

平成21年 4月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790526

研究課題名 (和文)

新規筋細胞特異的遺伝子の単離と心臓における機能解析

研究課題名 (英文)

Isolation and functional analysis of a novel muscle specific gene.

研究代表者

小形 岳寛 (OGATA TAKEHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・研究員

研究者番号：10402877

研究成果の概要：新規に同定した筋特異的遺伝子 Muscle-restricted coiled-coil protein (MURC) は、心筋・平滑筋細胞質内に発現しており、特に心筋細胞で高発現していた。大動脈狭窄による圧負荷刺激心肥大・心不全モデルで MURC は有意に上昇したが、MURC の心筋特異的過剰発現マウスでは心筋細胞の大小不同が存在し、加齢により心筋細胞の委縮と線維化が認められ、心機能低下と完全房室ブロックまたは心房細動が高率に認められた。さらに MURC は RhoA/ROCK シグナル経路を介して ANP 発現と心筋細胞での actin の再構成の調節を行っていることも確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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：心筋細胞、心不全、線維化、刺激伝導系、新規遺伝子、MURC

1. 研究開始当初の背景

循環器領域において心肥大・心不全の発症機序の解明とその治療法の開発は重要な研究課題の一つである。近年までに心肥大および心不全に至る分子メカニズムに関する研究が多くなされ、カテコラミンやレニン-アンジオテンシン系の重要性は知られるようになってきた(Braunwald's Heart Disease, 7th edition, edited by Douglas P. Zipes, Peter Libby, Robert O. Bonow and Eugene Braunwald, Pathophysiology of Heart

Failure, vol. 1, 509-538)。しかしながら、心不全の発症頻度と死亡は年々増加してきており、薬物治療の進歩にも関わらず、心臓移植以外に治療法の無い重症心不全患者が多数存在しているのが現況である。それゆえ、さらなる心肥大および心不全に至る分子メカニズムの研究が必要とされ、心肥大および心不全の発症を抑える新たな治療が待たれている。

研究代表者らは Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)法により成体の

マウス心臓の遺伝子発現プロファイルを作成し、データベースを用いた検索にて筋細胞に特異的に発現している候補遺伝子をいくつか得ることができ、それらについて臓器別の mRNA 発現を検討するため Northern blotting を行うことにより、筋特異的に発現する未知の遺伝子を同定、その単離に成功した。この新規筋特異的発現遺伝子の心臓における病態生理学的な役割を検討することにより、心肥大および心不全に至る新たな分子メカニズムを明らかにすることが出来るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

研究代表者らが単離・同定した筋特異的発現遺伝子は、研究開始時点で発現タンパクの局在部位やその機能について全く分からない遺伝子であった。そのため、マウス心臓における局在部位の同定と発達過程における発現量の検討を行い、これと同時に心筋細胞に特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成し、その表現型を解析することにより、この筋特異的未知遺伝子の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) Northern blotting と real-time RT-PCR による筋特異的遺伝子の発現部位の検討。
- (2) ポリクローナル抗体を使った同遺伝子の心臓におけるタンパク発現とその局在の検討。
- (3) Real-time RT-PCR によるマウス心臓の発達と圧負荷時における心臓での同遺伝子の発現量の検討。
- (4) 心臓特異的遺伝子発現トランスジェニックマウスを作成し、同遺伝子の心筋細胞過剰発現による表現型の検討。
- (5) アデノウイルスベクターを使い、新生児マウス心筋細胞の同遺伝子過剰発現やノックダウンによる ANP mRNA の発現量や Rho/ROCK シグナルについて検討。
- (6) さらに過剰発現またはノックダウンした心筋細胞での Rho/ROCK シグナルを介した actin 形成の同遺伝子の関与について検討。

4. 研究成果

今回、単離同定された筋特異的遺伝子は 362 アミノ酸配列のタンパクをコードするものでその配列はツメガエル、齧歯類、ヒトと種を超えて多くの部分が保存されていた。ヒトでは Coiled Coil モチーフを持つことから、我々はこの同定された遺伝子を Muscle-restricted coiled-coil protein (MURC) と命名した。

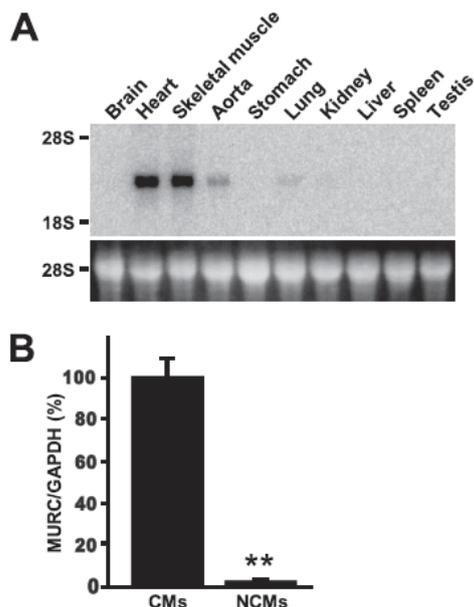


図1 組織における MURC 遺伝子発現

MURC は、以前の検討で心臓と骨格筋細胞、心臓ではほとんどが心筋細胞で発現していた(図 1A,B)ため、MURC に対するポリクローナル抗体を作製し心臓内での局在を評価したところ、MURC は心筋(主に Z line)・平滑筋細胞質内に発現しており、特に心筋で高発現していた(図 2A,B)。血管内皮細胞にはほとんどもしくは全く発現していなかった。

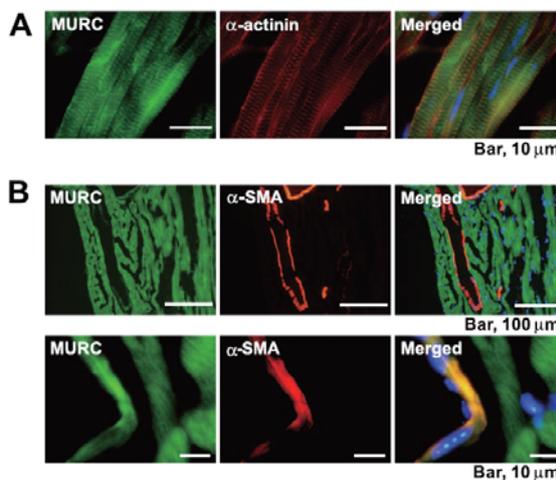


図2 心臓内の MURC タンパクの局在

MURC はマウスの心臓の発達において、胎児期の心臓が形成された時点ですでに発現が認められ、発達に伴いその発現量は増加した(図 3A)。さらに MURC は大動脈狭窄による圧負荷刺激心肥大・心不全マウスモデルで有意に上昇し、MURC は心筋において肥大・不全時に何らかの役割があると推察された(図 3B)。

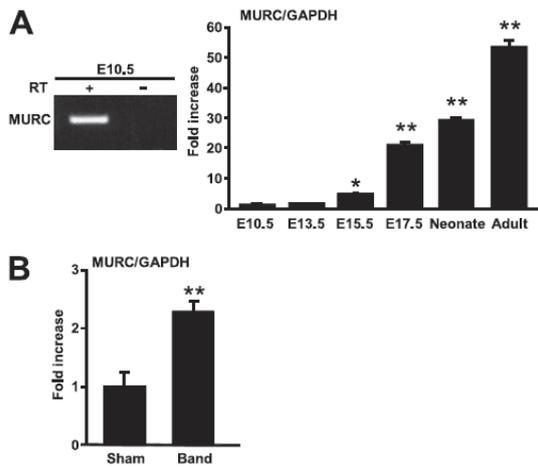


図3 発達と圧負荷における心臓での MURC 遺伝子発現

MURC の心筋特異的過剰発現トランスジェニックマウスでは心筋拡大を認め、同時に心筋細胞の大小不同が存在し、加齢により心筋細胞の委縮と線維化が認められた(図 4A-D)。これらの変化は5, 6 週齢から視覚的に認められるようになり、この移行期では線維化は認められず、心筋細胞一つ一つのサイズはコントロールよりも有意に肥大していた。この結果から、MURC は心筋細胞肥大を経て最終的に心筋細胞死、線維化を惹き起こす可能性が示唆された。

また、心機能低下と完全房室ブロックまたは心房細動も非常に高率に認められた。心房細動や完全房室ブロックが認められなかったトランスジェニックマウスについても心拍数の著しい低下が認められ、MURC 遺伝子の過剰発現は心臓において著しい刺激伝導系の障害も来すことが示された(図 5A,B)。

