

遺伝子導入によるプロテインフォスファターゼ1 β の発現抑制は
圧負荷心不全モデルにおける心臓リモデリングを抑制する

氏名 白石 宏造
所属 山口大学大学院医学系研究科
応用医工学専攻 器官病態内科学分野

平成29年1月

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 材料と方法	4
(1)動物	4
(2)ショートヘアピンRNAを用いるためのAAV9ベクターの準備	5
(3)圧負荷心不全モデルマウスの作成	5
(4)生体内へのAAV9ベクターを用いた遺伝子導入と大動脈弓結紮術	5
(5)心筋への遺伝子導入効率の解析	6
(6)AAVシャトルベクタープラスミドのプロモーター活性測定	7
(7)筋小胞体蛋白のリン酸化の解析	7
(8)抗体	7
(9)統計学的解析	8
4. 結果	8
(1) AAV9ベクターにより導入されたPP1 β shRNAによる部分的PP1 β 発現抑制	8
(2) TAC術後AAV9-PP1 β shRNA投与群における左室収縮能・拡張能の改善	8
(3) AAV9-PP1 β shRNA投与群における生化学的指標の変化	12
5. 考察	14
6. 謝辞	15
7. 参考文献	16

要旨

プロテインフォスファターゼ1(PP1)活性の異常な増加は筋小胞体におけるカルシウムサイクリングの非効率化に関連すると考えられており、心不全における心機能低下の原因となる。

本研究では脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)プロモーターによって誘導されるプロテインフォスファターゼ1β(PP1β)発現抑制が、圧負荷心不全モデルマウスの心不全進行を改善しうるかを検証した。仮説を証明するために、BNPプロモーターによって発現するプロテインフォスファターゼ1βショートヘアピンRNA(PP1βshRNA)をコードするアデノ随伴ウイルス9ベクター(AAV9)と陰性対照(NCshRNA)を実験に用いた。発現マーカーとしてBNPプロモーターの下流にmerald green fluorescent protein(EmGFP)を配した。

AAV9ベクター(AAV9-BNP-EmGFP-PP1βshRNAとAAV9-BNP-EmGFP-NCshRNA)は8週齢のC57BL/6Jマウスに尾静注によって生体内投与(4×10^{11} GC/匹)し、投与後2週間目に大動脈弓結紮術(transverse aortic constriction; TAC)を施行した。術前およびTAC施行後2週間毎に心エコー検査にて心機能を評価し、術後4週間目に血行動態の評価を行った。

PP1βshRNA治療群では心筋でのPP1β発現が陰性対照と比較して15%抑制されていた($p < 0.001$)。左室内径短縮率(fractional shortening; %FS)はPP1βshRNA治療群において陰性対照群に対して有意に増加していた($21\% \pm 1.0\%$ 対 $15\% \pm 0.01$, $p < 0.01$)。

心重量(heart weight; HW)/体重(body weight; BW)および肺重量(lung weight; LW)/体重比はPP1βshRNA治療群において陰性対照群と比較して有意に減少していた(HW/BW: 9.20 ± 0.49 対 10.6 ± 0.45 mg/g; $p < 0.05$, LW/BW: 9.27 ± 0.99 対 13.3 ± 1.29 mg/g; $p < 0.05$)。さらに、PP1βshRNA治療群において陰性対照群と比較して左室拡張末期圧(17.2 ± 3.93 mmHg 対 28.8 ± 1.20 mmHg, $p < 0.05$)とBNPメッセンジャーRNA発現量が有意に減少(陰性対照群と比較して40%減少)していた。マウスの生存率に関して、手術後7ヶ月の観察期間においてPP1βshRNA治療群で延長する傾向は認められたが統計学的有意差は認めなかった。

本研究の結果、心不全によって誘導されるPP1β発現抑制を標的とした治療戦略が、1週間から1ヶ月の短期間の心不全治療の一選択となる可能性が示された。

研究の背景

心不全は全世界においておよそ2600万人が罹患し、年間100万人の患者が入院する原因となっている。過去20年間の医療戦略や医療装置のめざましい進歩にもかかわらず、慢性心不全増悪により多くの人々が再入院を繰り返しており、このことは医療財政の圧迫、日常のQOL低下、将来の心血管イベント増加につながる。¹ 近年、臨床における重大な問題点として、心機能が保たれた心不全(heart failure with preserved ejection fraction; HFpEF)患者に対する有効な治療戦略の欠如が挙げられ、その兆候は特に高齢者において顕著である。¹ HFpEFの基礎的なメカニズムは未だ解明されていないが、病態生理学的には左室拡張または充満の障害が含まれている。これらは心疾患と心臓以外の併存疾患の両方に影響を受け、この病態はEBMに基づいた従来の治療を受けている駆出率が減少した心不全患者にも関係している。²

カルシウムサイクリングに関係する筋小胞体の障害は、これらの心不全の病態において重要な要素である。カルシウムサイクリングにおける重要な構成要素として筋小胞体ATPase

2a(sarcoplasmic calcium ATPase 2a; SERCA2a)とホスホランバン(phospholamban; PLN)があり、プロテインキナーゼとプロテインホスファターゼによる複雑な制御を受けている。³ この重要なプロテインキナーゼにはプロテインキナーゼAやカルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼ

II (calcium/calmodulin-dependent kinase II; CAMK II)が含まれる。プロテインホスファターゼは主にPP1、PP2A、PP2Bから成り、³ PP1の作用増強はPLNのリン酸化を減少させ、結果として成人心不全患者におけるカルシウムサイクリング非効率化につながることを報告されている。^{4,5} PP1の触媒サブユニットのアイソフォームは3つの異なった遺伝子から成り、PP1 α 、PP1 β/δ 、PP1 γ である。⁶

我々は以前にPP1が心筋細胞においてカルシウムサイクリングを司る筋小胞体に抑制的に働く最も重要なアイソフォームであることを示した。⁷ さらに、PP1抑制が細胞内カルシウムサイクリングを改善させ、心不全治療における重要な標的分子となり得ることも示されている。^{8,9} これまでにPP1の内因性阻害因子であるインヒビター1(INH-1c)またはインヒビター2(INH-2)の遺伝子導入実験において、心不全モデル動物の心機能が有意に改善し生存期間が延長した等という報告がなされている。^{8,10} さらに、我々は以前にAAV9ベクター-ショートヘアピンRNAを用い、拡張型心筋症様の病態を呈する遺伝子改変マウスにおいて、BNPプロモーターによって発現するPP1遺伝子抑制が心不全進行を軽減したことを示した。¹¹ 本研究では、心不全によって発現するPP1抑制が、より臨床に即した圧負荷心不全モデル動物においても同様の効果を示すかを検証した。

材料と方法

動物

全ての動物実験プロトコルは山口大学動物実験委員会の規約に準拠して作成した。動物の扱いについてはアメリカのNational Institutes of Health (NIH)の定めるガイド(the Guide for the care

and use of Laboratory Animals)に沿って行った。実験動物には九動株式会社(佐賀県)から購入した10週齢のC57/BL6Jマウスを使用した。

ショートヘアピンRNAを用いるためのAAV9ベクターの準備

先に述べたように、治療的遺伝子制御のためBNPプロモーターによってPP1 β shRNAがコードされるAAV9ベクターを実験に用いた。心不全にてPP1 β が抑制されていることを確認するマーカーとしてBNPプロモーターの3'側にEmGFPの配列を配した。AAV9ベクター

(AAV9-BNP-EmGFP-NCshRNA, AAV9-BNP-EmGFP-PP1 β shRNA)はペンシルバニア大学のvector core facilityにて作成された。

圧負荷心不全モデルマウスの作成

12週齢のマウスをケタミン(100mg/kg)とキシラジン(5mg/kg)の腹腔内注射および2-3%イソフルラン吸入麻酔にて鎮静し、気管挿管の上人工呼吸器管理を行った。胸部の第二肋間皮膚に小切開を加え、肋間を剥離した後大動脈弓を露出し大動脈弓結紮術(transverse aortic constriction; TAC)を施行した。¹² TACでは大動脈弓(腕頭動脈と左総頸動脈の間)と盲端化した27ゲージ針を一緒に4-0ナイロン糸にて結紮しその後素早く針を抜き取ることで大動脈弓の狭窄を作成した。TACの成否は左右の頸動脈の拍動の違いを確認することで行った。閉胸・抜管し、麻酔からの覚醒を確認した後補液のため生理食塩水を皮下注射(0.5ml/匹)、術後は不断給餌にて飼育を継続した。

生体内へのAAV9ベクターを用いた遺伝子導入と大動脈弓結紮術

10週齢C57/BL6Jマウス96匹にAAV9ベクターによる遺伝子導入を行った(図1)。図1Aに示すように48匹をランダムに二つのグループに割り当て、一方にはAAV9-BNP-EmGFP-NCshRNA配列(図2A)のベクター(n=24)を、もう一方にはAAV9-BNP-EmGFP-PP1 β shRNA配列(図2B)のベクター(n=24)を導入した。それぞれのマウスには一定濃度(4.0×10^{11} GC)のAAV9ベクター0.6mlを尾静注にて注入した。2週間後両グループのマウスに心エコー検査による心機能評価の後TAC手術を施行しその後も2週間毎に心機能評価を行った。TAC手術後4週間の時点で血行動態評価(n=6-8)と生化学的評価(n=14-15)を行った。9匹のマウスには生理食塩水尾静注と疑似手術(sham operation)を行い、コントロール標本として用いた。2週間毎の心機能評価には心臓超音波検査機(1.5MHzリニアプローブ使用 HDI-5000 SonoCT, フィリップス, オランダ)を用い、検査は1.5%イソフルラン吸入下で自発呼吸のある状態で行った。血行動態評価は、2%イソフルランによる吸入麻酔下に気管挿管を行い、右頸動脈から1Fミラーマイクロチップカテーテル(Millar

instruments ヒューストン テキサス州)を挿入し行った. カテーテル先端を左心室まで進め、左室圧から左室の最大および最小dP/dtと下降脚の時定数(time constant, Tau)を計測した.¹⁰

図1Bに示した様に、48匹のC57/BL6Jマウスをランダムに二つのグループに割り当て、一方には AAV9- BNP-EmGFP-NCshRNA配列のベクター (n=24)を、もう一方には AAV9-BNP-EmGFP-PP1βshRNA配列のベクター (n=24)を尾静注にて導入した. 導入2週間後にTACを施行し、12時間:12時間の明暗サイクル下で不断給餌にて7ヶ月間観察を継続しその生存率をみた.

