):1413-24. Epub 2010 Mar 11. 査読有

- ⑫ Xu X, Yano M, Uchinoumi H, Hino A, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Ikemoto N, Matsuzaki M. Defective calmodulin binding to the cardiac ryanodine receptor plays a key role in CPVT-associated channel dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Apr 9;394(3):660-6. Epub 2010 Mar 10. 査読有
- ⑬ Onoda M, Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Morikage N, Furutani A, Matsuzaki M, Hamano K. Lysyl oxidase resolves inflammation by reducing monocyte chemoattractant protein-1 in abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2010 Feb;208(2):366-9. Epub 2009 Jul 23. 査読有
- ⑭ 池田安宏, 宮崎要介, 松崎益徳. 【心不全研究と臨床の最前線】心不全の最先端研究トピックス 心不全に対する遺伝子治療研究—分子標的治療とそのターゲット 医学のあゆみ, 医歯薬出版 232(5): 626-632, 2010. 査読無
- ⑮ Kamota T, Li TS, Morikage N, Murakami M, Ohshima M, Kubo M, Kobayashi T, Mikamo A, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. Ischemic pre-conditioning enhances the mobilization and recruitment of bone marrow stem cells to protect against ischemia/reperfusion injury in the late phase. *J Am Coll Cardiol.* 2009 May 12;53(19):1814-22. 査読有
- ⑯ 池田安宏, 松崎益徳. 慢性心不全の治療の変遷と新しい分子標的治療法の開発

日本医事新報, 日本医事新報社 4449 : 74-75, 2009. 査読無

[学会発表] (計 17 件)

- ① 池田安宏 心筋内 Ca 循環とリン酸化異常を標的とした心不全の遺伝子治療 2012 年度岡崎生理学研究所, 生理学研究会 2011/11/29 岡崎カンファレンスセンター, 岡崎
- ② Miyazaki Y, Ikeda Y, Shiraishi K, Aoki H, Matsuzaki M. In vivo Heart failure inducible suppression of protein phosphatase 1b mitigates heart failure progression in cardiomyopathic mice. Best poster award of subspeciality AHA annual scientific meeting, 2011/11/14-16, Orlando, U.S.A.
- ③ Ikeda Y, Ohkusa T, Yano M, Matsuzaki M. Revision points and remaining issues to be solved in the updated guidelines for treatment of chronic heart failure. The 15th Annual Scientific Meeting of the Japanese Heart Failure Society, 2011/10/14 Kagoshima, Kagoshima Prefectural Citizens Exchange Center
- ④ 池田安宏. 「心不全心筋細胞の Ca²⁺循環を標的とした分子治療」第 45 回河口湖心臓討論会, 2011/7/23-24 富士河口湖町, 富士ビューホテル
- ⑤ Miyazaki Y, Ikeda Y, Shiraishi K, Aoki H, Matsuzaki M. In vivo Heart failure inducible suppression of protein phosphatase 1b mitigates heart failure progression in cardiomyopathic mice. Basic Cardiovascular Sciences Annual Conference 2011/7/18-21, New Orleans, U.S.A.

