

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591092

研究課題名(和文) 心筋梗塞後リモデリングにおけるタンパク質分解系の役割

研究課題名(英文) Impacts of Protein Quality Control in Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction

研究代表者

薄井 莊一郎 (Usui, Soichiro)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：50507043

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)：心不全の進展には、心筋細胞死・線維化といった心臓組織のリモデリングが深くかかわっている。骨格筋のサイズを制御する筋特異的ユビキチン連結酵素MAFbxは、心筋において生理的肥大や病的肥大を制御することが明らかになった。本研究では、より複雑な要因の加わる心筋梗塞後リモデリングにおける役割を検証した。MAFbx遺伝子欠損マウスに心筋梗塞モデルを作成すると、心破裂による死亡が野生型マウスと比較して有意に減少した。MAFbxは心筋梗塞後に生じる心破裂を制御している可能性が示唆された

研究成果の概要(英文)：Left ventricular (LV) remodeling following myocardial infarction (MI) has an important role on global cardiac function. Muscle atrophy F-box (MAFbx), an E3 ubiquitin ligase, induces skeletal muscle atrophy and cardiac remodeling under the condition of pressure overload, but the roles of MAFbx in MI is not well understood. Our aim is to determine if MAFbx contribute to cardiac remodeling following MI. MAFbx-knockout (KO) and wild-type (WT) mice were subjected to permanent coronary ligation to create MI. The infarct sizes 3 days after MI were not significantly different in WT and MAFbx KO mice. In comparison with WT mice, MAFbx KO mice were protected against early mortality due to cardiac rupture. MMP9 activity in risk areas 3 days after MI was significantly reduced in KO mice than in WT mice. MAFbx protein level increase in acute phase after MI. Gene deletion of MAFbx deletion reduces mortality after MI and cardiac rupture, decreasing the activity of MMP9.

研究分野：循環器内科学

キーワード：慢性心不全 心臓リモデリング 心筋梗塞 心破裂 ユビキチンプロテオソーム

1. 研究開始当初の背景

心血管疾患による死亡率が、悪性新生物(癌)、脳血管障害と並ぶ3大死因となつて久しい。心血管疾患の死亡原因の4割が心不全である。心不全は、急性心筋梗塞、高血圧性・糖尿病性心筋障害、さらには弁膜症や心筋症などの種々の心疾患の終末像であり、その5年生存率は50%と予後不良の症候群である。心不全の最大の原因である虚血性心疾患の生命予後改善、平均余命の延長などにより、心不全罹患者数は増大傾向にある。心血管系疾患の生命予後を改善するため、心不全の発症、増悪をコントロールすることが求められている。

心不全発症に至る機序、心臓リモデリングには、圧負荷、容量負荷、心筋自体の消失の3種類がある。左室収縮末期圧の増加を伴う圧負荷において心筋細胞は厚くなり、左室拡張末期圧が増加する容量負荷では心筋細胞は伸長する。負荷に対する心筋細胞応答の相違により、心臓では求心性左室肥大と遠心性左室肥大が誘導される。心筋虚血や梗塞による心筋細胞の脱落は心臓ポンプ不全の大きな原因である。心筋梗塞後では、心筋脱落に伴う左室へのストレス増大の影響は梗塞部位のみならず境界領域から非梗塞領域にまでおよび、左心室壁の線維化、肥大、左心室腔の拡大をきたす。このような梗塞後の心臓リモデリングは、圧負荷と容量負荷が混在した複雑なものであり、急性期から亜急性期に認められる梗塞部の伸展と壁のヒハク化と、慢性期に認められる非梗塞部の心筋肥大と心腔拡大に分けられる。長期的な心臓リモデリングによる心機能低下、慢性心不全の増悪が心筋梗塞後の予後を悪化させるもっとも頻度が多かつ重要な問題である。

我々は、これまでに心筋梗塞後リモデリングのメカニズムにサイトカイン産生と心筋アポトーシスが重要であることを明らかにした。さまざまな刺激による血行動態負荷の増大は、心筋細胞において新規のタンパク形成を促し、心筋細胞骨格の再構築・代謝形態の変化を引き起こす。心筋細胞は、終末分化細胞でその自己再生能力は低い細胞であるために、細胞レベルでの障害が組織機能の低下をまねく。拍動し続ける心臓・心筋細胞は、刻々と変化し続ける血行動態にさらされており、交感神経活動や酸化ストレス、機械的ストレスなどに適応し、細胞内の恒常性を保つことが必要である。

心臓リモデリングに関して、タンパク質の産生制御に関する研究は数多くなされているが、タンパク質の分解系に着目した研究は少ない。恒常性の視点から細胞内のタンパク質の品質を管理していくことは重要である。ユビキチン-プロテアソームシステム、小胞体ストレス、オートファジーといったタンパク質品質管理機構が心疾患の病態形成に主要な役割を担っている。ユビキチン連結酵素