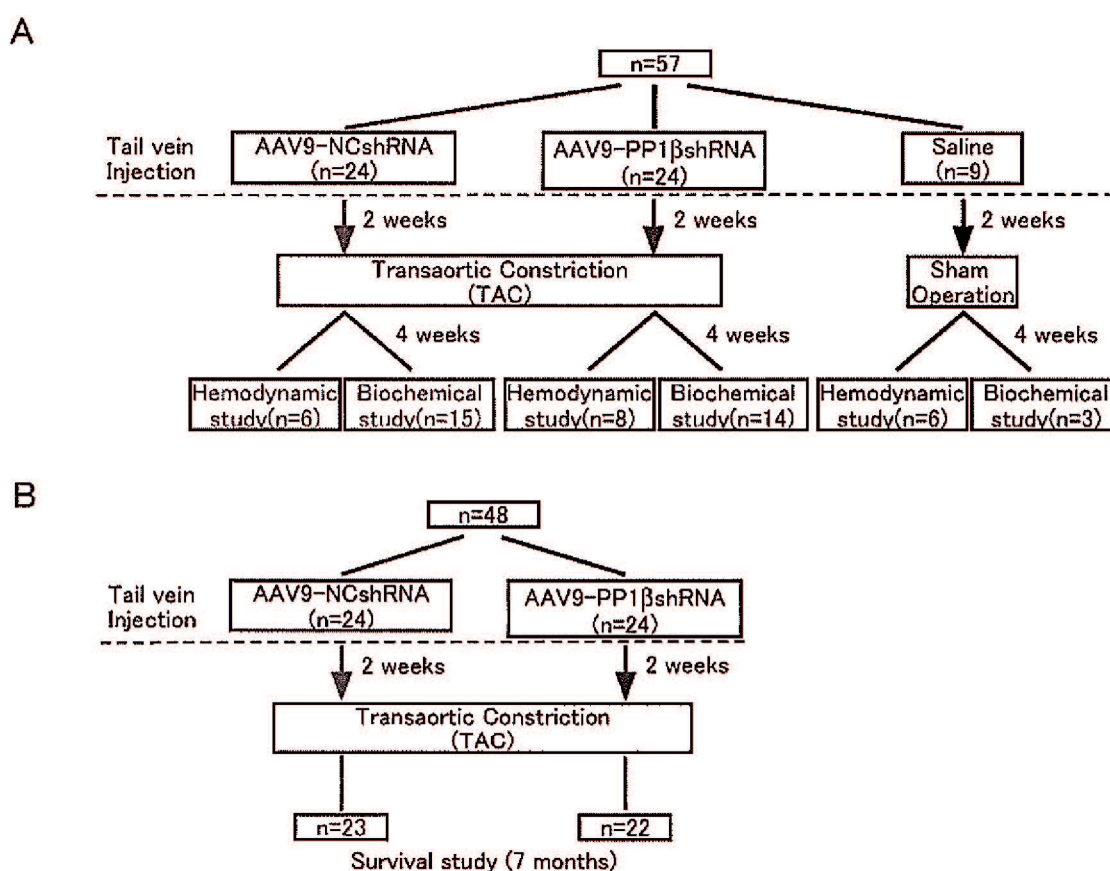


図1 実験デザイン (A) AAV9ベクターによって生体内に導入され、BNPプロモーターによって心不全特異的に発現するPP1β shRNAによる血行動態と生化学的変化を解析した. 遺伝子導入の陰性対照としてNCshRNA導入群を、TAC手術の陰性対照として疑似手術 (sham手術) 群を配した. (B) PP1β shRNA 導入群およびNCshRNA 導入群それぞれに関して、TAC手術後7か月間の生存率をみた.

心筋への遺伝子導入効率の解析

AAVを導入したモデルマウスの心筋を25mM Tris- HCl (pH 7.4)、50mM NaCl、300mM sucrose、1mM EDTA、1mM EGTA、50mM NaF、1mM Na₃VO₄、1% Nonidet P-40、0.5% deoxycholic

acid, 0.1% SDS, 0.02% 2-mercaptoethanol, 1% protease inhibitor cocktail (PIC)(Sigma, セントルイス ミズーリ州)が含まれたバッファーでホモジナイズした。¹⁰ 蛋白濃度はBradford法で定量し、その後LAS-4000(GE Healthcare, 東京都)を用いてイムノプロットティングと画像解析を行った。また、イムノプロットティングによりEmGFPの蛋白発現レベルを測定することでBNPプロモーター活性の指標とした。

AAVシャトルベクタープラスミドのプロモーター活性測定

AAV9ベクターが導入された心臓は、液体窒素によって予め冷やされたイソペンタンを用いて冷凍した。標本は-80℃で保存し切り出し標本を作成した。標本は2%パラフォルムアルデヒドとリン酸緩衝生理食塩水の溶液によって固定し、厚さ6μmで切り出しを行った。切り出された切片に抗GFP抗体(ab290, Abcam, ケンブリッジ イギリス)を用いて免疫染色を行った。その後、VECTASTAIN ABCキット(Vector Laboratories, バーリンガム カリフォルニア州)と3,3'-diaminobenzidine (DAB)を用いて染色を行った。

筋小胞体蛋白のリン酸化の解析

先に述べたバッファーを用いてホモジナイズされた心筋組織を用いて筋小胞体蛋白のリン酸化レベルを解析した。ホスホランバンの16番セリン、17番スレオニン、リアノジン受容体の2808番セリン、トロポニンIの22番と23番セリンのリン酸化レベルをそれぞれ測定した(全タンパク発現量により標準化を行った)。

抗体

以下に示す抗体は商業的に利用できる販売元から購入した。PP1β (ab16369, ab53315)とPLN (ab2865, clone 2D12)の抗体(Abcam, ケンブリッジ イギリス)、16番セリンがリン酸化したPP1β、ホスホランバン、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の抗体(Chemicon International, ビレリカ マサチューセッツ州)、17番スレオニンがリン酸化したホスホランバン、2808番セリンがリン酸化したリアノジン受容体2の抗体(Badrilla, リーズ イギリス)、リアノジン受容体2の抗体(clone C3-33: Sigma-Aldrich, セントルイス ミズーリ州)、SERCA2aの抗体(clone N-19: Santa Cruz Biotechnology, サンタクルス カリフォルニア州)、心筋トロポニンI、22番および23番セリンがリン酸化した心筋トロポニンIの抗体(clone 5E6: Genetex, サンアントニオ テキサス州)、GFPの抗体(ab290: Abcam)とprotein phosphatase regulatory subunit 12B (MYPT)の抗体(04-386, MerckMillipore, ダルムシュタット ドイツ)。ミオシン軽鎖2v(MLC2v)とリン酸化ミオシン軽鎖2vの抗体(pMLC2v)はフロリダ大学の笠原英子先生のご厚意で提供いただいた。

統計学的解析

2群間の比較はステューデントのt検定(Student's t-test)にて行った。また繰り返し測定を行った結果の比較には分散分析(ANOVA)を用い、その後の事後検定(post hoc test)としてステューデント=ニューマン=コイルス法(Student-Newman-Keuls method)を用いた。比較の結果、 p 値 <0.05 を有意差ありと判定し、結果は群平均 \pm 標準誤差で表記した。生存率の検定にはログランク検定(LogRank test)を用いた(SigmaPlot Ver.12.0 Systat Software Inc. サンホセ カリフォルニア州)。

結果

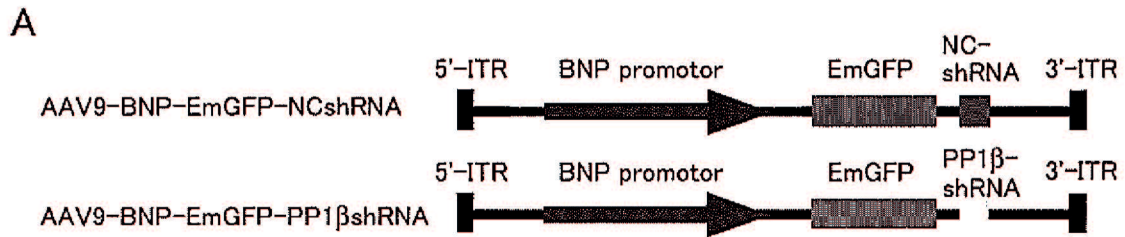
AAV9ベクターを用いた遺伝子導入のデザインを図1に示した。全てのマウスはAAV9ベクターの尾静注後生存した。プロトコルAでは遺伝子導入後の心臓に関して心機能と生化学的特性を評価した。TAC手術後AAV9-NCshRNA投与群とAAV-PP1 β shRNA投与群でそれぞれ3匹ずつ5日以内の死亡が認められた。コントロール群の生理食塩水尾静注とシ疑似手術群ではマウスの死亡は認めなかった。プロコルBではTAC手術後の生存率の評価を行った。TAC手術後1週間以内の死亡はいずれの治療群でも認められず、適切な手術と麻酔後覚醒が得られたと考えられた。

AAV9ベクターにより導入されたPP1 β shRNAによる部分的PP1 β 発現抑制

AAV9ベクター導入後の心臓では、切り出した標本の免疫化学染色により心筋細胞の核周囲にEmGFP陽性の染色が認められた(図2B)。染色の程度からはAAV9ベクターによる遺伝子導入とTAC術後の心臓においてEmGFPの発現がBNP依存性であることが示唆された。対照的に疑似手術後のマウスの心筋細胞ではEmGFP陽性の染色は認められなかった。圧負荷心不全モデルにおけるEmGFP発現は抗GFP抗体を用いた免疫ブロッティングでも確認された(図2B下段)。これらはこのAAVベクターがEmGFP発現カセットをマイクロRNAフラグメントと連結した部位に有していることによると考えられた。興味深いことにEmGFPの発現レベルはAAV9-NCshRNA投与群と比較してAAV9-PP1 β shRNA投与群で減弱していた。図2CにAAV9ベクターによる遺伝子導入後の心筋におけるPP1 β の発現レベルと免疫ブロッティングによる定量結果を示した。PP1 β の発現はAV9-NCshRNA投与群と比較してAAV9-PP1 β shRNA投与群で約15%の有意な減少が認められ、これらはBNPプロモーターにより発現したPP1 β shRNAがRNA干渉を介してPP1 β の発現を部分的に抑制したためと考えられた。

TAC術後AAV9-PP1 β shRNA投与群における左室収縮能・拡張能の改善

図3Aに示すようにAAV9-PP1 β shRNA投与群では、コントロール群と比較すると拡大が認められたが、AAV9-NCshRNA投与群と比較して有意な左室拡張期径と収縮期径の縮小が認められた。左室拡張期径と収縮期径の平均値においてもAAV9-PP1 β shRNA投与群ではAAV9-



B

	NCshRNA	PP1 β shRNA	Sham	AdV-CMV-GFP (Positive control)
Transaortic Constriction (TAC)	(+)	(+)	(-)	(-)
Promotor	BNP	BNP	(-)	CMV
Vector	AAV9-NCshRNA	AAV9-PP1 β shRNA	(-)	AdV

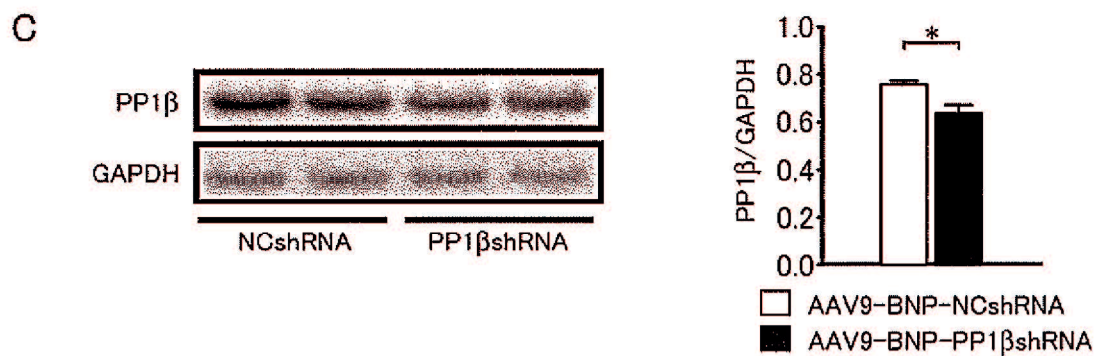
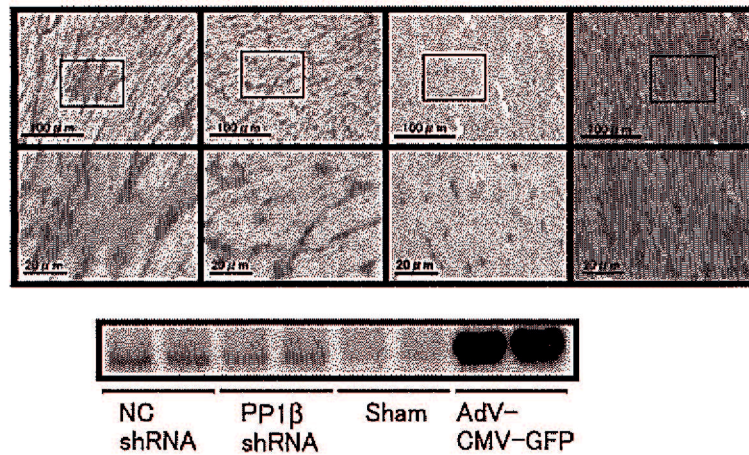


図2 (A) AAV9ベクターのデザイン. (B) AAV9-BNP-shRNAによって導入され発現したEmGFPの免疫組織化学染

色と免疫プロットティング。陽性対照としてアデノウイルスベクターを用いサイトメガロウイルスプロモーターにより GEPを発現させた心筋組織を用いた。(C) AAV9-PP1 β shRNA導入群およびAAV9-NCshRNA導入群でのマウス心筋におけるPP1 β 発現を示した免疫プロットティング解析。‘*’は $p < 0.01$ を示す。

