

令和 5 年 5 月 6 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08489

研究課題名(和文) 老化による心機能低下における低分子量Gタンパク質シグナル伝達系の新たな作用機序

研究課題名(英文) Novel role of small G protein signaling in the cardiac senescence-induced heart dysfunction

研究代表者

扇田 久和 (Ogita, Hisakazu)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：50379236

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)：心臓老化に対して低分子量Gタンパク質の一つRhoAが心保護的に作用していることを、心筋特異的RhoAコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作製して明らかにした。RhoAは心筋細胞内でパーキンの発現を促進し、心筋エネルギー代謝に重要なミトコンドリアの機能維持に関与していた。また、RhoA cKOマウスにアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を使って心筋でのパーキンの発現を補充すると心臓老化を抑制することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義として、高齢者で増加している心機能低下、心不全に関する新たな分子メカニズムを解明することができた。心不全は現在でも5年生存率約50%という予後不良の病態であり、本研究の成果は超高齢社会の日本においてこの病態を克服するための治療法開発の基盤として活用できる。例えば、心筋RhoAの発現が低下している心不全患者に対して、AAVを用いて心筋へのRhoAあるいはパーキンの補充療法を開発していくことなどが考えられる。

研究成果の概要(英文)：The main findings of this study were the cardioprotective effects of RhoA, a small GTPase, on cardiac senescence, which was certified by use of the originally generated cardiomyocyte-specific RhoA conditional knockout (cKO) mice. RhoA promoted the expression of Parkin in cardiomyocytes, and maintained the function of mitochondria in the heart. When reduced Parkin expression in the RhoA cKO heart was supplemented by the adeno-associated virus (AAV) system, cardiac senescence was almost completely recovered.

研究分野：生化学、循環器内科

キーワード：心機能 ミトコンドリア 老化 RhoA

1. 研究開始当初の背景

心機能低下(収縮障害および拡張障害を含む)から生じる心不全は現在においても国内外を問わず、5年生存率約50%と予後不良の疾患である。日本循環器学会の調査によれば、日本での最近の心不全による入院患者・死亡者数は、毎年15%以上もの大幅な増加を示している。超高齢社会を迎えた日本において、ヒトの「老化」は極めて大きな問題である。老化は心機能低下を引き起こし心不全の原因となることから、心不全の増加が今後も持続することは確実である。しかし、老化がどのように心機能を低下させるのかはほとんど分かっていない。

一方、一部の遺伝性疾患などを除いて、心不全に対する根本的な治療はまだ実用化されていない。現在、内科的な心不全治療として β -ブロッカーやアンジオテンシン変換酵素阻害薬などの投与が一般的である。これらの薬剤は実際、心不全の治療成績において一定の成果を上げている。しかし、今後ますます増加する高齢者の心機能低下・心不全に対応するためには、老化により心機能低下・心不全が生じ、症状が悪化していくプロセスにおける心筋の様態を分子レベルで解明することと、その知見に基づいた新たな治療法を開発することが循環器領域における重要課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、老化による心機能低下・心不全の発症を制御している分子メカニズムについて、細胞レベルから複数の動物モデル、患者サンプルまで幅広く実験を行うことで統合的に解明することである。本研究では特に低分子量Gタンパク質RhoAおよびその関連シグナル分子に着目して研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 心筋特異的RhoAコンディショナルノックアウト(cKO)マウスの作製

Rhoa 遺伝子のエキソン3の両側にloxP配列を挿入したRhoA-floxマウス(C57BL/6系統)と、心筋細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するMyh6-Creマウス(米国ジャクソン研究所より導入)を掛け合わせてRhoAcKOマウスを作製した。Creリコンビナーゼを持たず、loxP配列しか保有しないマウスをコントロールマウスとして使用した。これらのマウスはSPF環境で飼育した。上記マウスを使用する実験については、滋賀医科大学動物実験委員会の承認を得ており、ARRIVEガイドラインなどのガイドライン・諸規則に則って動物福祉に留意しつつ実施した。

