

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659390

研究課題名(和文) 拡張型心筋症の環境要因による病態修飾の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular bases for phenotypical modification of dilated cardiomyopathy by environmental factors

研究代表者

赤澤 宏 (Akazawa, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20396683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：家族性拡張型心筋症(DCM)の病因変異である心筋トロポニンT遺伝子のK210変異をノックインしたDCMモデルマウスは、ホモ接合体ではヒトDCMと同様に進行性の左室内腔の拡大と心機能の低下を呈し、心不全を呈して死亡する。しかし、DCM患者と同じヘテロ接合体では、野生型マウスと比較して心機能低下や心内腔の拡張が見られず、DCMの表現型を呈さない。DCM患者と同じヘテロ接合体では、高塩分食や高脂肪/高ショ糖食によって、心機能低下および心室性頻拍や心室細動の催不整脈性の病態は修飾されなかった。したがって、DCMモデルマウスでは、食事環境によってDCMの病態は修飾されないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：As animal models for dilated cardiomyopathy (DCM), we analyzed the knock-in mice in which a deletion of 3 base pairs coding for K210 in cardiac troponin (TNNT2) found in familial dilated cardiomyopathy (DCM) patients was introduced into endogenous genes. Although mice homozygous for TNNT2 mutant allele (TNNT2 delta210/delta210) exhibited progressive left ventricular chamber dilatation and systolic dysfunction and died due to heart failure, mice heterozygous for TNNT2 mutant allele (TNNT2 delta210/+) did not show the cardiomyopathic phenotype. In TNNT2 delta210/+ mice, the left ventricular systolic function and the arrhythmogenicity of ventricular tachycardia/fibrillation were not influenced by high salt intake or high-fat and high-sucrose diet. These results suggest that dietary environment exerts marginal effects on cardiomyopathic phenotype in DCM model mice with the TNNT2 mutation.

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：分子心臓病態学 モデルマウス 心不全 不整脈

1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症 (DCM) は、薬物治療の進歩にもかかわらず、依然として治療抵抗性の難病である。DCM の最終的な治療法は心臓移植しかなく、新たな治療法の確立が望まれている。DCM の原因の約 30% が遺伝子変異であるが、同じ病因変異を有する場合にも発症年齢や症状の重度・進行には個人差が見られる。このような浸透率や発現性の違いには病因変異以外の遺伝要因や環境要因が関与していると考えられるが、その詳細については未だに不明である。

DCM の発症機序に関する解析が進まなかった大きな原因として、モデル動物の欠如が挙げられる。私たちの研究室では、家族性 DCM の病因変異である心筋 - アクチン遺伝子の R312H 変異を有する新規の DCM モデルマウスの確立に成功していた (*Circulation*, 2010;122:891)。また、共同研究を行っている九州大学の森本らから、同じく家族性 DCM の病因変異である心筋トロポニン T 遺伝子の K210 変異をノックインした DCM モデルマウスの供与を受けていた (*Circ Res*, 2007;101:185)。私たちは心不全発症の分子機序に関する研究を長年行っており (*J Biol Chem*, 2004;279:41095, *Nature*, 2007;446:444, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009;106:8689 など) これら 2 種類のマウスについてもこれまでに心機能評価を行い、DCM の発症や経過について予備的なデータを既に得ていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DCM モデルマウスを用いた解析を行い、環境要因による DCM の病態修飾の分子基盤を解明し、DCM の新たな治療法の確立に役立てることにある。

3. 研究の方法

アンジオテンシン II (Ang II) 負荷: 8 週齢のマウスに対して Ang II の持続的投与を行った。Ang II は生理食塩水に溶解し、1.2 mg/kg/day の用量で浸透圧ポンプ (ALZET model 2002, Durent Corp) を用いて持続的皮下投与を行った。

食塩負荷と高脂肪高シヨ糖負荷: 8% 食塩添加飼料と高脂肪高シヨ糖飼料 (F2HFHSD) はオリエンタル酵母工業より購入した。

心機能評価と組織学的解析: 心機能は、無麻酔下に心エコー法 (Vevo770 Imaging System, 25 MHz プローブ, Visual Sonics) により行った。心臓組織は、ホルマリン固定後にパラフィン包埋、薄切し、HE 染色や Masson trichrome 染色にて組織学的評価を行った。

心室性頻拍の誘導: イソフルレンによるガス麻酔下で気管内挿管し、人工呼吸器管理下に前胸部エタノール消毒後開胸し、直視下に心室に留置した電極より電気刺激による

心室性頻拍の誘発を行い、その発生頻度と持続時間を検討した。

Real time RT-PCR: 心臓組織より total RNA を抽出し (RNeasy Kit, Qiagen) cDNA を作成し (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen)、Universal ProbeLibrary Assay 法 (Roche Applied Science) により real-time PCR を行った。

4. 研究成果

(1). 環境要因の DCM の病態修飾の検討 - 心機能低下

家族性 DCM の病因変異である心筋トロポニン T 遺伝子の K210 変異をノックインした DCM モデルマウスは、ホモ接合体ではヒト DCM と同様に、進行性の左室内腔の拡大と心機能の低下を呈し、心不全を呈して死亡することを確認している。ところが、DCM 患者と同じヘテロ接合体は、野生型マウスと比較して心機能低下や心内腔の拡張が見られず、DCM の表現型を呈さないことを確認した。環境要因による DCM の病態修飾について検討するために、ヘテロ接合体および野生型マウスに、アンジオテンシン II (Ang II) (1.2 mg/kg/day) 負荷、Ang II (1.2 mg/kg/day) + 8% 食塩負荷、高脂肪食/高シヨ糖食負荷、を行い、心エコー法や組織学的な解析による心機能評価と遺伝子発現の評価を行った。

4 週間および 6 週間の Ang II 負荷、あるいは Ang II + 8% 食塩負荷において、心肥大はヘテロ接合体において野生型よりも有意に誘導されたが、心機能低下や心拡大、線維化などの組織学的変化はヘテロ接合体と野生型とで有意な差は認められなかった。12 週間および 16 週間の高脂肪食/高シヨ糖食負荷において、摂餌量や体重、血糖や脂質などの血液生化学データに差は見られず、心機能低下や心拡大、線維化などの組織学的変化はヘテロ接合体と野生型とで有意な差は認められなかった。胎児性遺伝子発現も有意な差は認められなかった。したがって、この DCM モデルマウスにおいては、高塩分食や高脂肪/高シヨ糖食のような食事環境によっては、DCM の病態は修飾されないことが示唆された。

(2). 環境要因の DCM の病態修飾の検討 - 催不整脈性

家族性拡張型心筋症 (DCM) の病因変異である心筋トロポニン T 遺伝子の K210 変異をノックインした DCM モデルマウスは、ホモ接合体ではヒト DCM と同様に、進行性の左室内腔の拡大と心機能の低下を呈し、心不全を呈して死亡することを確認している。ところが、DCM 患者と同じヘテロ接合体は、野生型マウスと比較して心機能低下や心内腔の拡張が

見られず、さらに吸入麻酔下に開胸し心室ペーシングを行うことで心室性頻拍や心室細動を誘導しても、その頻度は野生型と有意差が見られなかった。環境要因によるDCMの病態修飾について検討するために、ヘテロ接合体および野生型マウスに、アンジオテンシンII (Ang II) (1.2 mg/kg/day) 負荷、Ang II (1.2 mg/kg/day) + 8% 食塩負荷、高脂肪食/高シヨ糖食負荷、を行い、心室性不整脈の誘導がどのような修飾を受けるかを検討した。

4週間および6週間のAng II負荷、あるいはAng II + 8% 食塩負荷、12週間および16週間の高脂肪食/高シヨ糖食負荷によって、ヘテロ接合体および野生型マウスにおいて心室性頻拍や心室細動の催不整脈性は増加したが、ヘテロ接合体と野生型とで有意な差は認められなかった。したがって、このDCMモデルマウスにおいては、高塩分食や高脂肪/高シヨ糖食のような食事環境によっては、心室性不整脈の病態は修飾されないことが示唆された。

