

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17572

研究課題名(和文) 選択的小胞体分解(ERファジー)に着目した心不全における細胞内品質管理の意義

研究課題名(英文) Impact of Intracellular Quality Control in Heart Failure by Selective Endoplasmic Reticulum Degradation of ER-Phagy

研究代表者

三阪 智史(Misaka, Tomofumi)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50793080

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)：近年、オートファジーによる選択的小胞体分解(ERファジー)の存在が明らかになったが、心臓における役割については検討されていない。大動脈縮窄後4週の不全心では、ユビキチン陽性蛋白質やP62陽性タンパク質、不良タンパク質の蓄積を示唆していた。ERファジー関連分子XのmRNAレベルは大動脈縮窄後の不全心で有意に低下しており、ERファジーの低下から心不全の進展に関与することが示唆されたが、機能的意義については今後の検討が必要である。質量分析の解析により、オートファジーに関連するタンパク質のミリスチル化がERファジーに関連することが示唆され、これが新規メカニズムとして期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全の病態において不良なタンパク質の蓄積が役割を果たしていることから、心不全の発症と進展を防ぐために心筋細胞内の恒常性維持機構としてのERファジーが新しい治療ターゲットと期待されている。本研究により、オートファジーに関連するタンパク質のミリスチル化がERファジーに関連することが示唆され、これが新規メカニズムであることが明らかになった。本研究結果からERファジーに関わる新規分子機構の可能性が明らかとなり、心不全に対する新たな治療戦略となり得ると期待され、今後の検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Recently, the existence of autophagy-mediated selective endoplasmic reticulum degradation (ER-phagy) has been demonstrated, but its role in the heart has not been investigated. In failing hearts 4 weeks after transverse aortic constriction, the accumulation of ubiquitin-positive proteins, P62-positive proteins, and defective proteins was suggested. mRNA levels of ER-phagy-related molecule X were significantly decreased in failing hearts after aortic constriction, suggesting that it is involved in the development of heart failure, but its functional significance needs further investigation. Besides, mass spectrometry analysis suggested that myristoylation of autophagy-related proteins is associated with ER-phagy, which is expected to be a novel mechanism.

研究分野：心不全

キーワード：心不全 細胞内品質管理 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

心不全はあらゆる心疾患の終末像であるが、心不全の発症と進展において、不良なタンパク質の蓄積・凝集が関与していると考えられている (Circ Res 2015; 116: 1863-1882)。細胞内でダメージを受けた不良なタンパク質は、正常なタンパク質と不適当な相互作用を招き、凝集体形成を引き起こし、細胞機能障害から疾患の原因となり得る。デスミン関連性心筋症は、不溶性の蛋白凝集塊を形成し拡張型心筋症を来す (Circ Res 2001; 89: 84-91)。神経変性疾患においては、高密度に凝集した不溶性のタウ・タンパク質がアルツハイマー病の原因となる。細胞内の品質管理の分子機構として、シャペロンによる修復機構に加えて、オートファジーやユビキチン-プロテアーゼシステムにより、不良タンパク質は分解・除去される仕組みが備わっている。しかしながらこれら複数の機構があるにも関わらず、心不全の心筋細胞内には、ユビキチン化タンパク質の蓄積や (Circulation 2008; 117: 3070-3078) P62 陽性タンパク質の蓄積が認められるとの報告があり (Nat Med 2013; 19: 1478-1488) 不良タンパク質の除去が十分ではなく、これが心筋障害や心不全の病態に深く関与していると考えられるが、詳細なメカニズムは不明である。

一方、小胞体は、網目状の膜性細胞小器官で、タンパク質の合成・修飾の場であるが、立体構造が異常なミスフォールディングタンパク質が蓄積すると、小胞体ストレス応答により除去される分子機構が備わっている。過剰な小胞体ストレスは、細胞機能障害へと発展し、小胞体関連性アポトーシスが誘導され細胞死に至る。近年、電子顕微鏡でオートファゴソーム内に小胞体の断片が観察され、オートファジーによる選択的小胞体分解 (ER ファジー) の存在が明らかになった。ER ファジーに特異的な受容体として、これまで FAM134B、SEC62、RTN3 (Nature 2015; 522: 354-358、Nat Cell Biol 2016; 18: 1173-1184、eLife 2017; 6: e25555) が報告され、さらに 2018 年 CCPG1 が新たに同定された (Dev Cell 2018; 22: 217-232)。小胞体膜蛋白である CCPG1 は、特徴的な LIR モチーフによりオートファジー小胞体内の不良タンパク質分解に関与し、小胞体ストレス下では ER ファジーが誘導される。複数の ER ファジー受容体は、独自の機能を有していると考えられるが、詳細な機能についてはまだ未解明であり、心不全の病態に関与するのか検討されておらず、これを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

心不全における ER ファジーの病態意義について解明することを目的とする。小胞体はキャパシティが広く、小胞体ストレス応答が十分に機能している範囲では、細胞障害には至らないが、小胞体の外側、すなわち細胞質内に存在した凝集体は、強い細胞機能障害へと発展する (EMBO J 2018; 37: 337-350)。言い換えれば、不良タンパク質の蓄積を小胞体内で ER ファジーによりコントロールできれば、細胞質の機能障害へと進展する前に分解を受け、不良タンパク質の蓄積から免れ、心不全の病態改善に貢献するものと期待される。今後、ER ファジーを促進させる分子機構を探索し、これが新たな治療戦略となり得ると期待される (図)。



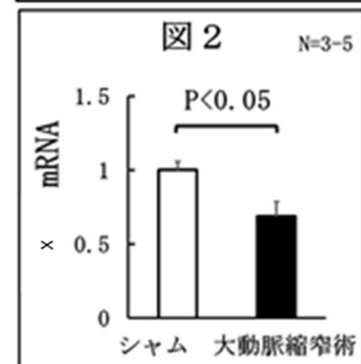
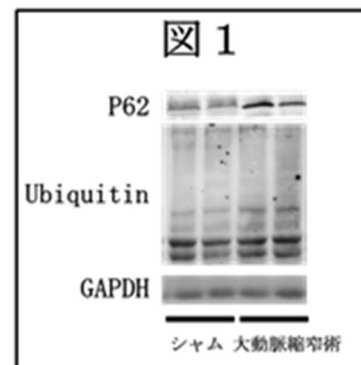
3. 研究の方法

マウスの大動脈弓部に狭窄を作成し左室に圧負荷をかけると、1 週後には左室は肥大し 4 週後には非代償性の心不全に陥る。その後マウスをサクリファイスし、心重量、肺重量などを測定し、心肥大の程度について解析する。病理組織学的検討では、WGA 染色による心筋細胞肥大、Masson-Trichrome 染色による心筋線維化の程度について評価するとともに、RT-qPCR により Nppa や Nppb など心臓リモデリングのマーカーについて解析する。免疫染色により、ユビキチン陽性タンパク質や P62 陽性の不良タンパク質蓄積について定量解析する。抗 GRP94・GRP78 抗体、抗 LC3 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、小胞体ストレスやオートファジーを解析する。ツニカマイシンやアンジオテンシン II などで刺激し、ER ファジーを誘導する。ER ファジー関連分子である Target X を SiRNA あるいは ShRNA ノックダウン後、小胞体ストレスを誘導させ、ユビキチン陽性・P62 陽性の不良タンパク質の蓄積を免疫染色およびウエスタンブロッティング法で評価する。小胞体ストレスについて抗 GRP94・抗 GRP78 抗体を用いてウエスタンブロッティングで解析する。小胞体マーカーである tomato-KDEL ベクターとオートファゴソームマーカーである GFP-LC3 ベクターをトランスフェクションし、生細胞イメージングで ER ファジーを視覚化する。心筋細胞死については、MTT アッセイや TUNEL 染色で検討する。心筋組織をホモジナイズし、界面活性剤を用いた遠心分離法により可溶性タンパク質および不溶性タンパク質を分離し、質量分析法により蓄積したタンパク質を解析する。X の心臓への遺伝子導入が、心不全の改善に寄与するか検討する。心臓特異的に発現する、X をコードしたアデノ随伴ウイルス (AAV9-X) ベクターを作成する。野生型マウスの大動脈縮窄術直前より、AAV9-X を 10^{11} コピーとして尾静脈から投与する。大動脈縮窄術 4 週後、同様に心エコーで心機能を評価し、病理学組織学的検討により、X 遺伝子治療の可能性を追求する。

