

受賞者

中岡 良和

大阪大学大学院医学研究科循環器内科学

## 研究テーマ

心不全と心筋細胞－内皮細胞間のサイトカインネットワーク

### 1. はじめに

心臓には心筋細胞以外に内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞など様々な種類の細胞が存在するが、心臓組織中では特に心筋細胞と内皮細胞が密接した微少環境の中で相互にパラクライン因子を分泌して協調的に恒常性維持を行っていることがこれまで知られている。しかしながら、心筋細胞－内皮細胞間の詳細な相互作用の分子メカニズムは明らかではなかった (*Physiol. Rev.* 83, 59-115, 2003)。neuregulin-1 (NRG-1) は Epidermal Growth Factor (EGF) ファミリーに属する増殖因子の 1 つで、心臓組織で心内膜内皮と毛細血管内皮に局在し shedding により近傍の心筋細胞上に発現するレセプター型チロシンキナーゼ (RTK) の 1 つである ErbB 受容体に作用して、心機能維持に重要な機能を果たす (*J. Biol. Chem.* 281: 19469-19477, 2006)。NRG-1/ErbB シグナルが心機能維持と心不全予防に重要であることは、①ErbB2 と ErbB4 の心筋特異的欠損マウスがそれぞれ拡張型心筋症を呈すること、②乳癌治療に頻用される ErbB2 のヒト化モノクローナル抗体 (Herceptin) の副作用で心不全が生じることから広く知られている (*Trends Cardiovasc. Med.* 13, 80-86, 2003)。しかしながら、そのシグナル伝達経路の心筋細胞内の特異的標的分子はこれまで明らかにされていなかった。

そこで、我々は RTK の下流で重要な機能を有することが報告されていた Gab ファミリードッキングタンパク質に着目して、心筋細胞特異的 Gab1/Gab2 二重欠損マウス (DKO マウス) を作成し詳細に解析した。この DKO マウスは拡張型心筋症様の心不全を自然発症して (図 1)、約 70% が心不全によると考えられる死亡を来した。DKO マウスでは心内膜に局限した弾性線維と膠原線維の強い集積を認め、病理組織学的にはヒトの「心内膜線維弾性症」に酷似していた (図 2)。さらに DKO マウスの左心室壁には拡大した異常血管像が観察され、正常血管で見られる Smooth muscle alpha-actin 陽性の周皮細胞のリクルート、すなわち血管の成熟化過程にも異常を来していた。

心筋細胞での Gab1/Gab2 に依存する RTK 依存性シグナルの検索を行ったところ、NRG-1/ErbB シグナル経路依存性の心筋細胞上での ERK1/2 及び AKT の活性化が完全に消失していた。さらに NRG-1/ErbB/Gab シグナルによる心筋細胞内の標的遺伝子の単離を目的として、マイクロ DNA アレイを用いて NRG-1 投与後 (8 時間後) に野生型マウスで発現が誘導され、DKO で誘導が遮断されている遺伝子を探索した。その結果、14 個の遺伝子とそのパターンに合致する遺伝子として同定され、その 1 つに *angiopoietin-1 (Ang1)* 遺伝子が見出された。

Ang1 は内皮細胞の成熟安定化因子として機能し、その遺伝子欠損マウスが胎生致死で、NRG-1/ErbB シグナル経路の遺伝子ノックアウトマウスとほぼ同様の心臓発生異常 (肉柱発生不全と心内膜異常)

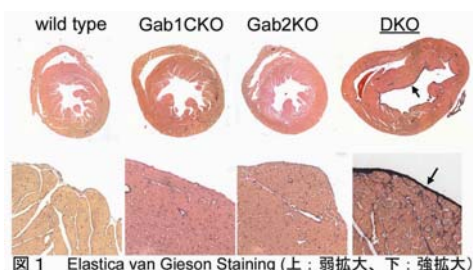


図 1 Elastica van Gieson Staining (上: 弱拡大, 下: 強拡大)

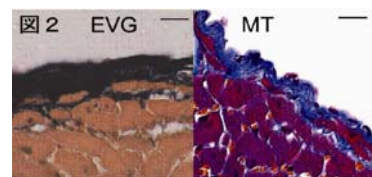
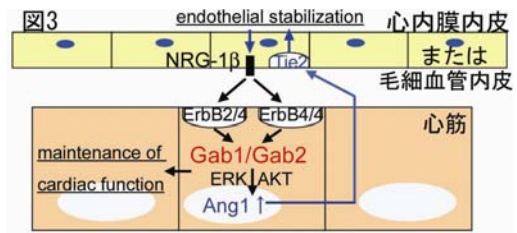


図 2 EVG (左) と Masson's trichrome (右) 染色による心臓組織像。EVG 染色は弾性線維を、Masson's trichrome 染色は膠原線維をそれぞれ青色で可視化する。

と血管の異常拡大などの表現型を呈することが報告されている (*Cell*, 87, 1171-1180, 1996)。よって、DKOマウスではNRG-1/ErbB シグナル依存性のシグナルの欠落によって心筋細胞由来の Ang1 分泌が障害された結果として、心内膜内皮と心臓組織毛細血管内皮に異常が出て、心内膜線維弾性化と左室壁内の異常血管像を生じたものと考えられた (図3)。



