

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25年6月10日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300130

研究課題名（和文） 変異トロポニンTによる心筋症の病態分子メカニズムの解明と延命因子の探索

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of an improvement in prognosis in the mouse model of dilated cardiomyopathy treated by inhibition of the RAA system.

研究代表者

栗原 敏 (KURIHARA SATOSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：90057026

研究成果の概要（和文）：

心不全に至る形態的变化と機能的変化の分子機構を明らかにするために、レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系(RAA系)の拡張型心筋症に対する延命効果について検討した。RAA系の抑制により、拡張型心筋症モデルマウスの致死率が著しく改善することが明らかになった。そのメカニズムは、(1)線維化抑制効果、(2)Ca²⁺感受性改善効果を伴わない何らかの収縮力増強効果、の2点である可能性が示唆された。(196文字)

研究成果の概要（英文）：

We investigated the role of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAA system) on the dilated cardiomyopathy, to clarify the molecular mechanism and morphological changes in heart failure.

By inhibition of the RAA system, survival rate of the mouse model of dilated cardiomyopathy was significantly improved.

We conclude that the possible mechanisms of RAA inhibition for improving life-span of dilated cardiomyopathy should include (1) inhibition of fibrosis and (2) an enhancement of contractility without improvement of the Ca²⁺ sensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	6,900,000	2,070,000	8,970,000

研究分野：心筋生理学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：細胞内 Ca²⁺、トロポニン、Ca²⁺感受性、アンギオテンシン、拡張型心筋症

1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症 (dilated cardiomyopathy: DCM) は、左心室の拡張と収縮不全を特徴とする心疾患で、うっ血性心不全、不整脈を誘起し、突然死の原因となる。しかし、心筋症が誘発される分子機序と不全心筋の生理学的特性は十分に明らかでない。

ヒトの拡張型心筋症の原因遺伝子が明らかにされ、それら原因遺伝子に関する遺伝子変異モデル動物の心筋を用いることによって、拡張型心筋症の発症に関わる原因蛋白が解明され、心不全のメカニズムが分子レベルで解明されつつある。連携研究者の森本らはヒトの家族性拡張型心筋症がトロポニンのアミノ酸点変異 ($\Delta K210$) によることを明らかにし、 $\Delta K210$ ノックイン ($\Delta K210$ -KI) マウスを作成し、拡張型心筋症の発症メカニズムをモデル動物を用いて研究する道を拓いた。

2. 研究の目的

心筋の収縮調節機構が明らかになり、ヒトの心筋症の原因遺伝子が解明されつつある。本研究では、拡張型心筋症モデルマウス ($\Delta K210$ -KI マウス) の心筋を用いて、心不全に至る形態的变化と機能的変化の分子機構を明らかにする。また、アンジオテンシン II 受容体阻害薬 (angiotensin II receptor blocker, ARB) の投与は致死率を著しく改善することを発見したので、致死率改善の細胞内メカニズムを明らかにし、心筋症の治療戦略を視野に入れて研究を展開する

3. 研究の方法

形態学的手法と生理学的手法を用いて、拡張型心筋症の分子メカニズムを解明する。

(1) 形態学的手法として

- ① 光学顕微鏡による心筋細胞の形態と線維化を定量する。
- ② 電子顕微鏡を用いて細胞内微細構造の変化を観察する。また、免疫組織細胞化学的手法を用いて細胞内 Ca^{2+} 調節系酵素群の局在および収縮系蛋白質の局在変化を観察する。

(2) 生理学的手法として、

- ① 筋小胞体の Ca^{2+} 放出チャネルの活動を調べるために共焦点顕微鏡を用いて Ca^{2+} spark を測定する。
- ② トロポニン T の点変異による収縮系の機能変化を解明するために、トリトン処理スキンド標本を用いて ATPase 活性の測定、step-length change による cross-bridge kinetics の測定を行う。
- ③ モデルマウス出生後から、心臓の形態 (サイズ、重量) と共にエコーを用いた心機能の経時的測定を行う。これらの実験を、モデルマウス出生