は選択的にタンパク質を分解するという分子多様性を決定する重要な役割を持つ。

筋特異的ユビキチン連結酵素 MAFbx は、さまざまな環境やストレスにより誘導される骨格筋萎縮を制御する。MAFbx は、心筋細胞でも発現しており、内因性の MAFbx の発現は運動により誘導される生理的肥大に關与することが報告されている。最近我々は、病的肥大モデルにおいて MAFbx の発現増加を認め、MAFbx 遺伝子欠損マウスにおいて病的な心筋肥大および心不全発症が抑制されることを報告した。これらは、内因性の MAFbx が心臓リモデリング、心不全病態形成制御していることを示した最初の論文である。心臓リモデリング、心不全病態形成での筋特異的ユビキチン連結酵素 MAFbx の機能を解明し、最終的にはその阻害が心不全治療の新たな介入点となる可能性があると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

ユビキチン連結酵素 MAFbx のまだ解明されていない心不全病態形成における作用を完成し、心不全治療の新たな介入点になりうるかを探求するとともに、MAFbx を利用した新しい診断方法、治療薬としての臨床応用への展開のための基礎となる研究を行う。

3. 研究の方法

(1) モデルの作成

筋特異的ユビキチン連結酵素 MAFbx の Exon1-5 を LacZ に置換し作成した MAFbx 遺伝子欠損マウスとその同腹のワイルドタイプマウス(12 から 16 週令)を使用した。心筋梗塞モデルは、マウスを麻酔後(ペントバルビタール 100mg・kg 腹腔内投与)気管内挿管し人工呼吸器管理下で開胸を行った。実体顕微鏡下に冠動脈左前下行枝を同定し、左心耳の 1-2mm 下を結紮し、肉眼的および心電図にて心筋梗塞の確認を行い閉胸した。

(2) 心臓超音波検査

心機能評価は術前および手術後 1 週、8 週後の心機能につき現存する心臓超音波装置(マウス解析用心臓超音波装置(VEVO®2100-70MHz))をもちい、左室拡張末期径、収縮末期径および、左室短絡率などを比較した。

(3) 心臓リモデリングの評価

モデル作成後、生存率を観察するとともに、手術後 3 日、1 週間、8 週間に心臓組織を摘出し、臓器重量を測定し心不全、心肥大を評価する。パラフィン包埋切片を作成し、HE 染色、Azan 染色など組織学的検討を行い、心筋梗塞面積、炎症細胞浸潤、心筋線維化などを評価した。さらに、生化学的検討として、定量的 PCR やウエスタンブロッティングによる、ANP、BNP、CCL2、IL-1b、TNF-a などの mRNA レベルの発現、ザイモグラフィによる MMP-2/9 の活性、フローサイトメーターによる好中球・単球・マクロファージの浸潤の程度、TUNEL 染色によるアポトーシスなど検討した。

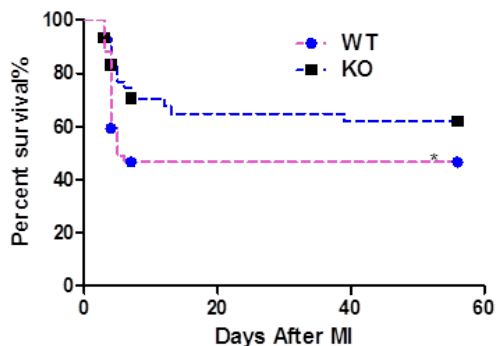
4. 研究成果

(1) MAFbx の発現

マウス心筋梗塞モデルにおける MAFbx の発現を、ウエスタンブロッティングを用いて評価した。正常心で MAFbx は発現し、心筋梗塞後 1 日目で MAFbx の発現が強く増加することが明らかになった。

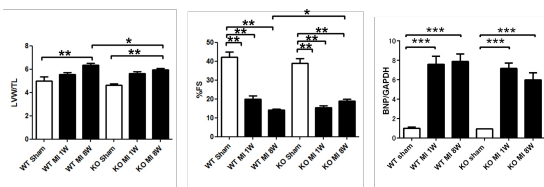
(2) 心筋梗塞後の生存率

MAFbx 遺伝子欠損マウス 60 匹、同腹のワイルドタイプマウス 60 匹を用いて心筋梗塞モデルを作成し生存率を検討した。手術後 8 週までの観察で、MAFbx 遺伝子欠損マウス群の生存率は 63%、ワイルドタイプマウス群の生存率は 43% であり、MAFbx 遺伝子欠損マウス群で有意に心筋梗塞後の死亡が減少した(下図)。手術後 1-7 日での心破裂による死亡が MAFbx 遺伝子欠損マウス群では、ワイルドタイプ群より有意に少なかった。心筋梗塞サイズは、MAFbx 遺伝子欠損マウス群とワイルドタイプマウス群で差は認められなかった。



