

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 6 月 13 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590936

研究課題名（和文）心臓線維芽細胞を標的とした新しい拡張期慢性心不全治療の開発

研究課題名（英文）The cardiac fibroblast-targeted novel strategy for diastolic heart failure.

研究代表者

横山 詩子（YOKOYAMA UTAKO）

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：70404994

研究成果の概要（和文）：

慢性心不全の進行を抑制する治療の開発として、本研究では新たなサイクリック AMP の標的分子である Epac に着目し、慢性心不全治療のターゲットになりうるかを検討した。慢性心不全ではアルドステロン分泌亢進状態にあることが知られており、デオキシコルチコイド+ナトリウム負荷で慢性心不全モデルでは、Epac1 欠損マウスのみ心臓収縮、拡張障害をきたすことが明らかになり、その原因はアポトーシスの亢進にあることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Activation of the renin-angiotensin-aldosterone system results in vasoconstriction, cardiac hypertrophy and fibrosis. Established arterial stiffness and cardiac dysfunction are key factors contributing to chronic heart failure. Regulation of intracellular concentrations of cyclic AMP is one of the most ubiquitous mechanisms for regulating cellular functions. In this study we showed Epac, an exchange protein activated by cAMP and a new effector molecule of cyclic AMP signaling, inhibited myocardial apoptosis and cardiac dysfunction under activation of aldosterone. Stimulation of Epac may be an alternative 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	1,100,000	330,000	1,430,000
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：分子心臓病理学・シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

心不全はあらゆる心疾患の終末像であり、重症慢性心不全は一年生存率が約 50%といまだに極めて予後不良な疾患である。レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の亢進や、交感神経活性の亢進が心不全の増悪因子であることが明らかにされ、現在、アンジオテンシン転換酵素阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬、 β アドレナリン受容体拮抗薬が心不全治療の中心となっている。なかでもアルドステロンは近年心不全や高血圧心において合成されることが明らかになり、RALES 試験などの大規模試験で、アルドステロン拮抗薬の有効性が示されたことで、アルドステロン拮抗薬は心不全治療薬として注目されている。アルドステロンは酸化ストレスをもたらし、心筋の肥大や心臓の線維化を促進することが知られている。しかしアルドステロンの受容体刺激から心不全に至るまでの分子メカニズムはいまだ不明な点が多い。

一方、心不全ではカテコラミンなどの交感神経活動が過剰であることが知られている。カテコラミンは β アドレナリン受容体を刺激し、G蛋白、特にGs蛋白、を活性化してサイクリックAMPを産生させる。サイクリックAMPの標的分子は、長年プロテインキナーゼAのみと考えられていたが、近年exchange protein activated by cyclic AMP (Epac)が発見され、その生理作用が注目されている。そこで本研究では、心不全などのアルドステロンの産生が亢進している状況での、カテコラミンシグナルの新たな下流標的分子であるEpacの作用に着目した。

2. 研究の目的

心不全などのアルドステロンの産生が亢

進している状況での、カテコラミンシグナルの新たな下流標的分子であるEpacの作用を検討すること。

3. 研究の方法

(1) 動物

①アルドステロンの産生が過剰である心不全の状態を作成するために、デオキシコルチコイド(DOCA)の錠剤(50mg)を頸部皮下に埋め込み、同時に1%NaClを飲水させた。また、アルドステロン粉末をポリエチレングリコールで溶解したものを浸透圧ポンプに注入して使用し、同時に1%NaClを飲水させた。いずれの方法も4週間刺激を行った。

②C57BL野生型マウスと、同じバックグラウンドのEpac1または、Epac2の遺伝子欠損マウスの12-16週令のオスを使用した。

(2) 薬剤など

デオキシコルチコイド(DOCA 50mg)の錠剤、アルドステロン粉末、ポリエチレングリコール。

(3) 生理学的検査

心臓の機能検査は、刺激開始前、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後に8MHzプローブを用いた心臓エコー検査を行い、その後心臓カテーテル検査を行った。

(4) 組織学、生化学的検査

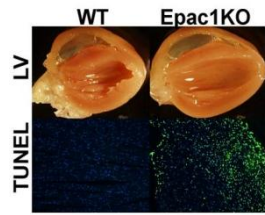
心臓組織は、4%パラフォルムアルデヒドで固定したのちにパラフィン切片を作成し組織学的検討を行った。線維化の検討はマッソントリクローム染色で行い、アポトーシス検出は、TUNEL染色を用いて行った。細胞内の微細形態は、透過型電子顕微鏡を用いて行った。血清中のサイトカインは、BioRad社のBioPlexを用いて測定した。蛋白の発現解析はウェスタンブロット法で行った。