後、4、6、8、週後に行い、かつ、angiotensin II 受容体阻害薬 (ARB) を投与したモデルマウス心筋と比較する。

4. 研究成果

(1) これまでに明らかにしたこと

$\Delta K210$ -KI マウス心筋は、心臓の拡張性肥大 (左室腔拡大) をもたらし、心重量体重比は大きくなり線維化が顕著になる。生理学的パラメータの変化としては、 Ca^{2+} 電流の増加、 Ca^{2+} transient (CaT) の増大と顕著な張力の低下を確認した。また、 CaT の時間経過は遅くなるが、張力の時間経過はやや速くなるという特徴がある。スキンド標本を用いて、pCa-tension 関係を測定すると、 $\Delta K210$ -KI マウス心筋では、pCa-tension 関係が右方移動し Ca^{2+} 感受性の低下が観察された。 CaT の増大や Ca^{2+} 感受性の低下は、protein kinase A (PKA) による、 Ca^{2+} チャネル、phospholamban (PLB)、TnI のリン酸化の亢進が考えられるが、TnI のリン酸化は亢進していなかった。

これらの結果は、 $\Delta K210$ -KI は、心臓の形態的变化と共に、 Ca^{2+} 調節系および収縮調節系 (Ca^{2+} 感受性の低下) を変化させることを示唆する。

(2) 心不全致死率の改善戦略

我々は心筋保護作用を有するアンジオテンシン II 受容体阻害薬 (ARB) に延命効果があるか検討した。その結果、ARB は $\Delta K210$ -KI マウスの致死率を著しく改善することを確認した。ARB は心肥大と左心室腔の拡大を抑制し、同時に線維化を抑制した。しかし、 Ca^{2+} 感受性の低下や CaT の増高は改善されなかった。

これらの結果は、拡張型心筋症における高死亡率は、 Ca^{2+} 感受性低下に直接起因するものでなく、 Ca^{2+} 感受性低下の影響を受け形態的变化を誘起する因子と関係があり、 Ca^{2+} 調節系も二次的な影響を受けることを示唆している。

これまでに、ARB 投与で延命効果が確認されたので、RAA 系の影響を詳細に調べるため、直接レニン阻害剤 (direct renin inhibitor; DRI) の投与の影響も検討した。その結果 DRI 投与におけるモデルマウスの致死率が著しく改善することが明らかになった。ARB 投与群と DRI 投与群それぞれで非投与群と比較したところ、心エコーによる機能評価で心収縮率の増大ならびに心拡大の著明な抑制を認めた。また、両投与群ともに心筋線維化の著明な抑制が認められた。本モデルマウスでは Ca^{2+} 感受性低下が明らかであるが、ARB 投与群におけるスキンド標本での Ca^{2+} 感受性測定では収縮蛋白系そのものの Ca^{2+} 感受

性改善効果は認められなかった。生筋標本での細胞内 CaT 測定において、ARB 投与群は細胞内 CaT の増加が認められ、それに伴う張力増強も認められた。このことは ARB 投与での致死率改善効果は線維化抑制だけではなく、細胞内 Ca²⁺調節機構を介した収縮力代償機構が致死率減少に寄与していることを示唆している。DRI 投与群に対しても収縮蛋白系 Ca²⁺応答性について検討したところ、DRI 投与でも明らかな Ca²⁺感受性改善効果は認められなかった。これらの結果から、RAA 系の抑制は拡張型心筋症に対して、線維化抑制効果と、Ca²⁺感受性改善効果を伴わない何らかの収縮力増強効果、の二要因が延命効果をもたらしている可能性が示唆された。

(3)今後の展望

今回の研究で、拡張型心筋症における延命効果をもたらす治療とその分子メカニズムが明らかになった。拡張型心筋症 Ca²⁺感受性変化に対する RAA 系の影響は国内外の研究を含めても、まだ十分に解明されていない。今後はさらにメカニズムを掘り下げて検討する必要がある。

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 9 件)

