

機関番号：11501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790701

研究課題名（和文） 心不全発症における SUMO 修飾によるシグナル伝達制御の検討

研究課題名（英文）

Investigation of the intracellular signaling induced by the SUMO modification in the process of CHF

研究代表者

宍戸 哲郎（SHISHIDO TETSURO）

山形大学・医学部・助教

研究者番号：60400545

研究成果の概要（和文）：加齢や糖尿病は心筋梗塞後の心不全進行を規定する独立した危険因子であり、そのメカニズムの解明は新しい心不全治療法の開発につながる。これまで動物実験で示唆されていたように、臨床的にも心不全患者では酸化ストレスが上昇しており、重症度や予後と関連することを明らかにした。酸化ストレスによって DGKzeta の心臓での発現が低下していることを臨床的に確認し明らかにした。マウスに存在せず、ヒトに存在する DGKalpha の役割を虚血再灌流で証明した。酸化ストレスによる kinase cascade の変化により、細胞内において SUMOylation, Ubiquitination の双方が修飾され、心筋細胞障害を引き起こしていることが確認された。

研究成果の概要（英文）：Clarify the mechanisms by which aging and diabetes are independent factor for the advancing the heart failure after myocardial infarction contribute to find a new therapeutic target for chronic heart failure. As shown in previous reports using animal model, we found that oxidative stress is increased in patients with heart failure, moreover, its concentration is associated with the severity and prognosis. We found the important role of DGKalpha, which exist in human heart but not in mice, in the process of ischemia reperfusion injury. We also found that oxidative stress modulated the kinase cascade, and modulated the SUMOylation and ubiquitination, finally induced myocardial injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：循環器内科学

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：慢性心不全、糖尿病、SUMOylation

## 1. 研究開始当初の背景

現在の日本において高齢者の心不全患者、  
中高年において糖尿病やメタボリック症候

群を合併した心不全患者増加しており、加齢  
や糖尿病は心筋梗塞後の心不全進行を規定  
する独立した危険因子であることから心臓

リモデリングの増悪機序の解明が期待されている。不全心の発症や進行の過程における細胞内シグナルの変化は、キナーゼカスケードを中心に解明されてきた。我々は、心不全で入院した患者さんから血液生化学検査を行い、経胸壁超音波心臓図や心臓カテーテル検査、心臓核医学検査所見といった臨床像と対比させ心不全の進行に関する新たなシグナルの発見と新たな治療法の開発を行っている。一方で、糖尿病やメタボリック症候群、加齢などによる心機能障害は、レニンアンジオテンシン系のような上流シグナルの遮断後も持続や進行することが知られており、新たな上流シグナルの解明と同時に、キナーゼカスケードの下流の調節やシグナル伝達機構の変化の解明が求められている。

近年、糖尿病において、心臓や平滑筋細胞において、Sumoylation がキナーゼ活性や転写因子活性に効果を与え、病態形成に関与している可能性が報告されていることから、翻訳後修飾に与える因子やその効果の解明が期待されている。small ubiquitin-related modifier (SUMO)は基質タンパク質のリジン残基側鎖にイソペプチド結合する翻訳後修飾因子であり、SUMO によるタンパク質修飾(SUMO修飾)は酵母からヒトを含む高等生物まで保存されている。SUMO 修飾の進行は、E1 活性化、E2 結合酵素(Ubc 9)、 E3 連結酵素である PIAS family により制御される。SUMO 修飾は細胞内蛋白の結合解離、転写活性の調整、蛋白の安定化、蛋白の局在への関わりが示唆され、発癌、神経疾患など多くの疾患への関与が知られている (Annu Rev Biochem. 2004; 73:355-382.)。

我々は、心筋梗塞後の心不全の増悪の危険因子である糖尿病や活性酸素 (ROS)により、MAPK のひとつであり圧負荷、虚血による心臓リモデリングにおいて血管内皮保護、心保護に作用する ERK5 が SUMO 修飾をうけ、ERK5 による心筋梗塞後の心臓保護作用が消失することを in vivo および in vitro で報告した(Circ Res. 2008;102:538-45. Circ Res. 2008; 102:1416- 25.)。すなわち、SUMO 修飾が糖尿

病状態で亢進していること、細胞の癌化、老化などと同様に病的状態における心筋障害にも関与することを明らかにした。

細胞内 DAG 濃度上昇及び PKC の活性化は、心肥大、心筋細胞アポトーシス、心筋収縮力低下を介して心不全の発症と進展に関与していることが広く認識されている。我々は DAG の細胞内調節を担っている DGK のなかでも特に心臓で多く発現している DGK $\zeta$  が DAG-PKC シグナル伝達経路を抑制した結果、心肥大や心不全の発症の抑制に関与することを報告した(Circulation. 2006;113:60-6)。その一方で、DGK 活性と発現の双方が糖尿病で低下している (Cell. 2008, 132, 375-386) ことが報告されている。

しかしながら、培養実験や基礎実験では SUMOylation の程度や、心筋障害に関連する酸化ストレスが臨床的に検出可能で予後や重症度と関連するのかどうか、ヒト不全心において DGK の発現がどのように変化し、どのようなメカニズムで変化しているのか、酸化ストレスによって活性が変化する他の DGK family に与える影響は明らかとなっていない。

## 2 . 研究の目的

心不全の進行を修飾する新しい因子を確立し、治療の指標となりうるかの検討を行う。さらに、基礎実験においてはそれらの刺激因子による細胞内シグナルに関し検討を行い、新しい治療法の開発を行っていく。

前述のように、糖尿病や活性酸素 (ROS)により、ERK5 が SUMO 修飾をうけ、ERK5 による心筋梗塞後の心臓保護作用が消失することを in vivo および in vitro で報告したことから、臨床的に糖尿病、慢性炎症や活性酸素による心不全不全患者の心機能や予後に与える影響を臨床的に評価を行う。続いて、虚血再灌流に対する DGKzeta 以外のほかの DGK family による効果の検討を行う。不全心筋サンプルを用いて DGKzeta をはじめとする DGK family の発現の変化の検討を行う。酸化ストレスや糖尿病による

SUMOylation をはじめとする翻訳後修飾による細胞内シグナルの変化の検討を行う。これらの ~ を明らかにすることで、糖尿病や加齢による心不全増悪メカニズムの解明を行っていくを本研究の目的とし、予防を含めた新たな治療目標を検討していく。

### 3 . 研究の方法

大学病院に心不全で入院した患者から血液サンプルを採取し、臨床像と照らし合わせ様々な因子と心不全の進行を明らかにしていく。研究プロトコールは山形大学医学部倫理委員会で承認を受けている。 虚血再灌流に対する DGKzeta 以外のほかの DGK family による効果の検討を行う。心臓特異的 DGKalpha 過剰発現マウスを作成し、虚血再灌流による心機能障害、細胞内シグナルの変化の検討を行う。 不全心筋サンプルを用いて DGK family の発現の変化の検討を PCR 法で行う。研究プロトコールは山形大学医学部倫理委員会で承認を受けている。 糖尿病マウスに心筋梗塞を作成し、心機能やアポトーシスの定量、kinase 活性の検討を行い、SUMOylation をはじめとする翻訳後修飾による細胞内シグナルの変化の検討を行う。

基礎実験を用いて検討を向けて様々な上流のシグナルの PKC 活性化抑制により、心臓リモデリング抑制効果のあるジアシルグリセロールキナーゼ(DGK) $\zeta$  が、糖尿病や加齢により small ubiquitin-related modification (SUMO 修飾)をうけ、DGK $\zeta$  活性が低下し心不全進行に関与している可能性がある。本研究の目的は、糖尿病による酸化ストレス増大による DGK $\zeta$  活性の変化と、SUMO 修飾の関連を明らかにし、心不全の予防を含めた新たな治療目標を検討することである。

### 4 . 研究成果

心不全患者から得られたサンプルを用いて酸化ストレスの評価を行った。酸化ストレスの評価は様々な方法があるが、今回は、8-Hydroxy-2'- deoxyguanosine (8-OHdG)を指標とした。心不全の重症度に相関して 8-OHdG

の濃度が亢進し、低値群より高値群で有意に退院後の再入院率が高値であることを報告した(Eur J Clin Invest. 2011 Jan 25.)。

ヒトに存在しマウスに存在しないと報告されている DGKalpha 過剰発現マウスは予想に反し虚血再灌流に対し梗塞サイズ、アポトーシスの程度が野生型マウスに比し亢進しており DGK family の多様な作用を確認した。

