

## 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：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659158

研究課題名（和文）包括的ストレス応答の心臓における病態生理学的意義の検討

研究課題名（英文）A significance of integrated stress response in the heart

研究代表者

佐野 元昭 (SANO MOTOAKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30265798

研究成果の概要（和文）：人工的 dimerizer AP20187 誘導性に Fv2E-PERK キメラ蛋白を 2 量体して eIF2 リン酸化シグナルを活性化させるトランスジェニック：Tg) マウス (MHC-Fv2E-PERK) 及び eIF2 特異的脱リン酸化酵素 Gadd34 の C 末端側のフラグメント (Gadd34C) を発現させ eIF2 リン酸化シグナルの活性化を抑制する Tg マウス (MHC-Gadd34C) を作製して解析を行った。MHC-Fv2E-PERK マウスに dimerizer AP20187 を投与すると心筋収縮力が一過性に低下し、AP20187 の投与をやめると心筋収縮力が回復した。eIF2 リン酸化は強い虚血で心筋に誘導されることから stunned myocardium の分子機序に eIF2 リン酸化が関与していると考えられる。eIF2 リン酸化シグナルの活性化に基づく心収縮抑制の分子機序についてさらなる解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：

We created and analyzed MHC-Fv2E-PERK mice (an inducible eIF2 activator mice) and MHC-Gadd34C mice (a loss of function model of eIF2). Notably, the strong activation of eIF2 triggered by dimerization of PERK transiently suppressed left ventricular systolic function. Left ventricular systolic function was gradually recovered in survivor mice. The strong activation of eIF2 was observed in the severe ischemia. Therefore, we hypothesized that the transient impairment of left ventricular systolic function is resemble to stunned myocardium. We are currently investigating the underlying mechanism of the transient impairment of left ventricular systolic function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

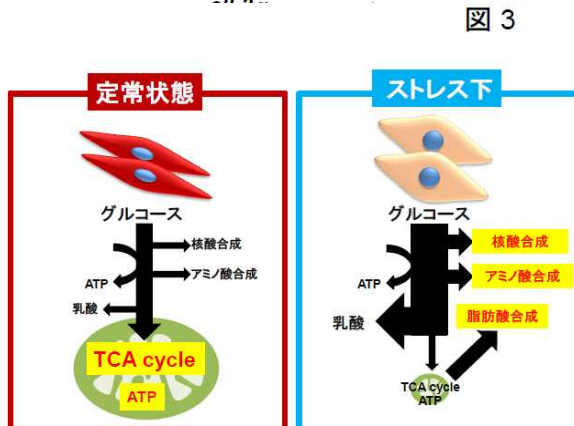
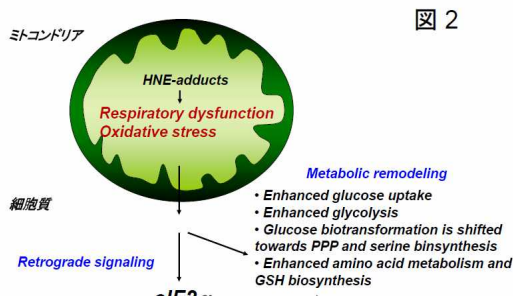
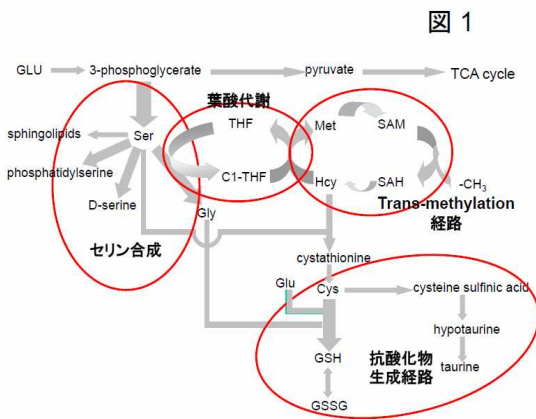
研究分野：医歯薬学

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：ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアに障害が存在していても、ミトコンドリア由来のアルデヒドがセコンドメッセンジャーとして働き eIF2 リン酸化シグナル (integrated stress response) の活性化を介して代謝応答 (還元物質グルタチオンの合成を促進) を刺激して、心機能を維持し、さらに虚血再灌流障害による強い酸化ストレスに対しては野生型の心臓よりもむしろ抵抗性を獲得する適応現象 (ホルミシス) を報告した。



## 2. 研究の目的

本研究においては eIF2 リン酸化シグナルを活性化および抑制するトランスジェニックマウスを用いて eIF2 リン酸化シグナルの病態生理学的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

人工的 dimerizer AP20187 誘導性に Fv2E PERK キメラ蛋白を 2 量体して eIF2 リン酸化シグナルを活性化させるトランスジェニック (Tg) マウス ( MHC Fv2E PERK ) 及び eIF2 特異的脱リン酸化酵素 Gadd34 の C 末端側のフラグメント (Gadd34C) を発現させ eIF2 リン酸化シグナルの活性化を抑制する Tg マウス ( MHC Gadd34C) を作製して解析を行う。

## 4. 研究成果

心筋虚血および再灌流は、冬眠心筋や気絶心筋、心筋梗塞と称される心筋傷害を引き起こす一方で、心筋プレコンディショニングに代表される心筋保護作用を誘導する。冬眠心筋、気絶心筋、心筋梗塞、心筋プレコンディショニングは臨床的には明瞭な定義が存在するが、分子生物学的、病態生理学的にはその機序に重複する概念があり、共通のメカニズムが存在する可能性がある。我々は、原生動物から保存されているストレス応答ホルモンである eukaryotic translation initiation factor 2 eIF2 に注目し、これらの病態を解明することを目的とした。

まずは虚血および再灌流時に心筋細胞で eIF2 が活性化するかどうかを検討した。新生仔ラット培養心筋細胞を重度の低酸素状態

以下で管理すると、ウェスタンブロッティング法にて eIF2 は

時間をピークに時間依存性に活性化され、時間以上持続した。また再酸素化後も eIF2 の活性化は 時間ほど持続した。また組織免疫染色法で eIF2 は心筋内で活性化していることを確認した。さらにマウスの冠動脈閉塞モデルを作製し、ウェスタンブロッティング法で冠動脈閉塞領域の eIF2 のリン酸化を検討すると、冠動脈閉塞後 時間をピークに活性化することが確認された。これらの結果から、虚血および再灌流で心筋の eIF2 は活性化されることが示された。

次に我々は、eIF2 の活性化の程度による心臓での病態生理学的な変化を検討した。心臓における eIF2 のリン酸化シグナルを自在に調整できるモデルとして、心筋特異的な Fv2E PERK (PER like kinase) トランスジェニックマウス( MHC Fv2E PERK Tg)を作製した。小胞体ストレスセンサーである PERK に人工物である Fv2E を融合させたキメラ蛋白 Fv2E PERK は、dimerizer AP20187 の存在下で PERK が 2 量体を形成し、eIF2 を活性化する (Oyadomari S. Cell metab 2008)。そのため AP20187 の投与量や投与間隔を変えることで、心筋での eIF2 の活性化レベルを調整することが可能となった。この成獣マウスはベースラインで軽度 eIF2 が活性化されていたが、野生型マウスと比較し、ランゲンドルフ虚血再灌流傷害モデルで抵抗性を示した (心筋プレコンディショニング)。一方、この成獣マウスに AP20187 を 2 日間連続で投与し、一過性に中等度の eIF2 の活性化を誘導すると、心機能は 4-5 日目をピークに左室内径短縮率が 40%から 25%程度まで減少したが、その後 1 週間程度で完全に回復した(冬眠心筋、気絶心筋)。さらに、AP20187 を 3 日以上連続で投与し、継続的に重度な eIF2 の活性化を誘導すると、4 日目以降に左室内径短縮率が 10%以下まで低下し平均 5 日目に心

不全で死亡した。これらの結果からは、eIF2 の活性化のレベルにより、心筋プレコンディショニング、気絶心筋、冬眠心筋、心筋細胞死の一連の病態を模倣することが示された。

最後にその分子細胞学的機序を検討した。マイクロアレイ遺伝子解析および定量 PCR 法にて、MHC Fv2E PERK トランスジェニックマウスの遺伝子発現の変化を確認した。これらの結果から、eIF2 の活性化でグルタチオン合成系の遺伝子の増加、脂肪酸代謝関連遺伝子の抑制が確認された。

心筋細胞では虚血および再灌流により eIF2 が活性化される。eIF2 の軽度な活性化で心筋保護作用 (心筋プレコンディショニング) を、中等度の活性化で可逆的な心機能低下 (冬眠心筋、気絶心筋) を、重度の活性化で心筋細胞死の誘導を示した。これらの結果から、虚血および再灌流から誘導される eIF2 の活性化レベルの違いが心臓の未来を決定する因子である可能性が示唆された。この変化は心筋代謝の糖代謝へのシフトおよびグルタチオン合成系の増加との関連が示唆された。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

佐野元昭 The Japanese Circulation Society 2012. 平成 24 年 3 月 18 日。福岡。  
The eIF2 ATF4 pathway is a key mitochondrial retrograde signal in response to mitochondrial oxidative stress.

佐野元昭 「心血管系における細胞死と老化」グルコース代謝と細胞死/老化 第 15 回日本適応医学会学術集会シンポジウム平成 23 年 6 月 24 日 浜松

〔図書〕(計4件)

佐野元昭、福田恵一 冠動脈疾患(上) 心エネルギー代謝と冠循環 日本臨床 2011年 69(-) (1006), 60-68, 2011-09

佐野元昭 代謝の異常は心不全の原因か Cardiovascular Frontier2011年 Cardiovascular frontier 2(3), 167-173, 2011-06 メディカルレビュー社

勝俣良紀、佐野元昭 『心臓の謎に迫る』「糖代謝異常により心機能は低下するか」 Angiotensin Research, 8巻, 3号, 21-25, 2011年7月号

佐野元昭 「エネルギー代謝と生活習慣病」エネルギー代謝とメタボローム・トランスクリプトム解析 Bio Clonica 2011年12月号 26巻14号, 44-50

〔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  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 元昭 (SANO MOTOAKI)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：30265798

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし