

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07299

研究課題名（和文）心不全病態の形成におけるジャンクトフィリン分解の役割

研究課題名（英文）Role of junctophilin degradation in the formation of heart failure

研究代表者

中田 勉（Nakada, Tsutomu）

信州大学・学術研究院総合人間科学系・准教授

研究者番号：70452141

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ジャンクトフィリン2（JP2）は、心筋において細胞膜と筋小胞体膜を架橋する分子である。心筋に病的障害が起こった際、JP2のC末端が切断されることが報告されている。本研究ではJP2のC末端欠失変異体（JP 427）をマウス心筋に強制発現し、その効果を確認した。JP 427の発現が心重量の増加、左室内径短縮率の低下、カルシウムトランジェントの低下などを誘導したことから、JP2の分解産物が心不全病態の形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の死因の第二位は心疾患であり、中でももっとも多いものは心不全である。心不全病態についてはさまざまな研究がなされているが、その原因にはなお不明な点が多く残されている。心不全病態において、ジャンクトフィリン分子が体内で分解されることが報告されている。本研究では、マウスの心臓にジャンクトフィリン分子の変異体を発現させると、心機能の低下などが引きこされることを明らかにした。この結果は、ジャンクトフィリンの分解産物が心不全病態形成に関与していること示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：Junctophilin 2 (JP2) stabilize the junctional membranes by bridging the sarcolemmal and sarcoplasmic reticulum membranes. It has been reported that the C-terminus of JP2 is truncated when myocardium is pathologically damaged. In the present study, we examined the effects of expression of C-terminal deletion mutant of JP2 (JP 427) in mouse myocardium. Expression of JP 427 increased heart weight and decreased fractional shortening. Calcium transients of isolated cardiomyocytes derived from JP 427-expressed mice were decreased compared to control mice. These results suggest that the degradation products of JP2 may be involved in the pathogenesis of heart failure.

研究分野：生理学

キーワード：ジャンクトフィリン L型カルシウムチャネル 心不全 カルシウム リアノジン受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋には細胞膜と筋小胞体膜が近接する結合膜構造と呼ばれる部位が存在し、形質膜上の L 型カルシウムチャネル (LTCC) と、筋小胞体膜上のリアノジン受容体 (RyR) が、この部位でクラスターを形成し機能的複合体を形成している。心筋細胞に活動電位が発生すると、LTCC は細胞外からカルシウムイオンを流入させ、これが RyR を開口させる。RyR は筋小胞体から大量のカルシウムイオンを細胞質に放出し、これにより収縮が引き起こされる。このように LTCC と RyR が結合膜構造に共局在することは、電気信号をカルシウム信号に変換するために必須であり、その異常は致死的である。

ジャンクトフィリン (JP) は、心筋や骨格筋において細胞膜と筋小胞体膜を架橋し、結合膜と呼ばれる構造を維持する分子である。近年、心筋に病的障害が起こった際、ジャンクトフィリンの C 末端がタンパク質分解酵素カルパインによって分解されることが複数のグループから報告され、病態との関連が注目されている。本研究では、ジャンクトフィリンの分解産物と同等の変異体を強制発現させたマウスを解析することで、心筋のジャンクトフィリン分解と心不全の病態形成との関係が明らかになり、新たな創薬ターゲットが見いだされる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、心不全の病態形成において、JP2 の分解がどのような役割を果たしているかを明らかにする。アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いて、健常マウスの心臓に JP2 の C 末端欠失変異体 (JP2 Δ 427-FLAG) を発現させ、JP2 の分解産物の作用を確認する。これらのマウスの心機能を、生理学、細胞生物学、分子生物学的手法を用いて多角的に解析することで、JP2 の分解と心不全病態の形成の関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) JP2 Δ 427-FLAG の発現

JP2 遺伝子の開始コドンから 427 番目のアミノ酸残基までの cDNA 配列を単離し、3xFLAG タグを付加し AAV 用ベクターに組み込んだ (JP2 Δ 427-FLAG)。心筋特異的な発現を誘導するために、JP Δ 427 の上流にニトリ cTnT プロモーターを組み込んだ。コントロール用に cTnT プロモーターのみを準備した。これらを pHelper プラスミド、pRC9 プラスミドとともに HEK293 細胞へトランスフェクションした。培養 5 日後、超遠心法によりウイルスベクターを精製した。ウイルスは PCR 法にて定量した。

6 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに、精製した AAV ベクターを 2×10^{12} vg/匹で腹腔注射した。ウイルスベクター導入 4 週間後に、心重量、肺重量、脛骨長を測定した上で、次項以下の解析を行った。

(2) 心機能の解析

小動物用超音波高解像度イメージングシステム Vevo[®]2100 を用いて、左心室収縮能の測定を行った。マウスを、イソフルラン麻酔下で保温ステージ (37°C) に背臥位に固定し、超音波検査を行った。

(3) ウェスタンブロッティング

コントロール群および JP Δ 427 発現群から心臓を採取し、ホモジネーションバッファー (20 mM HEPES, 320 mM Sucrose) 中でホモジナイズ後、5000g、15 分、4°C で遠心し、デブリスを沈殿させた。採取した上清を 100,000g、60 分、4°C で遠心した。上清を取り除き、沈殿を 1% Triton を含むリシスバッファーで懸濁した。懸濁液を 10,000g、30 分、4°C で遠心し、不溶成分を取り除き、粗膜画分とした。このサンプルを常法に従って SDS-PAGE で電気泳動した。これを PVDF 膜に転写し、ブロッキングを行った後、一次抗体を反応させた。洗浄後、二次抗体を反応させ、化学発光によってシグナルを検出した。一次抗体には、強制発現を行なった JP2 Δ 427-FLAG を検出するための抗 FLAG 抗体、心筋のカルシウム代謝において重要な役割を果たす L 型カルシウムチャネル Ca_v1.2 サブユニット (Ca_v1.2LTCC)、リアノジン受容体 (RyR)、内在性 JP2 に対する抗体をそれぞれ用いた。

(4) 心室筋細胞の単離

マウスから心室筋細胞を酵素還流法にて単離した。摘出した心臓の大動脈を結紮し、左心室内にコラゲナーゼ、プロテイナーゼを含む溶液をシリンジポンプにて継続注入した。30 分後、心室を切り取り、ピンセット、ピペットにて組織をホモジェナイズした。遠心分離後、上澄みを除き、心室筋細胞を得た。

(5) 免疫染色

心臓組織の染色では、組織を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定した後に OCT コンパウンドに包埋し、クリオスタットで凍結切片を作製した。単離心室筋細胞の染色では、細胞をラミネコートしたカバーガラスに接着させ、4%PFA で固定した。

組織切片もしくは単離細胞を PBS で洗浄し、5%ウシ血清・0.1% Triton X100 含有 PBS でプロ

ッキングを行った。続けて一次抗体を反応させ、蛍光標識二次抗体で検出を行った。一次抗体にはウェスタンブロッティングと同じものを用いた。二次抗体には Alexa 標識の抗マウス IgG 抗体、抗ウサギ IgG 抗体を用いた。標本の観察には Lecica TCS SP8 を使用した。

(6) カルシウムイメージング

細胞内 Ca^{2+} 動態の測定は、蛍光 Ca^{2+} 指示薬 Fluo4-AM を用いた。単離した心室筋細胞をラミネンコートしたカバーガラスに接着させた後に Fluo4-AM を添加し、室温で 45 分間培養した。その後、line-scanning 共焦点顕微鏡を用いて、蛍光シグナルを解析した。フィールド電気刺激は、0.2 Hz、1 ms 間、50 V の条件で行った。

4. 研究成果

(1) JP2 Δ 427-FLAG および関連分子の発現量

AAV ベクター投与 4 週後に心臓を採取し、FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行なったところ、JP2 Δ 427-FLAG が強く発現していることが確認できた。この発現は、免疫組織染色でも確認できた。一方、 $Ca_v1.2$ 、RyR、内在性 JP2 の発現量は、コントロール群と JP2 Δ 427-FLAG 発現群の間で変化は見られなかった (図 1)。