不全心筋での DGK family の遺伝子発現の検討を行った。ヒトの心臓において DGK gamma, eta, epsilon, zeta の発現を PCR で確認した。さらに、心房細動を伴い心房負荷を持つ患者由来の心筋細胞では、コントロールに比べ DGKeta の発現亢進、DGKzeta の発現低下を報告した(J Cardiothorac Surg. 2011;6:65.)。

酸化ストレス、アンジオテンシン II は糖尿病による心機能低下に関与していることから、これらの刺激と心筋細胞における SUMOylation, Ubiquitination の関連の検討を行った。高血糖刺激、過酸化水素刺激、アンジオテンシン II などによって ERK5 の SUMOylation の亢進を認めると同時に、CHIP 活性の低下により ERK5 を介した ICER の degradation が低下していることを報告した (FASEB J. 2010; 24:4917-28.)。

### 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 12 件)

1. Bilim O, Shishido T, Toyama S, Suzuki S, Sasaki T, Kitahara T, Sadahiro M, Takeishi Y, Kubota I. Differential regulation of diacylglycerol kinase isoform in human failing hearts. J Cardiothorac Surg. 2011;6:65. 査読有
2. Shishido T, Konta T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Takasaki S, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I. Suppressive effects of valsartan on microalbuminuria and CRP in patients with

- metabolic syndrome (Val-Mets). *Clin Exp Hypertens*. 2011;33:117-23. 査読有
3. Suzuki S, Shishido T, Ishino M, Katoh S, Sasaki T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine is a prognostic mediator for cardiac event. *Eur J Clin Invest*. 2011 Jan 25. 査読有
  4. Kutsuzawa D, Arimoto T, Watanabe T, Nitobe J, Miyamoto T, Miyashita T, Shishido T, Takahashi H, Nishiyama S, Kubota I. Persistent abnormal value of late potential in Brugada syndrome associated with hypokalemia. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2011;16: 104-6. 査読有
  5. Bilim O, Takeishi Y, Kitahara T, Ishino M, Sasaki T, Suzuki S, Shishido T, Kubota I. Serum YKL-40 predicts adverse clinical outcomes in patients with chronic heart failure. *J Card Fail*. 2010 ;16:873-9. 査読有
  6. Katoh S, Shishido T, Kutsuzawa D, Arimoto T, Netsu S, Funayama A, Ishino M, Niizeki T, Nishiyama S, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Kubota I. Iodine-123-metaiodobenzylguanidine imaging can predict future cardiac events in heart failure patients with preserved ejection fraction. *Ann Nucl Med*. 2010;24:679-86. 査読有
  7. Woo CH, Le NT, Shishido T, Chang E, Lee H, Heo KS, Mickelsen DM, Lu Y, McClain C, Spangenberg T, Yan C, Molina CA, Yang J, Patterson C, Abe J. Novel role of C terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) ubiquitin ligase on inhibiting cardiac apoptosis and dysfunction via regulating ERK5-mediated degradation of inducible cAMP early repressor. *FASEB J*. 2010;24:4917-28. 査読有
  8. Kitahara T, Shishido T, Suzuki S, Katoh S, Sasaki T, Ishino M, Nitobe J, Miyamoto T, Miyashita T, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I. Serum midkine as a predictor of cardiac events in patients with chronic heart failure. *J Card Fail*. 2010;16:308-13. 査読有
  9. Sasaki T, Takeishi Y, Suzuki S, Niizeki T, Kitahara T, Katoh S, Ishino M, Shishido T, Watanabe T, Kubota I. High serum level of neopterin is a risk factor of patients with heart failure. *Int J Cardiol*. 2010 ;145:318. 査読有
- [学会発表](計 30件 国際学会)
1. Ishino M, Shishido T, Funayama A, Netsu S, Kiribayashi N, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Kubota I: A comparison of B-type natriuretic peptide and heart-type fatty acid binding protein as predictors of cardiac events in heart failure patients with chronic kidney disease. American Heart Association Scientific Sessions 2010, Chicago; 2010 Nov 13-17
  2. Ishino M, Shishido T, Funayama A, Netsu S, Kiribayashi N, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Kubota I: Short-and long-term outcome and risk stratification by multibiomarkers in patients with chronic heart failure. American Heart Association Scientific Sessions 2010, Chicago; 2010 Nov 13-17
  3. Funayama A, Shishido T, Ohtaki Y, Hasegawa H, Honda S, Netsu S, Ishino M, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Kubota

- I: Combination of pentosidine and carboxy-terminal telopeptide of type I collagen strongly predicts cardiac events in heart failure patients with preserved left ventricular ejection fraction. American Heart Association Scientific Sessions 2010, Chicago; 2010 Nov 13-17
- 4 . Funayama A, Shishido T, Ohtaki Y, Hasegawa H, Honda S, Netsu S, Ishino M, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Kubota I: Utility of urinary excretion of b2 microglobulin to identify high risk subset for restenosis in patients who underwent percutaneous coronary intervention. American Heart Association Scientific Sessions 2010, Chicago; 2010 Nov 13-17
  - 5 . Netsu S, Shishido T, Ohtaki Y, Hasegawa H, Honda S, Funayama A, Ishino M, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Kubota I: Serum surfactant protein-D is a useful marker reflecting pulmonary congestion in patients with heart failure. American Heart Association Scientific Sessions 2010, Chicago; 2010 Nov 13-17
  - 6 . Ishino M, Shishido T, Funayama A, Netsu S, Kiribayashi N, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Kubota I: Heart-type fatty acid binding protein as predictor of cardiac mortality and events in patients with acute decompensated heart failure. American Heart Association Scientific Sessions 2010, Chicago; 2010 Nov 13-17
  - 7 . Katoh S, Shishido T, Kutsuzawa D, Arimoto T, Watanabe T, Kubota I: Influence of diabetes mellitus on prognostic utility of cardiac iodine-123-metaiodobenzylguanidine in diastolic heart failure patients. American Heart Association Scientific Sessions 2010, Chicago; 2010 Nov 13-17
  - 8 . Suzuki S, Shishido T, Sasaki T, Kato S, Ishino M, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: The long pentraxin PTX3 exacerbates pressure overload-induced left ventricular dysfunction. XXth World Congress of the International Society for Heart Research 2010 国際心臓研究会 (ISHR) 第20回世界大会, Kyoto; 2010 May 13-16
  - 9 . Katoh S, Shishido T, Takahashi H, Arimoto T, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Kubota I: Iodine-123-metaiodobenzyl guanidine imaging can predict future cardiac events in patients with preserved heart failure. American Heart Association Scientific Sessions 2009, Orlando; 2009 Nov 14-18
  - 10 . Sasaki T, Shishido T, Takahashi H, Arimoto T, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: High serum level of neopterin is a risk factor of patients with heart failure. American Heart Association Scientific Sessions 2009, Orlando; 2009 Nov 14-18
  - 11 . Suzuki S, Shishido T, Kitahara T, Sasaki T, Kato S, Ishino M, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: The long pentraxin PTX3 exacerbates pressure overload-induced left ventricular dysfunction. American Heart Association Scientific Sessions 2009, Orlando; 2009 Nov 14-18
  - 12 . Suzuki S, Shishido T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine predicts adverse clinical outcomes in patients with heart failure. American Heart Association Scientific Sessions 2009, Orlando; 2009

Nov 14-18

- 13 . Sasaki T, Shishido T, Takahashi H, Arimoto T, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I: High serum level of neopterin predicts cardiac events in chronic heart failure patients with preserved left ventricular systolic function. American Heart Association Scientific Sessions 2009, Orlando; 2009 Nov 14-18
- 14 . Funayama A, Shishido T, Arimoto T, Takahashi H, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Kubota I: High Serum level of pregnancy associated plasma protein A is a risk factor of patients with heart failure. American Heart Association Scientific Sessions 2009, Orlando; 2009 Nov 14-18

[ その他 ]

1. 日本心不全学会最優秀ポスター賞  
Funayama A, Shishido T, Sasaki T, Katou S, Ishino M, Netsu S, Kubota I: High serum level of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) is a risk factor of patients with heart failre. 第13回日本心不全学会学術集会, 福岡; 2009年10月
2. 第33回心筋代謝研究会 2010年7月3日 YIA 最優秀賞 Shishido T, Abe J, Kubota I, Critical Role of p90RSK on ERK5-Sumoylation in Development of LV Dysfunction in Diabetic Heart after Myocardial Infarction

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宍戸 哲郎 ( TETSURO SHISHIDO )

山形大学・医学部・助教

研究者番号 : 60400545