以上に述べた心筋特異的 Gab1/Gab2 二重欠損マウスの解析から、Gab ファミリー蛋白質が心筋-内皮間のサイトカインネットワークに必須のシグナル分子であり、心機能維持に必須の機能を担うことが明らかとなった。今回は、本助成金を用いて心臓組織での” Angiopoietin-1” の役割に着目して、心筋細胞-内皮細胞間のサイトカインネットワークと心不全の関連性を明らかにすることを目的として以下の実験検討を進めた。

## 2. 方法

心筋細胞由来の NRG-1 依存性の Ang1 分泌が心不全予防において果たす役割を解明するために、*Cre-loxP* システムを用いて遺伝子破壊を可能とする *Ang1flox* マウスを作成した (図4)。第1エクソンを loxP 配列で挟んだ targeting vector を作成して、TT2 の ES 細胞にエレクトロポレーション法で導入し、相同組み換えした細胞をネオマイシン耐性でスクリーニングして得た。

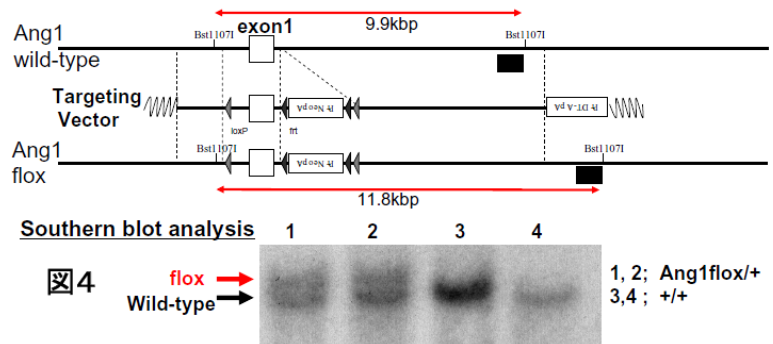
さらに CD-1 を宿主として組み換え ES 細胞をインジェクションして *Ang1flox* キメラマウスを作成した。*Ang1flox* アレルが germline transmission した個体を得た後、FRT サイト (黒の▼) で挟まれたネオマイシン耐性遺伝子を外すために CAG プロモーター下で酵母由来 Flippase を発現する CAG-FLPe トランスジェニックマウスと交配して *Ang1flox* マウスを得た (図4)。

## 3. 結果 研究成果

上述した方法に従い、相同組み換えした ES 細胞を得たのち、*Ang1flox* キメラマウスを作成した。

*Ang1flox* アレルが germline transmission した個体をまず PCR とサザンブロットによってスクリー

ニングした。図4に示すように Bst1107 I による制限酵素処理で flox アレルを有する個体を得たことが確認された。この *Ang1flox* アレルが germline transmission した個体と CAG-FLPe トランスジェニックマウスと交配してネオマイシン耐性遺伝子カセットを外した *Ang1flox* マウスを得るところまで成功している。今後は、心筋細胞特異的に Ang1 の遺伝子のノックアウトを行う為、*Ang1flox* マウスと心筋特異的に Cre レコンビナーゼ (Cre) を発現するトランスジェニックマウスと交配して解析を進める予定である。



## 4. 考察 まとめ

現時点では *Ang1flox* マウスが完成して研究は端緒についたばかりである。今後この *Ang1flox* マウスと心筋特異的に Cre レコンビナーゼ (Cre) を発現するマウスと交配して心筋由来 Ang1 の機能を明

らかにすべく以下のような実験を計画している。

- ① alpha-MHC-Cre-TGマウスとの交配実験：出生後にCre発現のドライブがかかるalpha-MHC-Cre-TGマウスと交配して、出生後の心筋細胞由来のAng1分泌欠損によって自然経過で心不全及び心内膜線維弾性化が発症するか否かを検討する。
- ② alpha-MHC-MerCreMer-TGマウスとの交配実験：タモキシフェン (Tamo) 腹腔内投与による誘導で、心筋細胞特異的にCreが活性化されるalpha-MHC-MerCreMer-TGマウス (*Circ. Res.*; 89, 20, 2001) とAng1*flox*マウスを交配する。心筋細胞由来のAng1欠損誘導により自然経過で心不全が誘導されるか否かを見る実験系と、NRG-1を心筋梗塞モデルに投与する治療実験系でAng1欠損の影響を見る実験系とを予定している。

これらの実験を行うことで、Ang1とその受容体Tie2を介したシグナル伝達経路が心臓組織で果たす役割が明らかになるものと期待される。さらに、NRG-1による心筋保護効果の発現に心筋由来Ang1が必須か否かについても解明されることが期待される。

#### 5. 発表論文、参考文献

1. **Nakaoka Y\***, Nishida K, Narimatsu M, Kamiya A, Minami T, Sawa H, Okawa K, Fujio Y, Koyama T, Maeda M, Sone M, Yamasaki S, Arai Y, Koh GY, Kodama T, Hirota H, Otsu K, Hirano T, and Mochizuki N\*. Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function via neuregulin-1/ErbB signaling. *J. Clin. Invest.* 117: 1771-1781, 2007, (\*co-corresponding author)
2. Koyama T\*, **Nakaoka Y\*<sup>¶</sup>**, Fujio Y, Hirota H, Nishida K, Sugiyama S, Okamoto K, Yamauchi-Takahara K, Yoshimura M, Mochizuki S, Hori M, Hirano T, Mochizuki N Interaction of Scaffolding Docking Protein Gab1 with Protein Tyrosine Phosphatase SHP2 Negatively Regulates Myogenic Differentiation through ERK1/2 Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 283, 24234-24244, 2008 (\*co-first author, <sup>¶</sup>corresponding author)