

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17077

研究課題名(和文) 三量体Gタンパク質を介した心不全進展の新規発症機序の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of a novel pathogenic mechanism of heart failure progression mediated by trimeric G protein

研究代表者

稲住 英明 (Inazumi, Hideaki)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：10844037

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)：我々は独自に開発した心不全モデルマウスを解析することにより、心血管病における役割が明らかでなかった抑制性Gタンパクサブユニット(G_{i/o})ファミリーのサブタイプの一つであるG_oが、不全心室筋で発現増加し、心不全の発症・進展に寄与するという新知見を見出すに至っている。本研究ではその分子メカニズムとして、G_oの発現増加によりマウス心室筋細胞のL型Caチャンネル電流の局在が変化する(T管ではなく細胞表面膜を介したL型Caチャンネル電流が増加する)ことを明らかにした。またこれはL型Caチャンネルの細胞内局在ではなく活性(開口確率)の変化によるものであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私達はこれまで心血管病における役割が明らかでなかった抑制性Gタンパクサブユニット(G_{i/o})ファミリーのサブタイプの一つであるG_oが心筋細胞内のL型Caチャンネルの局所活性を変化させることで心不全の発症・進展に寄与するという新知見を見出すことができました。本研究結果は高齢化により今後ますます増加が見込まれる心不全患者さんに対する新たな治療法の開発に繋がる可能性があると考えられます。

研究成果の概要(英文)：By analyzing a proprietary mouse model of heart failure, we have discovered that G_o, a subtype of the inhibitory G protein subunit (G_{i/o}) family, whose role in cardiovascular disease has not been clarified, is upregulated in failing ventricular muscle and contributes to the onset and progression of heart failure. In this study, we found that G_o up-regulation alters the localization of L-type Ca channel currents in mouse ventricular myocytes (L-type Ca channel currents through the cell surface membrane, not T-tube, are increased) as a molecular mechanism. We also found that this was not due to the subcellular localization of L-type Ca channels but to changes in their activity.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全

1. 研究開始当初の背景

申請者の所属するグループはこれまでに、心不全進展に関わる心筋胎児型遺伝子の発現を転写抑制因子 NRSF が抑制的に制御すること、また優性抑制変異体 NRSF を心筋特異的に過剰発現したマウス (dnNRSF-Tg) が進行性の心収縮力低下と心拡大、致死性不整脈による突然死をきたすなどヒト拡張型心筋症類似の表現型を呈することを示し、心筋恒常性維持における NRSF の重要性を明らかにしてきた (Kawahara et al. Mol Cell Biol.2001, EMBO J.2003; Nakagawa et al J Mol Cell Cardiol 2006)。しかし NRSF による心機能維持機構の詳細は依然不明であった。申請者は dnNRSF-Tg の心室筋における網羅的遺伝子発現解析により、dnNRSF-Tg では抑制性 G タンパクサブユニット G_{i/o} サブファミリーに属する G_o の発現が著明に増加していることを見いだした。

G_{i/o} は G_s に拮抗する形で短期的には アドレナリン受容体刺激による心筋収縮能亢進に対して抑制的に働くと考えられるものの、正常心室筋での主要サブタイプである G_{i2} の活性化が心保護的に働く可能性も報告されており、G_{i/o} の慢性心不全進行における役割は未だ不明であった。そこで G_o が NRSF の下流で心機能維持に重要な役割を果たすことを検証するために dnNRSF-Tg と G_o ノックアウトマウスを交配したところ、心機能の改善や心室性不整脈の減少、生存率の改善をきたす知見を得た。

さらに圧負荷心不全モデルマウスやトロポニン変異を有するヒト心筋症モデルマウスの不全心室筋でも G_o の発現亢進を確認したことから、G_o が心不全の発症・進展において重要な役割をもち、新規の心不全治療・予防標的となりうる可能性が考えられた。

その後上記心不全モデルマウスに対する G_o の遺伝的抑制による心不全の表現系の改善の有無や、また新たに心筋特異的 G_o 過剰発現マウスを作成し心不全様の表現系を呈するかについて検討し、心筋での G_o 発現上昇が心不全発症、進展に寄与することを確認することで、G_o が新たな治療標的になりうることの proof of concept (POC) を確立した。

ただ G_o の発現上昇がどのようにして心不全の発症、進展に寄与するのか。そのメカニズムについては未だ不明であった。また三量体 G タンパク質は共役している GPCR にリガンドが結合することで活性化され、サブユニットとサブユニットに分かれたあとそれぞれが特異的なシグナルを下流に伝えるが、同じ三量体 G タンパク質でも組織によって共役する GPCR は異なり、心室筋において G_o が共役する GPCR についても未だ不明である。

2. 研究の目的

G_o の発現上昇が心不全の発症、進展を引き起こす分子メカニズムを明らかにし、新たな心不全治療法の開発を行うこと。

3. 研究の方法

dnNRSF-Tg と dnNRSF-Tg に G_o ノックアウトマウスを交配し G_o 発現を遺伝的に半分に抑制したマウス (Gnao1 hKO; dnNRSF-Tg)、心筋特異的 G_o 過剰発現マウス (GNAO1-Tg) の心室組織での生化学的、分子生物学的検討や上記 dnNRSF-Tg、Gnao1 hKO; dnNRSF-Tg、GNAO1-Tg から単離した心室筋細胞における L 型 Ca チャネル電流の評価、並びに細胞免疫染色による L 型 Ca チャネルの細胞内局在評価を行った。

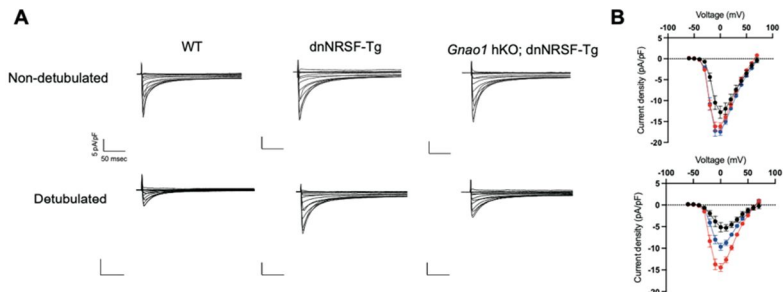
G_o が心室筋において共役する GPCR を同定するための共免疫沈降、またその結果共役する候補

とした受容体に対する阻害薬を心不全モデルマウス (dnNRSF-Tg) に対し投与し表現系を評価する実験を行った。

4. 研究成果

近年、興奮収縮連関に関わる T 管の L 型 Ca チャンネルではなく、細胞表面膜の L 型 Ca チャンネルを介した Ca 電流が CaMKII の活性化などの病的な Ca シグナリングに関わると報告されている。

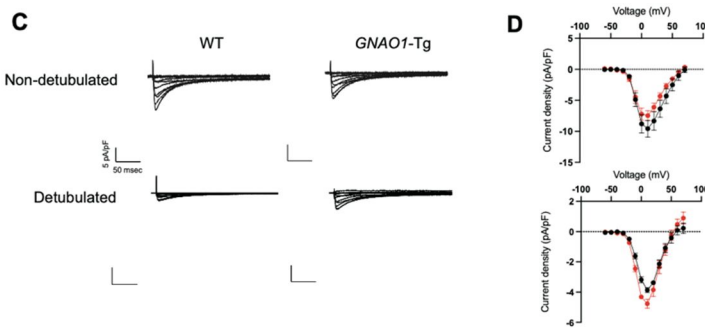
コントロールマウス、dnNRSF-Tg、Gnao1 hKO; dnNRSF-Tg の各マウスから単離した心筋細胞に対しパッチクランプで L 型 Ca チャンネル電流の評価を行ったところ (右図 Non-detubulated) 有意な差を認めなかった一方で、T 管を薬剤



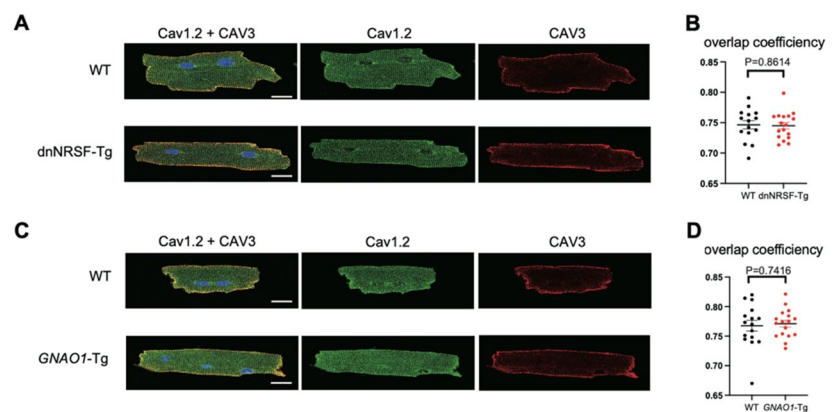
で漬すことで細胞表面膜に局限した L 型 Ca チャンネルを介した Ca 電流を評価したところ、dnNRSF-Tg 由来の心筋細胞では有意に電流密度が増加し、それが Gnao1 hKO; dnNRSF-Tg 由来の心筋細胞では軽減していることが明らかになった (上図 Detubulated)。

また心機能低下の生じていない若年の GNAO1-Tg から単離した心筋細胞についても同様の評価を

行ったところ、やはり心筋細胞全体 (T 管 + 細胞表面膜) では明らかな差を認めなかった一方で、細胞表面膜に局限した L 型 Ca チャンネルを介した Ca 電流が増加していた (右図) ことから、G o の発現上昇が 1 次的に L 型 Ca チャンネル電流の局在を変化させていることが推測された。



一方 L 型 Ca チャンネルの心筋細胞内局在について細胞免疫染色で評価したところ、G o の発現上昇にも関わらず細胞表面膜と T 管の間で L 型 Ca チャンネル自体の局在に変化を認めなかったことから (右図) G o の発現上昇は細胞表面膜における L 型 Ca チャンネルの局所活性 (開口確立) を変化させていることが推測された。



さらに G o の発現上昇により CaMKII のリン酸化が亢進し、それがさらにリアノジンレセプター-2 (RyR2) の過リン酸化が生じること、またマウスの生体内で内因性の G o の発現を亢進させることが明らかになり、心筋内では NRSF、G o、CaMKII がポジティブフィードバックループを形成することで心筋リモデリングの進行が生じることを明らかにした。(Inazumi et al Circ Res 2022)

一方でラット新生仔心室筋細胞を用いて複数の GPCR に対し共免疫沈降を行い、Gao と共役する GPCR の候補を得たがその阻害薬は dnNRSF-Tg の表現系を改善しなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inazumi Hideaki et al.	4. 巻 130
2. 論文標題 NRSF- ² <i>GNAO1</i> 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 Inazumi Hideaki, Kuwahara Koichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 NRSF/REST-Mediated Epigenomic Regulation in the Heart: Transcriptional Control of Natriuretic Peptides and Beyond	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 1197 ~ 1197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology11081197	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 稲住 英明
2. 発表標題 NRSF-GNAO1-CaMKII 転写制御回路の心筋リモデリング、Ca ²⁺ 恒常性における意義
3. 学会等名 第31回日本循環薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideaki Inazumi
2. 発表標題 The significance of NRSF-GNAO1-CaMKII transcriptional circuit in myocardial remodeling
3. 学会等名 第38回国際心臓研究学会日本部会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideaki Inazumi
2. 発表標題 CaMK-NRSF-GNAO1 transcriptional circuits participates in the pathological cardiac remodeling
3. 学会等名 Basic Cardiovascular Science (BCVS) 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideaki Inazumi, Yasuaki Nakagawa, Kenji Moriuchi, Koichiro Kuwahara
2. 発表標題 Increased G _o Expression Regulated by NRSF Plays a Key Role in the Development of Heart Failure Through the Impairment of Ca ²⁺ Homeostasis
3. 学会等名 Basic Cardiovascular Science (BCVS) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideaki Inazumi, Yoshihiro Kuwabara, Koichiro Kuwahara, Yasuaki Nakagawa, Hideyuki Kinoshita, Kenji Moriuchi, Hiromu Yanagisawa, Toshio Nishikimi, Miku Oya, Mitsuhiko Yamada, Toshihide Kashiwara, Nagomi Kurebayashi, Masami Sugihara, Kazuwa Nakao, Takeshi Kimura
2. 発表標題 NRSF-GNAO1-CaMK2 axis exacerbates cardiac remodeling and progresses heart failure by impairing Ca ²⁺ homeostasis
3. 学会等名 European Society of Cardiology (ESC) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideaki Inazumi
2. 発表標題 NRSF-GNAO1 Transcriptional Pathway Plays a Pivotal Role in the Regulation of Cardiac Ca ²⁺ Homeostasis
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲住 英明
2. 発表標題 転写調節因子・エピゲノム制御因子に着目した心不全の病態解明
3. 学会等名 第70回日本心臓病学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲住英明, 桑原宏一郎, 中川靖章, 大矢未来, 木下秀之, 森内健司, 柳澤洋, 金森敬彦, 錦見俊雄, 中尾一和
2. 発表標題 転写調節因子NRSFを介した心不全進展の分子メカニズム
3. 学会等名 第26回日本心血管内分泌代謝学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------