1. Alpha₁-adrenoceptor stimulation inhibits cardiac excitation-contraction coupling through tyrosine phosphorylation of beta₁-adrenoceptor. O-Uchi J, Komukai K, Kusakari Y, Morimoto S, Kawai M, Jhun BS, Hurst S, Hongo K, Sheu SS, Kurihara S. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有. 433(2):188-93. 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.072.
2. Sarcomere imaging by quantum dots for the study of cardiac muscle physiology. Kobirumaki-Shimozawa F, Oyama K, Serizawa T, Mizuno A, Kagemoto T, Shimozawa T, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. *J Biomed Biotechnol*. 査読有. 313814. 2012. doi: 10.1155/2012/313814.
3. Role of Ca²⁺ in the rapid cooling-induced Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum in ferret cardiac muscles. Tanaka E, Konishi M, Kurihara S. *J Physiol Sci*. 査読有. 62(3):241-50. 2012. doi: 10.1007/s12576-012-0203-1.
4. Sarcomere length-dependent Ca²⁺ activation in skinned rabbit psoas muscle fibers: coordinated regulation of thin filament cooperative activation and passive force. Fukuda N, Inoue T, Yamane M, Terui T, Kobirumaki F, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S. *J Physiol Sci*. 査読有. 61(6):515-23. 2011. doi: 10.1007/s12576-011-0173-8.
5. Real-time measurement of the length of a single sarcomere in rat ventricular myocytes: a novel analysis with quantum dots. Serizawa T, Terui T, Kagemoto T, Mizuno A, Shimozawa T, Kobirumaki F, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. *Am J Physiol Cell Physiol*. 査読有. 301(5):C1116-27. 2011. doi: 10.1152/ajpcell.00161.2011.
6. Depressed contractile performance and reduced fatigue resistance in single skinned fibers of soleus muscle after long-term disuse in rats. Uda J, Terui T, Ohtsuki I, Marumo K, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. *J Appl Physiol*. 査読有. 111(4):1080-7. 2011. doi: 10.1152/jappphysiol.00330.2011.
7. Regulatory mechanism of length-dependent activation in skinned porcine ventricular muscle: role of thin filament cooperative activation in the Frank-Starling relation. Terui T, Shimamoto Y, Yamane M, Kobirumaki F, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. *J Gen Physiol*. 査読有. 136(4):469-82. 2010. doi: 10.1085/jgp.201010502.
8. Titin-based regulations of diastolic and systolic functions of mammalian cardiac muscle. Fukuda N, Terui T, Ishiwata S, Kurihara S. *J Mol Cell Cardiol*. 査読有. 48(5):876-81. 2010. doi: 10.2174/157340309788166714.
9. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the regulation of the cardiac L-type Ca²⁺ current during endothelin-1 stimulation. Komukai K, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Yoshimura M, Kurihara S. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有. 298(6):H1902-7. 2010.

[学会発表] (計 21 件)

1. Kusakari Y, Urashima T, Kurihara S. Measurement of Ca^{2+} handling in right ventricular hypertrophy induced by pressure-overload. The XXth World Congress of the International Society for Heart Research. 2010年5月. 京都.
2. Kusakari Y, Urashima T, Kurihara S. Changes in Ca^{2+} handling and contraction in pressure overload-induced right ventricular hypertrophy. International Academy of Cardiovascular Sciences Japan Section Meeting. 東京 2010年7月
3. Morimoto S, O-Uchi J, Kawai M, Kusakari Y, Komukai K, Sasaki H, Yoshimura M, Hongo K, Kurihara S. Beta-adrenergic stimulation enhances Ca^{2+} leak from sarcoplasmic reticulum through protein kinase A-dependent phosphorylation of ryanodine receptor under physiological condition. Scientific Session of American Heart Association. 2010年11月. Chicago, IL, USA.
4. Kusakari Y, Urashima T, Kurihara S. Ca^{2+} handling impairment in papillary muscle with interstitial fibrosis. 第88回日本生理学会学術集会. 2011年3月. 横浜.
5. Shintani S, Yamane M, Oyama K, Kurihara S, Ishiwata S, Fukuda N. Unraveling the role of autonomous regulation in heartbeat: Analysis of self-oscillatory properties of rat neonatal cardiomyocytes. 第49回日本生物物理学会年会. 2011年09月. 姫路.
6. Kobirumaki F, Terui T, Mizuno A, Kagemoto T, Shimozawa T, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Real-time measurement of sarcomere length in the rodent heart by using alpha-actinin-GFP. 第49回日本生物物理学会年会. 2011年09月. 姫路
7. 雨宮えりか, 宮坂玄樹, 横田俊介, 草刈洋一郎, 井上天宏, 浦島崇, 栗原敏. 線維化心筋における興奮収縮連関の生理学的特性. 第128回成医会総会. 2011年10月. 東京.
8. Hongo K, Morimoto S, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Yoshimura M, Kurihara S. Direct renin inhibition improved cardiac remodeling and survival in mouse model of dilated cardiomyopathy. Scientific Session of American Heart Association. 2011年11月. Orlando FL USA.
9. Kusakari Y, Urashima T, Kurihara S. Impairment of contractility in cardiac papillary muscle with fibrosis. 1st HD Physiology International Symposium: Integrative Multi-level Systems Biology for Silico Cardiology and Pharmacokinetics. 2012年1月. 東京.
10. Shintani S, Yamane M, Oyama K, Kurihara S, Ishiwata S, Fukuda N. Analyses of sarcomeric self-oscillatory properties of rat neonatal cardiomyocytes. Biophysical Society of USA, The 56th Annual Meeting. 2012年02月. San Diego, Ca, USA.
11. Hongo K, Morimoto S, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Yoshimura M, Kurihara S. Compensatory increase in the Ca^{2+} transient is important for contractile recovery of dilated cardiomyopathy in mice. 第76回日本循環器学会学術集会. 2012年3月. 福岡
12. Kusakari Y, Urashima T, Kurihara S. Impairment of E-C coupling in cardiac papillary muscle with fibrosis induced by pressure overload. 第89回日本生理学会学術集会. 2012年3月. 松本.
13. Inoue T, Kusakari Y, Hongo K, Morimoto S, Ohtsuki I, Kurihara S, Fukuda N. Depressed length-dependent activation in skinned left ventricular muscles from a mouse model of dilated cardiomyopathy. 第89回日本生理学会学術集会. 2012年3月. 松本.
14. Shintani S, Yamane M, Oyama K, Kurihara S, Ishiwata S, Fukuda N. Properties of sarcomeric self-oscillations in rat neonatal cardiomyocytes: Relationship with heart beats by response of electrical stimuli. 第89回日本生理学会学術集会. 2012年3月. 松本.
15. 草刈洋一郎, 浦島崇, 栗原敏. 心筋線維化における興奮収縮連関 第16回日本適応医学会学術集会. 2012年6月. 東京.
16. Shintani S, Yamane M, Oyama K, Kurihara S, Fukuda N, Ishiwata S. Auto-oscillation (SPOC) properties of sarcomeres in rat neonatal cardiomyocytes. 第50回日本生物物理学会. 2012年9月. 名古屋.
17. Kusakari Y, Urashima T, Kurihara S, Minamisawa S. Estimation of E-C coupling in cardiac papillary muscle with fibrosis. The 29th Annual Meeting

- of the International Society for Heart Research Japanese Section. 2012年10月. 福岡.
18. Morimoto S, Hongo K, Kusakari Y, Komukai K, Kawai M, Yoshimura M, Kurihara S. Selective modulation of SERCA did not affect Ca²⁺ leak from sarcoplasmic reticulum in transgenic mouse models. Scientific session of American Heart Association. 2012年11月. Los Angeles, CA, USA.
19. Kobirumaki-Shimozawa F, Oyama K, Mizuno A, Terui T, Shimozawa T, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Real-time imaging of single sarcomeres in the mouse heart in vivo. 第90回日本生理学会学術集会. 2013年03月. 東京.
20. Kusakari Y, Urashima T, Minamisawa S, Kurihara S. Impairment of E-C coupling in cardiac papillary muscle with fibrosis. 第90回日本生理学会学術集会. 2013年03月. 東京.
21. Inoue T, Kobirumaki-Shimozawa F, Kagemoto T, Fujii T, Terui T, Kusakari Y, Hongo K, Morimoto S, Ohtsuki I, Kurihara S, Fukuda N. Depressed length-dependent activation in left ventricular muscle of the knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy with troponin T deletion mutation K210. 第90回日本生理学会学術集会. 2013年03月. 東京.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

東京慈恵会医科大学細胞生理学講座 HP

http://www.jikei.ac.jp/academic/course/04_saiboseiri.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 敏 (KURIHARA SATOSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：90057026

(2) 研究分担者

本郷 賢一 (HONGO KENICHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00256447

佐々木 博之 (SASAKI HIROYUKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60170693

小武海 公明 (KOMUKAI KIMIYUKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60360145

草刈 洋一郎

(KUSAKARI YOICHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：80338889

(3) 連携研究者

森本 幸夫 (MORIMOTO SACHIO)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50202362