

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890085
 研究課題名（和文） 筋特異的ユビキチン連結酵素 MAFbx の不全心病態形成における役割の検討

研究課題名（英文） Role of Muscle Atrophy F-box in the progression of Cardiac Remodeling.

研究代表者

薄井 荘一郎 (USUI SOICHIRO)
 金沢大学・附属病院・助教
 研究者番号：50507043

研究成果の概要（和文）：

心不全の病態形成における解析を行うために、マウスを用いて圧負荷誘導性の心肥大・心不全モデルの作成を行った。C57/B6 マウスに、人工呼吸器管理下に横行大動脈に狭窄を作成した。術後 2 週で有意な左室肥大が、術後 4 週で肺うっ血を生じ心不全が起ることを確認した。筋特異的ユビキチン連結酵素 MAFbx が、術後 1 週、2 週と時間依存的にその発現レベルが有意に増加していくことを確認した。MAFbx 欠損マウスに圧負荷モデルを作成し、MAFbx 欠損マウスでは圧負荷による左室肥大は有意に抑制された。MAFbx は圧負荷に伴う心肥大および心臓リモデリング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）：

Muscle atrophy F-box (MAFbx) is an E3 ubiquitin ligase expressed only in muscle. We examine the role of endogenous MAFbx in regulating cardiac hypertrophy in response to pathological stimuli. Transverse aortic constriction (TAC) was applied for 2 weeks to MAFbx^{-/-} and wild type (WT) mice. TAC-induced increases in left ventricular weight/body weight were significantly smaller in MAFbx^{-/-} than in WT mice. Endogenous MAFbx plays an essential role in mediating cardiac hypertrophy in response to pressure overload.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：循環器内科

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：心不全、心肥大、ユビキチンプロテアソーム、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

本邦で生活習慣の欧米化に伴い高血圧、脂

質代謝異常、インスリン抵抗性などメタボリックシンドロームに通じる生活習慣病患者が増加、心血管疾患による死亡率が悪性腫瘍

や脳血管障害と並ぶ3大死因の一つとなって久しい。虚血性心疾患に対する積極的な早期再灌流療法の普及により急性期の死亡率は減少している。しかし、心血管疾患の死亡者数は依然として多く、介入すべき問題点が残されている。心不全は、虚血性心疾患、高血圧性心機能障害、糖尿病性心筋障害、さらには弁膜症や心筋症など種々の心疾患の終末像であり、5年生存率は50%と依然として予後不良の症候群である。心筋肥大・アポトーシスといった心臓リモデリングが不全心病態形成のメカニズムに重要な役割を持つことが分子生物学的手法を用いて検討されてきている。これまでは、転写翻訳といったタンパク質合成系に注目され多くの研究が行われてきた。心筋細胞は神経細胞と同じように終末細胞で自己再生能のきわめて低い細胞である。このような細胞において細胞内の恒常性を維持していくことは非常に重要である。拍動し続ける心筋細胞は、時々刻々と変化し続ける循環動態にさらされており機械的ストレスや分泌ホルモン、交感神経活動、酸化ストレスにさらされた環境にあって細胞内の恒常性を維持していくことは重要なことである。細胞内の恒常性を維持するという視点から、細胞内のタンパク質の品質を管理し分解していくことは重要なことであり、実際に、糖尿病や神経変性疾患において小胞体ストレス、ユビキチン-プロテアソームシステム、オートファジーといったタンパク質品質管理機構の破綻が病態形成に重要な役割を担っていることが数多く報告されている。また、心肥大群・心不全群にてプロテアソームサブユニットの発現亢進およびプロテアソーム活性の増強を認め、プロテアソーム阻害薬の投与により圧負荷による心肥大が抑制される。また、申請者は、不全心病態形成時に、活性化されるセリン・スレオニカインース Mst1 が、小胞体ストレスを誘導し、心筋細胞アポトーシスを促進し、心臓リモデリングを制御することを見出した。以上から、不全心病態形成にユビキチン-プロテアソームシステムが重要な役割を担っていることが示唆され、リモデリング時の蛋白分解系の制御メカニズムの解明が新たな治療戦略となる可能性がある。ユビキチン-プロテアソームシステムは細胞内タンパク質分解の主要な役割を担っている。標的タンパク質はユビキチン化させた後プロテアソームによって急速に分解される。ユビキチン連結酵素は、ユビキチン-プロテアソームシステムにおいて律速酵素で、広大な分子多様性をもち、特定のユビキチン連結酵素が特定のタンパク質をユビキチン化し蛋白分解を促進する。ユビキチン-プロテアソームシステムの特異性、制御はユビキチン連結酵素によって決定されている。筋特異的ユビキチン連結

酵素 MAFbx は、様々な骨格筋萎縮モデルで誘導され MAFbx ノックアウトマウスでは骨格筋萎縮が抑制される。MAFbx は心筋細胞でも発現しており、心筋細胞の肥大を制御することによって心臓病態形成に関与していることが予想される。最近、内因性の MAFbx が、運動による生理的心筋肥大を抑制する因子であるとの報告がなされた。このことは、筋特異的ユビキチン連結酵素 MAFbx の発現抑制が、生理的な刺激に対しては肥大を促進することを示唆する結果であり、すなわち MAFbx の阻害が心不全治療の新たな介入点となる可能性を持つことから、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、蛋白品質管理機構である、ユビキチン-プロテアソームシステムが、心不全治療の新たな介入点となりうるか否かを探求する。これまでの研究成果をもとに、ユビキチン-プロテアソームシステムの破綻モデルとして、筋特異的ユビキチン連結酵素 MAFbx のノックアウトマウスを用いて、ユビキチン-プロテアソームシステムの心臓リモデリングに与える影響を明らかにし、その応答制御が圧負荷による心筋肥大を抑制する、細胞死の誘導を制御する、総じて不全心発症を制御するという仮説を検証する。