(2) 心筋細胞培養

HL-1心筋細胞を使用した。HL-1細胞は10%ウシ胎児血清を添加したClaycomb培地で培養した。この細胞でRhoAをノックダウンするために、siRhoA(5'-GCAGAGUAUUGGCAAACAG-3')を、N-Mycをノックダウンするために、siN-Myc(5'-GCUCUUGCGGCCAGUAUUA-3')を用いた。コントロールとしてスクランブル配列(5'-CAGUCGCGUUUGCGACUGG-3')を用いた。

(3) 心エコー解析、血圧・脈拍測定

この解析を行うため、マウスを1%イソフルランで麻酔した。左室のディメンジョンや収縮能はVevo2100(VisualSonics社製)で測定・解析した。マウスの血圧・脈拍は覚醒したまま、BP-98-AL(Softron社製)を用いてtail-cuff法で測定した。

(4) アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いたパーキンの心筋細胞での発現

AAV serotype 6ベクターを用いてパーキンを、HL-1心筋細胞またはマウス心臓に発現させた。AAV-パーキンベクターはVector Builder社で作製した。HL-1細胞には培養液を介して、マウスには尾静脈から注入(1×10^{11} ウイルスパーティクル)することで投与した。

(5) 統計処理

データは平均±標準偏差で示した。グループ間の統計学的差異はtテストあるいはANOVAを利用して検定した。生存率の差はカプラン-マイヤー法を用い、log-rankテストで検定した。 $p < 0.05$ で統計学的に有意と判定した。

4. 研究成果

(1) Rho cKOマウスの早期死亡と心機能低下

RhoAcKOマウスはコントロールマウスと同様に異常なく出生したが、生後10週頃より死亡

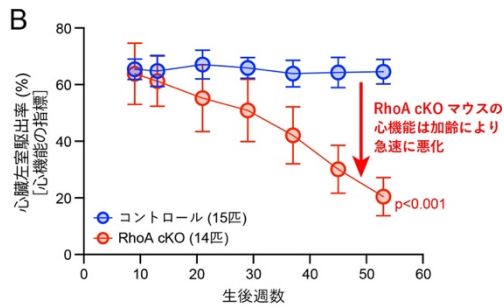
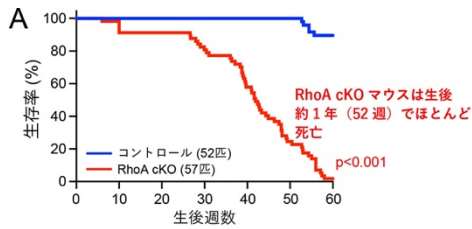


図1. マウスの生存曲線 (A) と心臓左室駆出率 (B)

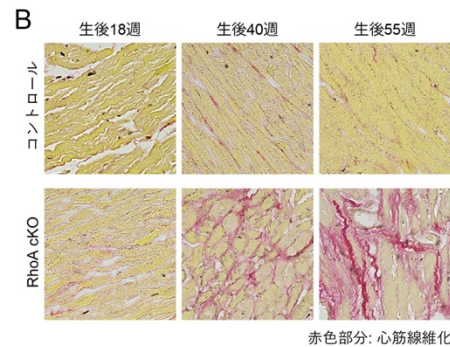
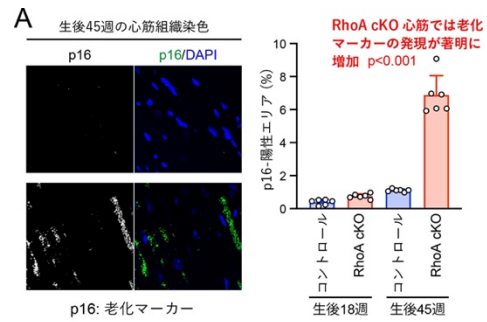


図2. マウス心筋の老化 (A) と線維化 (B)

する個体が現れ、生後1年(52週)でほとんどの個体が死亡した(図1A)。一方、コントロールマウスはほぼ全例1年以上生存した。心臓の機能を心エコーで観察すると、RhoA cKO マウスでは、生後10週頃より心機能の指標となる左室収縮率(LVEF)が低下し、1年後にはLVEFが約20%と生きていくのに非常に厳しい状態となっていた(図1B)。