4. 研究成果

マウスの大動脈縮窄術 (TAC) による圧負荷モデルを作成した。手術 1 週後、シャム手術 (Sham) 群と比較して、心エコーでの心室中隔壁厚の有意な増加および心重量/体重比の増加を認めるが左室短縮率の低下を認めない「肥大心」を呈していた。4 週後では左室短縮率の有意な低下と肺重量の増加を認め、非代償性の「不全心」を呈していた。リアルタイム RT-PCR では心不全マーカーである BNP の増加を確認した。マウスの大動脈縮窄後 4 週の不全心では、ユビキチン陽性蛋白質や P62 陽性タンパク質が蓄積していることを確認し、不良タンパク質の蓄積を認めた。ER ファジー-X mRNA レベルは大動脈縮窄後不全心で低下しており、ER ファジーの低下から心不全の進展に関与することが示唆される (図 2)。Sec62 などの他の ER ファジー関連分子の mRNA は、変化を認めなかった。

In vitro では、X のノックダウン後、小胞体ストレスを誘導させ、ユビキチン陽性・P62 陽性の不良タンパク質の蓄積を免疫染色を行った。ノックダウンによる X タンパク質レベルの低下が十分でなかった可能性があったが、ER ファジーの明らかな変化を認めなかった。in vitro における X の ER ファジーの意義に関する検討では、X ノックダウンの系が確立出来ず、X 心筋細胞特異的ノックアウトマウス作成には至っていない。一方、質量分析の解析によりオートファジー