NCshRNA投与群と比較して有意に小さく、この結果、TAC手術後2週間および4週間目における左室内径短縮率も有意に保たれていた(図3B)。

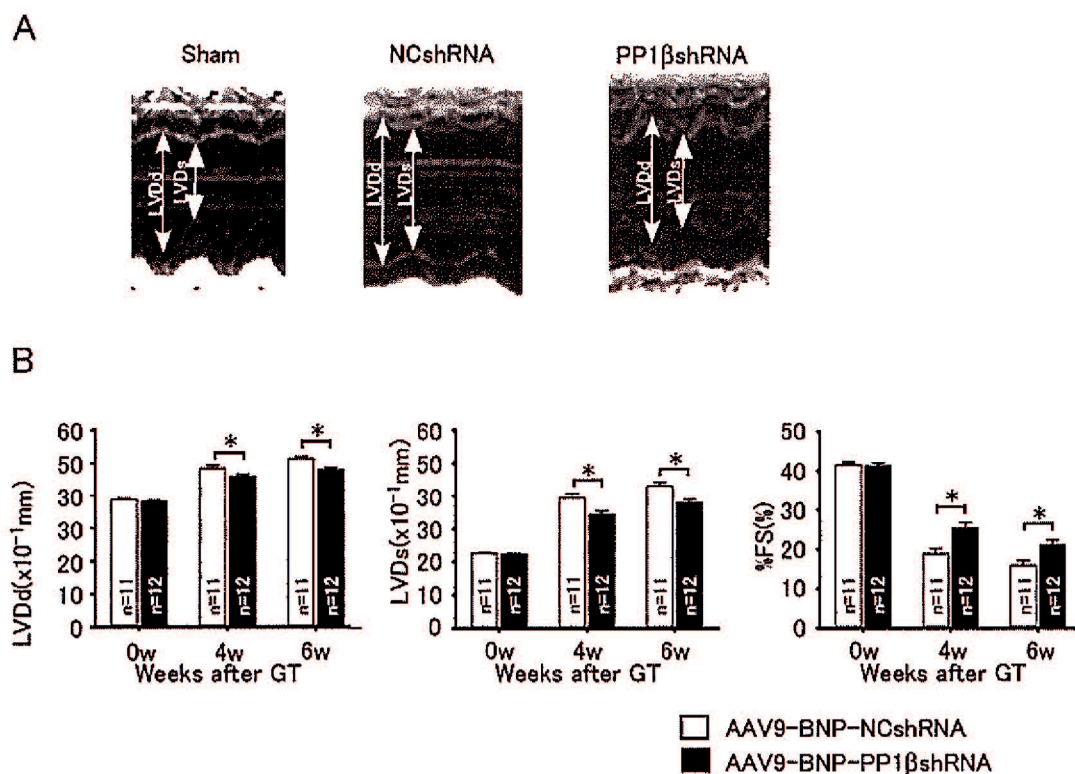


図3 (A) 心エコー検査法によるTAC手術1ヶ月後のsham手術群、AAV9-BNP-NCshRNA導入群、及び AAV9-BNP-PP1 β shRNA導入群での心収縮能の評価。(B) TAC手術前、術後2週間、4週間における左室拡張末期径、収縮末期径及び左室内径短縮率の比較。‘*’はAAV9-BNP-NCshRNA導入群に対して AAV9-BNP-PP1 β shRNA導入群で有意な改善がある($p < 0.01$)があることを示す。

図4Aに示すように、PP1 β shRNA投与群ではNCshRNA投与群と比較して有意に改善した左室圧波形パターンを認め、左室拡張末期圧の上昇、左室圧波形の一次微分から導かれる陽性/陰性dP/dtの振幅(それぞれ心臓の収縮能/拡張能と正の相関)の減少も軽減していた。一方、NCshRNA投与群では小さく鈍化した左室圧波形を示し、左室拡張末期圧の上昇が認められた。図4BにはPP1 β shRNA投与群において、コントロール群と比較すると劣っていたがNCshRNA投与群と比較して有意に高い左室圧、陰性dP/dt振幅と拡張末期圧の低下が認められたことを示した。また、陽性dP/dtの最大振幅について統計上有意差は認めなかったがPP β shRNA投与群で

改善する傾向が認められた。心拍数に関しては3群間で有意な差は認めなかった。これらの結果からPP1 β shRNA投与群の心臓では主に拡張能の改善が認められ、TAC手術後の圧負荷心不全における左室リモデリングに対して4週間の間は抑制的に働くことが示唆された。

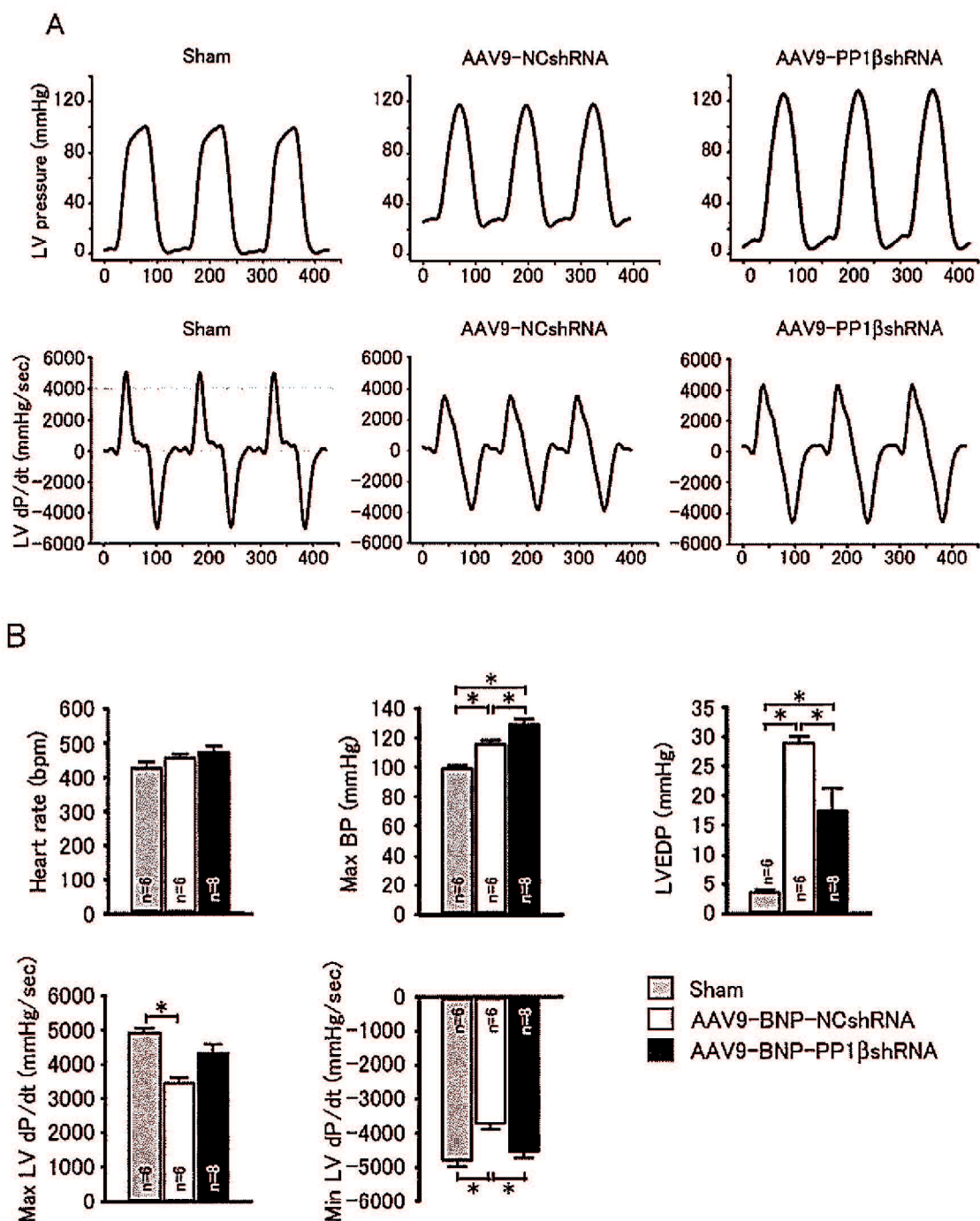


図4 (A) sham手術群、AAV9-BNP-NCshRNA導入群、及びAAV9-BNP-PP1 β shRNA導入群でのTAC手術後1ヶ月の左室圧波形及びdp/dt曲線。(B) 最高左室収縮期圧、左室拡張末期圧及び最高/最低dp/dtの比較。‘*’それぞれ有意差(p<0.01)があることを示す。