3. 研究の方法

心臓リモデリングにおけるユビキチン-プロテアソームシステムの関与と、筋特異的ユビキチン連結酵素 MAFbx が、不全心病態形成に寄与する可能性を検討する。

本研究では、ユビキチン-プロテアソームシステムの破綻モデルとして、MAFbx ノックアウトマウスを使用し、心筋肥大、細胞死といった心臓リモデリングの面から検討し、ユビキチン-プロテアソームシステムの制御が心不全病態を改善する可能性を検証する。

心不全モデルの作成

対象はマウス筋特異的ユビキチン連結酵素 MAFbx ノックアウト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)。心不全モデルとして、圧負荷誘導性の心不全の心不全を作成。横行胸部大動脈を結紮し、圧負荷誘導性の心不全モデルを作成する。

心機能の評価

術前および 2、4 週後の心機能につき現存する心臓超音波装置 (電子セクター 12-17MHz) 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する。心エコー施行者は、マウスのエコーに精通した者とし、blind label 法で行う。

心臓リモデリングの評価

手術後 2、4 週目に心臓を摘出し、ホルマ

リン固定しパラフィンに包埋する。線維化をマッソントリクローム染色、アポトーシスをTunel染色で評価し、心臓リモデリングを組織学的に評価する。

また、摘出心のRNAを抽出し心臓リモデリング時に発現が亢進するといわれている胎児型遺伝子の発現を調べる。

4. 研究成果

蛋白質質管理機構である、ユビキチン-プロテアソームシステムが、心不全治療の新たな介入点となりうるか否かを探求することを目的として研究を進めた。心不全の病態形成における解析を行うために、マウスを用いて圧負荷誘導性の心肥大・心不全モデルの作成を行い、術

後2週で有意な左室肥大が生じていることを、左室重量の測定と心臓超音波検査にて壁肥厚が形成されていることを確認した(図1)。

また術後4週で肺重量が増加し、肺うっ血が生じ、心不全が起こることを確認した(図2)。筋組織に特異的に発現するユビキチン連結酵素MAFbxの発現レベルは、コントロールでわずかに発現しており、術後1週、2週と時間依存的にその発現レベルが有意に増加していくことを確認した(図3)。

このことは、MAFbxが心肥大病態形成に関与する可能性が示唆された。さらに、MAFbxの役割を明らかにするために、MAFbx欠損マウスに圧負荷モデルを作成した。大動脈結紮後2週で野生マウスでは左室重量の増加が確認されたが、MAFbx欠損マウスでは圧負荷による左室肥大は有

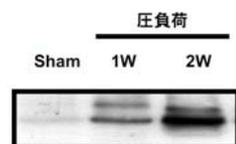
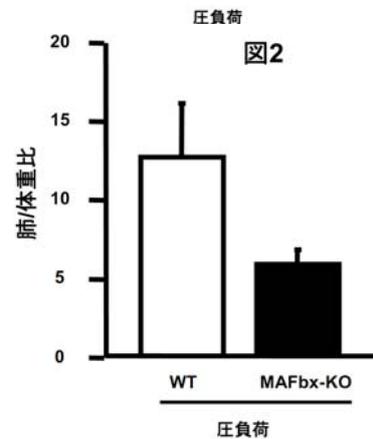
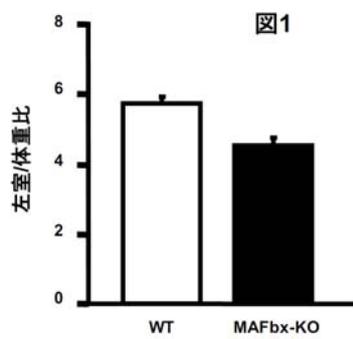


図3

意に抑制された。さらに、大動脈結紮後4週で野生マウスでは肺重量の増大を認めたが、MAFbx欠損マウスの肺重量は増加していなかった。以上の結果からMAFbxは圧負荷に伴う心肥大および心不全の進行、心臓リモデリングを制御していることが明らかになった。心臓の組織学的検討から、MAFbx欠損マウスでは、圧負荷に伴う心筋細胞肥大が抑制されていた。さらに、TUNEL染色にて、MAFbx欠損マウスでは野生マウスと比較して心筋細胞アポトーシスが有意に減少していることが明らかになった。さらに、シリウスレッド染色により線維化の評価を行ったところ、MAFbx欠損マウスでは線維化の抑制が見られた。以上の検討から、内因性の筋特異的ユビキチン連結酵素MAFbxは、圧負荷に伴う心臓リモデリング及び心不全発症に対して促進的に作用している可能性が示唆された。

今後、容量負荷心不全モデルとして心筋梗塞モデルや、イソプロテレノールやアンジオテンシンIIなどの負荷モデルも用いて、種々のストレスに対する心臓リモデリングにおけるMAFbxの役割の検討を進めていく。

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)

- Ohtsuji H, Honda M, Usui S and other 7: Altered Hepatic Gene Expression Profiles Associated with Myocardial Ischemia. *Circulation Cardiovasc Genet.* 2010;3:194-203、査読あり
- Takuwa N, Ohkura SI, Usui S and other 18: S1P3-mediated cardiac fibrosis in sphingosine kinase 1 transgenic mice involves reactive oxygen species. *Cardiovasc Res.* 2010;85:484-493、査読あり

[学会発表] (計 1件)

- Usui S, Muscle Atrophy F-box Inhibited Pressure Overload Induced Cardiac Hypertrophy through the Activation of NFκ-B Pathway. 第73回日本循環器学会、2009年3月23日、大阪国際会議場(大阪)

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