

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2012 年 03 月 12 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名： 焦 其彬 
指導責任者名： 南沢 享
所属部署名： 早稲田大学 職名：研究員
所在地： 東京都新宿区若松町 2-2 TWIns
電話：03-5369-7322 内線：

1. 助成金額： 600000 円

2. 研究テーマ

心房筋特異的遺伝子欠損法の開発と応用

3. 成果の概要

Cre リコンビナーゼが、心臓で心房筋に特異的に発現することが確かめられた。

Sarcoplin het と KO マウスの心機能や心房筋機能に異常がないことを証明した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・有(学会名・演題)

(2) 発表した論文 無・有(雑誌名・題名)

5. 指導責任者の意見(指導責任者がご記入・ご捺印ください)

焦 其彬研究員は真摯な態度と熱意をもって、本研究を精力的に推進した。

心房筋特異的に Cre 遺伝子を発現させることに成功し、今後、本マウスを

使って、心房筋特異的遺伝子欠損を生体で起こすことが可能になり、世界的

広く利用されることになるものを予測される。現在、論文も準備されており、

短期間に十分な成果を挙げる事が出来た。

指導責任者署名 南沢 享



収支報告

心房筋特異的遺伝子欠損法の開発と応用

研究者氏名： 焦 其彬
日本研究機関： 早稲田大学 先端生命医科学 研究員
指導責任者： 教授 南沢 享
共同研究者： 岩崎 清隆, 中井 岳

要 旨：

時空間条件付き遺伝子欠損法、いわゆるコンディショナルノックアウトは、非常に強力な分子生物学的研究手法であり、心臓研究においても、心筋特異的遺伝子欠損法により多くの新しい知見が得られている。しかしながら、心房筋特有の分化過程・機能・病態を調べる上で、心房筋特異的な遺伝子欠損法の開発は重要であるにも拘わらず、現在までその開発は進んでいない。我々の研究室では、筋小胞体膜蛋白のひとつで、筋小胞体カルシウムATPaseの活性を制御する sarcolipin が、心臓では心房筋に特異的に発現していることを利用し、sarcolipin 遺伝子座に Cre リコンビナーゼ遺伝子を挿入し、Cre リコンビナーゼ knockin-sarcolipin knockout マウスを作成することによって、心房筋特異的遺伝子欠損法を開発した。本研究では、本マウスを使って心房筋特異的遺伝子欠損を行うことの有用性を検証することを目的とする。

現在まで心房は心臓のポンプ機能の側面からは補助的な役割しかなく、そのために心房筋自体の発生・分化の過程や心室筋との機能的相違をもたらす分子機序に関しては十分に調べられてきたとはいえない。こうした基礎的検討が未熟なために心房に特有の病態解明に関しても不明な点が多く残されている。本研究によって、Cre リコンビナーゼ knockin-sarcolipin knockout マウスが、心房筋特異的な遺伝子欠除を生じさせるための分子道具として、利用されてゆけば、心房筋特有の分化過程・機能・病態の分子機序の解明に大きく貢献できると考えている。特に将来的には心房細動の分子機序の解明につなげてゆくことを目標としている。心房細動は臨床で、最も一般的に見られる不整脈であり、人口の約1%が罹患しているとされ、心房筋特有の病態である。このマウスを利用することで、心房筋特異的に各種のイオンチャネル欠損マウスの作成が可能となり、病態を詳細に解明し、新しい治療法の開発につなげてゆくことが出来るのではないかと考えている。

Key Words マウス, 心房筋, 遺伝子欠損法, 心機能, western blot

緒 言：

1 背景

組織特異的遺伝子発現を利用して、ある組織・器官に局限して目的の遺伝子を欠損させる技

術（時空間条件付き遺伝子欠損法）は、非常に強力な研究手法である。心臓研究においても、心筋特異的遺伝子欠損法により多くの新しい知見が得られている。しかし現在まで心房筋特異的な遺伝子欠損法の開発は進んでいない。心房筋と心室筋とは各々異なる構造及び機能特性を有し、心房細動など心房筋に特有な病態が存在する。心房筋特有の分化過程・機能・病態を調べる上で、心房筋特異的な遺伝子欠損法の実用化は必須である。我々は先行研究において、筋小胞体膜蛋白のひとつで、筋小胞体カルシウム ATPase の活性を制御する sarcolipin が、心臓では心房筋に特異的に発現していることを見出した (Minamisawa et al. J Biol Chem, 2003)。DNA マイクロアレイを用いた他の研究などによっても、sarcolipin の心房筋特異的な発現は確認されている (Circ Res 93:1193-201, 2003; Physiol Genomics 12:53-60, 2002)。心房、心室での収縮機能の相違をきたす大きな原因のひとつに筋小胞体でのカルシウム調節が重要であり、sarcolipin による筋小胞体カルシウム ATPase 制御が心房筋の収縮特性を特徴づけるのに重要な役割を果たしていることが示唆されている。そこで我々はハーバード大学 Chien 博士との共同研究のもと、sarcolipin 遺伝子座に Cre リコンビナーゼ遺伝子を挿入し、Cre リコンビナーゼ遺伝子が sarcolipin 発現部位に特異的に発現するような、Cre リコンビナーゼ knockin-sarcolipin knockout マウスを作成した。

2. 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

現在まで心房筋特異的な遺伝子欠損・導入法の実用化は進んでいないため、本研究において、Cre リコンビナーゼ knockin-sarcolipin knockout マウスの利用が心房筋特異的な遺伝子発現を行う方法として確立出来れば、世界で初めて利用可能なものを示すことになる。sarcolipin 以外にも心房筋特異的な発現を示すと考えられている分子はあるが、その殆どが心肥大や心不全などの疾患時に、心室筋への発現が増加する問題点を有している。例えば、心房性ナトリウム利尿ホルモン (ANF) は心房筋特異的に発現することが知られており、実際そのプロモーターはクローニングされ、発現実験に利用されている。しかし ANF は心肥大などストレスによって、心室筋に発現が誘導され、心負荷の分子マーカーとして利用されている。この点、sarcolipin はこうした病態時にも心室筋への発現は殆ど認められないため、心房筋特異性が極めて高く、心房筋特有の分化過程・機能・病態を調べるための分子道具として、利用価値が極めて大きいと考えられる。

さらに本研究において、Cre リコンビナーゼ knockin-sarcolipin knockout マウスの表現型を詳細に検討することによって、sarcolipin 分子自体の心房での役割を明らかにすることが可能となる。sarcolipin は筋小胞体カルシウム ATPase の活性を制御し、心房筋の収縮特性を特徴づけるのに重要な役割を果たしていることが想定されているが、sarcolipin が個体において、心房機能をいかに制御しているかに関しては、不明のままである。sarcolipin knockout マウスによる解析はその最も直截的な証明となると考えられる。

対象 と 方法 :

Cre リコンビナーゼ knockin-sarcolipin het と knockout マウスを使って心房筋特異的遺

伝子欠損を行うことの有用性を検証するため、以下の詳細な解析を行う。

1) Cre リコンビナーゼ knockin 効果の確認

我々の研究室では、既に Cre リコンビナーゼによる組換えによって、蛍光色素 YFP を発現するマウスを米国 Jackson 研究所から購入をしており、このマウスと Cre リコンビナーゼ knockin-sarcolipin knockout マウスとを掛け合わせて、心臓発生段階における心房筋での YFP 発現時期とその様式を詳細に観察する。これによって、心房発生のどの時期から、sarcolipin が発現し、心房特異的な遺伝子欠損が可能となるのかを検証する。

2) sarcolipin ヘテロ欠損による心機能への影響の有無

野生型マウスと比較して、sarcolipin ヘテロマウスでの心機能や心房筋機能・心房形態に異常がないかを調べる。すなわち、本マウスを心房筋特異的遺伝子欠損を生じさせるために使用する場合、一方の遺伝子座は少なくとも sarcolipin ヘテロ欠損となる。従って、sarcolipin ヘテロ欠損によって、既に心房筋に異常を生じてしまうと、本マウスを心房筋特異的遺伝子欠損法を行うための分子道具として使用するには大きな制約が生まれてしまう。そこで平成 22 年度においては、生物学研究法によって、sarcolipin ヘテロマウスでの心機能や心房筋機能・心房形態に異常がないかを調べる。

結 果：

1. 心室と心房筋の重量

普通マウスと sarcolipin 遺伝子欠損マウスの左心室、右心室、左心房、右心房の重量一体重比が変化していない。

2. 心機能

普通マウスと sarcolipin 遺伝子欠損マウスの心機能指標 (FS) は変化がしていない。心室壁の厚さも変化がない。

3. 心肥大

sarcolipin 遺伝子欠損マウスの心肥大の指標 (ANP, BNP, MHC) の発現が増加していない。

4. Ca²⁺ ハンドリング蛋白の変化

sarcolipin 遺伝子欠損マウスでは SERCA2, PLN, RyR2, CSQ、NCX1 等の Ca²⁺ ハンドリング蛋白の変化を認められない。

5. テレメトリー解析

sarcolipin 遺伝子欠損マウスでは交感神経と副交感神経の指標 (LF, HF, SDNN 等) が変わっていない。

考 察 :

本研究の結果から見ると、若時時期には sarcolipin 遺伝子欠損マウスでは心機能が変わっていないことが分かりましたが、高齢になったら、心機能が変わるかどうか、まだ分からない状態になっている。将来は18月の高齢マウスを用いて、sarcolipin 遺伝子欠損マウスの心房筋特有の機能・病態を調べることを考えている。

参考文献 :

1. Minamisawa S, Wang Y, Chen J, Ishikawa Y, Chien KR, Matsuoka R. Atrial Chamber-specific Expression of Sarcolipin Is Regulated during Development and Hypertrophic Remodeling. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14;278(11):9570-5.
2. Shanmugam M, Molina CE, Gao S, Severac-Bastide R, Fischmeister R, Babu GJ. Decreased sarcolipin protein expression and enhanced sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ uptake in human atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jun 24;410(1):97-101. Epub 2011 May 25.
3. Shanmugam M, Gao S, Hong C, Fefelova N, Nowycky MC, Xie LH, Periasamy M, Babu GJ. Ablation of phospholamban and sarcolipin results in cardiac hypertrophy and decreased cardiac contractility. *Cardiovasc Res.* 2011 Feb 1;89(2):353-61. Epub 2010 Sep 10.
4. Jiao Q, Takeshima H, Ishikawa Y, Minamisawa S. Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity. *Cell Calcium.* 2012 Jan;51(1):31-9. doi: 10.1016/j.ceca.2011.10.003. Epub 2011 Nov 25.
5. Jiao Q, Bai Y, Akaike T, Takeshima H, Ishikawa Y, Minamisawa S. Sarcalumenin is essential for maintaining cardiac function during endurance exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Aug;297(2):H576-82. Epub 2009 Jun 5.

作成日 : 2012 年 3 月 12 日