

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07046

研究課題名(和文)カベオラ関連タンパクを介する圧負荷心不全時心臓線維化の病理機序の解明

研究課題名(英文)Pathological mechanism of cardiac fibrosis via caveolae-related proteins in pressure-loaded heart failure

研究代表者

小形 岳寛(Ogata, Takehiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10402877

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文):筋線維化におけるCavin-2の関与を調査するために、全身性Cavin-2遺伝子欠損マウスと線維芽細胞特異的Cavin-2遺伝子欠損マウスの2種類のマウスを作製した。これらのマウスは発育および成長において異常は観察されなかったが、横行大動脈狭窄による左室圧負荷心不全モデルマウスでは心臓線維芽細胞のCavin-2の欠失により心筋線維化の顕著な抑制と心機能障害の抑制がみられた。心臓線維芽細胞はTGF- β 1刺激により筋線維芽細胞に分化しコラーゲン線維の産生と沈着を促進するが、マウス胚性線維芽細胞でCavin-2を欠させるとTGF- β 1誘導性の筋線維芽細胞への分化とコラーゲン産生が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全における心臓線維化は心機能に負の影響を及ぼす。線維化の制御は患者の予後改善に重要である。線維化を抑制するため、これまでにTGF- β 1受容体の阻害薬を使った治療が提案されているが過度な線維化抑制による心破裂など負の影響が懸念されている。本研究でCavin-2をターゲットにした線維化制御は生理的役割を損なうことなく線維化を抑制できる可能性が示された。本研究結果は、カベオラ関連線維化シグナルの制御による心不全治療のための基礎基盤の構築に貢献するものとする。

研究成果の概要(英文):To investigate the involvement of Cavin-2 in cardiac fibrosis, we generated two types of mice: systemic Cavin-2 knockout mice and fibroblast-specific Cavin-2 knockout mice. No abnormalities were observed in the development and growth of these mice. However, in a mouse model of left ventricular pressure-overloaded heart failure due to transverse aortic constriction, Cavin-2 deletion in cardiac fibroblasts resulted in marked suppression of myocardial fibrosis and cardiac dysfunction. Cardiac fibroblasts differentiate into activated myofibroblasts and promote collagen production and deposition upon TGF- β 1 stimulation. Cavin-2 deletion in mouse embryonic fibroblasts suppressed TGF- β 1-induced differentiation into myofibroblasts and collagen production.

研究分野：循環器疾患の基礎研究

キーワード：心臓線維化 心不全 線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 医療の発展にも関わらず、心不全の予後は不良であり、新しい機序に基づいた心不全治療の開発が求められている。心不全治療のターゲットは複数考えられるが、心臓線維化も重要な治療ターゲットの1つである。心臓線維化は圧負荷や心筋傷害に対する代償反応であるが、不全状態にある心臓では心筋細胞傷害とともに心臓線維化が高頻度で進行し、拡張不全と収縮不全、どちらのタイプの心不全の悪化にも強く関係する。しかしながら、心臓線維化をコントロールする治療法は現在もなお確立されていない。心臓線維化を理想的に制御することが出来れば心不全での心臓機能障害を最小限に留めることが可能になるかもしれない。

(2) カベオラ(Caveola)は細胞膜上の微小陥入構造物である。カベオラの構造的特徴から細胞膜上に存在する受容体やイオンチャンネルが局在している。カベオラの陥入構造は、Caveolin と Cavin というカベオラ関連タンパクにより決定されている。この2種類のタンパクはカベオラ構造を形成するための構造タンパクとしての役割だけでなく、様々なシグナル関連分子と関連する受容体とが密な複合体を形成するための機能タンパクとしての役割も持っていることが明らかになってきた。我々のグループでも2008年に筋特異的カベオラ関連タンパク MURC/Cavin-4 を単離同定し報告したことをきっかけに、Cavin タンパクからみた筋細胞におけるカベオラ関連タンパクの機能的役割について研究、報告してきた(-)。線維芽細胞や内皮細胞では SDPR/Cavin-2 という Cavin タンパクが非常に多く発現していることが以前から知られていたが、Cavin-2 が線維芽細胞においてどのような役割を持っているかについては、これまで報告がない。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、圧負荷心不全で起こる心臓線維化でカベオラ関連タンパク Cavin-2 が果たす役割を解明し、心不全における線維化の病態解明を進展させることである。心不全における線維化の制御機構を、カベオラ関連タンパクの機能から明らかにしようとするというアプローチはこれまで研究されておらず、本研究により、カベオラ関連線維化シグナルの制御による「心不全」に対する新たな治療法確立のための研究基盤を構築することを目指す。

3. 研究の方法

(1) まず、Cavin-2 遺伝子全身欠損マウスを作成し、横行大動脈縮窄(TAC)術後の心臓線維化と心機能の変化について多角的に評価を行った。具体的には、心エコーや組織標本を使って形態学的、組織学的な評価、RT-qPCR による線維化関連マーカー遺伝子、心不全マーカー遺伝子発現の評価し、形質転換を促進するシグナルタンパクの活性や局在にどのような変化があるかも含め Western blotting、免疫染色による評価を行い、心筋線維化抑制、心不全抑制の効果を多角的に評価した。さらに、得られた結果が心臓内の線維芽細胞により起こっている変化かどうかを評価するため、さらに Postn-Cre マウスと SDPR^{fllox/fllox} マウスの交配による線維芽細胞特異的 Cavin-2 遺伝子欠損マウスを作成し、同様の評価を行った。

(2) 線維芽細胞は α SMA を発現する筋線維芽細胞へ形質転換することにより増殖能・遊走能の亢進、コラーゲンを含む細胞外マトリックス産生亢進により線維化を促す。Smad2/3、p38MAPK、PI3K/Akt/mTOR、Rho/ROCK/SRF など線維芽細胞が筋線維芽細胞に形質転換する際のシグナルはいくつか知られているが、このシグナルが活性化する際は受容体を含むシグナル関連タンパク同士が一時的に複合体を形成していると考えられる。過去の Cavin 研究から、Cavin-2 も他の Cavin タンパクと同様、足場タンパクとしてシグナル複合体形成に関わっていることが予想されたことから、この仮説を検討するためにマウス胎児線維芽細胞(MEF)を使って筋線維芽細胞への形質転換能に対する Cavin-2 の役割を解析することとした。Cavin-2 遺伝子欠損マウスから採取したマウス胎児線維芽細胞(MEF)に TGF- β 1 刺激を行い、 α SMA 遺伝子発現変化をみることにより筋線維芽細胞への分化のし易さと同時に関与するシグナルについて評価し、その後の遊走能・コラーゲン産生能にも Cavin-2 が関与するかも評価した。さらに、ビオチンリガーゼを使用したタンパク質間相互作用スクリーニングである BioID 法を用いて Cavin-2 と相互関係を持つ分子を可視化し、線維芽細胞内における Cavin-2 の役割の解明を試みた。

4. 研究成果

(1) Cavin-2 全身欠損マウスや線維芽細胞特異的 Cavin-2 欠損マウス(Postn-Cre; SDPR^{fllox/fllox})

は出産、発育は正常で負荷しない状態では正常対照群との間に差はみられなかった。しかし、TAC の 4 週間後の Cavin-2 全身欠損マウス心臓は、対照と比較して左心室の短縮率 (LVFS) が維持され、心筋の線維化が著しく減少した。線維芽細胞特異的 Cavin-2 欠損マウスでも TAC4 週間後の心臓を評価したところ、全身欠損マウスの時と同様、LVFS の維持と心筋線維化の著しい減少がみられ、線維化関連遺伝子の mRNA 発現や I 型コラーゲンの沈着も有意に減少していた。線維芽細胞が活性化し筋線維芽細胞に分化すると α -平滑筋アクチン (α SMA) を発現するようになるが、線維芽細胞特異的 Cavin-2 欠損マウス的心臓では TAC 後の筋間質内 α SMA 陽性細胞が対照と比較して有意に減少していた。この結果は、圧負荷心不全時において、Cavin-2 が常在性の心臓線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に大きく関与しており、Cavin-2 が欠損すると筋線維芽細胞への分化が抑制され同時に線維化も抑制されることが示された。

(2) 筋線維芽細胞は、TGF- β 1 シグナル経路を介して α SMA 発現や細胞外マトリックス(ECM)分泌といった筋線維芽細胞の特徴を示すと言われている。そこで、TGF- β 1 刺激による α SMA タンパク発現および線維化関連遺伝子発現について MEF を使って評価を行った。その結果、Cavin-2 全身欠損マウスから採取した MEF では、対照 MEF と比較して、 α SMA タンパク発現および線維化関連遺伝子発現の増加が有意に抑制された。一方で、MEF にアデノウイルスによる Cavin-2 の過剰発現を誘導すると、線維化関連遺伝子の mRNA の発現は有意に増加した。TGF- β 1 による刺激は Smad シグナル経路を介しているため、次に Smad シグナルについて評価した。TGF- β 1 によって MEF 内に Smad2 のリン酸化が誘導されたが、Cavin-2 の欠損した MEF ではそのリン酸化が有意に減弱した。

(3) Cavin-2 は酵素ではないため Smad を直接活性化することはない。我々は、Cavin-2 が Smad シグナル経路を構成する関連タンパクに作用し、シグナルの効率化に寄与しているのではないかと考え、BioID と呼ばれるタンパク質間相互作用スクリーニングを使って Cavin-2 に相互作用している Smad 関連タンパクの同定を試みた。その結果、Cavin-2 は α SMA 発現および Smad 経路の調節に関わるとされる Hsp90ab1 および Hsp90b1 と相互作用することが明らかになった。確認のため、Cavin-2 欠損 MEF における Hsp90 のタンパク質発現を評価したところ、対照と比較して有意に減少していた。

(4) 今回の結果は、Cavin-2 が TGF- β 1/Smad シグナル伝達を介した線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を通じて心臓線維化に寄与していることを示唆している。圧負荷などで線維芽細胞内の TGF- β a/Smad シグナルが活性化する際に Cavin-2 はその効率化を担っているのかもしれない。Cavin-2 欠損は出産や発達には影響を与えなかったことから恒常性の維持にはそれほど重要ではないと考えられ、Cavin-2 を治療ターゲットにすれば、副作用の少ない心臓線維化治療が確立できる可能性がある。

< 引用文献 >

Ogata T, et al. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. *Mol Cell Biol.* 28(10):3424-36, 2008

Rodriguez G, Ogata T, et al. Molecular genetic and functional characterization implicate muscle-restricted coiled-coil gene (MURC) as a causal gene for familial dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet.* 4:342-348, 2011

Ogata T, et al. MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by α 1-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111(10):3811-6, 2014

Naito D, Ogata T, et al. The coiled-coil domain of MURC/Cavin-4 is involved in membrane trafficking of caveolin-3 in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 309(12):H2127-36, 2015

Nakanishi N, Ogata T, et al. MURC deficiency in smooth muscle attenuates pulmonary hypertension. *Nat Commun.* 7:12417, 2016

Taniguchi T, Ogata T, et al. PTRF/Cavin-1 Deficiency Causes Cardiac Dysfunction Accompanied by Cardiomyocyte Hypertrophy and Cardiac Fibrosis. *PLoS One.* 11(9):e0162513, 2016

Miyagawa K, Ogata T, et al. Loss of MURC/Cavin-4 induces JNK and MMP-9 activity enhancement in vascular smooth muscle cells and exacerbates abdominal aortic aneurysm. *Biochem Biophys Res Commun.* 487(3):587-593, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yusuke Higuchi, Takehiro Ogata, Masahiro Nishi, Naohiko Nakanishi, Akira Sakamoto, Yumika Tsuji, Satoaki Matoba
2. 発表標題 Cavin-2/SDPR in Cardiac Fibroblasts Regulates Cardiac Fibrosis and Function via TGF- β /Smad Signaling in Pressure-Overloaded Hearts
3. 学会等名 2019 XXIII ISHR WORLD CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Higuchi, Takehiro Ogata, Masahiro Nishi, Naohiko Nakanishi, Akira Sakamoto, Yumika Tsuji, Satoaki Matoba
2. 発表標題 Cavin-2/SDPR in cardiac fibroblasts modulates TGF- β /Smad signaling and promotes pressure overload-induced fibrosis
3. 学会等名 BCVS Scientific Sessions 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Higuchi, Takehiro Ogata, Masahiro Nishi, Satoaki Matoba
2. 発表標題 Cavin-2 Deficiency Attenuates Cardiac Fibrosis and Dysfunction in Pressure-overloaded Hearts
3. 学会等名 The 23rd Annual Scientific Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy (ISCP) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Higuchi, Takehiro Ogata, Naohiko Nakanishi, Masahiro Nishi, Akira Sakamoto, Yumika Tsuji, Satoaki Matoba
2. 発表標題 Cavin-2/SDPR Deficiency Attenuates Myofibroblast Differentiation and Cardiac Fibrosis in TAC Mice
3. 学会等名 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Higuchi, Takehiro Ogata, Masahiro Nishi, Naohiko Nakanishi, Akira Sakamoto, Yumika Tsuji, Hideo Tsubata, Satoaki Matoba
2. 発表標題 SDPR/Cavin-2 Deficiency Attenuates Myofibroblast Differentiation via the Actin-MRTF-SRF Signaling Axis and Cardiac Fibrosis in Pressure Overload-induced Heart Failure
3. 学会等名 The American Heart Association, Scientific Sessions 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Higuchi, Takehiro Ogata, Masahiro Nishi, Naohiko Nakanishi, Akira Sakamoto, Yumika Tsuji, Satoaki Matoba
2. 発表標題 SDPR/Cavin-2 Deficiency Suppresses Myofibroblast Differentiation via the Actin/MRTF/SRF Signaling Axis and Cardiac Fibrosis in Pressure Overload-induced Heart Failure
3. 学会等名 第35回国際心臓研究学会日本部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Higuchi, Takehiro Ogata, Masahiro Nishi, Naohiko Nakanishi, Akira Sakamoto, Yumika Tsuji, Satoaki Matoba
2. 発表標題 Cavin-2 Deficiency Attenuates Myofibroblast Differentiation and Cardiac Fibrosis in Pressure Overloaded Hearts
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------