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Misaka T, Niimura Y, Yoshihisa A, Wada K, Kimishima Y, Yokokawa T, Abe S, Oikawa M, Kaneshiro T, Kobayashi A, Yamaki T, Kunii H, Takeishi Y.	4. 巻 38
2. 論文標題 Clinical impact of sleep-disordered breathing on very short-term blood pressure variability determined by pulse transit time.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Hypertens	6. 最初と最後の頁 1703-1711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HJH.0000000000002445	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 Misaka Tomofumi, Yoshihisa Akio, Yokokawa Tetsuro, Sato Takamasa, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Yamaki Takayoshi, Sugimoto Koichi, Kunii Hiroyuki, Nakazato Kazuhiko, Takeishi Yasuchika	4. 巻 66
2. 論文標題 Plasma levels of melatonin in dilated cardiomyopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pineal Research	6. 最初と最後の頁 e12564 ~ e12564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jpi.12564	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 Misaka Tomofumi, Yoshihisa Akio, Takeishi Yasuchika	4. 巻 495
2. 論文標題 Titin in muscular dystrophy and cardiomyopathy: Urinary titin as a novel marker	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 123 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2019.04.005	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 Yoshihisa Akio, Yokokawa Tetsuro, Misaka Tomofumi, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Yamaki Takayoshi, Sugimoto Koichi, Kunii Hiroyuki, Nakazato Kazuhiko, Takeishi Yasuchika	4. 巻 6
2. 論文標題 Soluble neprilysin does not correlate with prognosis in pulmonary hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 291 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ehf2.12404	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 Yoshihisa Akiomi, Misaka Tomofumi, Kanno Yuki, Yokokawa Tetsuro, Sato Takamasa, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Yamaki Takayoshi, Kunii Hiroyuki, Takeishi Yasuchika	4. 巻 60
2. 論文標題 Prognostic Impact of Restless Legs Syndrome on Patients with Heart Failure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 1098 ~ 1105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.19-049	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 Sugimoto Koichi, Yokokawa Tetsuro, Misaka Tomofumi, Nakazato Kazuhiko, Ishida Takafumi, Takeishi Yasuchika	4. 巻 60
2. 論文標題 Senescence Marker Protein 30 Deficiency Exacerbates Pulmonary Hypertension in Hypoxia-Exposed Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 1430 ~ 1434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.19-190	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15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Misaka T, Yoshihisa A, Hotsuki Y, Watanabe K, Sato Y, Kimishima Y, Yokokawa T, Oikawa M, Kobayashi A, Takeishi Y.
2. 発表標題 Clinical impact of splenic ultrasonographic findings in patients with heart failure
3. 学会等名 第85回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Misaka T, Ichijo Y, Yoshihisa A, Hotsuki Y, Watanabe K, Anzai F, Sato Y, Kimishima Y, Yokokawa T, Oikawa M, Kobayashi A, Takeishi Y.
2. 発表標題 Hepatokine selenoprotein P is associated with hepatic hypoperfusion and predicts adverse prognosis in heart failure patients
3. 学会等名 第85回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三阪智史, 横川哲朗, 君島勇輔, 清水竹史, 金城貴士, 義久精臣, 竹石恭知.
2. 発表標題 Increases in circulating cardiomyocyte-specific cell-free DNA in heart failure
3. 学会等名 第24回 日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三阪智史, 義久精臣, 新村裕子, 君島勇輔, 菅野優紀, 横川哲朗, 佐藤崇匡, 及川雅啓, 小林 淳, 竹石恭知.
2. 発表標題 Clinical utility of pulse-transit-time to monitor beat-to-beat blood pressure in the patients with sleep disordered breathing
3. 学会等名 第84回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三阪智史, 横川哲朗, 君島勇輔, 清水竹史, 金城貴士, 義久 精臣, 竹石 恭知
2. 発表標題 心不全における心筋細胞特異的セルフリーDNA の臨床的意義
3. 学会等名 第6回 日本心筋症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Misaka T, Yokokawa T, Kimishima Y, Shimizu T, Kaneshiro T, Takeishi Y
2. 発表標題 An increase in circulating cardiomyocyte-specific cell-free DNA in heart failure.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Session 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Misaka T, Ichijo Y, Yoshihisa A, Hotsuki Y, Watanabe K, Sato Y, Kimishima Y, Yokokawa T, Oikawa M, Kobayashi A, Takeishi Y.
2. 発表標題 Serum hepatokine selenoprotein P is upregulated by hepatic hypoperfusion and predicts adverse prognosis in heart failure patients.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Session 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Misaka Tomofumi
2. 発表標題 Cardioprotective role of FKBP8 during pressure overload by preventing accumulation of misfolded proteins and ER associated apoptosis
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 Misaka T, Yoshihisa A, Kono S, Ichijo Y, Oikawa M, Kaneshiro T, Miura I, Yabe H, Ishida T, Takeishi Y
2. 発表標題 Reduced brain activity is associated with anxiety status and cognitive function in patients with heart failure as measured by near-infrared spectroscopy
3. 学会等名 Scientific Sessions of American Heart Association 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Misaka T, Yoshihisa A, Niimura Y, Kimishima Y, Kanno Y, Yokokawa T, Sato T, Kobayashi A, Takeishi Y
2. 発表標題 Clinical utility of pulse-transit-time for continuous blood pressure monitoring in patient with sleep disordered breathing.
3. 学会等名 Scientific Sessions of American Heart Association 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Misaka T, Yoshihisa A, Ichijo Y, Kimishima Y, Kanno Y, Yokokawa T, Abe S, Sato T, Oikawa M, Kobayashi A, Yamaki T, Kunii H, Nakazato K, Ishida T, Takeishi Y
2. 発表標題 Clinical implications of intrarenal hemodynamic evaluation by ultrasonography in patients with heart failure.
3. 学会等名 Scientific Sessions of American Heart Association 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kimishima Y, Misaka T, Yokokawa T, Minakawa K, Sugimoto K, Ishida T, Ikeda K, Takeishi Y
2. 発表標題 JAK2 V617F mutation promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice
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 Kimishima Y, Misaka T, Yokokawa T, Sugimoto K, Minakawa K, Ishida T, Ikeda K, Takeishi Y
2. 発表標題 Janus activating kinase 2 V617f mutation promotes hypoxia induced pulmonary hypertension in mice
3. 学会等名 Scientific Sessions of American Heart Association 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三阪智史
2. 発表標題 心不全における細胞内品質管理；心筋細胞老化から多臓器連関まで
3. 学会等名 令和元年度福島医学会表彰受賞授与式及び受賞記念講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三阪智史, 竹石恭知
2. 発表標題 加齢に関連した新しい心不全のメカニズム (シンポジウム)
3. 学会等名 脳心血管抗加齢研究会2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 三阪智史, 竹石恭知	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本臨牀	5. 総ページ数 4
3. 書名 . 心筋疾患 23. 膠原病に伴う心筋症. 別冊 日本臨牀 領域別症候群シリーズ 5, 211-214, 2019	

1. 著者名 義久精臣, 三阪智史, 竹石恭知	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 6
3. 書名 . 睡眠時無呼吸と生活習慣病: OSA, CSAと冠動脈疾患, 心房細動, 心不全 呼吸器ジャーナル 67, 448-453, 2019	

〔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
---------	---------