

プロテオーム解析を用いたアンジオテンシン II
による不全心形成の分子機構の解明

課題番号 15590736

平成 15 年度～平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）研究成果報告書

滋賀医科大学附属図書館



2004011527

平成 17 年 6 月

研究代表者 和田 厚 幸
(滋賀医科大学 医学部 講師)

ゲノム解読が行われても、単一遺伝子異常が病気を引き起こしてくるのは 2%程度であり、残り 98%は環境因子や伝染性因子等の諸因子の影響をうけて発症してくる。特に心不全の形成にはレニン-アンジオテンシン系や 交感神経系といった多くの血管作動物質の活性化、その受容体、情報伝達系の変化が複雑に絡み合い、一分子だけで病態を意義づけるのは困難で、生物学的な解析をするためには、多数のタンパク質を一度に解析することが重要である。遺伝子の発現は mRNA レベルとタンパク質レベルの両面から検討されてきたが、トランスクリプトーム研究を中心とした mRNA での検討ではメッセージの多寡をみてはいるものの、必ずしも実際の発現タンパク質の量を表しているわけではない。現に肥大のシグナルにおいても、多数の情報伝達系に転写時あるいは翻訳後修飾（リン酸化、アセチル化、グリコシル化など）が起こり、既存の方法ではその不全心形成への分子生物学的な機序の解明は十分であるとは言えない。今回我々は、不全心筋で特異的あるいは有意に発現変化するタンパク質を探索する方法としてプロテオーム解析によるディファレンシャル ディスプレーを取り入れて以下の点について検討を行った。

1) 高頻度右室ペーシングにて作製した心不全イヌ筋と正常心筋との比較を通して、プロテオーム解析による不全心での発現タンパク質のスクリーニングを行う。この手法での 2 次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて一度に数百のタンパク質の発現を検証し、心不全の病態形成過程において、肥大や線維化、心筋保護に関係する細胞活性調節のカギとなるタンパク質の同定を MALDI/TOF-MS による質量分析にて行う。

2) 心不全関連たんぱく質の同定に引き続いて、それらの機能発現に重要な意味を持つ翻訳後修飾の一形式であるリン酸化について、特異的抗リン酸化抗体を用いて Western blot analysis を行い、発現様式の違いを正常心との比較にて行う。さらにセリン残基のリン酸化部位の同定も行い、実際のたんぱく質レベルでの変化の実態、シグナル伝達路をとらえ、新たな心不全の病態の指標や治療の新たな標的たんぱく質の検索を試みる。

研究組織

研究代表者： 和田 厚幸 （滋賀医科大学 医学部 講師）

研究分担者： 磯野 高敬 （滋賀医科大学 医学部 助教授）

（研究協力者： 道家智博、 松本武洋、 高山智行、 山本孝、 蔦本尚慶）

交付決定額 （配布額）

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	2,700		2,700
平成16年度	800		800
総計	3,500		3,500

研究発表

(1) 学会誌

1. Matsumoto T, Wada A, Tsutamoto T, Ohnishi M, Isono T, Kinoshita M.
Chymase Inhibition Prevents Cardiac Fibrosis and Improves Diastolic Dysfunction in the Progression of Heart Failure.
Circulation. 2003. 107; 2555-2558
- 2: Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, Tsutsui T, Ishii C, Ohno K, Fujii M, Taniguchi A, Hamatani T, Nozato Y, Kataoka K, Morigami N, Ohnishi M, Kinoshita M, Horie M.
Immediate Administration of Mineralocorticoid Receptor Antagonist Spironolactone Prevents Post-Infarct Left Ventricular Remodeling Associated With Suppression of a Marker of Myocardial Collagen Synthesis in Patients With First Anterior Acute Myocardial Infarction.
Circulation. 2003. 107; 2559-2565
- 3: Tsutamoto T, Wada A, Hayashi M, Tsutsui T, Maeda K, Ohnishi M, Fujii M, Matsumoto T, Yamamoto T, Takayama T, Ishii C, Kinoshita M.
Relationship between transcardiac gradient of endothelin-1 and left ventricular remodeling in patients with first anterior myocardial infarction.
Eur Heart J. 2003. 24(4):346-55.
- 4: Yamamoto T, Wada A, Tsutamoto T, Ohnishi M, Horie M
Long-term treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor improves pulmonary hypertension secondary to heart failure through enhancing the natriuretic peptides-cGMP pathway.
J Cardiovasc Pharmacol. 2004. 44(5): 596-600
- 5: Takayama T, Wada A, Tsutamoto T, Ohnishi M, Fujii M, Isono T, Horie
Contribution of vascular NAD(P)H oxidase to endothelial dysfunction in heart failure and the therapeutic effects of HMG-CoA reductase inhibitor.
Circ J. 2004. 68(11): 1067-75:

(2) 口頭発表

平成 15 年度

- 1: Atsuyuki Wada, Masato Ohnishi, Takehiro Matsumoto, Masanori Fujii, Takashi Yamamoto, Tomoyuki Takayama, Tomohiro Dohke, Takayoshi Tsutamoto, Minoru Horie.
Heart chymase inhibition improves left ventricular diastolic dysfunction in heart failure via modification of nitric oxide release and Ca²⁺ handling
American Heart Association Annual Scientific Session, 2003, General Session
- 2: Masato Ohnishi, Atsuyuki Wada, Takehiro Matsumoto, Masanori Fujii, Takashi Yamamoto, Tomoyuki Takayama, Tomohiro Dohke, Chitose Ishii, Keijin Ohno, Minoru Horie
Enhanced endogenous bradykinin under chronic angiotensin-converting enzyme inhibition improves renal function in congestive heart failure.
American Heart Association Annual Scientific Session, 2003, General Session
- 3: Tomoyuki Takayama, Atsuyuki Wada, Masato Ohnishi, Masanori Fujii, Takehiro Matsumoto, Takashi Yamamoto, Tomohiro Dohke, Chitose Ishii, Keijin Ohno, Takayoshi Tsutamoto, Minoru Horie
HMG-CoA reductase inhibitor improves left ventricular diastolic function via modification of NADPH oxidase and NO system in heart failure.
American Heart Association Annual Scientific Session, 2003, General Session
- 4: Takehiro Matsumoto, Atsuyuki Wada, Masato Ohnishi, Takayoshi Tsutamoto, Masanori Fujii, Takashi Yamamoto, Tomoyuki Takayama, Tomohiro Dohke, Chitose Ishii, Keijin Ohno, Minoru Horie
ACE independent chymase pathway plays an important role in water and sodium balance and renal organ injury in heart failure.
American Heart Association Annual Scientific Session, 2003, General Session
- 5: Atsuyuki Wada, Takehiro Matsumoto, Chitose Ishii, Keijin Ohno, Masanori Fujii, Masato Ohnishi, Minoru Horie
Relationship between transcardiac gradient of endothelin-1 and left ventricular remodeling in patients with first anterior myocardial infarction
5th International Congress on Coronary Artery Disease, 2003, General Session

- 6: Takashi Yamamoto, Atsuyuki Wada, Masato Ohnishi, Takayoshi Tsutamoto, Masanori Fujii, Takehiro Matsumoto, Tomoyuki Takayama, Tomohiro Dohke, Minoru Horie
Chronic phosphodiesterase type 5 inhibition reduces vascular resistance via amplifying both Nitric oxide-cGMP and natriuretic peptides-cGMP pathways in heart failure.
第 67 回 日本循環器学会総会・2003、一般
- 7: Takehiro Matsumoto, Atsuyuki Wada, Masato Ohnishi, Takayoshi Tsutamoto, Masanori Fujii, Takashi Yamamoto, Tomoyuki Takayama, Tomohiro Dohke, Minoru Horie
Heart chymase inhibition improves left ventricular diastolic dysfunction via modification of nitric oxide release and Ca²⁺ handling.
第 67 回 日本循環器学会総会・2003、一般
- 8: Takayoshi Tsutamoto, Masaru Hayashi, Atsuyuki Wada, Masato Ohnishi, Chitose Ishikawa, Keijin Ohno, Takashi Yamamoto, Tomoyuki Takayama, Tomohiro Dohke, Minoru Horie
Spironolactone prevents post-infarct ventricular remodeling with suppression of myocardial fibrosis in patients with first anterior acute myocardial infarction.
第 67 回 日本循環器学会総会・2003、一般
- 9: Tomohiro Dohke, Atsuyuki Wada, Masato Ohnishi, Masanori Fujii, Takehiro Matsumoto, Takashi Yamamoto, Tomoyuki Takayama, Takashi Tsutsui, Chitose Ishii, Takayoshi Tsutamoto, Minoru Horie
Chymase inhibition improves cardiac diastolic dysfunction in the progression of heart failure.
第 67 回 日本循環器学会総会・2003、一般
10. Takehiro Matsumoto, Atsuyuki Wada, Masato Ohnishi, Takayoshi Tsutamoto, Masanori Fujii, Takashi Yamamoto, Tomoyuki Takayama, Tomohiro Dohke, Minoru Horie.
Chronic chymase inhibition prevented cardiac fibrosis and improved diastolic dysfunction in the progression of heart failure.
第 7 回日本心不全学会総会学術集会、2003、一般