AAV9-PP1βshRNA投与群における生化学的指標の変化

図5に示すようにPP1βshRNAおよびNCshRNA投与群において、コントロール群と比較して体重によって均一化した心重量と肺重量は有意に増加していた。PP1βshRNA投与群ではNCshRNA投与群と比較して心重量、肺重量ともに有意な減少が認められた(図5A)。さらに、PP1βshRNA投与群ではBNP mRNA発現量がNCshRNA投与群と比較して有意に減少していた(図5B)。これらの結果からPP1βshRNA投与群においてTAC術後の心肥大と左室リモデリングが抑制されていることが示唆された。

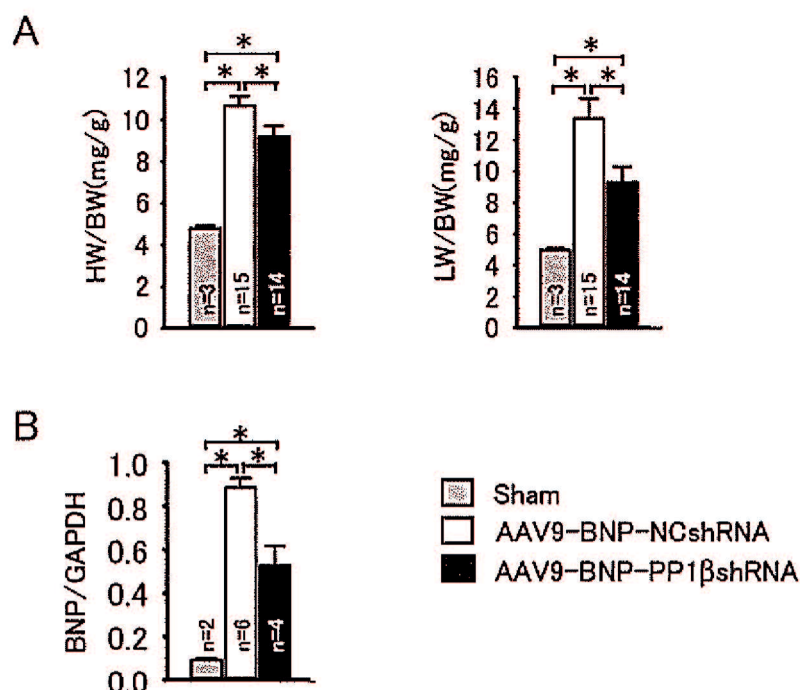


図5 (A) TAC術後一ヶ月での体重により標準化した心重量および肺重量の比較。PP1β shRNA導入群において陰性対照群と比較して有意に減少していた(HW/BW: 9.20±0.49 対 10.6±0.45 mg/g; p<0.05, LW/BW: 9.27±0.99 対 13.3±1.29 mg/g; p<0.05)。 (B) TAC術後1ヶ月でのsham手術群、AAV9-BNP-NCshRNA導入群、及びAAV9-BNP-PP1β shRNA導入群でのBNP発現量の比較。

‘*’はそれぞれ有意差(p<0.01)があることを示す。

ホモジナイズした心筋組織でのホスホランバンセリン16番セリンのリン酸化レベルは、PP1βshRNA投与群においてNCshRNA投与群と比較して有意に上昇していた(図6)。対照的にホスホランバン、リアノジン受容体の発現レベルやリアノジン受容体2808番セリンのリン酸化レベルに有意差は認められなかった。EmGFP発現レベルはNCshRNA投与群においてPP1βshRNA投与群と比較し

で増加する傾向が認められた。また、心筋トロポニンI、SERCA2a、GAPDHの発現レベルと心筋トロポニンI 22番および23番セリンのリン酸化レベルにも変化は認められなかった。PP1 β はミオシン軽鎖キナーゼと拮抗的に働きミオシン軽鎖のリン酸化にも関与していることが報告されており、我々はMLC2vのリン酸化レベルとMYPT蛋白発現レベルも併せて測定したが、PP1 β shRNA投与群において陰性コントロール群と比較していずれも有意な変化を認めなかった。

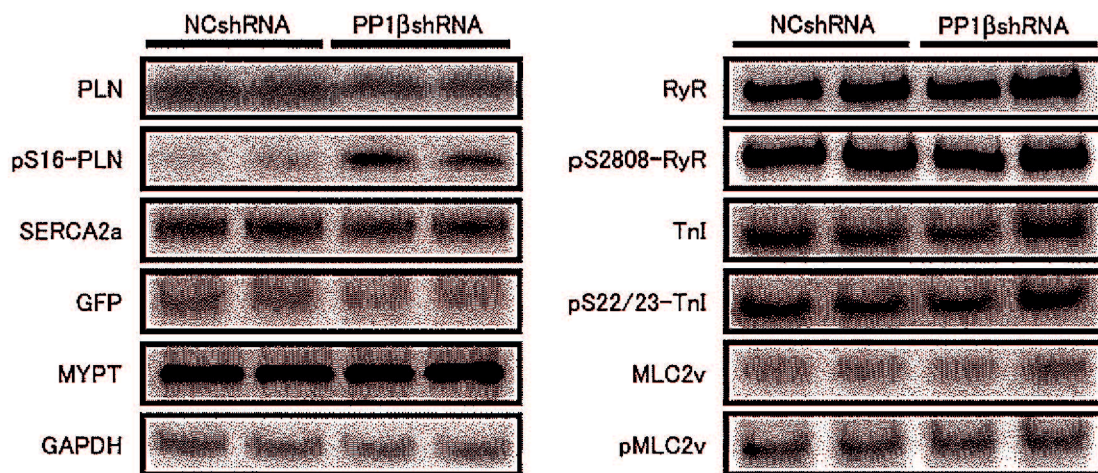


図6 リン酸化特異的抗体を用いたTAC手術後1ヶ月における心筋組織の免疫プロットティング。筋小胞体のリン酸化蛋白と心筋繊維蛋白についてリン酸化レベルを解析し、PP1 β shRNA導入群でPLNリン酸化の改善が認められた。

