

Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

研究成果報告書(最終) <概要>

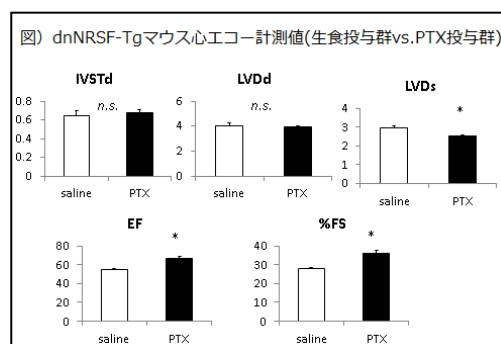
所 属	京都大学医学研究科循環器内科
氏 名	桑原佳宏
研究テーマ	心不全発症における NRSF 転写抑制複合体の標的としての Galpha i/o の意義

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は1ページにまとめること。(図表、写真などの添付を含む)

【目的】心不全は心機能の低下を伴う症候群であり、種々の治療法の進歩にも関わらずその予後は不良であるため、心機能低下の分子プロセス解明に基づく新規治療標的の同定が望まれる。申請者らは転写抑制因子 NRSF (neuron-restrictive silencer factor) が胎児型心筋遺伝子の発現制御を介して正常な心筋の形質維持に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。実際に、NRSF の機能を競合的に阻害する NRSF の優性抑制変異体 dnNRSF を過剰発現する dnNRSF-Tg マウス(以下、Tg)は進行性の心拡大と心収縮能低下・心室性不整脈の頻発など、拡張型心筋症様の病態を呈し 40 週ころまでに高率で死亡する。このマウスはヒト心不全に類似した遺伝子発現プロファイルを示し、その中でも胎児型イオンチャネル発現亢進が突然死に関与していることを明らかにしてきた。しかし一方で Tg の心機能低下の機序は不明であった。そこで本申請研究では、NRSF 機能低下から心機能低下に至る分子機序を明らかにし、心不全における心機能低下に対する新規治療標的の同定を目的とする。

【方法】NRSF の発現が心機能維持に重要であること確認し、その分子機序を検討するために、申請者らは心筋特異的 NRSF コンディショナルノックアウトマウスを作製し(NRSF cKO、以下 cKO)、cKO が Tg と類似の表現形質を示すことを確認した。そこでこの 2 種類のマウスで共通に発現が変化している遺伝子をマイクロアレイにて検索し、これらマウス心室における G alpha o をコードする遺伝子 GNAO1 の発現亢進を見出した。本申請研究では、Tg および NRSF cKO を用いて、G alpha o の心機能低下における意義とその分子機序を明らかにし、新規心不全治療標的としての可能性を探るために以下の研究を行った。1、pertussis toxin 投与による Tg および cKO の収縮不全における G alpha i/o の役割の検討。2、Tg および cKO における G alpha o 発現亢進の心筋 Ca²⁺ハンドリングに対する影響の解析。3、病的肥大モデルマウスにおける G alpha i/o の発現の解析。4、G alpha o 発現亢進機序における NRSF の役割の検討。

【成果】Tg および cKO の心室において、G alpha o の発現が亢進していることを確認し、これらマウスに G alpha o の機能を阻害する pertussis toxin (PTX) の投与を行った。PTX 投与により、Tg および cKO いずれにおいても、心エコーで解析した心収縮能の有意な改善を認め、G alpha o の機能亢進と NRSF 機能低下による心収縮能低下との関連が示唆された。さらに G alpha o 発現上昇による心機能低下の分子メカニズムに関して明らかにするために、Tg 心室における L 型カルシウムチャネル(LTCC)電流活性を対照マウスと比較解析したところ、Tg マウス心室筋細胞において t-tubular membran における LTCC 電流は対照群と比べて有意な低下は認められなかった一方で、surface sarcolemma(SS)の LTCC 電流密度が Tg 心筋において高値であった。以前我々が報告した Tg の細胞内拡張期 Ca²⁺濃度高値の結果と合わせて、G alpha o からの何らかのメカニズムを介した SS における LTCC 電流の増加が、SR 機能異常と相まって拡張期 Ca²⁺濃度上昇、心収縮能低下に関係している可能性があると考えられた。また G alpha o 遺伝子発現が NRSF により直接制御されている可能性を見出し、さらに圧負荷肥大心において G alpha o 発現の亢進も確認した。現在、より詳細な解析のため、心筋細胞の SR Ca²⁺ content などの SR 機能の評価実験を準備すると共に、G alpha o の役割とその心機能低下に関わる機序をより厳密に検討するために Tg および cKO マウスと G alpha o ノックアウトマウスとの交配、解析を実施中である。本研究により心不全に対する新規治療標的としての G alpha o の意義が示唆された。



Banyu Foundation Research Grant 2013—生活習慣病領域—

研究成果報告書(最終) <発表実績/予定一覧>

所	属	京都大学医学研究科循環器内科
氏	名	桑原佳宏

1. 論文発表実績	
	<ul style="list-style-type: none"> 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。 掲載年次順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 国内外雑誌を問わない。 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。
1	Nishikimi T, Nakagawa Y, Minamino N, Ikeda M, Tabei K, Fujishima A, Takayama K, Akimoto K, Yamada C, Nakao K, Minami T, <u>Kuwabara Y</u> , Kinoshita H, Tsutamoto T, Ishimitsu T, Kangawa K, Kuwahara K, Nakao K. Pro-B-type natriuretic peptide is cleaved intracellularly: impact of distance between O-glycosylation and cleavage sites. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. Sep 15;309(6):R639-49. 2015
2	Oshita K, Itoh M, Hirashima S, <u>Kuwabara Y</u> , Ishihara K, Kuwahara K, Nakao K, Kimura T, Nakamura K, Ushijima K, Takano M. Ectopic automaticity induced in ventricular myocytes by transgenic overexpression of HCN2. J Mol Cell Cardiol. 80:81-9.2015. (査読有)
3	Yamada Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakagawa Y, <u>Kuwabara Y</u> , Minami T, Yamada C, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Kamakura S, Nishida M, Kiyonaka S, Mori Y, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. Inhibition of N-type Ca ²⁺ channels ameliorates an imbalance in cardiac autonomic nerve activity and prevents lethal arrhythmias in mice with heart failure. Cardiovasc Res. 104(1):183-93.2014 (査読有)
4	Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Yasuno S, Kinoshita H, <u>Kuwabara Y</u> , Nakao K, Minami T, Yamada C, Ueshima K, Ikeda Y, Okamoto H, Horii K, Nagata K, Kangawa K, Minamino N, Nakao K. The effects of super-flux (high performance) dialyzer on plasma glycosylated pro-B-type natriuretic peptide (proBNP) and glycosylated N-Terminal proBNP in end-stage renal disease patients on dialysis. PLoS One. 9(3):e92314.2014. (査読有)
5	Yasuno S, Kuwahara K, Kinoshita H, Yamada C, Nakagawa Y, Usami S, <u>Kuwabara Y</u> , Ueshima K, Harada M, Nishikimi T, Nakao K. Angiotensin II type 1a receptor signalling directly contributes to the increased arrhythmogenicity in cardiac hypertrophy. Br J Pharmacol. 170(7):1384-95. 2013 (査読有)

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順(新しいものから)に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2014.11.28-29	第 31 回 国際心臓研究会(ISHR)日本部会, Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Koichiro Kuwahara, Shinji Yasuno, Hideyuki Kinoshita, <u>Yoshihiro Kuwabara</u> , Chinatsu Yamada, Kenji Ueshima, Naoto Minamino, Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura: O-glycosylation in N-terminal region of proBNP regulates its processing in ventricular myocytes.
2	2014.11.15-19	AHA Scientific Sessions 2014, Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Koichiro Kuwahara, Shinji Yasuno, Hideyuki Kinoshita, <u>Yoshihiro Kuwabara</u> , Kazuhiro Nakao, Chinatsu Yamada, Kenji Ueshima, Naoto Minamino, Takeshi Kimura, Kazuwa Nakao: O-glycosylation-dependent Regulation of Human proBNP Processing
3	2014.10.10-12	第 18 回日本心不全学会学術集会, Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Koichiro Kuwahara, Shinji Yasuno, Hideyuki Kinoshita, <u>Yoshihiro Kuwabara</u> , Kazuhiro Nakao, Chinatsu Yamada, Kenji Ueshima, Naoto Minamino, Takeshi Kimura, Kazuwa Nakao: Role of O-glycosylation in N-terminal region of human proBNP in proBNP processing
4	2014.9.10-12	The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication, Yasuaki Nakagawa, Toshio Nishikimi, Koichiro Kuwahara, Shinji Yasuno, Hideyuki Kinoshita, <u>Yoshihiro Kuwabara</u> , Kazuhiro Nakao, Chinatsu Yamada, Kenji Ueshima, Naoto Minamino, Takeshi Kimura, Kazuwa Nakao: Significance of O-glycosylation in proBNP processing
5	2014.8.30-9.3	ESC congress 2014, C. Yamada, K. Kuwahara, <u>Y. Kuwabara</u> , H. Kinoshita, Y. Nakagawa, T. Nishikimi, K. Nakao, T. Kimura: Critical involvement of renin-angiotensin system for developing arrhythmogenic remodeling in mice with chronic heart failure and lethal arrhythmias
6	2014.7.22-25	第 31 回日本心電学会学術集会 (学術奨励賞受賞), <u>Yoshihiro Kuwabara</u> , Koichiro Kuwahara, Makoto Takano, Hideyuki Kinoshita, Yuji Arai, Yasuaki Nakagawa, Shinji Yasuno, Sachio Igata, Satoru Usami, Takeya Minami, Yuko Yamada, Kazuhiro Nakao, Chinatsu Yamada, Junko Shibata, Toshio Nishikimi, Kenji Ueshima, Kazuwa Nakao: Increased Expression of HCN channels in the Ventricular Myocardium Contributes to Enhanced Arrhythmicity in Mouse Failing Hearts
7	2014.4.24-26	第 87 回日本内分泌学会学術総会, 中川靖章、錦見俊雄、桑原宏一郎、保野慎治、木下秀之、 <u>葉原佳宏</u> 、中尾一泰、山田千夏、上嶋健治、南野直人、木村剛、中尾一和: 血液透析患者における BNP 前駆体 proBNP についての検討
8	2014.4.14-18	The 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM 2014), Minami T, Kuwahara K, <u>Kuwabara Y</u> , Cho K, Kinoshita H, Nakagawa Y, Ueda K, Kimura T.: Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin is crucial for pathological vascular remodeling in mice
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等

1	投稿中	The renin–angiotensin system promotes arrhythmogenic remodeling and lethal arrhythmias in mice with non–ischemic cardiomyopathy Yamada C, Kuwahara K, Yamazaki M, Nakagawa Y, Nishikimi T, Kinoshita H, <u>Kuwabara Y</u> , Minami T, Yamada Y, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Honjo H, Kamiya K, Nakao K, Kimura T. Cardiovascular Research in submission
2		
3		
4		