- ⑥ Suetomi T, Yano M, Fukuda M, Hino A, Ono M, Xu X, Susa T, Uchinoumi H, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Yamamoto T, Ikeda Y, Matsuzaki M. Mutation-linked defective domain interaction within the ryanodine receptor causes Ca^{2+} leak leading to catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. 83rd Scientific Session of American Heart Association, 2010/11/15-17. Chicago, U.S.A.
- ⑦ Miyazaki Y, Ikeda Y, Aoyama H, Shiraishi K, Yoshimura K, Yano M, Aoki H, Matsuzaki M. In Vivo inducible suppression of phosphatase 1 β ameliorates cardiac dysfunction in mouse cardiomyopathy. 19th International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society, 2010/9/23-26. Fukuoka, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine
- ⑧ Ikeda Y, Aoyama H, Miyazaki Y, Shiraishi K, Yoshimura K, Nishino S, Yamamoto T, Yano M, Inui M, Aoki H, Matsuzaki M. Isoform-specific role of protein phosphatase 1 catalytic subunits in sarcoplasmic reticulum-mediated Ca^{2+} cycling. 19th International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society, 2010/9/23-26. Fukuoka, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine
- ⑨ 池田安宏. 「心筋収縮と細胞内脱リン酸化制御」第2回研究推進体「ストレス」フォーラム, 2010/9/8. 宇部, 山口大学
- ⑩ Ikeda Y, Aoyama H, Miyazaki Y, Yoshimura K, Yamamoto T, Yano M, Matsuzaki M. Isoform-specific role of protein phosphatase 1 catalytic subunits in sarcoplasmic reticulum mediated Ca^{2+} cycling in cardiomyocytes. 20th World Congress of the International Society for Heart Research, 2010/5/13-15. Kyoto, Kyoto International Conference Center
- ⑪ Miyazaki Y, Ikeda Y, Aoyama H, Shiraishi K, Yoshimura K, Yano M, Aoki H, Matsuzaki M. Protein phosphatase 1 β is critical to determine cardiac diastolic function in cardiomyopathic mice. 20th World Congress of the International Society for Heart Research, 2010/5/13-15. Kyoto, Kyoto International Conference Center
- ⑫ Xu X, Yano M, Hino A, Suetomi T, Ono M, Uchinoumi H, Oda T, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Ohkusa T, Matsuzaki M. Decreased affinity of calmodulin to RyR2 may be a cause mechanism of leaky channel in CPVT-associated mutation. 82nd Scientific Session of American Heart Association, 2009/11/16-18. Orlando, U.S.A.
- ⑬ Suetomi T, Yano M, Hino A, Ono M, Xu X, Susa T, Uchinoumi H, Oda T, Doi M, Okuda S, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Matsuzaki M. Mutation-linked channel disorder in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is caused by abnormally tight

domain-domain interaction in RyR2.
82nd Scientific Session of American
Heart Association, 2009/11/16-18.
Orlando, U.S.A.

- ⑭ Kimura T, Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Hamano K, Hiroe M, Aonuma K, Matsuzaki M. Tenascin-c has a protective role during the development of abdominal aortic aneurysm. 82nd Scientific Session of American Heart Association, 2009/11/16-18. Orlando, U.S.A.

[図書] (計 3 件)

- ① 池田安宏, 松崎益徳. 医学書院, 糖尿病と心臓病 基礎知識と実践患者管理 Q&A (第 II 章 糖尿病に合併する循環器疾患 3 心不全と糖尿病) 2010, 102-110.
- ② Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Furutani A, Hamano K, Matsuzaki M. Springer, Advances in Understanding Aortic Diseases. (Regression of Abdominal Aortic Aneurysms through Pharmacologic Therapy.) 2009, 43-49.
- ③ 池田安宏, 松崎益徳. 最新医学社, 最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC 64 心臓突然死 (第 2 章 病理・病態 心不全と心臓突然死) 2009, 70-78.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ホスホランバン標的修飾 RNA アプタマー
発明者: 乾 誠, 池田安宏, 松崎益徳
権利者: 山口大学
種類: 特許
番号: 特願 2012-028555
出願年月日: 2012/2/13
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~ninai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 安宏 (IKEDA YASUHIRO)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 00260349

(2) 研究分担者

矢野 雅文 (YANO MASAFUMI)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 90294628
山本 健 (YAMAMOTO TAKESHI)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 50363122
松崎 益徳 (MATSUZAKI MASUNORI)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 60116754

(3) 研究協力者

宮崎 要介 (山口大学大学院生)
青山 英和 (山口大学大学院生)
白石 宏造 (山口大学大学院生)
西野 静香 (山口大学技術補佐員)