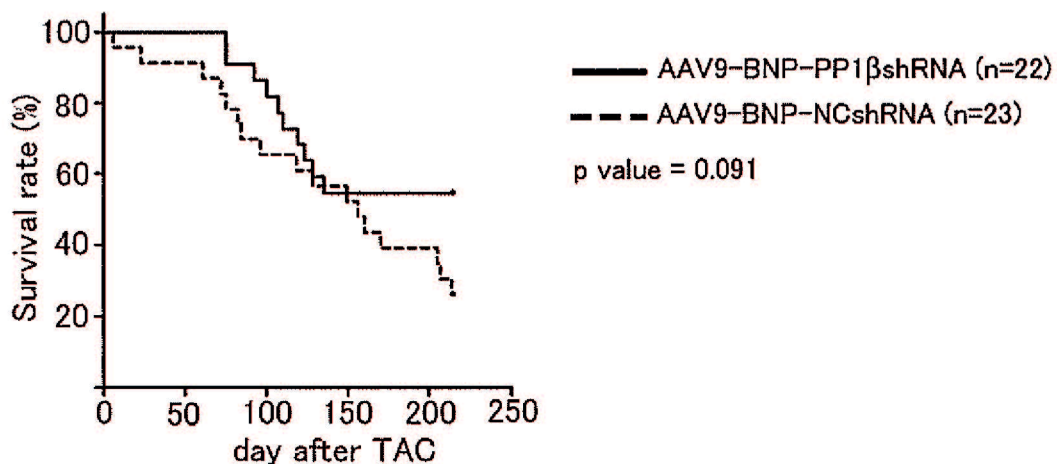


図7 生存率をLog-Lank曲線で示した。PP1 β shRNA導入群(n=22)ではNCshRNA(n=23)導入群と比較して延長する傾向は認められたが統計学的有意差を認めなかった(p= 0.09)。

生存率の解析では最初に示したようにTAC手術後のPP1 β shRNA投与群において改善する傾向は認められたが、7ヶ月間の観察期間において統計学的有意差は認めなかった(図7, $p=0.09$).

考察

PP1は心臓における主要なセリン/スレオニン脱リン酸化酵素として知られている。¹³ PP1活性の異常な増強が心不全の進行や、心筋細胞におけるSERCA2aの内因性抑制因子である筋小胞体のPLNリン酸化の障害に関与していることが示唆されている。⁴ よって心不全心筋において内因性抑制因子を標的としてPP1活性を修飾することが、筋小胞体に関与したリン酸化を適正化し、カルシウムサイクリングを改善する有効な治療方法であると考えられた。^{8,9,10,14} PP1には3つの触媒サブユニットのアイソフォームが存在(PP1 α 、PP1 β 、PP1 γ)し、90%の相同性があるもののいずれも別々の遺伝子によりコードされる。¹⁵ 我々は先の研究において、心筋細胞ではアイソフォームの中でもPP1 β が最も重要な役割を担っており、ホスホランバンのリン酸化を修飾することで筋小胞体のカルシウムサイクリングおよび心筋細胞の収縮性を制御することを報告してきた。⁷ また、PP1 β はMLC2vにおいて心筋フィラメントの脱リン酸化を制御することでミオシン軽鎖キナーゼのリン酸化をもたらし、心筋細胞の収縮性に関与していることも報告されている。^{16,17,18} MLC2vのリン酸化レベルはヒトおよび実験的心不全モデルにおいて低下していることが知られており、これらに関するリン酸化酵素と脱リン酸化酵素の不均衡が心筋フィラメントの収縮や心機能低下に重要な役割を果たしていると考えられる。^{16,19} 我々は以前の研究においてBNPプロモーターによって誘導されるPP1 β の発現抑制が拡張型心筋症類似心不全モデルマウス(MLP欠損マウス)における左室拡張能を改善し心不全進行を抑制したことを報告した。本研究において我々は、BNPプロモーターによって誘導されるPP1 β の発現抑制が心不全進行を抑制するという仮説をさらに検証するため、拡張型心筋症モデルより臨床に即していると考えられるTAC手術による圧負荷心不全モデルマウスを用いた実験を行った。我々はAAV9ベクターにより導入され、BNPプロモーターによって誘導されるPP1 β shRNA発現がTAC手術後の心不全マウスの左室収縮/拡張能を改善し、左室リモデリングの進行を術後1ヶ月の時点までの抑制したことを先に述べた。生化学的分析からこれらの収縮/拡張能の改善には、PLN16番セリンのリン酸化レベルの上昇とこれによる筋小胞体でのカルシウムサイクリングの増強が寄与していると考えられた。これらのデータはPP1 β が圧負荷心不全の心筋細胞の収縮および拡張における極めて重要な脱リン酸化酵素のアイソフォームであることを示している。また、これらのデータはPP1 β の発現を修飾することが心不全の病態において心臓の収縮能を改善させる有用な手段であることを示唆している。

しかしながらAAV9-PP1 β shRNAによる心不全モデルの治療は、7ヶ月間における観察期間での生存率を改善させる傾向を示したものの統計上有意な改善は得られなかった。この点について

我々は最新の知見も併せて考察した。Liuらは心臓特異的なPP1 β の発現抑制は、心筋繊維蛋白のリン酸化の変化を介した心筋細胞の収縮性増強には関与せず、病理学的に心筋肥大と繊維化につながったと報告している。

彼らはMLC2vの著明なリン酸化上昇を観測したが、PLNでは認めなかったと報告している。²⁰

我々の研究では、TAC手術後1ヶ月の時点でのPLNのリン酸化上昇を認めたが、MLC2vのリン酸化レベルの変化は認めなかった。そのためBNPプロモーターによるPP1 β 発現抑制がどれほど長期間にわたって効果を発現するかの評価のため7ヶ月間の生存率を確認した。我々の実験では長期間におけるPP1 β 抑制が心筋繊維リン酸化にどのような影響を及ぼすかの評価はできておらず、MLC2vやPLNのリン酸化についての評価もできていない。加えて、ホスホランパンとMLC2vのリン酸化が乖離した原因として実験アプローチの違いによるPP1 β の抑制の程度の違いがあるかもしれない。Luiらの実験ではPP1 β 遺伝子の発現をNKX2.5-Creコンビナーゼおよびタモキシフェン誘導型 α MHC-MerCreMerリコンビナーゼを用いることで完全に削除しているが、これに対して我々はBNP-PP1 β shRNAを用いて心筋特異的、心不全特異的な遺伝子導入アプローチによって1ヶ月の時点でPP1 β の発現を15%抑制している。一方、両研究とも、PP1 β はPP1の3つの触媒サブユニットアイソフォームのうち、心筋細胞収縮力を調整する最も重要なアイソフォームとしておりさらなる検証が望まれる。²⁰