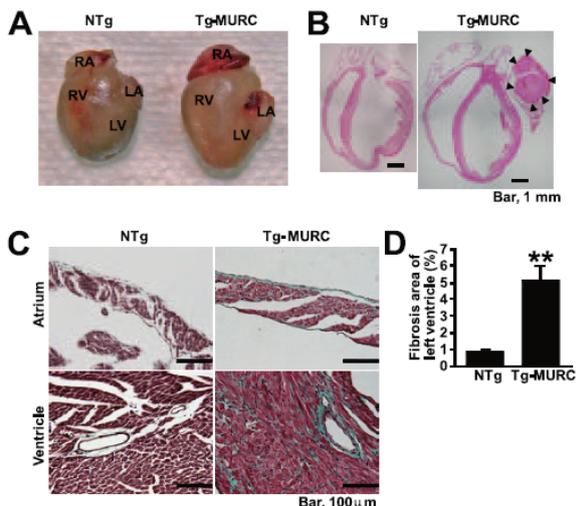
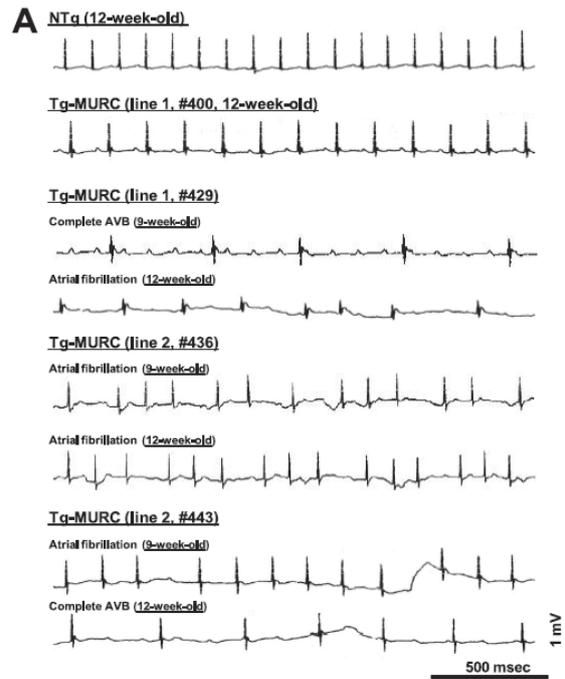


図4 心筋特異的 MURC 発現トランスジェニックマウス(13 週齢)における心臓の形態(A),HE 染色(B, 矢印内は血栓), Masson's trichrome 染色(C)と線維組織の心筋内比率(D)



B

	NTg (n=9)	Tg-MURC (n=9)
HR (bpm)	516 ± 30	400 ± 17**
PR interval (msec)	43.89 ± 1.39	57.78 ± 1.47**

図5 MURC トランスジェニックマウスにおける不整脈

さらに MURC は RhoA/ROCK シグナル経路を介して ANP 発現を調節していることがアデノウイルスベクターと ROCK 阻害薬である Y27632 を用いたラット新生児心筋細胞での検討で確かめられた(図 6A-C)。

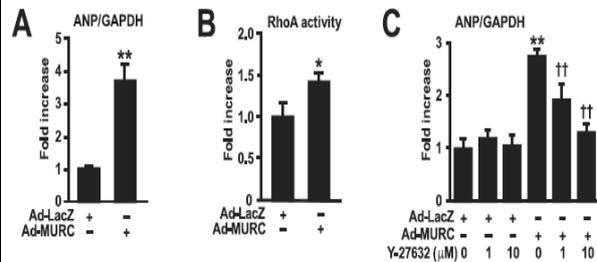


図6 Rho/ROCK シグナルを介した MURC による ANP 発現促進

Rho/ROCK シグナル経路は、また、心筋細胞における actin の再構成に関わるとの報告があり、実際に MURC 過剰発現の心筋細胞では actin の再構成が亢進しており Y27632 の投与により、これが抑制された(図 7A)。さらに、MURC をノックダウンした心筋細胞ではフェニレフリン(PE)による actin 再構成亢進を逆に抑制することが示され(図 7B)、これらのことから、MURC は心筋細胞において actin の再構成の調節を行っていることが示唆された。