(2) JP2 Δ 427-FLAG 発現の心機能への影響

心重量を測定したところ、JP2 Δ 427-FLAG 発現群で有意な増加が認められた。一方、肺重量については有意な変化は見られなかった。心エコーでの解析を行ったところ、コントロール群の左室内径短縮率が 43%であったのに対し、JP2 Δ 427 群では 31%に低下していた。

(3) JP2 Δ 427-FLAG 発現のカルシウムトランジェントへの影響

単離心筋細胞のカルシウムイメージングを行ったところ、電気刺激によって惹起されるカルシウム上昇が、JP2 Δ 427-FLAG 群由来細胞ではコントロール群由来細胞に比べて有意に減少していた (図 2)。

(4) JP2 Δ 427-FLAG 発現の L 型カルシウムチャネルの細胞内局在に対する影響

単離心筋細胞を用いた免疫細胞染色を行った結果、JP2 Δ 427-FLAG は T 管と比べて表面細胞膜に多く分布していることが明らかになった。また同じ細胞で $Ca_v1.2$ LTCC について検討を行なったところ、コントロールと比較して表面細胞膜により多く局在していた (図 3)。

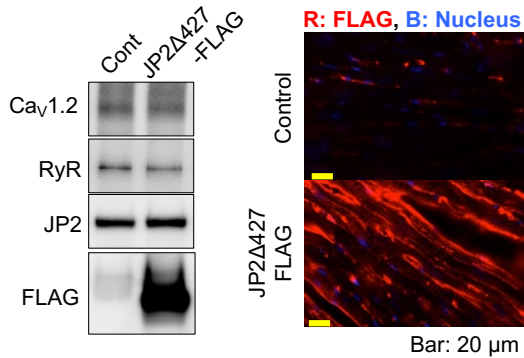


図 1 : JP2 Δ 427-FLAG およびカルシウム関連分子の発現量。JP2 Δ 427-FLAG を AAV によってマウス心筋細胞に発現させ、4 週間後にウェスタンブロッティング、免疫染色を行なった。

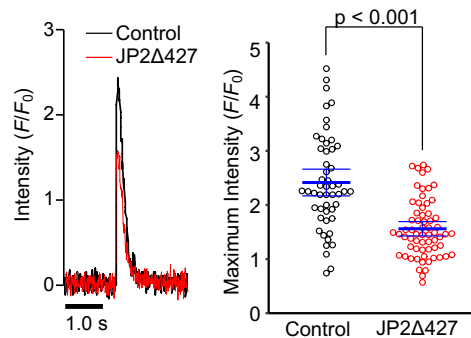


図 2 : JP2 Δ 427-FLAG 発現のカルシウム代謝への影響により、単離心筋細胞のカルシウムトランジェントが有意に減少した。

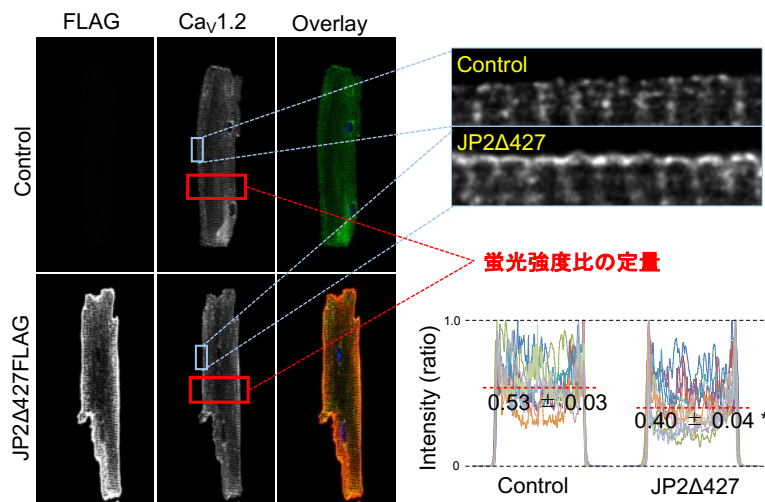


図 3 : JP2 Δ 427-FLAG 発現の $Ca_v1.2$ LTCC の局在への影響。JP2 Δ 427-FLAG 発現細胞では、 $Ca_v1.2$ LTCC が表面細胞膜に局在している割合が増加した。

(5) 考察

心重量の増加や左室内径短縮率の低下が認められたことから、JP2 Δ 427-FLAG の強制発現が心機能の低下を誘導することが明らかになった。また、単離心筋細胞を用いた検討では、JP2 Δ 427-FLAG の強制発現により、カルシウムトランジェントの低下と $Ca_v1.2$ LTCC の細胞内局在を変化が認められた。JP2 は LTCC と RyR と結合することが報告されている。本研究の結果は、JP2 Δ 427-FLAG が、内在性 JP2 と LTCC の結合を阻害することで、正常な LTCC の細胞内局在を乱し、カルシウム代謝を低下させることを示唆している。このことから、カルパインによる JP2 の C 末端切断が、心不全病態の形成に関係している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Inazumi Hi, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Numaga-Tomita T, Kashihara T, Nakada T, Kurebayashi N, Oya M, Nonaka M, Sugihara M, Kinoshita H, Moriuchi K, Yanagisawa H, Nishikimi T, Motoki H, Yamada M, Morimoto S, Otsu K, Mortensen RM., Nakao K, Kimura T | 4. 巻 130 |
| 2. 論文標題 NRSF-GNAO1 Pathway Contributes to the Regulation of Cardiac Ca ²⁺ Homeostasis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Circulation Research | 6. 最初と最後の頁 234 ~ 248 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.121.318898 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Nakada Tsutomu, Yamada Mitsuhiko | 4. 巻 157 |
| 2. 論文標題 Regulation of localization and function of L-type calcium channels by junctophilins | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica | 6. 最初と最後の頁 4 ~ 8 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.21064 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Kashihara T, Kawagishi H, Nakada T, Numaga-Tomita T, Kadota S, Wolf EE, Du CK, Shiba Y, Morimoto S, Yamada M. | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 -Arrestin-Biased AT 1 Agonist TRV027 Causes a Neonatal-Specific Sustained Positive Inotropic Effect Without Increasing Heart Rate | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 JACC Basic Transl Sci | 6. 最初と最後の頁 1057-1069 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2020.08.011. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|--------------------------|
| 1. 著者名 Murayama T, Kurebayashi N, Numaga-Tomita T, Kobayashi T, Okazaki S, Yamashiro K, Nakada T, Mori S, Ishida R, Kagechika H, Yamada M, Sakurai T | 4. 巻 154 |
| 2. 論文標題 A reconstituted depolarization-induced Ca ²⁺ release platform for validation of skeletal muscle disease mutations and drug discovery | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 J Gen Physiol | 6. 最初と最後の頁 e202213230 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1085/jgp.202213230 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kawagishi H, Nakada T, Numaga-Tomita T, Larranaga M, Guo A, Song LS, Yamada M | 4. 巻 323 |
| 2. 論文標題 Cytokine receptor gp130 promotes postnatal proliferation of cardiomyocytes required for the normal functional development of the heart | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Am J Physiol Heart Circ Physiol | 6. 最初と最後の頁 H103-H120 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00698.2021 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 中田勉、川岸裕幸、富田拓郎、山田充彦 |
| 2. 発表標題 横紋筋のジャンクトフィリンによるカルシウムチャネル調節機構 |
| 3. 学会等名 第98回日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中田勉、川岸裕幸、富田拓郎、山田充彦 |
| 2. 発表標題 ジャンクトフィリンによるL型カルシウムチャネル調節機構 |
| 3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中田勉、小松雅俊、山田充彦 |
| 2. 発表標題 除神経モデルマウスの骨格筋におけるホスホランバンの発現量の増加 |
| 3. 学会等名 第66回中部日本生理学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中田勉、小松雅俊、山田充彦 |
| 2. 発表標題 除神経モデルマウスの骨格筋におけるホスホランパンの発現量の増加 |
| 3. 学会等名 第97回日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 中田勉、川岸裕幸、富田拓郎、山田充彦 |
| 2. 発表標題 ジャンクトフィリン2変異体発現の心機能への影響 |
| 3. 学会等名 第50回日本心脈管作動物質学会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------|
|---------|---------|