

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 7 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790719

研究課題名（和文） 5型アデニル酸シクラーゼによる活性酸素産生シグナルの解析と心不全治療への応用

研究課題名（英文） Analysis of type 5 adenylyl cyclase role for the production of active oxygen and its clinical application for the treatment of heart failure

研究代表者

白 云哲 (BAI YUNZHE)

横浜市立大学・医学研究科・共同研究員

研究者番号：50571147

研究成果の概要（和文）：

心臓型アデニル酸シクラーゼ (AC5) ノックアウトマウス (AC5KO) は、酸化ストレスに抵抗性を示し、心不全発症が抑制されることを報告した。本研究では近年報告された Epac (exchange protein directly activated by cAMP) に着目し、AC5-Epac 経路の心不全発症にはたす役割を、心筋細胞に AC5 が過剰発現した Epac1KO (AC5TG-Epac1KO) を作成し、心筋細胞における活性酸素産生シグナルとしての AC5-Epac 経路の役割と同経路を標的にした心不全治療の可能性について検討した。

研究成果の概要（英文）：

Type 5 adenylyl cyclase (AC5) is a major cardiac isoform and AC5 null mice show the resistance to oxidative stress and heart failure. Recent studies have shown that cAMP can activate Epac1, exchange protein directly activated by cAMP, as well. However, its role in the pathogenesis of heart failure remains unknown. In order to examine the role of Epac1 in the heart, we have generated the cardiac-specific type 5 adenylyl cyclase, a major cardiac AC isoform, transgenic mice (AC5TG) and Epac1-deficient AC5TG (AC5TG-EpacKO) and demonstrated that cAMP-Epac1 pathway plays an important role for the development of heart failure through the activation of cAMP-PKA pathway, suggesting that this pathway may be a new target for the treatment of heart failure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：シグナル伝達、循環器・高血圧、サイクリック AMP、心不全、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

ベータアドレナリン受容体 (β -AR) シグナルの主要な構成因子であるアデニル酸シクラーゼ (AC) には 9 つのサブタイプ (type1-type9) の存在が報告され、各サブタイプは固有の発現部位ならびに生化学的特徴を有する。我々は 5 型アデニル酸シクラーゼ (AC5) を犬の心臓の cDNA ライブラリーよりクローニングし、その主要な発現部位が生命維持にきわめて重要な心臓、脳、腎臓に局限していることを明らかにした (*J Biol Chem* 267, 13553-13557, 1992; *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 9809-9813, 1992)。また AC5 のノックアウトマウス (AC5KO) を作製し (*Circ Res* 93, 364-371, 2003)、AC5KO を用いて胸部大動脈狭窄 (TAC; transverse aortic constriction) を用いた慢性圧負荷刺激心不全マウスモデルを作成したところ、AC5KO ではコントロールマウス (WT; wild type) に比べて心不全発症が抑制され (*Proc Natl Acad Sci USA* 100, 9986-9990, 2003)、イソプロテノール (ISO) を用いた慢性カテコラミン刺激心不全マウスモデルにおいても AC5KO では心不全発症が抑制された (Okumura S, Bai Y et al. *Circulation* 118, 1776-1783, 2007)。さらに我々は AC5KO の加齢に対する影響について検討したところ、生後 30 ヶ月までの生存率は WT ではわずかに 16%であったが、AC5KO では 92%ときわめて高い生存率を示した。加齢に伴う臓器障害に活性酸素は重要な役割を演じていることが報告されている。そこで AC5 の主要な発現部位の 1 つである心筋細胞の酸化ストレスに対する抵抗性について検討を行ったところ AC5KO の心筋細胞は酸化ストレスが加わったときに Mn 型 Superoxide dismutase (MnSOD) なら

びに Raf/MEK/ERK 経路を活性化 (リン酸化) させて抗酸化作用を獲得していることが明らかになった。以上の所見は心臓以外の AC5 の発現臓器である脳と腎臓においても観察された。また興味深いことに AC5KO では WT に比べて加齢に伴う骨密度の減少が抑制されており骨粗鬆症の発症にも AC5 は重要な役割をはたしていることが示唆された (*Cell* 130, 247-258, 2007)。

本研究では AC5 を経由する活性酸素シグナル制御機構について詳細な解析を行うとともに、我々がすでに報告した数種類の AC5 特異的抑制薬 (*J Biol Chem* 276; 47785-47793, 2001; *J Biol Chem* 279; 40938-40945, 2004) の AC5 特異的抑制薬の心不全治療薬としての有用性について検討した。

2. 研究の目的

AC の下流に存在し cAMP により活性化される因子として従来より知られている PKA (protein kinase A) 以外に、近年 Epac (exchange protein directly activated by cAMP) (*Nature* 396, 474-477, 1998; *Science* 282, 2275-2279, 1998) と呼ばれる新しい

β -AR シグナルの構成因子が報告された。また cAMP による活性酸素の産生が PKA 非依存的に行われるという報告がある。そこで我々は Epac に着目し Epac の 2 種類のサブタイプ (Epac1, Epac2) のうち、心臓に発現する主要な Epac のサブタイプである Epac1 ノックアウトマウス (Epac1KO) を解析したところ、Epac1KO は AC5KO と同様に心不全発症に対して抵抗性を示した。そこで「AC5-Epac 経路は心筋細胞内で活性酸素を産生し心不全発症を誘導する主要な経路である」という仮説をたて AC5TG と EpacKO を交配して、心筋細

胞に AC5 が過剰発現した Epac1KO (AC5TG-Epac1KO) を作成し、このマウスモデルを用いて AC5-Epac 経路の役割について詳細な検討を行った。また平成 24 年度は同経路を治療標的にした新しい心不全治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) AC5TG-Epac1KO を用いた心不全モデル

AC5TG-Epac1KO を用いてイソプロテレノール (ISO) を用いた慢性カテコラミン刺激心不全マウスモデルを作成する。

①**生理学実験**：心臓超音波検査 (LVEF)、による心機能測定。

②**病理学実験**：心肥大の程度 (左室/頸骨比) TUNEL 染色によりアポトーシス陽性細胞の割合、Masson 染色により心筋組織線維化の検討。

(2) AC5TG-Epac1KO を用いた不整脈モデル

AC5-Epac1 経路は不整脈発症に関しても重要な役割を果たしている可能性が示唆される。そこで AC5TG-Epac1KO マウスを用いて、AC5-Epac 経路の不整脈発症にはたす役割を、経食道頻回刺激による心房細動モデル (Circ Res 97, 62-69, 2005) を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) AC5TG-Epac1KO を用いた心不全モデル

①**生理学実験**：心臓超音波検査 (LVEF) を行ったところ、AC5TG-Epac1KO では AC5TG に比較して心不全発症が抑制されていた。

②**病理学実験**：心肥大の程度 (左室/頸骨比) TUNEL 染色によりアポトーシス陽性細胞の割合、Masson 染色により心筋組織線維化について検討を行った。その結果 AC5TG に比較して AC5TG-Epac1KO ではアポトーシス陽性心筋細胞の割合が低下していた。

(2) AC5TG-Epac1KO を用いた不整脈モデル

経食道ペーシングで誘発される心房細動持続時間は、AC5TG マウスに比較して、

AC5TG-Epac1KO マウスでは有意に短縮していた。以上の結果より AC5-Epac 経路が心房細動発症に重要であ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 2 件)

① Bai Y, Tsunematsu T, Jiao Q, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, Jin M, Cai W, Jin HL, Fujita T, Ichikawa Y, Suita K, Kurotani R, Yokoyama U, Sato M, Iwatsubo K, Ishikawa Y, Okumura S: Pharmacological stimulation of type 5 adenylyl cyclase stabilizes heart rate under both microgravity and hypergravity induced by parabolic flight.

J Pharmacol Sci 119:381-189. 2012 (査読有)

② Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, Bai Y, Kurotani R, Yokoyama U, Okumura S, Cismowski MJ, Lanier SM, Ishikawa Y: Identification of transcriptional factor E3 (TFE3) as a receptor-independent activator of G $\cdot$ 16: Gene regulation by nuclear G $\cdot$ subunit and its activator. J Biol Chem. 286, 17766-17776, 2011 (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

① Jin H-L, Okumura S, Jin M, Cai W, Suita K, Bai Y, Tsunematsu T, Fujita T, Ishikawa I
Pharmacological inhibition of STAT3 protect heart from lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction through the inhibition of Jak2/STAT3/iNOS signaling

第 90 回日本生理学会大会, タワーホール船堀, (東京都), 2013 年 3 月 28 日

②Okumura S, Jing M, Ohnuki Y, Namekata I, Kurotani R, Fujita T, Jin H-L, Cai W, Bai Y, Suita K, Tsunematsu T et al.

Disruption of Epac1 decreases phosphorylation of phospholamban and protects the heart against stress.
American Heart Association Scientific Scission 2012 Los Angeles, California, USA

November 6 2012

③Okumura S, Jin M, Kawamata F, Jin H-L, Cai W, Bai Y, Suita K, Hidaka Y, Tsunematsu T, Ishikawa Y

Epac activation protects heart from interleukin-6-induced cardiac dysfunction by inhibiting STAT/iNOS signaling.

American Heart Association Scientific Sessions 2011
Orlando in USA
November 14 2011

④ Okumura S, Cai W, Jin M, Bai Y, Tsunematsu T, HidakaY, Kurotani R, Ishikawa Y:

Disruption of Epac1 Protects Heart from Catecholamine-mediated Cardiac Fibrosis.

第 75 回日本循環器学会学術集会
パシフィコ横浜 (神奈川県)

2011 年 8 月 3 日

⑤ Okumura S, Cai W, Jin M, Bai Y, Tsunematsu T, HidakaY, Kurotani R, Ishikawa Y:

Disruption of Epac1 Protects Heart from Catecholamine-mediated Cardiac Fibrosis.

第 75 回日本循環器学会学術集会
パシフィコ横浜 (神奈川県)

2011 年 8 月 3 日

⑥Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, Bai Y, Okumura S, Cismowski MJ, Lanier, SM, Ishikawa Y

Novel transcription regulation in the hypertrophied myocardium via nuclear G・16 subunit and activator of G-protein signaling (AGS).

American Heart Association Scientific Sessions 2010
Chicago in USA
November 16 2010

[その他]
横浜市立大学循環制御医学 ホームページ
www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiril/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白 云哲 (BAI YUNZHE)

横浜市立大学・医学研究科・共同研究員

研究者番号 : 50571147

(2) 研究分担者 : 該当者なし

(3) 連携研究者 : 該当者なし