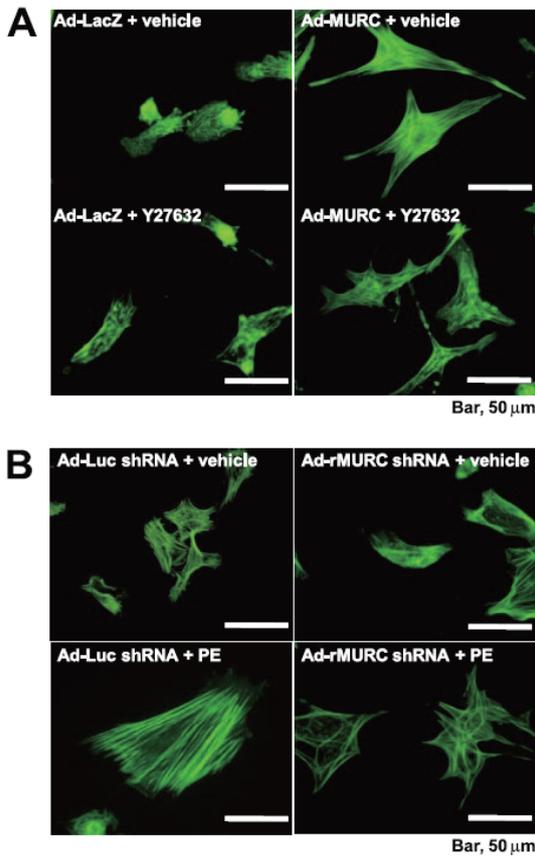


図 7 MURC 過剰発現またはノックダウンによる心筋細胞内 actin 再構成の検討

以上の研究成果をまとめると以下のようになる。

- (1) 研究代表者は筋特異的遺伝子として新規遺伝子 MURC を単離・同定することに成功した。
- (2) この MURC の遺伝子は、脊椎動物においてよく保存されており、MURC タンパクは心筋細胞において Z-line に多く局在していた。
- (3) MURC は心筋での過剰発現により刺激伝導系の障害を伴った心機能低下を来とし、心筋細胞内での ANP 発現を亢進させていた。
- (4) この ANP 発現は Rho/ROCK シグナルを介して制御されており、MURC による Rho/ROCK シグナルの亢進は心筋細胞内の actin 再構成にも関与していることが示唆された。

今回、Rho/ROCK シグナルを介した新規筋特異的発現遺伝子 MURC の心筋に対する幾つかの機能を同定することが出来た。現在までに MURC について報告している研究者は研究代表者ら以外にはなく、今回の成果は、国内はもとより国外においても他の追随を許さないインパクトの強い先進的な研究と考えている。今後の展望として、さらなる研

究を重ね、MURC による心筋細胞一過性肥大や心筋線維化のメカニズムを解明することにより、心不全の原因、さらには新しい治療のターゲットとなりうるか検討していきたい。

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 5 件)

- ① **Ogata T**, Ueyama T, Isodono K, Tagawa M, Takehara N, Kawashima T, Harada K, Takahashi T, Shioi T, Matsubara H, Oh H. 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). 査読有り
- ② Tagawa M, Ueyama T, **Ogata T**, Takehara N, Nakajima N, Isodono K, Asada S, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295(2):C490-8, (2008). 査読有り
- ③ Takehara N, Tsutsumi Y, Tateishi K, **Ogata T**, Tanaka H, Ueyama T, Takahashi T, Takamatsu T, Fukushima M, Komeda M, Yamagishi M, Yaku H, Tabata Y, Matsubara H, Oh H. Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardiosphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 52(23):1858-65 (2008). 査読有り
- ④ Asada S, Takahashi T, Isodono K, Adachi A, Imoto H, **Ogata T**, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Downregulation of Dicer expression by serum withdrawal sensitizes human endothelial cells to apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295(6):H2512-21 (2008). 査読有り
- ⑤ **Ogata T**, Ueyama T, Nomura T, Asada S, Tagawa M, Nakamura T, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. Osteopontin is a myosphere-derived secretory molecule that promotes angiogenic progenitor cell proliferation through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 359(2):341-7 (2007). 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① **Ogata T**, Ueyama T, Isodono K, Imoto H, Tagawa M, Takehara N, Asada S, Adachi A, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. MURC,

a muscle-restricted coiled-coil protein, induces cardiomyocyte hypertrophy through the extracellular signal-regulated kinase pathway. AHA Basic Cardiovascular Sciences Conference(July 30, 2008, Keystone CO. USA)

- ② **Ogata T**, Ueyama T, Isodono K, Tagawa M, Takehara N, Kawashima T, Shioi T, Takahashi T, Harada K, Matsubara H, Oh H. A novel muscle-restricted coiled-coil protein, MURC, induces cardiac dysfunction accompanied with an altered gene expression profile. 第72回日本循環器学会学術集会 (March 29, 2008, 福岡)
- ③ **小形岳寛**, 上山知巳, 野村哲也, 浅田聡, 田川雅史, 中村智之, 松原弘明, 王英正
Osteopontin enhances proliferatve self-renewal via PI3K/Akt signaling in skeletal myosphere-derived progenitor cells. 第11回日本心不全学会(September 9, 2007, 舞浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小形 岳寛 (OGATA TAKEHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・研究員

研究者番号：10402877

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし