

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790512
 研究課題名（和文）代償性心肥大から心不全への移行に関する新規メカニズムとしてのオートファジー関与
 研究課題名（英文）Mechanistic Insights into the Association between Autophagy and Progression from Compensated Cardiac Hypertrophy to Heart Failure
 研究代表者
 野堀 潔（NOBORI KIYOSHI）
 秋田大学・医学部・特任講師
 研究者番号：40436192

研究成果の概要：

ライソゾームと融合後にも分解されにくく、細胞毒性が少ないmRFPの改良赤色蛍光蛋白mCherryを使用し、心筋特異的プロモーター α MHCを用いて、我々は、心筋細胞にてオートファジーを評価するための心筋特異的にmCherry-LC3を発現するトランスジェニックマウスを作製した。GFP-LC3-TGとのダブルトランスジェニックを作成し、オートファゴゾームとオートライソゾームとを区別して認識するマウスを確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、循環器内科学

キーワード：心臓病態学、オートファジー、遺伝子組み換えマウス、心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

<代償性心肥大から心不全への移行>

心不全の発症率、死亡率は高いにも関わらず、その根本的な治療法はなく、その発症抑制は重要である。高血圧や弁膜症疾患等で心臓に圧負荷がかかると、個々の心筋細胞容積を増大することにより生じる心肥大により、しばらくの期間は、心機能が代償され維持される。しかし、さらに圧負荷が継続しつづ

ると、最終的には、心筋層の菲薄化が生じ、代償しきれずに心不全へと進行する。同様に、肥大型心筋症において、病態が進行すると、心筋層が菲薄化し、拡張型心筋症様の病態を呈し、心不全へと移行する。上記のような、一旦は肥大した心筋層が、ある時期を境に、菲薄化を開始するメカニズムの詳細は不明であり、その解明および抑制は、心不全の発症を抑制する新規治療法の開発への第一歩と考えられる。人間のサンプルを用いた研究で、

大動脈弁狭窄症の圧負荷心では、オートファジーが生じていることが報告されており、心肥大、心不全への関与が示唆される。

<オートファジーの細胞死誘導、細胞死抑制>

オートファジーとは、飢餓状態等のストレスに反応し、オートファゴゾームと呼ばれる脂質二重膜構造の小胞で異常蛋白質や細胞小器官を包み込みライソゾームと融合後に分解する細胞内システムであり、しいて例えれば細胞内の掃除屋である。ストレス下でなくとも、非分裂細胞の細胞質内構成要素の新陳代謝に関与している。このように細胞のホメオスタシスを保つことにより細胞死を抑制するように働く機能をもつ一方で、細胞に過剰のストレスがかかると、過剰な細胞質分解を起こし、細胞死へと導く。つまり、オートファジーとは、細胞死抑制と細胞死誘導の二面性をもった諸刃の剣と言える。

<オートファジーの疾患への関与>

オートファジーは最近このプロセスを促進させる遺伝子が発見されてから、注目を浴びるようになった分野である。オートファゴゾーム形成に関わる遺伝子として、autophagy-related 5(ATG5), beclin-1/ATG6, ATG7, LC3/ATG8等が報告されており、多くの疾患への関与が報告されている。そのなかでも、心筋細胞と同じ非分裂細胞である神経細胞においての、オートファジーと疾患の関連が注目されている。

神経特異的にオートファジーの能力を欠いたATG5ノックアウトマウスでは、異常タンパク質が神経細胞内に蓄積するために神経変性を生じ、さまざまな行動異常を呈するようになる(2006nature)。

神経特異的ATG7のノックアウトでも上記のATG5ノックアウトマウスと同様な表現型を示した(2006nature)。神経疾患以外にも多くの疾患とオートファジーとの関与が報告されている。Beclin-1は線虫の寿命を延ばすことに関与していることが報告された(2003science)。Beclin-1-/+マウスには癌が生じることが報告された(2003JCI)。肝臓におけるATG7ノックアウトマウスを用いて、ATG7が飢餓によるオートファジーに必要であることが示された(2006 JCB)。

<オートファジーと心臓疾患>

オートファゴゾームはライソゾームと融合後に内容物が分解される。ライソゾーム関連

膜蛋白 2 遺伝子 (lysosome-associated membrane-2:LAMP-2) 異常が、肥大型心筋症とミオパチーが主症状であるX連鎖優性遺伝疾患のダノン病で認められる。電子顕微鏡でダノン病患者の筋組織を見ると、筋線維内に筋線維崩壊産物を含んだ多数のオートファゴゾームが認められる。LAMP-2 ノックアウトマウスではダノン病と同様の表現型が認められ、原因遺伝子と考えられた(2000nature)。

オートファゴゾームに発現するLC3蛋白にGFP蛋白を結合させたフュージョン蛋白をCAGプロモーターにて発現させることにより、オートファジー観察を可能にした遺伝子改変マウス (GFP-LC3-TG) がオートファジー評価に使われている(2004MCB)。このマウス(GFP-LC3-TG)を用いて、ATG7ノックアウトマウスでは、ミトコンドリア障害、ユビキチン化蛋白の異常集積が生じ、心筋細胞でオートファゴゾームが形成されないことが示された(2006 JCB)。GFP-LC3-TGをもちいて、飢餓マウスで亢進した心筋細胞のオートファジーが、アンチアポトーシス遺伝子Bcl-2の発現により抑制されたことが報告されている。そのメカニズムとして、Beclin-1と結合したBcl-2は、Beclin-1誘導性オートファジーを適度に抑制することにより、オートファジーのバランス調整し、オートファジーを細胞死誘導機能としてではなく細胞生存維持機能として作用させているからであることが示唆された。(2005 cell)

心筋細胞に虚血再還流刺激を与えるとオートファジーが生じる。優勢抑制型変異体ATG5を発現させた心筋細胞では、野生型と比較して細胞死が亢進する。このことから、ATG5によるオートファジーは虚血心筋において細胞障害を防いでいる可能性が示唆された(2006JBC)。

人間のサンプルを用いた研究で、大動脈弁狭窄症の圧負荷心では収縮力の低下に伴い、ユビキチン化された異常蛋白の蓄積およびオートファジー、オンコーシスによる細胞死が増加する所見が観察された(2003Circulation)。心不全をおこした拡張型心筋症では正常心と比較して異常蛋白の蓄積およびオートファジー、オンコーシス、アポトーシスの増加が認められた(2003Circ. Res.)。

以上の報告より、オートファジーと心筋疾患との関連性が示唆される。

2. 研究の目的

代償性心肥大から非代償期（心不全）への移行メカニズムは不明である。代償性心肥大ではオートファジーが細胞死を抑制している一方で、過剰なストレスが継続した結果、オートファジーによる細胞のホメオスタシス維持能が破綻した段階で非代償期へと移行し、アポトーシス、オンコーシス、オートファジーによる心筋細胞死が、心筋層菲薄化そして心不全へ導くとの仮説をたてた。代償性心肥大から非代償期（心不全）への移行と、オートファジーとの関与を検討し、心不全発症抑制のあらたな治療法開発をめざす。

3. 研究の方法

ライソゾームと融合後にも分解されにくく、ダイマーを形成せず、細胞毒性が少ないmRFPの改良赤色蛍光蛋白mCherryを使用し、心筋特異的プロモーターである α myosin heavy chain promoter (α MHC)を用いて、我々は、心筋細胞にてオートファジーを評価するための心筋特異的にmCherry-LC3を発現するトランスジェニックマウス (α MHC-mCherry-LC3-TG)を作製した。

このマウスを、GFP-LC3-TG掛け合わせて、ダブルトランスジェニックを作成することにより、心筋細胞、非心筋細胞で、オートファゴゾームとオートライソゾームとを区別して認識するマウスを確立した。

4. 研究成果

オートファジーは、二重膜構造のオートファゴゾームにより細胞質内の蛋白質や細胞小器官を隔離したのち、ライソゾームと融合することによりオートライソゾームとなり、その後、内容物を分解することにより、飢餓や細胞障害時の細胞のホメオスタシス維持に働くと同時に、細胞死誘導にも働くことが知られている。オートファゴゾームの構成蛋白であるLC3にGFPを結合させた蛋白（GFP-LC3）を、CAG promoterにて、全身に発現させたトランスジェニックマウス（GFP-LC3-TG）を用いると、GFPシグナルの凝集を評価することにより、オートファジーをおこした細胞を認識することが可能である（Mizushima N. 2004MBC）。しかし、心臓には線維芽細胞等の非心筋細胞が存在するため、CAGプロモーターを用いたGFP-LC3-TGでは、心臓のシグナル陽性細胞が必ずしも心筋細

胞であるとは限らず、心筋細胞であることを証明するために、心筋特異的な蛋白との二重染色で示す必要がある。その上、GFP蛋白は、オートファゴゾームがライソゾームと融合後に分解されてしまうためオートライソゾームの同定が困難である。これらの問題を克服するために、ライソゾームと融合後にも分解されにくく、ダイマーを形成せず、細胞毒性が少ないmRFPの改良赤色蛍光蛋白mCherryを使用し、心筋特異的プロモーターである α myosin heavy chain promoter (α MHC)を用いて、我々は、心筋細胞にてオートファジーを評価するための心筋特異的にmCherry-LC3を発現するトランスジェニックマウス (α MHC-mCherry-LC3-TG)を作製した。このマウスを、GFP-LC3-TG掛け合わせて、ダブルトランスジェニックを作成することにより、心筋細胞、非心筋細胞で、オートファゴゾームとオートライソゾームとを区別して認識するマウスを確立した。現在、論文を投稿準備中である。今後、このマウスを利用することにより、代償性心肥大から非代償期（心不全）への移行メカニズムの解明への取り組みを継続する予定である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計4件）

①Yoshida T, Sugiura H, Mitobe M, Tsuchiya K, Shirota S, Nishimura S, Shiohira S, Ito H, Nobori K, Gullans SR, Akiba T, Nitta K. ATF3 protects against renal ischemia-reperfusion injury. J Am Soc Nephrol. Feb;19(2):217-24. 2008 査読有

②Takahashi Y, Watanabe H, Murakami M, Ono K, Munehisa Y, Koyama T, Nobori K, Iijima T, Ito H. Functional role of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun. Oct 5;361(4):934-40. 2007 査読有

③ Nobori K, Munehisa Y, Ito H. Intracellular signaling pathways for cardiac hypertrophy: ERK, JAK-STAT, S6 kinase] Nippon Rinsho. Apr 28;65 Suppl 4:196-200. 2007 査読無

④Takahashi Y, Murakami M, Watanabe H, Hasegawa H, Ohba T, Munehisa Y, Nobori K,

Ono K, Iijima T, Ito H. Essential role of the N-terminus of murine Orail in store-operated Ca²⁺ entry. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 27;356(1):45-52. 2007 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

①柿崎学、野堀 潔、伊藤宏
The Percentage of Angiogenic T Cells in Peripheral Blood was Increased in the Patients with Coronary Artery Disease. 2009年3月 第73回日本循環器学会総会

②寺田舞、野堀 潔、伊藤宏
 α MyHC mCherry LC3 Transgenic Mouse is a New and Useful Tool to Examine the Role of Autophagy in Cardiomyocytes 2008年11月 American Heart Association scientific meeting

③寺田舞、野堀 潔、伊藤宏. α MyHC mCherry LC3 Transgenic Mouse is a New and Useful Tool to Examine the Role of Autophagy in Cardiomyocytes 2008年3月 第72回日本循環器学会総会

〔図書〕（計2件）

①野堀 潔、柿崎学、伊藤宏
*meditina*循環器病薬の使い方2009
医学書院、2009年、54-57

②野堀 潔、伊藤宏
心腎関連の病態理解と診療
羊土社、2008年、133-140

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野堀 潔 (NOBORI KIYOSHI)
秋田大学・医学部・特任講師
研究者番号：40436192

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし