

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590115

研究課題名(和文) 心筋梗塞後不全心でのアルファBクリスタリンの病態生理学的役割と治療への応用

研究課題名(英文) Pathophysiological roles of alphaB crystallin in the failing heart following myocardial infarction and its therapy

研究代表者

田野中 浩一 (Tanonaka, Kouichi)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50188398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：アルファBクリスタリン(CryAB)の心筋梗塞後心不全への病態生理学的役割を検討した。ラットで心筋梗塞を作製すると、心筋梗塞後2週目で観察された心筋CryABの増大傾向が不全心では消失した。このCryABの減少には、転写因子HSF-1の機能低下が関与した。このHSF-1の機能低下はCryABだけでなく、ストレス負荷に対するHSP72誘導能も低下させた。さらに不全心ではミトコンドリア画分のリン酸化CryABが減少し、ゲラニルゲラニルアセトン投与により改善された。これらの知見から転写因子HSF-1の機能低下とミトコンドリアでのリン酸化CryAB減少が、心不全を発症させる要因の一つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Pathophysiological role of alphaB crystallin (CryAB) in the development of heart failure following myocardial infarction in rats was examined. Signs of chronic heart failure 8 weeks after the left coronary artery ligation in rats were seen. CryAB content in the viable left ventricle at the 2nd week after myocardial infarction tended to be increased. In contrast, CryAB content in the viable left ventricle was similar to that in the normal myocardium. An inactive form of heat shock factor-1 (HSF-1) was increased in the failing heart. The HSF-1 inactivation also resulted in a failure of HSP72 induction after an exposure to stress. An activated CryAB in mitochondria of the failing heart was reduced. When treatment with geranylgeranylacetone increased activated CryAB in myocardial mitochondria, mitochondrial energy producing ability was preserved. These results suggest that prevention of HSF-1 and CryAB activation involve s in the development of heart failure following myocardial infarction.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：心不全 熱ショックタンパク質 ミトコンドリア 心筋梗塞 心機能

## 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞により心筋細胞が失われると、心臓および生体は様々な代償機序を働かせて心ポンプ機能を維持させる(心機能代償期)。しかしながら、この心機能代償期は一時的なもので、やがて心機能が低下し、慢性心不全に陥る(心不全期)。この心不全に陥る過程で、心筋組織には様々な機械的および代謝的なストレスが負荷される。細胞あるいは組織がストレスに暴露されると、その障害から細胞を保護するためにストレスタンパク質と呼ばれるタンパク質が産生される。特に心筋組織は HSP72 およびアルファ B クリスタリン (CryAB、別名 HSPB5) の発現量が多い組織である。つまり、心筋梗塞後のこれらストレスタンパク質の心筋組織での変化が心不全発症に重要な役割を演ずると考えられる。HSP72 の誘導能が不全心で低下することが、本研究代表者によって明らかにされた。近年、デスミン心筋症が CryAB の変異により誘発されることが示された。しかしながら、CryAB に変異の無い心臓での心筋梗塞後心不全の発症に及ぼす CryAB の役割を明らかにする研究は成されていない。

## 2. 研究の目的

心筋組織は、その収縮弛緩運動を介した心ポンプ機能を発揮するため、大量のエネルギーを消費する。このエネルギーは心筋細胞のミトコンドリアにより産生される。心筋ミトコンドリア機能低下が、心収縮不全を誘発すると考えられている。このミトコンドリア機能低下の誘因は未だ不明である。心筋梗塞後の心筋は梗塞巣を抱えることから、持続した機能的および代謝的ストレスが負荷された状態にある。予め心筋組織にストレスタンパク質の CryAB の発現を誘導すると、一過性の虚血・再灌流障害から心筋組織を保護することは知られているものの、心筋梗塞から心

不全を発症する段階での CryAB の心筋組織での変化は明らかにされていない。そこで、本研究では、心筋梗塞後の生存心筋の CryAB の変化とミトコンドリア機能変化を把握し、心不全発症の機序を解明することを目的として企画された。加えて、ストレスタンパク質誘導を促進させるグラニルグラニルアセトン (GGA) 投与が、心筋梗塞後の心筋ストレスタンパク質発現と心機能に及ぼす効果についても検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 心不全モデルの作製および薬物投与

Wistar 系雄性ラットの左冠状動脈を結紮することで、急性心筋梗塞を発生させた。心筋梗塞後の心機能を心エコー法で評価した。その結果、心筋梗塞後 2 週目の心収縮弛緩の運動能は低下するものの、心ポンプ機能の cardiac output index (COI) は維持されていた。さらに心筋梗塞後 8 週目には、この COI が低下し、いわゆる低拍出量性心不全(うっ血性心不全)を発症した。本研究では、心筋梗塞後 2 週目を代償期、心筋梗塞後 8 週目を心不全期として機能的および代謝的指標の評価を行った。

GGA 投与は、実際の薬物治療を模倣する目的で心筋梗塞後 2 週目から 8 週目までの 6 週間行った。GGA は、50 mg/kg/day を経口投与した。

### (2) ミトコンドリアエネルギー産生能評価

心筋ミトコンドリア酸素消費は、skinned fiber 法で評価した。左心室筋を細切した後、界面活性剤で切片の心筋細胞膜を脱膜化し、組織内のミトコンドリア酸素消費を細胞外から直接測定できるようにした。心筋梗塞後の生存心筋は、残存量が少なく、通常のミトコンドリア画分を調整しても十分量の単離ミトコンドリアを用意できないため、本法は

組織内のミトコンドリア活性を少量の組織で評価出来る方法である。このミトコンドリア酸素消費をエネルギー産生能の指標とした。

### (3) 熱ショックタンパク質の検出・定量

熱ショックタンパク質の誘導は、実験動物の体温を 42°C、15 分間上昇させることにより行った。心筋組織あるいはオルガネラの CryAB を含めたストレスタンパク質および転写因子 HSF-1 の含量変化は、western immunoblot にて評価した。転写因子 HSF-1 と他のタンパク質の相互作用は、免疫沈降法とそれに続く western immunoblot 法で評価した。加えて、これらタンパク質の細胞内局在を把握するために、組織切片の免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 心筋梗塞後の CryAB およびその他の HSP の変化

心筋梗塞後、心機能代償期の生存心筋 CryAB 含量は、正常動物の心筋組織のそれよりも増加する傾向にあった。一方、心不全期の生存心筋 CryAB 含量も正常動物のそれと同様の含量となり、心機能代償期のレベルを維持できない可能性が示された。CryAB と同じ低分子量熱ショックタンパク質ファミリーに属する HSPB1 および HSPB8 についても心機能代償期および心不全期の発現量変化を追跡した。その結果、これらタンパク質も心機能代償期では増加するものの、心不全期ではその増加が維持できないことを見出した。

### (2) 心筋梗塞後の CryAB 発現調節因子の変化

CryAB の発現は、HSF-1 により調節されている。そこで、HSF-1 の発現量の変化に

ついて検討したところ、心機能代償期の心筋 HSF-1 含量は増大し、心不全期では、その含量が更に増大した。HSF-1 の Ser303 残基のリン酸化は、その転写活性を低下させる。そこで、Ser303 がリン酸化された HSF-1 量について検討したところ、心不全期ではリン酸化された HSF-1 が増大した。免疫染色法で、不全心の生存心筋細胞では、HSF-1 の核への移行が阻止された状態にあることを見出した。不全心の心筋細胞では HSF-1 がリン酸化されることで、細胞質から核への移行が出来ない状態にあり、この HSF-1 機能低下が、CryAB およびその他の低分子 HSP (HSPB1 および HSPB8) の発現能を低下させたと考えられた。さらに、細胞質の HSF-1 は HSP90 を中心としたシャペロン複合体を形成しており、核への移行が阻止された状態にあると推測されている。そこで、免疫沈降法を用い、不全心の生存左室筋での HSF-1 と HSP90 の会合について調査した。その結果、心不全期では HSP90 と複合体を形成する HSF-1 の比率が上昇することを見出した。通常、HSF-1 の転写活性は、HSP72 の誘導を指標に評価される。そこで、HSP90 の阻害薬を投与すると、不全心での HSF-1 の細胞質から核への移行が観察された。この HSP90 阻害薬処置により、熱ショック負荷後の不全心での HSP72 誘導能も改善された。

### (3) 心筋梗塞後の CryAB の細胞内局在変化

さらに、CryAB の心筋細胞内の局在変化について検討した。その結果、心機能代償期では、心筋ミトコンドリアへ CryAB が移動し、細胞内局在が変動することを発見した。心不全期では、心筋ミトコンドリアへ移動する CryAB 量はさらに増大した。CryAB はリン酸化されることで、そのシャペロン活性を発揮すると考えられている。そこで、リン酸化 CryAB (pCryAB) 量を測定した。心機

能代償期には心筋ミトコンドリアの pCryAB 量が増大した。その一方で、心不全期の心筋ミトコンドリアの pCryAB は正常動物のその約 50% まで減少した。これらの知見から、シャペロン機能を発揮する pCryAB は心筋ミトコンドリア画分に移行することでオルガネラのエネルギー産生を維持させることが示唆された。他方、リン酸化されていない CryAB のミトコンドリアへの集積は、ミトコンドリア機能を低下させることが示された。

#### (4) HSP 誘導薬投与の効果

ゲラニルゲラニルアセトン (GGA) には、sublethal stress に暴露せずに、ストレスタンパク質を誘導させる能力のあることが報告されている。前述したように、心機能代償期は CryAB 誘導能が保持されているので、心筋梗塞後 2 週目から同 8 週目まで GGA を投与した。その結果、GGA 投与群では心筋梗塞後、心機能代償期の CryAB 量増加傾向が心筋梗塞後 8 週目でも維持された。他の HSPB1 および HSPB8 の増加した状態も同様に維持された。この GGA 投与は、心筋梗塞後 8 週目の生存心筋組織 HSP72 含量も増加した状態を維持させた。つまり、CryAB を含めたストレス障害への心筋組織の耐性を上昇させる HSP の発現を促進させることが示された。さらに、ミトコンドリア画分の pCryAB 量を測定したところ、pCryAB 含量は正常動物のそれと同様の高いレベルにあった。この状態にあるミトコンドリア酸素消費速度を測定したところ、心機能代償期から心不全期に観察されたミトコンドリア活性低下が軽減され、正常心臓のそれと同様のレベルが維持されていた。

これら本研究結果から、心筋梗塞後の心機能代償機序が破綻し、心不全に陥る段階で、ストレスタンパク質の転写調節因子 HSF-1

の機能低下が誘発されることを示すことが出来た。

同時に、心筋梗塞後の生存心筋で、CryAB は細胞質からミトコンドリアへ移行することを見出した。心機能代償期に心筋ミトコンドリアへ移行した CryAB はリン酸化体の占める割合が高く、その一方で心不全期の心筋ミトコンドリアに移行した CryAB は、非リン酸化体の割合が高くなった。CryAB はリン酸化を介して、ストレスタンパク質としてストレス障害から細胞を保護すると考えられている。CryAB のリン酸化は心筋梗塞後の心筋組織へのストレス障害からミトコンドリア機能の低下を防止し、心機能代償期から心不全期への移行を阻止すると考えられた。さらに、不全心の心筋ミトコンドリアに集積された非リン酸化 CryAB がミトコンドリア機能低下に関与する可能性が示された。この CryAB のミトコンドリアへの集積とリン酸化平衡の破綻がミトコンドリアエネルギー産生低下を誘発し、心収縮不全に陥る誘因になることが本研究で示された。

さらに、ストレスタンパク質誘導能を発揮する GGA に、新たな心不全治療薬としての可能性を提示することもできた。GGA は、医薬品として、消化管潰瘍の薬物治療で汎用されており、安全性が確立されている薬物である。GGA の作用機序をさらに精査することにより、CryAB を含む熱ショックタンパク質を介した新たな心不全治療薬の開発が期待される。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Marunouchi T., Inomata S., Sanbe A., Takagi N., Tanonaka K. “Protective effect of geranylgeranylacetone via enhanced induction of HSPB1 and HSPB8 in mitochondria of the failing heart following myocardial infarction in

rats.” *European Journal of Pharmacology*, 2014; **730**: 140-147.

2) Marunouchi T., Murata M., Takagi N., Tanonaka K. “Possible involvement of phosphorylated heat-shock factor-1 in changes in heat shock protein 72 induction in the failing rat heart following myocardial infarction.” *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 2013; **36**: 1332-1340.

3) Marunouchi T., Abe Y., Murata M., Inomata S., Sanbe A., Takagi N., Tanonaka K. “Changes in small heat shock proteins HSPB1, HSPB5 and HSPB8 in mitochondria of the failing heart following myocardial infarction in rats.” *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 2013; **36**: 529-539.

4) Marunouchi T., Araki M., Murata M., Takagi N., Tanonaka K. “Possible involvement of HSP90-HSF1 multi-chaperone complex in impairment of HSP72 induction in the failing heart following myocardial infarction in rats.” *Journal of Pharmacological Sciences*, 2013; **123**: 336-346.

[学会発表](計4件)

1) 長田 志保、丸ノ内 徹郎、猪俣 聡美、田野中 浩一 「ラット梗塞心での geranylgeranylacetone による HSP72 誘導の効果」第 87 回日本薬理学会年会(2014 年 3 月、仙台)

2) 丸ノ内 徹郎、村田 茉央、荒木 政人、高木 教夫、田野中 浩一 「ラット心筋梗塞後不全心での HSP72 誘導能変化へのリン酸化 heat shock factor-1 の関与」第 86 回日本薬理学会年会(2013 年 3 月、福岡)

3) 丸ノ内 徹郎、武藤 千晶、岩崎 晋吾、

杉本 杏子、永井 翔、高木 教夫、田野中 浩一 「ラット心筋梗塞後不全心のミトコンドリアエネルギー産生能低下の機序」第 55 回日本薬学会関東支部大会 (2011 年 10 月、船橋)

4) 田野中 浩一、丸ノ内 徹郎、阿部 洋平、猪俣 聡美、高木 教夫、三部 篤 「くたびれた心臓 - 心筋梗塞後不全心でのアルファ B クリスタリンの変化 - 」生体機能と創薬シンポジウム 2011 (2011 年 9 月、東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田野中浩一 (TANONAKA, Koichi)  
東京薬科大学、薬学部、教授  
研究者番号：23590115