

## 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22日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590937

研究課題名（和文）心筋細胞特異的新規 ER タンパクの同定と心筋細胞分化・心不全発症における機能解析

研究課題名（英文）Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum molecule involved in cardiomyogenic differentiation and cardiac dysfunction

研究代表者

高橋 知三郎 (TOMOSABURO TAKAHASHI)

京都府立医科大学・医学研究科・客員講師

研究者番号：20381973

研究成果の概要（和文）：PARM-1 は、心筋細胞において小胞体(ER)に局在する新規 ER タンパク質であり、ER ストレスによって発現が誘導される。心筋細胞で PARM-1 をノックダウンすると ER ストレス誘導性アポトーシスが増加する。また、P19CL6 細胞に PARM-1 を過剰発現させると BMP の発現と Smad1/5/8 のリン酸化は増加し、心筋細胞分化は促進する。以上の結果より、PARM-1 は、生後の心筋細胞において ER ストレスに対して保護的に作用する ER タンパク質であり、心筋細胞の分化過程においては BMP-Smad シグナルを介して促進的に作用することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We identified PARM-1 as a novel endoplasmic reticulum (ER)-localized protein whose expression was induced by ER stress. In cardiomyocytes, knockdown of PARM-1 increased ER stress-induced apoptosis. In P19CL6 cells, overexpression of PARM-1 increased expression of BMP and phosphorylation of Smad1/5/8, resulting in acceleration of cardiomyogenic differentiation. These results indicate that PARM-1 is an ER-localized protein which plays a protective role against ER stress in postnatal cardiomyocytes, and that PARM-1 promotes cardiomyogenic differentiation through regulating the BMP-Smad signaling pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：心筋細胞、PARM-1、心不全、ER ストレス、心筋細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

(1). 我が国を含む先進国において心不全の有病率と心不全による死亡は年々増加しており、その発症機序の解明と有効な治療法の開発が囑望されている。一方、最近、幹細胞を用いた再生医療が目ま

れ、心不全に対しても様々な幹細胞・前駆細胞を用いた心筋再生療法が検討されているが、ここで用いられる幹細胞・前駆細胞の心筋細胞への分化の分子機構は依然、不明な点が多く、その分化効率も低い。これらの問題を解決するためには、心不全の発症・進展あるいは心筋

細胞分化に関わる分子機構の解明が必須で、中でも現在までに知られていない新たな分子標的の同定と機能の解明は重要であると考え、私達は心筋細胞に特異的に発現する遺伝子のプロファイリングを行ってきた。

- (2). 単離ラット新生仔心筋細胞を用いてシグナルシーケンストラップ (SST) 法にて分泌シグナルシーケンスをもつタンパク質をコードする cDNA のカタログ化を私達は行っており、その過程で、PARM-1 (prostatic androgen-repressed message-1) が心臓を含む筋組織に豊富に発現し、心臓においては心筋細胞に特異的に発現することを見出した。

## 2. 研究の目的

私達が SST 法を用いて単離同定した PARM-1 の心筋細胞分化、および心臓病の病態形成における働きを明らかにすることで、心不全発症進展と心筋細胞分化の分子機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1). PARM-1 の細胞内局在を免疫染色により検討する。
- (2). PARM-1 などの遺伝子発現変化を、Dahl 食塩感受性ラットの心肥大から心不全に至る過程、あるいは心筋細胞の ER ストレス誘導により検討する。
- (3). PARM-1 をノックダウンし、小胞体 (ER) ストレスによる心筋細胞死を検討する。
- (4). ER ストレス応答に関わる分子 (PERK, ATF6, CHOP) の発現と活性化を検討する。
- (5). P19CL6 細胞を用い、DMSO により心筋細胞分化を誘導し、その過程における遺伝子発現を検討する。
- (6). 組換えレトロウイルスにより PARM-1 あるいは LacZ を過剰発現させた P19CL6 細胞を用い、PARM-1 の心筋細胞分化におよぼす作用を検討する。
- (7). 心筋細胞分化過程での BMP 発現や Smad の活性化を検討する。

## 4. 研究成果

- (1). PARM-1 の細胞内局在を検討するために

免疫染色を行い、PARM-1 が心筋細胞において ER 蛋白質である GRP78 と共局在していることより、ER 蛋白質であることが示唆された (図 1)。

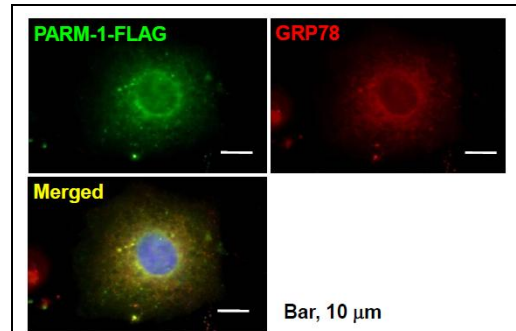


図 1. 心筋細胞において PARM-1 は ER に局在する。

- (2). Dahl 食塩感受性ラットの心肥大から心不全に至る過程において PARM-1 mRNA 発現は心不全発症に伴い増加した (図 2)。

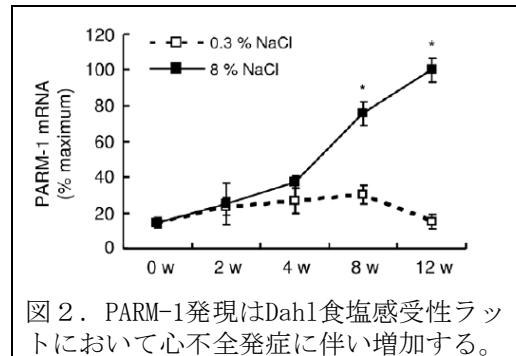
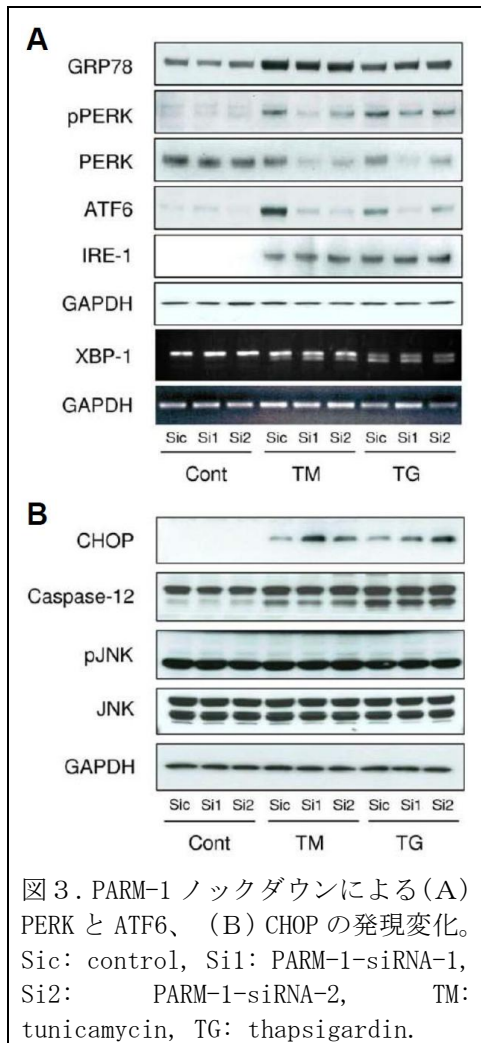
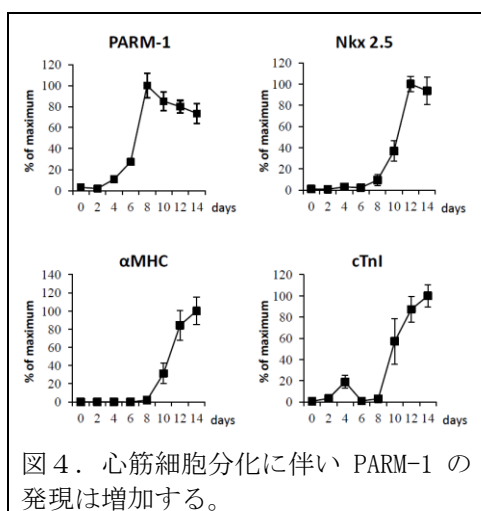


図 2. PARM-1 発現は Dahl 食塩感受性ラットにおいて心不全発症に伴い増加する。

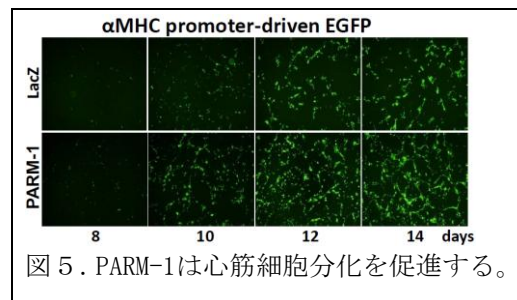
- (3). 心筋細胞において PARM-1 の発現は、ER ストレス誘導刺激剤 (tunicamycin あるいは thapsigardin) により増加した。
- (4). PARM-1 をノックダウンすると ER ストレスによる心筋細胞のアポトーシスは増加した。
- (5). 心筋細胞において PARM-1 をノックダウンし tunicamycin あるいは thapsigardin により ER ストレスを誘導すると、ER ストレス応答に関わる PERK や ATF6 の発現は低下し、PERK のリン酸化も減少した (図 3)。そして、ER ストレス誘導性アポトーシスに関与する転写因子 CHOP の発現亢進を認めた (図 3)。



(6). PARM-1 は、P19CL6 細胞の DMSO による心筋細胞への分化に伴い発現が増加した(図4)。



(7). 組換えレトロウイルスにより PARM-1 を PARM-1 過剰発現させると心筋細胞分化は促進した(図5)。



(8). PARM-1 過剰発現により心筋細胞分化初期の BMP の発現と BMP の下流である Smad1/5/8 のリン酸化を増加させた。

(9). 以上の結果より、PARM-1 は、生後の心筋細胞において ER ストレスにより誘導され、PERK、ATF6、CHOP の発現を制御し、心筋保護的に作用することと、心筋細胞分化においては BMP-Smad シグナルを介して P19CL6 の心筋分化に関与す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8件)

- Che J, Okigaki M, Takahashi T, Katsume A, Adachi Y, Yamaguchi S, Matsunaga S, Takeda M, Matsui A, Kishita E, Ikeda K, Yamada H, Matsubara H. Endothelial FGF receptor signaling accelerates atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有 2011; 300: H154-161. DOI: 10.1152/ajpheart.00075.2010
- Isodono K, Takahashi T, Imoto H, Nakanishi N, Ogata T, Asada S, Adachi A, Ueyama T, Oh H, Matsubara H. PARM-1 is an endoplasmic reticulum molecule involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. *PLoS ONE*. 査読有 2010; 5: e9746. DOI: 10.1371/journal.pone.0009746
- Nakagawa Y, Ikeda K, Akakabe Y, Koide M, Uraoka M, Yutaka KT, Kurimoto-Nakano R, Takahashi T, Matoba S, Yamada H, Okigaki M, Matsubara H. Paracrine osteogenic signals via bone morphogenetic protein-2 accelerate the atherosclerotic intimal calcification in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 査読有 2010; 30: 1908-1915. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.206185
- Yokoi H, Yamada H, Tsubakimoto Y, Takata