本研究により、DCMモデルマウスにおいて、DCM患者と同じヘテロ接合体では高塩分食や高脂肪/高シヨ糖食のような食事環境によっては、DCMの病態は修飾されないことが示唆された。いずれの環境要因も臨床的には重要性が高いだけに、予想外の結果であった。今後は、出生前の栄養環境や運動環境がDCMの病態に与える影響について検討を進めていきたい。

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8件)

1. Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Hara Y, Shimizu I, Zhu W, Toko H, Katada A, Akazawa H, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Walsh K, Kikuchi A, Matsumoto M, Botto M, Shiojima I, Komuro I. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell*. 149:1298-1313,2012,査読有.
2. Yoshizawa T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Iesato Y, Koyama T, Uetake R, Yang L, Yamauchi A, Tanaka M, Toriyama Y, Igarashi K, Nakada T, Kashihara T, Yamada M, Kawakami H, Nakanishi H, Taguchi R, Nakanishi T, Akazawa H, Shindo T. Novel regulation of cardiac metabolism and homeostasis by the adrenomedullin-receptor activity-modifying protein 2 system. *Hypertension*. 61:341-351,2013,査読有.

3. Akazawa H, Yabumoto C, Yano M, Kudo-Sakamoto Y, Komuro I. ARB and Cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther*. 27:155-160,2013,査読有.
4. Ozasa Y, Akazawa H, Qin Y, Tateno K, Ito K, Kudo-Sakamoto Y, Yano M, Yabumoto C, Naito AT, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Kobayashi Y, Komuro I. Notch activation mediates angiotensin II-induced vascular remodeling by promoting proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res*. 36:859-865,2013,査読有.
5. Akazawa H, Yano M, Yabumoto C, Kudo-Sakamoto Y, Komuro I. Angiotensin II type 1 and type 2 receptor-induced cell signaling. *Curr Pharm Des*. 19:2988-2995,2013,査読有.
6. Murakami M, Suzuki J, Yamazaki S, Ikezoe M, Matsushima R, Ashigaki N, Aoyama N, Kobayashi N, Wakayama K, Akazawa H, Komuro I, Izumi Y, Isobe M. High incidence of Aggregatibacter actinomycetemcomitans infection in patients with cerebral infarction and diabetic renal failure: A cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 13:557,2013,査読有.
7. Oka T, Akazawa H, Naito AT, Komuro I. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ Res*. 114:565-571,2014,査読有.
8. Akazawa H, Komuro I. Dickkopf-3: a stubborn protector of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 102:6-8,2014,査読有.

[学会発表](計30件)

1. 赤澤 宏、血行力学的ストレスによる心疾患発症機序の解明、第49回日本臨床分子医学会学術集会、2012年4月13日～2012年4月14日、みやこめっせ(京都市)
2. 藪本千鶴、赤澤 宏、藤本真徳、中谷晴昭、小室一成、HMG-CoA reductase阻害剤による、肥満細胞を標的とした心房細動アップストリーム治療の可能性、第49回日本臨床分子医学会学術集会、2012年4月13日～2012年4月14日、みやこめっせ(京都市)
3. 赤澤 宏、藪本千鶴、山本里恵、小室一成、骨格筋の修復と再生におけるアンジオテンシンII受容体シグナルの多面的役割、第11回日本再生医療学会総会、2012年6月12日～2012年6月14日、パシフィコ横浜(横浜市)
4. 赤澤 宏、心筋のストレス適応プログラムと破綻メカニズム、第15回小児心血管分子医学研究会、2012年7月5日、国立京都