(2) RhoA cKO マウス心臓での急速な老化進行と心筋線維化

上記のような RhoA cKO マウスの早期死亡、心臓機能低下が生じる原因を調べるため、心筋組織で老化マーカー(p16 など)に免疫組織染色したところ、RhoA cKO マウスでは p16 などの老化マーカーの発現が有意に増加していた(図2A)。また、心筋の線維化も RhoA cKO マウスで顕著に見られた(図2B)。

(3) RhoA cKO マウス心筋ミトコンドリアの破綻

心筋の老化にミトコンドリア機能が関係していることが報告されていることから(Lesnefsky E, et al. *Circ Res.* 2016)、心筋サンプルを電子顕微鏡でミトコンドリアの形態を観察すると、RhoA cKO マウス心筋では加齢に伴いミトコンドリアの形態が異常となり、55週齢ではほぼ全てのミ

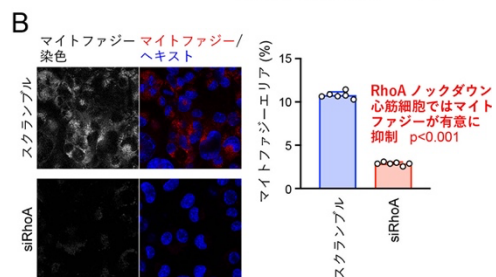
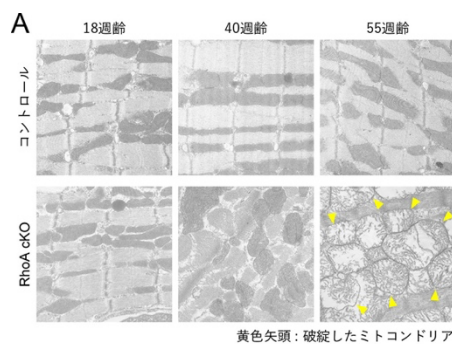


図3. RhoA cKO マウス心筋でのミトコンドリアの破綻 (A) と RhoA ノックダウン HL-1 細胞でのミトファジーの抑制 (B)

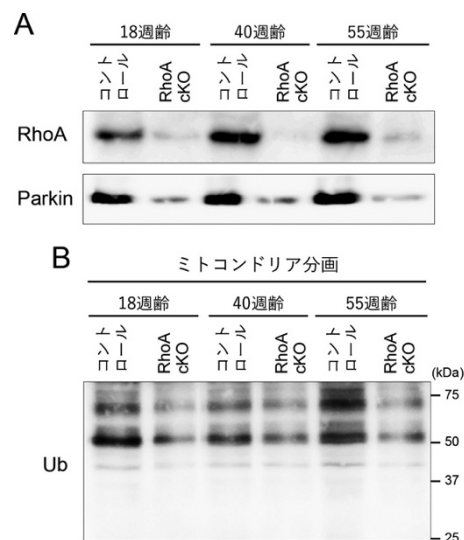


図4. RhoA cKO マウス心筋におけるパーキン発現減少 (A) とミトコンドリアのユビキチン化減少 (B)

トコンドリアが形態的に破綻していた (図 3A)。ミトコンドリアの形態維持にはマイトファジーによる調節が必要であるが、RhoA をノックダウンした HL-1 心筋細胞ではマイトファジーが有意に抑制されていた (図 3B)。

(4) 心筋ミトコンドリア機能維持に関する分子レベルでの解析

マイトファジーに関わる主要な分子としてパーキン (Parkin) がある (Dorn GW. *Biochim Biophys Acta*. 2016)。パーキンは E3 ユビキチンリガーゼで、ダメージを受けたミトコンドリアにユビキチン (Ub) の目印を付けてそのようなミトコンドリアを処理するマイトファジーを促進している。RhoA cKO マウス心筋ではパーキンの発現はほぼ消失し (図 4A)、ミトコンドリアのユビキチン付加も大きく減少した (図 4B)。さらに詳細な解析により、RhoA はパーキンの発現を抑制する N-Myc の発現を抑制してパーキンの発現を維持していること、RhoA をノックダウンした HL-1 細胞においてさらに N-Myc をノックダウンするとパーキンの発現が回復することが分かった (図 5)。

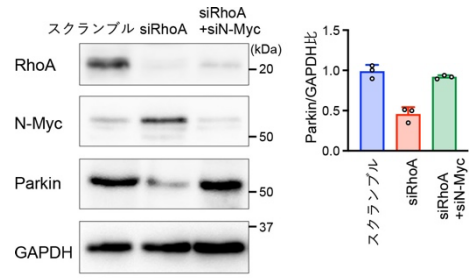


図 5. HL-1 細胞での RhoA、N-Myc、パーキンの発現

(5) RhoA cKO マウスにおける AAV ベクターを用いたパーキン補充療法

RhoA cKO マウスの心機能回復と老化予防を目的として、RhoA cKO マウスに、AAV ベクターを利用して、AAV-パーキンを 2 回静脈内投与し、心臓でのパーキン発現量を人工的に増やした。AAV-パーキンを投与した RhoA cKO マウスは、AAV ベクターのみを投与した RhoA cKO マウスと比較して、心機能が回復し、生存率も向上した (図 6A, B)。また、HL-1 細胞を用いた実験で、RhoA をノックダウンすることで強く抑制されたマイトファジーが AAV-パーキンを投与することで回復した (図 6C)。

(6) ヒト心不全サンプルにおける RhoA の発現解析

心不全が生じる原因として、いくつかの遺伝子異常が見出されているが、原因不明なことも多い。中年以降に発症した原因不明の重度心不全患者の心筋生検サンプルを用いて解析したところ、重度心不全患者の心筋で RhoA およびパーキンの発現が低下していることを見出した (図 7)。



図 7. 重度心不全患者における RhoA、Parkin の発現減少

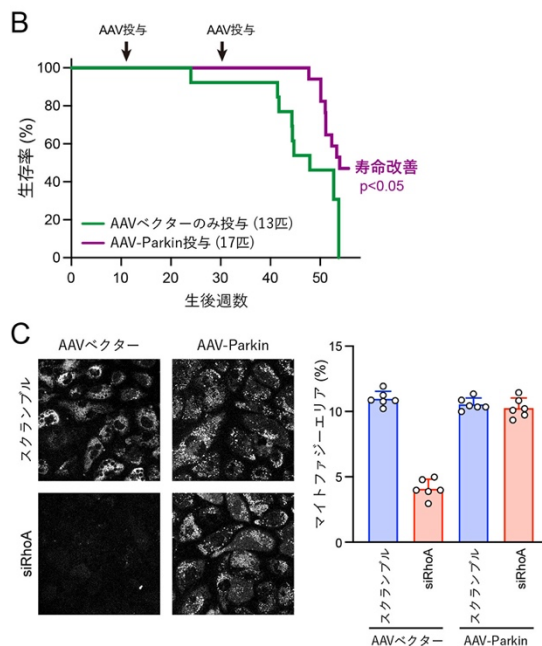


図 6. AAV-Parkin 投与により RhoA cKO マウスの心機能 (A) および寿命 (B) が改善し、HL-1 細胞ではマイトファジーも回復 (C)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Soh JEC, Shimizu A, Molla MR, Zankov DP, Nguyen LKC, Khan MR, Tesega WW, Chen S, Tojo M, Ito Y, Sato A, Hitosugi M, Miyagawa S, Ogita H	4. 巻 299
2. 論文標題 RhoA rescues cardiac senescence by regulating Parkin-mediated mitophagy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 102993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.102993	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 Molla MR, Shimizu A, Komeno M, Rahman NIA, Soh JEC, Nguyen LKC, Khan MR, Tesega WWW, Chen S, Pang X, Tanaka-Okamoto M, Takashima N, Sato A, Suzuki T, Ogita H	4. 巻 5
2. 論文標題 Vascular smooth muscle RhoA counteracts abdominal aortic aneurysm formation by modulating MAP4K4 activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 1071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-04042-z	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 Sato A, Rahman NIA, Shimizu A, Ogita H	4. 巻 112
2. 論文標題 Cell to cell contact mediated regulation of tumor behavior in the tumor microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 4005 ~ 4012
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15114	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 Nguyen LKC, Shimizu A, Soh JEC, Komeno M, Sato A, Ogita H	4. 巻 170
2. 論文標題 Transmembrane protein 168 mutation reduces cardiomyocyte cell surface expression of Nav1.5 through B-crystallin intracellular dynamics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 577 ~ 585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab066	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 Komeno M, Pang X, Shimizu A, Molla MR, Yasuda-Yamahara M, Kume S, Rahman NIA, Soh JEC, Nguyen LKC, Ahmat Amin MKB, Kokami N, Sato A, Asano Y, Maegawa H, Ogita H	4. 巻 296
2. 論文標題 Cardio- and reno-protective effects of dipeptidyl peptidase III in diabetic mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 100761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100761	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 Suzuki T, Ogita H, Sato A, Minamidate N, Hachiro K	4. 巻 62
2. 論文標題 Differences Between Patients with and without Atherosclerosis in Expression Levels of Inflammatory Mediators in the Adipose Tissue Around the Coronary Artery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Heart J	6. 最初と最後の頁 390 ~ 395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.20-585	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 Rahman NIA, Sato A, Tsevelnorov K, Shimizu A, Komeno M, Ahmat Amin MKB, Molla MR, Soh JEC, Nguyen LKC, Wada A, Kawauchi A, Ogita H	4. 巻 81
2. 論文標題 Stomatin-Mediated Inhibition of the Akt Signaling Axis Suppresses Tumor Growth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Res	6. 最初と最後の頁 2318 ~ 2331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-2331	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 Shimizu A, Zankov DP, Sato A, Komeno M, Toyoda F, Yamazaki S, Makita T, Noda T, Ikawa M, Asano Y, Miyashita Y, Takashima S, Morita H, Ishikawa T, Makita N, Hitosugi M, Matsuura H, Ohno S, Horie M, Ogita H	4. 巻 34
2. 論文標題 Identification of transmembrane protein 168 mutation in familial Brugada syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 6399 ~ 6417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201902991R	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 Tomita I, Kume S, Sugahara S, Osawa N, Yamahara K, Yasuda-Yamahara M, Takeda N, Chin-Kanasaki M, Kaneko T, Mayoux E, Mark M, Yanagita M, Ogita H, Araki S, Maegawa H	4. 巻 32
2. 論文標題 SGLT2 Inhibition Mediates Protection from Diabetic Kidney Disease by Promoting Ketone Body-Induced mTORC1 Inhibition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Metab	6. 最初と最後の頁 404 ~ 419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmet.2020.06.020	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19件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Joanne Ern Chi Soh、清水昭男、Md Rasel Molla、扇田久和
2. 発表標題 Novel protective role of RhoA in the senescence heart by regulating Parkin-mediated mitophagy
3. 学会等名 日本循環器学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Le Kim Chi Nguyen、清水昭男、佐藤朗、扇田久和
2. 発表標題 Role of transmembrane protein 168 mutation in Brugada syndrome by alteration in subcellular localization of B-crystallin to modulate sodium channel Nav1.5 surface expression in cardiomyocytes
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤朗、清水昭男、扇田久和
2. 発表標題 非ヒト霊長類モデルを活用したドキシソルピシン誘発心筋症における心筋障害因子S100A8/9の同定とその阻害による心保護
3. 学会等名 腫瘍循環器学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Md Mahbubur Rahman Khan、佐藤朗、清水昭男、米野雅大、扇田久和
2. 発表標題 Role of Afadin in vascular smooth muscle contraction via the Gq - phospholipase C axis to enhance calcium signaling
3. 学会等名 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Le Kim Chi Nguyen、清水昭男、佐藤朗、扇田久和
2. 発表標題 Transmembrane protein 168 mutation that associates with Brugada syndrome recruits B-crystallin to reduce cardiac Nav1.5 expression on the cardiomyocyte surface
3. 学会等名 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Joanne Ern Chi Soh、清水昭男、扇田久和
2. 発表標題 RhoA regulates senescence heart by maintaining mitochondrial function via Parkin-dependent mitophagy
3. 学会等名 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Md RaseI Molla、清水昭男、佐藤朗、鈴木友彰、扇田久和
2. 発表標題 Vascular Smooth Muscle RhoA Confers Protection Against Abdominal Aortic Aneurysm Formation by Inhibiting MAP4K4 Activity
3. 学会等名 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Md Rasel Molla、清水昭男、Nor Idayu A. Rahman、Joanne Ern Chi Soh、Le Kim Chi Nguyen、Mahbubur Rahman Khan、岡本（田中）三紀、高島範之、佐藤朗、鈴木友彰、扇田久和
2. 発表標題 Novel protective role of RhoA in vascular smooth muscle cells against aortic aneurysm formation
3. 学会等名 日本循環器学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nor Idayu A. Rahman、佐藤朗、清水昭男、米野雅大、Md Rasel Molla、Joanne Ern Chi Soh、Le Kim Chi Nguyen、和田晃典、河内明宏、扇田久和
2. 発表標題 Stomatin possesses tumor-suppressive effect via the PDPK1-Akt signaling axis.
3. 学会等名 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米野雅大、Md Rasel Molla、清水昭男、扇田久和
2. 発表標題 Dipeptidyl peptidase IIIの糖尿病性腎臓病抑制機序
3. 学会等名 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Joanne Ern Chi Soh、清水昭男、Md Rasel Molla、米野雅大、扇田久和
2. 発表標題 RhoA protects senescence heart by preserving mitochondrial function via Parkin
3. 学会等名 日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 扇田久和、佐藤朗
2. 発表標題 Tumor microenvironment-mediated upregulation of stomatin for suppressing the tumor growth by inhibiting the Akt pathway
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米野雅大、Md Raseel Molla、清水昭男、扇田久和
2. 発表標題 ジベプチジルペプチダーゼIIIが糖尿病性腎臓病を抑制する作用機序
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Joanne Ern Chi Soh、清水昭男、Md Raseel Molla、米野雅大、扇田久和
2. 発表標題 RhoA rescues senescence heart by maintaining mitochondrial function via Parkin
3. 学会等名 日本循環器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米野雅大、清水昭男、扇田久和
2. 発表標題 Dipeptidyl Peptidase III Prevents Cardiac Dysfunction and Nephropathy in Type II Diabetes
3. 学会等名 日本循環器学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Md Rasef Molla, 清水昭男, 扇田久和
2. 発表標題 Novel mechanism for the protective effect of RhoA in vascular smooth muscle cells on abdominal aortic aneurysm
3. 学会等名 日本循環器学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hisakazu Ogita, Dimitar P. Zankov, Akio Shimizu
2. 発表標題 A novel mutation in transmembrane protein 168 causes fatal ventricular arrhythmogenesis in Brugada syndrome
3. 学会等名 European Society of Cardiology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Md Rasef Molla, 清水昭男, 扇田久和
2. 発表標題 RhoA Confers Protection Against Aortic Aneurysm by Preserving Aortic Smooth Muscle Contractility and Preventing Inflammation
3. 学会等名 日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Md Rasef Molla, 清水昭男, 佐藤朗, 扇田久和
2. 発表標題 Novel protective effect of vascular smooth muscle RhoA on aortic aneurysm
3. 学会等名 日本血管生物医学会若手研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 低密度リポタンパク質受容体ノックアウトによる脂質異常症カニクイザルの作製	発明者 扇田久和、佐藤朗、 依馬正次、築山智之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-135524	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 心不全の治療及び / 又は予防用医薬組成物	発明者 扇田久和、佐藤朗	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-196440	出願年 2022年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 電位治療器	発明者 見片三郎、阿部剛代 志、扇田久和	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/002592	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

滋賀医科大学 生化学・分子生物学講座 分子病態生化学部門 http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbioch2/ 滋賀医科大学 分子病態生化学ホームページ http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbioch2/
--

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
---------	---------