本研究では臨床に適応するための限界があると考えている。我々がTAC手術に先立ってAAV9ベクターでの遺伝子導入を行っている。理由として先の研究でAAV9を尾静注した後治療的な遺伝子発現まで最低でも2週間を要するとされている。その一方で、27ゲージ針を用いたTAC手術は左室に対して強い圧負荷をかけ心肥大と左室リモデリングを進行させる。このため、遺伝子導入の効果を最大化し、PP1 β 抑制を分子標的とした効果を明確にするためには、上に示したAAV9ベクターの尾静注を用いたアプローチでは臨床に即していないと指摘を受けるかもしれない。

本研究の結論として、BNPプロモーターにより導入される、圧負荷心不全モデルにおけるPP1 β 発現の抑制は、1ヶ月間の短期間では新たな治療の分子標的となる可能性を秘めいていると考えられた。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導・ご助言を頂いた器官病態内科学 矢野雅文教授に深く感謝を申し上げます。また、指導教官としてご指導頂いた池田安宏先生に深謝申し上げます。実験に協力頂いた器官病内科学の多くの先生方、技師の方に、改めて感謝の意を表します。

参考文献

1. Ambrosy, A.P., Fonarow, G.C., Butler, J., Chioncel, O., Greene, S.J., Vaduganathan, M., et al.: The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from hospitalized heart failure registries. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 63(12): 1123-33, 2014
2. van Riet, E.E., Hoes, A.W., Wagenaar, K.P., Limburg, A., Landman, M.A. and Rutten, F.H.: Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review. *Eur. J. Heart Fail.*, 18(3): 242-52, 2016
3. Ikeda, Y., Hoshijima, M. and Chien, K.R.: Toward biologically targeted therapy of calcium cycling defects in heart failure. *Physiology (Bethesda)*, 23: 6-16, 2008
4. Huang, B., Wang, S., Qin, D., Boutjdir, M. and El-Sherif, N.: Diminished basal phosphorylation level of phospholamban in the postinfarction remodeled rat ventricle: role of beta-adrenergic pathway, G(i) protein, phosphodiesterase, and phosphatases. *Circulation research*, 85(9): 848-55, 1999
5. Neumann, J., Eschenhagen, T., Jones, L.R., Linck, B., Schmitz, W., Scholz, H., et al.: Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 29(1):265-72, 1997 (Epub 1997/01/01.)
6. Cohen, P.: The past and future of protein phosphatase research. *Methods Enzymol.*, 366: xlv-xlix, 2003
7. Aoyama, H., Ikeda, Y., Miyazaki, Y., Yoshimura, K., Nishino, S., Yamamoto, T., et al.: Isoform-specific roles of protein phosphatase 1 catalytic subunits in sarcoplasmic reticulum-mediated Ca(2+) cycling. *Cardiovasc. Res.*, 89(1): 79-88, 2011
8. Pathak, A., Del Monte, F., Zhao, W., Schultz, J.E., Lorenz, J.N., Bodi, I., et al.: Enhancement of Cardiac Function and Suppression of Heart Failure Progression By Inhibition of Protein Phosphatase 1. *Circulation research*, 96(7): 756-66, 2005
9. Fish, K.M., Ladage, D., Kawase, Y., Karakikes, I., Jeong, D., Ly, H., et al.: AAV9.I-1c delivered via direct coronary infusion in a porcine model of heart failure improves contractility and mitigates adverse remodeling. *Circ. Heart Fail.*, 6(2): 310-7, 2013
10. Yamada, M., Ikeda, Y., Yano, M., Yoshimura, K., Nishino, S., Aoyama, H., et al.: Inhibition of protein phosphatase 1 by inhibitor-2 gene delivery ameliorates heart failure progression in genetic cardiomyopathy. *FASEB. J.*, 20(8): 1197-9, 2006
11. Miyazaki, Y., Ikeda, Y., Shiraishi, K., Fujimoto, S.N., Aoyama, H., Yoshimura, K., et al.: Heart failure-inducible gene therapy targeting protein phosphatase 1 prevents progressive left ventricular remodeling. *PLoS One*, 7(4): e35875, 2012

12. Rockman, H.A., Ross, R.S., Harris, A.N., Knowlton, K.U., Steinhilber, M.E., Field, L.J., et al.: Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88(18): 8277-81, 1991
13. MacDougall, L.K., Jones, L.R. and Cohen, P.: Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur. J. Biochem.*, 196(3): 725-34, 1991
14. Nicolaou, P., Rodriguez, P., Ren, X., Zhou, X., Qian, J., Sadayappan, S., et al.: Inducible expression of active protein phosphatase-1 inhibitor-1 enhances basal cardiac function and protects against ischemia/reperfusion injury. *Circulation research*, 104(8): 1012-20, 2009
15. Cohen, P.T.: Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J. Cell Sci.*, 115(Pt 2): 241-56, 2002
16. Warren, S.A., Briggs, L.E., Zeng, H., Chuang, J., Chang, E.I., Terada, R., et al.: Myosin light chain phosphorylation is critical for adaptation to cardiac stress. *Circulation*, 126(22): 2575-88, 2012
17. Seguchi, O., Takashima, S., Yamazaki, S., Asakura, M., Asano, Y., Shintani, Y., et al.: A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. *J. Clin. Invest.*, 117(10): 2812-24, 2007
18. Chan, J.Y., Takeda, M., Briggs, L.E., Graham, M.L., Lu, J.T., Horikoshi, N., et al.: Identification of cardiac-specific myosin light chain kinase. *Circulation research*, 102(5): 571-80, 2008
19. Asakura, M., Kitakaze, M.: Global gene expression profiling in the failing myocardium. *Circ. J.*, 73(9): 1568-76, 2009
20. Liu, R., Correll, R.N., Davis, J., Vagnozzi, R.J., York, A.J., Sargent, M.A., et al.: Cardiac-specific deletion of protein phosphatase 1beta promotes increased myofilament protein phosphorylation and contractile alterations. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 87: 204-13, 2015