(3) 心臓リモデリングに及ぼす影響

心筋梗塞後 1 週、8 週の心臓を摘出し左室重量を測定した。手術後 8 週で sham 群と比較して、MAFbx 遺伝子欠損マウス群、ワイルドタイプマウス群いずれも左室重量が有意に増加していた。心臓超音波検査による、左室収縮能は、手術後 1 週、8 週で sham 群と比較して、MAFbx 遺伝子欠損マウス群、ワイルドタイプマウス群いずれも有意に低下していた。心臓リモデリングマーカーの一つである BNP の mRNA 発現は、心筋梗塞後 1 週、8 週で sham 群と比較して、MAFbx 遺伝子欠損マウス群、ワイルドタイプマウス群いずれも有意に増加していた。心破裂に關与する MMP9 の活性は、手術後 3 日目で sham 群と比較して、MAFbx 遺伝子欠損マウス群、ワイルドタイプマウス群いずれも有意に増加していた。MAFbx 遺伝子欠損マウス群での活性が、ワイルドタイプマウス群と比較すると減少していた。



(4) 遺伝子発現に及ぼす影響

心筋梗塞後 1 日目の心臓から mRNA を抽出し、cDNA マイクロアレイにて、網羅的遺伝子発現解析を行った。MAFbx 遺伝子欠損マウス群、ワイルドタイプマウス群がそれぞれのクラスターを形成することが確認できた。心筋梗塞後 MAFbx 遺伝子欠損マウス群において、ワイルドタイプマウス群と比較して発現が低下している遺伝子として、CCL2 や IL-1b などの炎症に關連する分子が含まれていることを確認した。

これらの検討から、筋特異的ユビキチン連結酵素 MAFbx は、心筋梗塞後心臓での発現が増強し、心破裂などによる心臓死に關連することが考えられた。MAFbx を抑制することにより、心筋梗塞後の過度の炎症を抑え心臓リモデリングを制御でき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 8 件)

- Inomata J, Murai H, Kaneko S, Hamaoka T, Ikeda T, Kobayashi D, Usui S, Furusho H, Sugiyama Y, Takata S, Takamura M. Differential effects of azelnidipine and amlodipine on sympathetic nerve activity in patients with primary hypertension. *J Hypertens.* 2014 Sep;32(9):1898-904. (査読有)
- Yaegashi T, Furusho H, Chikata A, Usui S, Kaneko S, Yamagishi M, Takamura M. Separated right and left ventricular excitation during right ventricular septal pacing in a patient with narrow QRS wave: a case report. *J Med Case Rep.* 2014 May 21;8:158. (査読有)
- Maejima Y*, Usui S*, Zhai P, Takamura M, Kaneko S, Zablocki D, Yokota M, Isobe M, Sadoshima J. Muscle-specific RING finger 1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy through downregulation of calcineurin A. *Circ Heart Fail.* 2014 May;7(3):479-90. * Both authors contributed equally to this work (査読有)
- Kitano K, Usui S, Ootsuji H, Takashima S, Kobayashi D, Murai H, Furusho H, Nomura A, Kaneko S, Takamura M; Rho-kinase activation in leukocytes plays a pivotal role in myocardial

ischemia/reperfusion injury.

PLoS One. 2014 Mar 17;9(3):e92242.

Corresponding author (査読有)

5. Inoue O, Murai H, Kaneko S, Usui S, Furusho H, Takamura M. Hemodynamic collapse induced by general anesthesia in a patient with an unruptured thoracic aortic aneurysm: a case report. *BMC Cardiovasc Disord*. 2013 Dec 27;13:122 (査読有)
6. Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, Usui S, Nasti A, Yoshida K, Seki A, Komura T, Honda M, Wada T, Furuichi K, Ochiya T, Kaneko S. Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression. *Eur J Immunol*. 2013 Nov;43(11):2956-68. (査読有)
7. Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, Honda M, Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. *Hepatology*. 2013 Sep;58(3):1133-42 (査読有)
8. Hariharan N, Ikeda Y, Hong C, Alcendor RR, Usui S, Gao S, Maejima Y, Sadoshima J. Autophagy plays an essential role in mediating regression of hypertrophy during unloading of the heart. *PLoS One*. 2013;8(1):e51632. (査読有)

[学会発表](計 3件)

1. Chikada A, Usui S, Sadoshima J, Kaneko S, Takamura M
MAFbx regulates cardiac rupture in mice with myocardial infarction JCS 2015
(平成 27 年 4 月 26 日 大阪国際会議場、大阪市、大阪府)
2. Kashimoto, M; Usui, S; Kusayama, T; Kitano, T; Kaneko, S; Sadoshima, J; Takamura, M
Muscle atrophy F-box (MAFbx) regulates neointimal formation during vascular remodeling in mice ECS 2014
(平成 26 年 8 月 31 日 バルセロナ ス

ペイン)

3. Usui.S, Okura, S, Takashima, S, Takamura M, Kaneko S, Takawa Y
Sphingosine 1-phosphate receptor 1 signaling in cardiac fibroblast regulates cardiac hypertrophy and fibrosis through angiotensin II and interleukin-6. AHA 2013
(平成 25 年 11 月 18 日 デンバー 米国)

[図書](計 0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

薄井 莊一郎 (USUI, Soichiro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号: 50507043