国際会館（京都市）

5. 赤澤 宏、小室一成、アカデミア発創薬の課題、第31回臨床薬理阿蘇カンファレンス、2012年7月14日～2012年7月15日、別府亀の井ホテル（別府市）
6. 小笹由香子、赤澤 宏、永井敏雄、小林欣夫、小室一成、アンジオテンシンIIによるNotchシグナル活性化の血管平滑筋における機能と役割、第3回Molecular Cardiovascular Conference II、2012年9月7日～2012年9月9日、ホテルピアノ（北海道余市郡）
7. 赤澤 宏、心房細動発症における炎症の機序と役割、第47回理論心電図研究会、2012年10月12日、ホテルニューオータニ幕張（千葉市）
8. 赤澤 宏、小室一成、Antagonistic pleiotropic effects of angiotensin II receptor signaling on cardiovascular homeostasis and life span、第29回国際心臓研究学会（ISHR）日本部会、2012年10月26日～2012年10月27日、九州大学医学部百年講堂（福岡市）
9. 藪本千鶴、赤澤 宏、小室一成、骨格筋の修復と再生におけるアンジオテンシンII受容体シグナルの多面的役割、第18回アンジオテンシンカンファレンス、2013年2月2日、都市センターホテル（東京都）
10. 小笹由香子、赤澤 宏、永井敏雄、小林欣夫、小室一成、Notch activation mediates angiotensin II-induced vascular remodeling by promoting proliferation and migration of vascular smooth muscle cells、第77回日本循環器学会学術集会、2013年3月15日～2013年3月17日、パシフィコ横浜（横浜市）
11. 赤澤 宏、小室一成、心不全の病態におけるアゴニスト非依存的なアンジオテンシンII受容体活性化の機序と役割、日本薬学会第133年会、2013年3月27日～2013年3月30日、パシフィコ横浜（横浜市）
12. 赤澤 宏、老化促進におけるRASの役割、第13回日本抗加齢医学会総会、2013年6月28日～2013年6月30日、パシフィコ横浜（横浜市）
13. 藪本千鶴、赤澤 宏、矢野正道、上島悦子、小室一成、Angiotensin II receptor signaling regulates skeletal muscle repair through a pleiotropic mechanism、第30回国際心臓研究学会（ISHR）日本部会、2013年6月29日、La Valencia Hotel（La Jolla, USA）
14. 矢野正道、赤澤 宏、藪本千鶴、小室一成、Cardiac fibroblast-specific role of angiotensin II type 1 receptor in the pathogenesis of post-myocardial infarction remodeling、第30回国際心臓研究学会（ISHR）日本部会、2013年6月29日、La Valencia Hotel（La Jolla,

USA）

15. 藪本千鶴、赤澤 宏、矢野正道、上島悦子、小室一成、Pleiotropic effects of angiotensin II receptor signaling in repair and regeneration of skeletal muscle、International Society for Heart Research XXI World Congress、2013年6月30日～2013年7月4日、San Diego Convention Center（San Diego, USA）
16. 矢野正道、赤澤 宏、藪本千鶴、小室一成、Angiotensin II type 1 receptor in cardiac fibroblasts plays an integrative role in the pathogenesis of post-myocardial infarction remodeling、2013年6月30日～2013年7月4日、San Diego Convention Center（San Diego, USA）
17. 赤澤 宏、小室一成、Roles of angiotensin II receptor signaling in cardiac remodeling、11th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology、2013年8月21日～2013年8月24日、Hyatt Regency Jeju（Jeju, Korea）
18. 藪本千鶴、赤澤 宏、小室一成、アンジオテンシンII受容体シグナルの骨格筋の修復と再生における多面的役割、第4回Molecular Cardiovascular Conference II、2013年9月6日～2013年9月8日、ホテルピアノ（北海道余市郡）
19. 赤澤 宏、小室一成、Integrative role of non-myocytes in left ventricular remodeling after myocardial infarction complicated by hypertension、第21回日本血管生物医学学会学術集会、2013年9月26日～2013年9月28日、千里阪急ホテル（豊中市）
20. 赤澤 宏、小室一成、心臓リモデリングにおけるアンジオテンシンII受容体の細胞特異的な役割、第36回日本高血圧学会総会、2013年10月24日～2013年10月26日、大阪国際会議場（大阪市）
21. 坂本陽子、赤澤 宏、矢野正道、藪本千鶴、高野二郎、西道隆臣、小室一成、Calpastatin deficiency exacerbates calpaon-dependent progression of left ventricular remodeling after myocardial infarction、American Heart Association Scientific Sessions 2013、Dallas Convention Center（Dallas, USA）
22. 赤澤 宏、心筋のストレス応答と心不全発症の分子メカニズム、第17回日本心不全学会学術集会、2013年11月28日～2013年11月30日、大宮ソニックシティー（さいたま市）
23. 赤澤 宏、小室一成、心不全と老化におけるアンジオテンシンII受容体シグナルの多面的役割、脳心血管抗加齢研究会2013、2013年12月14日～2013年12月15日、梅田スカイビル（大阪市）

24. 藪本千鶴、赤澤 宏、小室一成、骨格筋の修復と再生におけるアンジオテンシンII受容体シグナルの役割、脳心血管抗加齢研究会2013、2013年12月14日～2013年12月15日、梅田スカイビル（大阪市）
25. 矢野正道、赤澤 宏、小室一成、心筋梗塞後左室リモデリングにおけるアンジオテンシンII受容体の細胞特異的な役割、第19回アンジオテンシンカンファレンス、2014年2月1日、千里ライフサイエンスセンター（豊中市）
26. 赤澤 宏、藪本千鶴、矢野正道、坂本陽子、内藤篤彦、小室一成、Angiotensin II receptor blockade reduces aging-promoting C1q expression and promotes repair of skeletal muscle、2014年3月2日～2013年3月7日、Gordon Research Conference on Angiotensin、Renaissance Tuscany Il Ciocco Resort (Il Ciocco, Italy)
27. 赤澤 宏、小室一成、老化と心疾患をつなぐRASの多面的役割、第78回日本循環器学会学実集会、2014年3月21日～2013年3月23日、東京国際フォーラム（東京都）
28. 坂本陽子、赤澤 宏、矢野正道、藪本千鶴、高野二郎、西道隆臣、小室一成、Calpain-dependent cleavage of N-cadherin is involved in the progression of left ventricular remodeling after myocardial infarction、第78回日本循環器学会学実集会、2014年3月21日～2013年3月23日、東京国際フォーラム（東京都）
29. 矢野正道、赤澤 宏、藪本千鶴、坂本陽子、小室一成、Angiotensin II type 1 receptor in cardiac fibroblasts plays a pivotal role in the pathogenesis of post-myocardial infarction remodeling、第78回日本循環器学会学実集会、2014年3月21日～2013年3月23日、東京国際フォーラム（東京都）
30. 藪本千鶴、赤澤 宏、矢野正道、坂本陽子、内藤篤彦、小室一成、Angiotensin II receptor blockade improves repair and regeneration of skeletal muscle through down-regulation of aging-promoting C1q expression、第78回日本循環器学会学実集会、2014年3月21日～2013年3月23日、東京国際フォーラム（東京都）

〔図書〕（計5件）

1. 赤澤 宏、小室一成、心不全・心肥大を有する高血圧の特徴と治療、あなたも名医！高血圧、再整理 jmedmook No. 20（日本医事新報社） 108-110, 2012
2. 赤澤 宏、小室一成、心不全の分子メカニズム、最新内科学（西村書店） 592-594, 2012
3. 赤澤 宏、小室一成、不整脈と慢性炎症、慢性炎症と生活習慣病（南山堂） 68-74,

2013

4. 赤澤 宏、小室一成、降圧薬・利尿薬・Ca拮抗薬、重要薬マニュアル（医学書院） 2-39, 2014
5. 赤澤 宏、小室一成、左室収縮不全による心不全を伴う高血圧患者の降圧治療について、薬剤選択、開始時期、投与方法について教えて下さい、高血圧診療 Q&A155 エキスパートからの回答（中外医学社） 220-221, 2014

〔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

<http://www.cvrn.med.osaka-u.ac.jp/research/az>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤澤 宏（AKAZAWA HIROSHI）
 東京大学・医学系研究科・講師
 研究者番号：20396683

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小室 一成（KOMURO ISSEI）
 東京大学・医学系研究科・教授
 研究者番号：30260483