平成 16 年度

1. Cardiac Mast Cell Chymase Plays a Significant Role in the Progression of Cardiac Remodeling via Collagen Accumulation
Atsuyuki Wada
Symposium 69th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
March 20, 2005
2. Takayama T, Wada A, Fujii M, Yamamoto T, Dohke T, Matsumoto T, Tsutamoto T, Horie M.
Myocardial NADPH oxidase is a major source of reactive oxygen species in heart failure.
American Heart Association 2004. 11. 07 New Orleans
3. Chronic chymase inhibition prevented cardiac fibrosis and improved diastolic dysfunction in the progression of heart failure.
Takehiro Matsumoto, Atsuyuki Wada, Minoru Horie
a Symposium of DEFINING THE TARGETS FOR TREATMENT OF HEART FAILURE at the XVIII World Congress of the International Society for Heart Research 2; and the 52nd Annual Scientific Meeting of the Cardiac Society of Australia and New Zealand
August 9th, 2004
- 4: Ohno K, Tsutamoto T, Ishikawa C, Sakai H, Tsutsui T, Hayashi M, Wada A, Horie M.
Relationship between the transcardiac increase of plasma heart-type fatty acid-binding protein and left ventricular remodeling in patients with dilated cardiomyopathy.
American College of Cardiology(2004. 03. 07-10 New Orleans).
- 5: Tomohiro Dohke, Atsuyuki Wada, Masato Ohnishi, Masanori Fujii, Takehiro Matsumoto, Takashi Yamamoto, Tomoyuki Takayama, Takayoshi Tsutamoto, Minoru Horie
Proteome analysis of myocardial protein expression in heart failure.
第 6 8 回日本循環器学会総会、2004
- 6: Tomoyuki Takayama, Atsuyuki Wada, Masato Ohnishi, Masanori Fujii, Takehiro Matsumoto, Takashi Yamamoto, Tomohiro Dohke, Keijin Ohno, Chitose Ishii, Hiroshi Sakai, Takayoshi Tsutamoto, Minoru Horie
The activity and expression of myocardial NADPH oxidase are increased in heart failure.

第 68 回日本循環器学会総会、2004

7: Dohke T, Wada A, Tsutamoto T, Fujii M, Yamamoto T, Takayama T, Matsumoto T, Horie M.

Proteome analysis reveals the significant alternations of cardiac small heat shock proteins expression in heart failure.

第 8 回日本心不全学会学術集会

8: 大西正人、道家智博、和田厚幸

プロテオーム解析を用いたアンジオテンシン? による不全心形成の分子機構の解明.

第 12 回分子循環器研究会講演会

研究成果

心不全の病態形成が単一の因子で形成されることはないという事実から、不全心での特異的発現タンパク質を網羅的に探索することが重要であると考えられる。我々は頻拍誘発性心不全イヌモデルを用いて、不全心筋組織でのタンパク質発現を正常心筋と比較し、特異的発現タンパク質の同定を行った。2次元 gel 上に約 500 個のたんぱく質スポットを確認した。不全心にて 20 タンパク質スポットが正常心と比して変化しており、その内 14 スポットが発現増加、6 スポットが低下していた。特に発現変化の大きい 9 スポットについて 2DE/MALDI-TOF MS によるプロテオームプロファイリング、質量分析データベース解析を行った。その結果 alpha B-crystallin や small heat shock protein (HSP)27、HSP20 が不全心にて有意に増加していることを同定した。またミトコンドリア、エネルギー代謝に関連する myoglobin, fatty acid-binding protein, cytoskeletal protein の一つである tropomyosin-alpha chain の発現低下を同定した。alpha B-crystallin、HSP27、HSP20 が同じ small heat shock protein 群に属することより、今回我々は small heat shock protein の発現に注目し、翻訳後修飾の一つであるリン酸化について更なる検討を加えた。それら small heat shock protein は心不全においては本来の native form ではなく、リン酸化したものが有意に増加しており、alpha B-crystallin に関して言えば、59 番目のセリンのリン酸化型、HSP27 では 47、62 番目のセリンのリン酸化型が心不全で有意に増加していた。以前に転写後リン酸化修飾を受けることで、small HSP は抗アポトーシス作用等の心保護作用を発揮することが報告されており、心不全においても抗アポトーシス作用にそれらたんぱく質が関連している可能性がある。small heat shock protein は High molecular HSP とは異なり、慢性の心不全状態で発現していることから、慢性心不全の病態形成に特別な働きをしていることが示唆される。今後これらのたんぱく質の発現をヒト心筋レベルで検証したり、また血液中濃度の測定を試みることで、心不全重症度の新たな指標となりうるか検討してゆきたい。

これら成果の一部を添付した論文にても報告する。