- H, Kawahito H, Kishida S, Kato T, Matsui A, Hirai H, Ashihara E, Maekawa T, Iwai M, Horiuchi M, Ikeda K, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H. Bone marrow AT<sub>1</sub> augments neointima formation by promoting mobilization of smooth muscle progenitors via platelet-derived SDF-1  $\alpha$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 査読有 2010; 30: 60-67.  
DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.192161
5. Nakano-Kurimoto R, Ikeda K, Uraoka M, Nakagawa Y, Yutaka K, Koide M, Takahashi T, Matoba S, Yamada H, Okigaki M, Matsubara H. Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 査読有 2009; 297: H1673-1684.  
DOI: 10.1152/ajpheart.00455.2009
  6. Tsubakimoto Y, Yamada H, Yokoi H, Kishida S, Takata H, Kawahito H, Matsui A, Urao N, Nozawa Y, Hirai H, Imanishi J, Ashihara E, Maekawa T, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H. Bone marrow angiotensin AT<sub>1</sub> receptor regulates differentiation of monocyte lineage progenitors from hematopoietic stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 査読有 2009; 29: 1529-1536.  
DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.187732
  7. Yamamoto T, Shirayama T, Takahashi T, Matsubara H. Altered expression of Na<sup>+</sup> transporters at the mRNA level in rat normal and hypertrophic myocardium. *Heart Vessels.* 査読有 2009; 24: 54-62.  
DOI: 10.1007/s00380-008-1071-8
  8. Uraoka M, Ikeda K, Nakagawa Y, Koide M, Akakabe Y, Nakano-Kurimoto R, Takahashi T, Matoba S, Yamada H, Okigaki M, Matsubara H. Prorenin induces ERK activation in endothelial cells to enhance neovascularization independently of the renin-angiotensin system. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 2009; 390: 1202-1207.  
DOI:10.1016/j.bbrc.2009.10.121
- [学会発表] (計 8 件)
1. Naito D, Ogata T, Amano K, Taniguchi T, Isodono K, Adachi A, Imoto H, Nakanishi N, Kangawa H, Takahashi T, Ueyama T, Matsubara H. MURC induces cardiomyocyte hypertrophy through the extracellular signal-regulated kinase pathway. International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism 2010 Mar 31-Apr 1, Nara, Japan
  2. Yamada H, Tsubakimoto Y, Yokoi H, Kishida S, Kato T, Kawahito H, Hirai H, Ashihara E, Maekawa T, Ikeda K, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H. Bone marrow angiotensin AT<sub>1</sub> receptor regulates differentiation of Monocyte lineage progenitors from hematopoietic stem cells. International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism 2010 Mar 31-Apr 1, Nara, Japan
  3. Yamada H, Tsubakimoto Y, Yokoi H, Kishida S, Kato T, Kawahito H, Hirai H, Ashihara E, Maekawa T, Iwai M, Horiuchi M, Ikeda K, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H. Bone marrow A<sub>11</sub> augments neointima formation by promoting mobilization of smooth muscle progenitors via platelet-derived SDF-1 $\alpha$ . International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism 2010 Mar 31-Apr 1, Nara, Japan
  4. Taniguchi T, Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Miyagawa K, Amano K, Isodono K, Imoto H, Tagawa M, Takehara N, Asada S, Adachi A, Morimoto T, Takahashi T, Oh H, Ueyama T, Matsubara H. MURC, muscle-restricted coiled-coil protein, regulates caveolae morphology and induces hypertrophy in cardiomyocytes. American Heart Association (米国心臓病学会) 2010 Nov 13-17, Chicago, USA
  5. Adachi A, Takahashi T, Imoto H, Nakanishi N, Kangawa H, Ueyama T, Matsubara H. NFAT5 is essential for mesodermal and cardiomyogenic differentiation through regulating the canonical pathway. 第74回日本循環器学会総会 2010年3月 京都
  6. Imoto H, Takahashi T, Adachi A, Nakanishi N, Kangawa H, Ueyama T, Matsubara H. Serglycin, a novel adipokine highly expressed in epicardial adipose tissue. 第74回日本循環器学会総会 2010年3月 京都
  7. Isodono K, Takahashi T, Imoto H, Nakanishi N, Ogata T, Asada S, Adachi A, Kangawa H, Ueyama T, Matsubara H. PARM-1, a novel transmembrane molecule involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. 第74回日本循環器学会総会 2010年3月 京都

8. Asada S, Takahashi T, Isodono K, Imoto H, Adachi A, Ogata T, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Downregulation of Dicer Expression by Serum Withdrawal Sensitizes Human Endothelial Cells to Apoptosis. 第73回日本循環器学会総会 2009年3月 大阪

[図書] (計1件)

1. 竹原有史、高橋知三郎、松原弘明、メディカルレビュー社、心筋前駆・幹細胞と臨床応用の可能性、循環器再生医学の現状と展望、2011、85-89

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 知三郎 (TAKAHASHI TOMOSABURO)  
京都府立医科大学・医学研究科・客員講師  
研究者番号：20381973

### (2) 研究分担者

五十殿 弘二 (ISODONO KOJI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：50515294