

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591100

研究課題名(和文) 抗加齢に着目した難治性心不全に対する新しい治療法の開発

研究課題名(英文) A novel strategy for heart failure by anti-aging

研究代表者

竹石 恭知 (Takeishi, Yasuchika)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40272067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウス、SMP30遺伝子ノックアウトマウス、心筋細胞にのみSMP30遺伝子を選択的に過剰発現したトランスジェニックマウスにドキシソルビシンを投与した。ノックアウトマウスではドキシソルビシンによる心機能低下が増悪し、酸化ストレスによるアポト-シスシグナルの活性化を認めた。一方、心筋細胞に抗加齢遺伝子SMP30を高発現することで、ドキシソルビシンによる酸化ストレスの抑制とアポト-シスシグナル抑制が認められ、SMP30のドキシソルビシンに対する心保護作用を直接的に示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Doxorubicin was administered to wild type mice, SMP30 knockout mice, and transgenic mice with cardiac specific overexpression of SMP30. We demonstrated that SMP30 has a cardio-protective role by anti-oxidative and anti-apoptotic effects in doxorubicin-induced cardiotoxicity. Anti-aging gene, SMP30, can be a new therapeutic target to prevent heart failure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：SMP30 doxorubicin oxidative stress signal transduction heart failure

1. 研究開始当初の背景

心不全症例数が年々増加しており、高齢化とともに今後さらに増加するものと予想されている。そのため、心不全の発症機序を解明し予防法と治療法を確立することは重要な意義をもつ。

Senescence marker protein-30 (SMP30)は加齢に伴い減少する分子量約 34-kDa の蛋白質で、血球系の細胞を除き心臓を含むほとんどすべての臓器で発現が認められる。SMP30 ノックアウト(SMP30-KO)マウスが作成され、SMP30 の生体内での機能が明らかになった(*Proc Natl Acad Sci USA* 2006)。SMP30-KO マウスは、野生型(WT)マウスと比較して老化が早期に進行した。その機序として SMP30 欠損により抗酸化作用が低下し、活性酸素種(ROS)を消去する働きが减弱していることが示唆された。我々は WT マウスと SMP30-KO マウスにアンジオテンシン(A)を持続投与した。SMP30-KO マウスでは WT マウスに比し、A による ROS 産生の増加と NADPH オキシダーゼ発現の上昇を認めた。また SMP30-KO マウスでは、AII 投与後の c-Jun-N-terminal kinase (JNK) 活性の上昇、Bax/Bcl 比の増大、カスパーゼ3活性の上昇、TUNEL 陽性細胞数の増加を認めた。SMP30-KO マウスでは AII による心臓リモデリングの増悪、ROS 産生増加、アポトーシスを認めたことから、心臓において SMP30 は抗酸化作用、抗アポトーシス作用を介して、心保護作用を有していることが示唆された

2. 研究の目的

本研究では、SMP30 の心不全の発症と進展における役割を詳細に検討し、SMP30 が新たな心不全治療の標的分子となるかを明らかにすることを目的とする。SMP30-KO マウスに加え、心臓特異的 SMP30 過剰発現トランスジェニック(SMP30-TG)マウスを作成し、ドキシソルピシン心筋症、虚血性心不全モデルにて、SMP30 が心不全の発症と進展を抑制するか検討する。

3. 研究の方法

12 週齢の WT マウス、SMP30-KO マウス、-myosin heavy chain プロモ - タを用いて心筋細胞にのみ SMP30 遺伝子を選択的に過剰発現した SMP30-TG マウスの腹腔内にドキシソルピシン(DOX) 20 mg/kg ないし生食を投与した。DOX 投与1週間後、心エコー - 検査を行い心機能を評価した後、サクリファイスし心臓を摘出した。左室駆出率、心筋の線維

化率、superoxide 産生、80HDG 陽性細胞数、TUNEL 陽性細胞数、カスパーゼ3活性、Bax/Bcl 比、JNK 活性を測定した。

また、SMP30-KO マウスの大腿動脈を結紮し、下肢の血流をレ - ザ - ドブラ血流計で観察した。下肢骨格筋の毛細血管の発達、VEGF 発現、NADPH オキシダーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

SMP30-KO マウスでは、WT マウスに比して DOX 投与後の左室駆出率は低下し、線維化率は増加、superoxide 産生は増加、80HDG 陽性細胞数、TUNEL 陽性細胞数は増加、カスパーゼ3活性、Bax/Bcl 比、JNK リン酸化活性は上昇した。SMP30-KO マウスでは DOX による心機能低下が増悪し、酸化ストレスによるアポト - シスシグナルの活性化を認めた。

一方、SMP30-TG マウスでは WT マウスと比較し、DOX 投与後の左室駆出率は保持され、線維化率は低下、superoxide 産生は低下、80HDG 陽性細胞数は減少、カスパーゼ3活性、Bax/Bcl 比、JNK リン酸化活性は低下した。この結果は SMP30-KO マウスを用いた検討とほぼ一致した。心筋細胞に SMP30 を高発現することで、ドキシソルピシンによる酸化ストレスの抑制とアポト - シスシグナル抑制が認められ、SMP30 のドキシソルピシンに対する心保護作用を直接的に示すことができた。

また、SMP30-KO マウスでは大腿動脈を結紮後、下肢の血流回復は WT マウスに比し低下していた。下肢骨格筋の毛細血管の発達が低下しており、VEGF 発現も低下していた。NADPH オキシダーゼ活性は上昇しており、酸化ストレスの増大に伴い、虚血後の側副血行路の発達が抑制されていた。このことから、心筋梗塞後の側副血行路の形成と心機能の低下、その後の虚血性心不全の発症に SMP30 が重要な役割を演じている可能性が示唆された。

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 12 件)

1. Hoshino Y, Yamada S, Saitoh S, Machii H, Mizukami H, Miyata M, Misaka T, Ishigami A, Takeishi Y: Age-related oxidant stress with senescence marker protein-30 deficiency plays a pivotal role in coronary artery spasm. *Coronary Artery Dis* 24, 110-118, 2013,

- DIO: 10.1097/MCA.0b013e32835c8f96
2. Yamada S, Saitoh S, Machii H, Mizukami H, Hoshino Y, Misaka T, Ishigami A, Takeishi Y: Coronary artery spasm related to thiol oxidation and senescence marker protein-30 in aging. *Antioxid Redox Sign* 19, 1063-1073, 2013, DIO: 10.1089/ars.2012.4903
 3. Misaka T, Suzuki S, Miyata M, Kobayashi A, Shishido T, Ishigami A, Saitoh S, Hirose M, Kubota I, Takeishi Y: Deficiency of senescence marker protein 30 exacerbates angiotensin II-induced cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 99, 461-470, 2013, DIO: 10.1093/cvr/cvt122
 4. Suzuki S, Shishido T, Funayama A, Netsu S, Ishino M, Kitahara T, Sasaki T, Katoh S, Otaki Y, Watanabe T, Shibata Y, Mantovani A, Takeishi Y, Kubota I: Long pentraxin PTX3 exacerbates pressure overload induced left ventricular dysfunction. *PLoS One* 8, e53133, 2013, DIO: 10.1371/journal.pone.0053133
 5. Mizukami H, Saitoh S, Machii H, Yamada S, Hoshino Y, Misaka T, Ishigami A, Takeishi Y: Senescence marker protein-30 (SMP30) deficiency impairs myocardium-induced dilation of coronary arterioles associated with reactive oxygen species. *Int J Mol Sci* 14, 9408-9423, 2013, DIO: 10.3390/ijms14059408
 6. Misaka T, Suzuki S, Miyata M, Kobayashi A, Ishigami A, Shishido T, Saitoh S, Kubota I, Takeishi Y: Senescence marker protein 30 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction. *Biochem Biophys Res Comm* 439, 142-147, 2013, DIO: 10.1016/j.bbrc.2013.08.002
 7. Miyata M, Suzuki S, Misaka T, Shishido T, Saitoh S, Ishigami A, Kubota I, Takeishi Y: Senescence marker protein 30 has a cardio-protective role in doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *PLoS One* 8, e79093, 2013, DIO: 10.1371/journal.pone.0079093
 8. Oikawa M, Wu M, Lim S, Knight WE, Miller CL, Cai Y, Lu Y, Blaxall BC, Takeishi Y, Abe J, Yan C: Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 64, 11-19, 2013, DIO: 10.1016/j.yjmcc.2013.08.003
 9. Iwaya S, Oikawa M, Yan C, Takeishi Y: Phosphodiesterase 3A1 protects the heart against angiotensin II-induced cardiac remodeling through regulation of transforming growth factor-expression. *Int Heart J* 55, 165-168, 2014, DIO: 10.1536/ihj.13-268
 10. Takeishi Y: Pivotal roles of regulating the proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2) signaling in cardiac function and remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 74, 295-296, 2014, DIO: 10.1016/j.yjmcc.2014.06.005
 11. Oikawa M, Owada T, Yamauchi H, Misaka T, Machii H, Yamaki T, Sugimoto K, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: Epicardial adipose tissue reflects the presence of coronary artery disease: comparison with abdominal visceral adipose tissue. *Biomed Res Int* 2015, 483982, 2015, DIO: 10.1155/2015/483982
 12. Nakamura Y, Suzuki S, Shimizu T, Miyata M, Saitoh S, Kubota I, Takeishi Y: High mobility group box 1 promotes angiogenesis from bone marrow derived cells after myocardial infarction. *J Atheroscler Thromb (in press)*, DIO: 10.5551/jat.27235
- [学会発表](計 10 件)
1. Misaka T, Suzuki S, Miyata M, Kobayashi A, Saitoh S, Takeishi Y: Cardiac overexpression of senescence marker protein 30 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. Congress of the European Society of Cardiology 2012 (2012.8.25-8.29, Munich, Germany)
 2. Miyata M, Suzuki S, Misaka T, Saitoh S, Takeishi Y: Deficiency of senescence marker protein 30 exacerbates doxorubicin-induced cardiac dysfunction. The 29th Annual Meeting of the International Society for Heart Research (ISHR) Japanese Section

- (2012.10.26-10.27, Fukuoka, Japan)
3. Oikawa M, Iwaya S, Yan C, Takeishi Y: Overexpressed phosphodiesterase 3A1 protects the heart against angiotensin II-induced cardiac injury via regulating interaction between α -adrenergic and angiotensin II signaling pathways. Scientific Sessions of American Heart Association 2012 (2012.11.3-11.7, Los Angeles, California, USA)
 4. Hoshino Y, Saitoh S, Machii H, Yamada S, Misaka T, Miyata M, Mizukami H, Takeishi Y: Coronary artery spasm related to thiol oxidation and RhoA activation in aging model with senescence marker protein-30 (smp 30) deficiency. Scientific Sessions of American Heart Association 2012 (2012.11.3-11.7, Los Angeles, California, USA)
 5. Miyata M, Suzuki S, Misaka T, Takeishi Y: Senescence marker protein 30 has a cardio-protective role in doxorubicin-induced cardiac dysfunction. Scientific Sessions of American Heart Association 2013 (2013.11.16-11.20, Dallas, Texas, USA)
 6. Yamauchi H, Saitoh S, Owada T, Yamada S, Takeishi Y: Senescence marker protein-30 deficiency impairs collateral growth under ischemia in aging. Scientific Sessions of American Heart Association 2013 (2013.11.16-11.20, Dallas, Texas, USA)
 7. Nakamura Y, Suzuki S, Shimizu T, Miyata M, Shishido T, Ikeda K, Saitoh S, Kubota I, Takeishi Y: High mobility group box 1 promotes angiogenesis from bone marrow-derived endothelial progenitor cells after myocardial infarction. Scientific Sessions of American Heart Association 2014 (2014.11.15-11.19, Chicago, USA)
 8. Yamauchi H, Saitoh S, Owada T, Takeishi Y: Deficiency of senescence marker protein-30 impairs collateral growth by suppressing nitric oxide bioactivity under ischemia. Scientific Sessions of American Heart Association 2014 (2014.11.15-11.19, Chicago, USA)

9. Owada T, Yamauchi H, Saitoh S, Machii H, Takeishi Y: Resolution of mitochondrial oxidant stress improves aged-cardiac performance. Scientific Sessions of American Heart Association 2014 (2014.11.15-11.19, Chicago, USA)
10. Suzuki S, Nakazato K, Sugimoto K, Yoshihisa A, Yamaki T, Kunii H, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y: The impact of plasma levels of receptor for advanced glycation end-products and high mobility group box 1 in patients with pulmonary hypertension. Scientific Sessions of American Heart Association 2014 (2014.11.15-11.19, Chicago, USA)

〔図書〕(計 2 件)

1. Takeishi Y, Aging and Heart Failure, Role of resistin in heart failure in the elderly, Ed: Bodh I Jugdutt, Springer, New York, 243-247, 2014, DOI: 10.1007/978-1-4939-0268-2_16
2. Suzuki S, Takeishi Y, Aging and Heart Failure, SMP30 and aging-related cardiac remodeling and heart failure, Ed: Bodh I Jugdutt, Springer, New York, 457-463, 2014, DOI: 10.1007/978-1-4939-0268-2_32

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

竹石恭知 (TAKEISHI Yasuchika)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40272067

(2)研究分担者

及川雅啓 (OIKAWA Masayoshi)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：30457775

鈴木 聡 (SUZUKI Satoshi)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：60536944

(3)連携研究者

石神昭人 (ISHIGAMI Akihito)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ
ンター・東京都健康長寿医療センター研究
所・研究部長
研究者番号：50270658