4. 研究成果

心不全などのアルドステロンの産生が亢進している状況での、カテコラミンシグナルの新たな下流標的分子である Epac の作用を検討し、以下の結果を得た。

(1) デオキシコルチコイド+1%NaCl 負荷を、野生型マウスと、Epac1 欠損マウスに行ったところ、Epac1 欠損マウスでは野生型マウスに比べて著明な心拡大を呈した。(下図、上段)

(2) デオキシコルチコイド+1%NaCl 負荷により、Epac1 欠損マウスの心臓

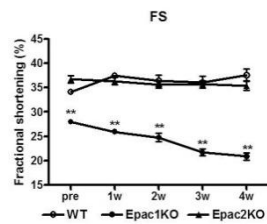


組織でアポトーシスが著明に亢進していた。

(上図、下段)

(3) Epac1 欠損マウス、Epac2 欠損マウスにデオキシコルチコイド負荷を行って、そのサブタイプ別の作用を検討した。デオキシコルチコイド 50mg+1%NaCl 負荷により、野生型マウスと Epac2 欠損マウスは4週間で左心室駆出率 (FS: fractional shortening) の有意な低下を認めなかったが、Epac1 欠損マウスでは、刺激前からの心機能の低下が認められ、さらにデオキシコルチコイド+1%NaCl 負荷により、有意な左心室駆出率 (FS) の低下を認めた。

(右図) 次いで、負荷後4週間での心臓カテーテル検査でMax dP/dt、Min



dP/dt を計測した。Epac1 欠損マウスでのみ、心室の収縮性の指標である Max dP/dt の低下、拡張能低下の指標である Min dP/dt が増加した。また負荷により Epac1 欠損マウスでは、心エコーにて心室拡張能の指標である、E 波の A 波に対する割合が高くなった。つまり、

デオキシコルチコイド負荷のもとでは、Epac1 欠損マウスは、心臓の収縮能と拡張能がともに低下していた。さらに負荷後4週間のカテーテル検査で Epac1 欠損マウスで血圧の低下と心拍の低下が認められたが、Epac2 や野生型マウスでは変化が認められなかった。

(4) 電子顕微鏡による解析では Epac1 欠損マウスでは、ミトコンドリアの膨張、構造異常が認められたが、線維化の亢進はなかった。

(5) 負荷後の Epac1 欠損マウスの心臓組織を用いた発現解析では STAT3 (Signal Transducers and Activator of Transcription 3) 蛋白のリン酸化が亢進した。STAT1 のリン酸化は亢進しなかった。Epac2 欠損マウスは野生型と差が認められなかった。

(6) STAT3 のリン酸化が負荷後の Epac1 欠損マウスで亢進したことより、血清のサイトカイン産生が変化している可能性を考えて、BioPlex にて各種サイトカインを定量した。負荷後の Epac1 欠損マウスの血清のサイトカイン (IL-1beta, IL6, IL10, IL17, KC, RANTES, TNFalpha) は生食対照群や負荷後野生型マウスとともに変化がなかった。また Epac2 欠損マウスでも負荷前後の変化は認められなかった。

(7) 負荷後の Epac1 欠損マウスの尿中アドレナリン濃度は野生型マウスと比べて差がなかった。Epac2 欠損マウスは野生型と差が認められなかった。

本研究の結果よりデオキシコルチコイド 50mg+1%NaCl 負荷では、Epac1 欠損マウスでのみ心臓収縮、拡張障害をきたし、その原因はアポトーシスの亢進にあることが示唆された。つまり Epac1 は心不全などアルドステロン系が亢進した状態で、心臓保護的に働いていることが示唆された。

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 15 件)

- ① Ichikawa Y, Yokoyama U*, Iwamoto M, Oshikawa J, Okumura S, Sato M, Yokota S, Masuda M, Asou T, Isikawa Y. Inhibition of Phosphodiesterase Type 3 Dilates the Rat Ductus Arteriosus without Inducing Intimal Thickening. *Circ J*, 査読有, 2012, *corresponding author
- ② Yokota T, Aida T, Ichikawa Y, Fujita T, Yokoyama U, Minamisawa S. Low-dose Thromboxane A2 Receptor Stimulation Promotes Closure of the Rat Ductus Arteriosus with Minimal Adverse Effects. *Pediatr Res*, 査読有, in press, 2012
- ③ Yokoyama U*, Ishiwata R, Jin MH, Kato Y, Suzuki O, Jin H, Ichikawa Y, Kumagaya S, Katayama Y, Fujita T, Okumura S, Sato M, Sugimoto Y, Aoki H, Suzuki S, Masuda M, Minamisawa S, Ishikawa Y. Inhibition of EP4 signaling Attenuates Aortic Aneurysm Formation. *PLoS ONE*, 査読有, in press, 2012 *corresponding author
[DOI:10.1371/journal.pone.0036724](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036724)
- ④ Fukumura H, Sato M, Kezuka K, Sato I, Feng X, Okumura S, Fujita T, Yokoyama U, Eguchi H, Ishikawa Y, Saito T. Effect of ascorbic acid on reactive oxygen species production in chemotherapy and hyperthermia in prostate cancer cells. *J Physiol Sci*, 査読有, 62(3): 251-257, 2012
[DOI:10.1007/s12576-012-0204-0](https://doi.org/10.1007/s12576-012-0204-0)
- ⑤ Insel PA, Murray F, Yokoyama U, Romano S, Yun H, Brown L, Snead A, Lu D, Aroonsakool N. Cyclic AMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis. *Br. J. Pharmacol*, 査読有, 166(2): 447-456, 2012
[DOI:10.1111/j.1476-5381.2012.01847.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01847.x)
- ⑥ Kurotani R, Okumura S, Matsubara T, Yokoyama U, Buckley JR, Tomita T, Kezuka K, Nagano T, Esposito D, Taylor TE, Gillette WK, Ishikawa Y, Abe H, Ward JM, Kimura S. Secretoglobin 3A2 suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by TGFbeta signaling down-regulation. *J. Biol. Chem*. 査読有, 286(22): 19682-19692, 2011
[DOI:10.1074/jbc.M111.239046](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.239046)
- ⑦ Sato M, Yokoyama U, Fujita T, Okumura S, Ishikawa Y. The Roles of Cytochrome P450 in Ischemic Heart Diseases. *Curr Drug Metab*. 査読有, 12 (6): 526-532, 2011
<http://www.benthamdirect.org/pages/content.php?CDM/2011/00000012/0000006/0002F.SGM>
- ⑧ Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, Bai Y, Kurotani R, Yokoyama U, Okumura S, Cismowski MJ, Lanier SM, Ishikawa Y. Identification of transcription factor E3 (TFE3) as a receptor-independent activator of G{alpha}16: Gene regulation by nuclear G{alpha} subunit and its activator. *J Biol Chem*, 査読有, 286(20): 17766-17776, 2011
[DOI:10.1074/jbc.M111.219816](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.219816)
- ⑨ Jin MH, Yokoyama U, Sato Y, Shioda A, Jiao Q, Ishikawa Y, Minamisawa S. DNA microarray profiling identified a new role of growth hormone in vascular remodeling of rat ductus arteriosus. *J Physiol Sci*, 査読有, 61(3): 167-179, 2011
[DOI:10.1007/s12576-011-0133-3](https://doi.org/10.1007/s12576-011-0133-3)
- ⑩ Yokoyama U, Minamisawa S, Katayama A, Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, Iwasaki S, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Yokota S, Hammond HK, Ishikawa

Y. Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. *Circ Res*, 査読有, 106(12): 1882-1892, 2010
DOI:10.1161/CIRCRESAHA.109.214924

- ⑪ Suzuki S, Yokoyama U, Abe T, Kiyonari H, Yamashita N, Kurotani R, Sato M, Okumura S, Ishikawa Y. Differential roles of Epac in regulating cell death in neuronal and myocardial cells. *J Biol Chem*, 査読有, 285(31): 24248-24259, 2010
DOI:10.1074/jbc.M109.094581

- ⑫ Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y. Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. *J. Smooth Muscle Res*, 査読有, 46(2): 77-87, 2010
DOI:10.1540/jsmr.46.77

- ⑬ 岩本眞理, 西澤崇, 渡部重朗, 市川泰宏, 志水直, 山口和子, 赤池徹, 横山詩子, 瀧間浄宏, 佐近琢磨, 安井清, 柴田利満, 新村一郎, 横田俊平. 運動誘発性発作を呈する QT 延長症候群の運動負荷心電図の特徴について. *日本小児循環器学会雑誌*, 査読有, 第 26 巻第 1 号: 67-72, 2010

- ⑭ Otsu K, Toya Y, Oshikawa J, Kurotani R, Yazawa T, Sato M, Yokoyama U, Umemura S, Minamisawa S, Okumura S, Ishikawa Y. Caveolin gene transfer improves glucose metabolism in diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 査読有, 298(3): C450-456, 2010
DOI:10.1152/ajpcell.00077.2009

- ⑮ Akaike T, Jin MH, Yokoyama U, Izumi-Nakaseko H, Jiao Q, Iwasaki S, Iwamoto M, Nishimaki S, Sato M, Yokota S, Kamiya Y, Adachi-Akahane S, Ishikawa Y, Minamisawa S. T-type Ca²⁺ channels promote oxygenation-induced closure of the rat ductus arteriosus not only by vasoconstriction but also by neointima formation. *J Biol Chem*,

査読有, 284(36): 24025-24034, 2009
DOI:10.1074/jbc.M109.017061

[学会発表] (計 18 件)

- ① Yokoyama U, Jin MH, Kato Y, Ishiwata R, Suzuki S, Masuda M, Asou T, Aoki H, Sugimoto Y, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Inhibition of EP4 Signaling Attenuates Mouse Aortic Aneurysm Formation. The 76rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2012.3.17, 福岡国際会議場, 福岡
- ② Yokoyama U, Shioda A, Ishiwata R, Suzuki S, Masuda M, Asou T, Aoki H, Sugimoto Y, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Molecular mechanism of the regulation of vascular elastic fiber formation. The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (招待講演), 2012.3.31, 長野県松本文化会館, 長野
- ③ 横山詩子. 動脈管の閉鎖機序と新生児循環管理, 第 9 回日本周産期循環管理研究会 (招待講演), 2011.11.26, ハーネル仙台, 宮城
- ④ 横山詩子. 動脈管の閉鎖, 開存の分子メカニズムと治療開発, 横浜市立大学医学部小児科同門会 (招待講演), 2011.11.10, ホテルプライム, 神奈川
- ⑤ 横山詩子. 胎生期から始まる血管リモデリングの分子機序, 第 9 回腫瘍病理学分野・探索病理学講座セミナー (招待講演), 2011.9.1, 北海道大学医学部, 北海道
- ⑥ 横山詩子. 臨床から基礎医学研究へー豊かな感受性を持つー基礎研究者育成プロジェクト, 第 1 回リトリート (招待講演), 2011.8.20, 東京大学医学部, 東京
- ⑦ 横山詩子. 動脈管を制御する分子メカニズム, 第 1 回新生児循環 基礎・臨床 コラボレーションカンファレンス in YOKOHAMA (招待講演), 2011.6.22, 神奈川県立子供医療センター, 神奈川
- ⑧ 横山詩子. 動脈管を制御する分子メカ

- ニズム, 第 8 回 R S V Japan Global Expert Meeting (招待講演), 2011.6.18, 東京国際フォーラム, 東京
- ⑨ Yokoyama U, Shioda A, Kato Y, Asou T, Aoki H, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y. Prostaglandin EP4 Signaling Negatively Regulates Vascular Elastic Fiber Assembly. The 84th Scientific Session, American Heart Association (AHA), 2010.11.16, Chicago, USA
- ⑩ Minamisawa S, Yokoyama U, Akaike T, Hammond K, Ishikawa Y. Counteracting regulation of vascular remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. The 16th International Vascular Biology Meeting, 2010.6.20-24, Los Angeles, USA
- ⑪ Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y. Regulation of vascular remodeling of the ductus arteriosus. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (招待講演), 2011.3.29, パシフィコ横浜, 神奈川県
- ⑫ 横山詩子. 炎症性メディエーターによる血管弾性線維と細胞外基質の制御. 大阪大学明石研セミナー (招待講演), 2010.12.7, 大阪大学, 大阪
- ⑬ 横山詩子. 動脈管閉鎖のメカニズム—from bench to bedside. 第6回横浜小児先端医療セミナー (招待講演), 2010.9.3, 横浜崎陽軒, 神奈川県
- ⑭ 横山詩子. 動脈管のリモデリング—酸素の役割. 小児心血管分子医学研究会 (招待講演), 2010.7.8, シェラトングランド・トーキョーベイホテル, 千葉
- ⑮ 横山詩子. Prostaglandin E2-activated Epac promotes neointimal formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of cAMP-dependent protein kinase A. 第52回日本平滑筋学会総会 栗山熙賞受賞記念講演 (招待講演), 2010.7.1, 仙台市情報プラザエル, 宮城
- ⑯ Kato Y, Yokoyama U, Okumura S, Sata M, Minamisawa S, Ishikawa Y. Epac1 plays a critical role in advancing vascular remodeling after mechano-injury in vivo. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2010.3.5, 国立京都国際会議場, 京都
- ⑰ Minamisawa S, Akaike T, Yokoyama U, Iwasaki S, Ishikawa Y. Oxygenation Promotes Migration of Smooth Muscle Cell in the Rat Ductus Arteriosus. Developmental Vascular Biology Workshop IV, 2010.2.10-13, Monterey, California
- ⑱ Yokoyama U, Minamisawa S, Katayama A, Tang T, Iwasaki S, Hammond HK, Ishikawa Y. Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. Developmental Vascular Biology Workshop IV, 2010.2.10-13, Monterey, California

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiril/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 詩子 (YOKOYAMA UTAKO)
横浜市立大学・医学部・講師
研究者番号: 70404994

(2) 研究分担者

上地 正実 (UECHI MASAMI)
横浜市立大学・医学研究科・客員教授
研究者番号: 90296426