

# 様式 C-19

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号：31201 研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2009～2011  
課題番号：21590299  
研究課題名（和文） 細胞内変性タンパク質の凝集機構解明と凝集体形成阻害による新規心筋症治療法の開発  
研究課題名（英文） Development of new therapeutic strategy for rescuing cardiomyopathy via inhibition of protein aggregation  
研究代表者  
三部 篤 (SANBE ATSUSHI)  
岩手医科大学・薬学部・教授  
研究者番号：30425706

### 研究成果の概要：

デスミン心筋症の病態形成にヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)6が関わっているか否かを検討した。心筋細胞にデスミン心筋症の原因の一つである点変異 $\alpha$ -Bクリスタリンを過剰発現させると、細胞内に不溶性凝集体が蓄積し、細胞生存率は低下した。点変異クリスタリンと同時にHDAC6を過剰発現させると、点変異クリスタリンによる細胞障害は抑制された。一方、HDAC6を失活させると、細胞障害は悪化した。この結果は、遺伝子改変マウスを用いた研究でも再現された。心筋HDAC6活性の低下は、デスミン心筋症病態を悪化させることが明らかとなった。

A missense mutation in crystallin, alpha B (CryAB) causes desmin-related cardiomyopathy, which is characterized by the formation of aggresomes containing CryAB. Cardiac disease in desmin-related cardiomyopathy can be recapitulated in transgenic (TG) mice by expressing the mutant CryAB protein specifically in the cardiomyocytes, which causes perinuclear formation of aggresomes. To analyze the role of HDAC6 in cardiac disease in desmin-related cardiomyopathy, cardiac-specific TG mice with overexpressed dominant negative HDAC6 or wild-type HDAC6 were generated. The mice with dominant negative HDAC6 showed increased acetylated tubulin levels concomitantly with higher numbers of CryAB-positive aggresomes and enhancement of heart weight/body weight ratio, while overexpression of wild-type HDAC6 was protective in the mutant CryAB TG mice hearts. These results indicate that HDAC6 inhibition exacerbates cardiac disease in mice with desmin-related cardiomyopathy.

### 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：循環

#### 1. 研究開始当初の背景

神経筋変性疾患の多くは、正常な立体構造

を有さない変性タンパク質(unfolded protein)が原因で発症する。また、神経筋変性疾患に

限らず、デスミン心筋症、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋梗塞および心臓疾患の終焉である心不全などの心疾患においても、unfolded protein がその病態に関わっていることが報告されている。特にデスミン心筋症に関しては、申請者のグループが変性タンパク質関連疾患であることを見いだしている。これらの変性タンパク質が過剰に存在すると、アグレゾームと呼ばれる不溶性凝集体を形成し、細胞機能にとって様々な障害を引き起こすことが知られている。また、変性タンパク質はその凝集課程で可溶性中間体（別名アミロイドオリゴマー）を形成し、その可溶性中間体が細胞毒性を示すことも分かっている。これらの結果は、変性タンパク質が様々な疾患に深く関わっていることを意味するだけでなく、変性タンパク質の発生を消去、あるいは、変性タンパク質の分解を促進できれば、神経筋変性疾患や心筋症などの変性タンパク質関連疾患の治療につながる可能性を強く示唆する。

変性タンパク質は細胞内に存在するタンパク質分解系によって消去されるが、消去しきれなかったものは、 $\alpha$ -および $\beta$ -チューブリンから構成されている微小管に沿って細胞核周辺まで運ばれ、核周辺で蓄積し、アグレゾームを形成する。変性タンパク質の微小管上での変性タンパク質輸送機構は不明な点が多いが、近年、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) ファミリーの一つである、HDAC6 がその輸送に密接に関与していることが報告されている。また、近年の報告では、HDAC6 は単に変性タンパク質を輸送するだけでなく、他のタンパク質と複合体を形成し、変性タンパク質の分解および変性タンパク質から細胞を保護するストレスタンパク質 (HSP) の発現調節をしていることが報告されている。この結果は、HDAC6 の機能を修飾することにより、変性タンパク質の分解を促進し、かつ保護作用を示す HSP の発現誘導を亢進することが出来る可能性を意味する。しかし、HDAC6 の病態下での機能、特に心筋症などの心疾患での役割は全く不明である。すなわち、HDAC6 の心筋症での機能を解析することにより、デスミン心筋症の新規治療法の開発につながるだけでなく、その他の変性タンパク質関連疾患の新規治療法の開発にもつながると考えられる。

## 2. 研究の目的

デスミン心筋症の病態形成に HDAC6 が関わっているか否かを、培養心筋細胞、アデノウイルスシステムおよび siRNA をもちいたデスミン心筋症 *in vitro* モデルを使用して詳細に検討した。さらに HDAC6 の機能亢進あるいは機能消失により、デスミン心筋症病態が変化するか否かを、遺伝子改変動物モデル

を使用して *in vivo* レベルで検討した。

## 3. 研究の方法

### 1) デスミン心筋症病態への HDAC6 の関与 (*in vitro*)

HDAC6 のデスミン心筋症への関与を検討する目的で、デスミン心筋症 *in vitro* モデルを使用する。具体的には、新生児ラット (SD 系、1-3 日齢) の心臓を単離し、トリプシン、コラゲナーゼ処理後に 0.1%ゼラチンでコートしてあるプレート上に接着させ、心筋細胞を培養する。培養液は 10%牛胎児血清を含む D-MEM を用いる。培養 24 時間後に、血清を含まない D-MEM に培養液を置換後、野性型  $\alpha$ -B クリスタリン (CryAB) および CryAB の点変異体 (120 番目のアルギニン $\rightarrow$ グリシン, CryAB R120G) を含むアデノウイルスベクター (10 M.O.I) を加え、4 日間培養を行う。HDAC 阻害薬としては、トリコスタチン A、あるいはバルプロ酸を用いた。HDAC6 の過剰発現が、R120G によって引き起こされる細胞障害に影響するかを検討する為に、HDAC6 を含むアデノウイルスを作製し、CryAB R120G ウイルスと同時に処置した。また、HDAC 活性が必須であるか否かを検討する目的で、HDAC6 失活体 (216 番目ヒスチジン $\rightarrow$ アラニンおよび 611 番目ヒスチジン $\rightarrow$ アラニン) を作製し、アデノウイルスベクターを用いて、過剰発現させた。HDAC6 を選択的にノックダウンするために HDAC6 選択的な siRNA を作製し、心筋細胞に処置した。処置 4 日後、細胞生存率は MTT 法にて検討し、細胞内不溶性凝集体量はフィルター法を用いて定量した。HDAC6 の基質として知られているアセチル化  $\alpha$ -チューブリン量は、アセチル化  $\alpha$ -チューブリン特異的な抗体を用いて、ウェスタンブロット法にて測定した。

### 2) デスミン心筋症病態への HDAC6 の関与 (*in vivo*)

HDAC6 の機能亢進あるいは機能消失により、デスミン心筋症治療が可能か否かを、遺伝子改変マウスを用い、*in vivo* レベルで検討した。本研究では、 $\alpha$ -ミオシン重鎖プロモーターを用いた心筋特異的遺伝子発現システム (TG) を用いる。 $\alpha$ -ミオシン重鎖プロモーターを用い、CryAB R120G を心筋特異的に発現させた TG マウスは既に作製されている (CryAB R120G TG マウス)。この TG マウスに HDAC 阻害薬であるバルプロ酸を投与し、HDAC 阻害によるデスミン心筋症病態の変化を検討した。また、HDAC6 選択的な効果を検討するために、心筋特異的に HDAC6 を過剰発現しているマウス (HDAC6 TG マウス) および HDAC6 失活体 (216 番目ヒスチジン $\rightarrow$ アラニンおよび 611 番目ヒスチジン $\rightarrow$ アラニン) を過剰発現している TG マウス (HDAC6

失活体 TG マウス) を作製した。これらの HDAC6 TG マウス、HDAC6 失活 TG マウスと CryAB R120G TG マウスを掛け合わせ、ダブル TG マウスを作製し、その表現型を解析した。心筋症病態の進行は、心機能の変化、心筋組織学的変化(トリクローム染色、CryAB およびオリゴマー抗体の免疫染色)を検討した。また、心筋細胞の場合と同じく、アセチル化  $\alpha$ -チューブリン量は、アセチル化  $\alpha$ -チューブリン特異的な抗体を用いて、ウェスタンブロット法にて測定した。

#### 4. 研究成果

##### 1) デスミン心筋症病態への HDAC6 の関与 (in vitro)

デスミン心筋症の病態形成に HDAC6 が関わっているか否かを、培養心筋細胞、アデノウイルスシステムおよび siRNA を用いた。デスミン心筋症 in vitro モデルを使用して詳細に検討した。心筋細胞に CryAB R120G を過剰発現させると、細胞内に不溶性凝集体が蓄積し、細胞生存率は低下した。一方、野性型の CryAB を発現させた心筋細胞では、未処置群と比較して、不溶性凝集体の変化は認められず、細胞生存率も低下しなかった。そのため、過剰発現により産生された点変異 CryAB タンパク質そのものの毒性により、心筋細胞内に不溶性凝集体が蓄積し、細胞死が発生すると考えられる。CryAB R120G を発現している心筋細胞では、未処置群および野性型 CryAB 発現心筋細胞と比較し、アセチル化  $\alpha$ -チューブリン量が増加していた。この細胞に HDAC 阻害薬であるトリコスタチン A を処置すると、アセチル化  $\alpha$ -チューブリン量は更に増加し、その上細胞内の不溶性凝集体量が増大し、細胞生存率は低下した。すなわち、心筋細胞の HDAC 阻害により、CryAB R120G による細胞障害は増大した。この作用が HDAC6 特異的か否かを検討する為、CryAB R120G と同時に HDAC6 を心筋細胞に過剰発現させた。HDAC6 を過剰発現させた心筋細胞では、心筋細胞のアセチル化  $\alpha$ -チューブリン量は減少し、CryAB R120G による不溶性凝集体の蓄積は減少し、細胞生存率の低下は抑制された。一方、HDAC6 特異的な siRNA を用いて HDAC6 をノックダウンさせると、トリコスタチン A を処置した場合と同じく、アセチル化  $\alpha$ -チューブリン量は著しく増加し、CryAB R120G による凝集体蓄積は増加し、細胞生存率は低下した。また、脱アセチル化酵素活性を消失させた HDAC6 失活体を過剰発現させても同様にアセチル化  $\alpha$ -チューブリン量が増加し、CryAB R120G の細胞障害は増大した。

##### 2) デスミン心筋症病態への HDAC6 の関与 (in vivo)

HDAC6の機能亢進あるいは機能消失により、in vivoレベルでのデスミン心筋症病態が変化するか否かをTGマウスを使用して検討した。心筋特異的にCryAB R120Gを心筋細胞内に過剰発現させると、対象群であるノントランスジェニック (NTG) マウスと比較し、心筋細胞内に不溶性凝集体が蓄積し、心筋肥大を伴いながら心機能は低下した。この時、心筋のアセチル化 $\alpha$ -チューブリン量は、NTGマウスと比較し、増加していた。このCryAB R120G TGマウスにHDAC阻害薬であるバルプロ酸を生後5週目から1ヶ月間投与した。その結果、バルプロ酸の投与により、CryAB R120G TGマウスのアセチル化 $\alpha$ -チューブリン量は更に増加し、その上細胞内の不溶性凝集体量が増加し、心体重比が増大した。すなわち、心筋細胞での検討結果と同様、CryAB R120Gによる心筋障害は増大した。そのデスミン心筋症病態の悪化作用が、HDAC6の抑制によるものかを検討する為、デスミン心筋症モデルマウスと脱アセチル化酵素活性を失活させたHDAC6 (HDAC6失活体)を発現させたマウスを交配し、ダブルTG マウスを作製した。そのダブルTG マウスを解析すると、CryAB R120G TGマウスと比較し、心筋アセチル化 $\alpha$ -チューブリン量がさらに増加し、心筋細胞内に凝集する不溶性凝集体量の増加が確認され、それに伴い心筋肥大は増大した。すなわち、HDAC6の失活体の過剰発現によるHDAC6活性の低下により、アセチル化 $\alpha$ -チューブリン量の増加と共にデスミン心筋症病態は悪化した。一方、HDAC6 を過剰発現させて、HDAC6活性が上昇したダブルTGマウスのデスミン心筋症病態は、CryAB R120G TGマウスと比較し、軽減していた。これら心筋細胞を用いたin vitro、およびTGマウスを用いたin vivo研究の結果、HDAC6は、心筋細胞において、変性タンパク質を原因とする不溶性凝集体の蓄積を制御していることが明らかとなった。さらに、HDAC6の脱アセチル活性の低下は、不溶性凝集体の蓄積を促進し、その結果デスミン心筋症病態を悪化させると考えられた。また、HDAC6の不溶性凝集体の形成制御には $\alpha$ -チューブリンの脱アセチル化酵素活性が必須であると考えられた。アセチル化 $\alpha$ -チューブリンの増加による不溶性凝集体の増加の詳細な機序は、現在の所不明であり、今後の検討課題である。

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 2 件)

1) Sanbe A., Marunouchi T., Yamauchi J., Tanonaka K., Nishigori H. and Akito Tanoue Cardioprotective effect of nicorandil, a mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener, prolongs survival in HSPB5 R120G transgenic mice *PLoS One* 6:e18922, 2011.

2) Sanbe A. Molecular mechanisms of  $\alpha$ -crystallinopathy and its therapeutic strategy. *Biol. Pharm. Bull.* 34: 1653-1658, 2011

[学会発表] (計 4 件)

1) Sanbe A., Miyauchi N., Yamauchi J. and Tanoue A. ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬のデスミン心筋症病態への影響 第19回循環薬理学会、京都、2009年11月26-27日

2) Sanbe A., Miyauchi N., Yamauchi J. and Tanoue A. Impairment of tubulin deacetylation can enhance heart disease in desmin-related cardiomyopathy. *The 26th Annual Meeting of ISHR Japanese Section. Sapporo, Japan. December 4-5, 2009*

3) Sanbe A., Miyauchi N., Yamauchi J., Nishigori H. and Tanoue A. Valproic acid can enhance heart disease in desmin-related cardiomyopathy via impairment of tubulin deacetylation 日本薬学会年会、30P-0510、静岡、2011年3月28-31日

4) Sanbe A., Miyauchi N., Nishigori H. and Tanoue A. Cardiac histone deacetylase 6 (HDAC6) activity is critical for disease progression in desmin-related cardiomyopathy The 82th Scientific Sessions of American Heart Association. Chicago IL., USA. *Circulation* 122:A12922, November 13-17, 2010

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://gaia-sb.iwate-med.ac.jp/pharm/?page\\_id=49](http://gaia-sb.iwate-med.ac.jp/pharm/?page_id=49)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三部 篤 (SANBE ATSUSHI)  
岩手医科大学薬学部・特任教授  
研究者番号: 30425706

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし