

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：11501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20890

研究課題名(和文) 病的心肥大発症におけるHECT型ユビキチン転移酵素HECW2の機能解明

研究課題名(英文) The role of HECT-Type Ubiquitin E3 Ligase HECW2 for pathological cardiac hypertrophy

研究代表者

後藤 準 (Goto, Jun)

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70810836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：人口の高齢化に伴い心不全患者が増加し、心不全パンデミックと呼ばれ世界的な問題となっている。病的心肥大は、心不全の大きな原因であるが、その機序は十分には解明されていない。近年、HECT型ユビキチン転移酵素と心疾患との関連が数多く報告されてきている。HECW2はNEDD4ファミリーに属するHECT型ユビキチン転移酵素であるが、心肥大・心不全との関連は十分に検討されていない。本研究では、心筋細胞を用いて心肥大にHECW2が果たす役割を検討する。さらに心筋特異的HECW2過剰発現マウスを作成し、圧負荷心不全モデルマウスで心組織および蛋白、生存率の検討を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全は増加傾向にある日本人の重要な死因である。心不全では、病的心肥大が生じるが、その機序は十分には解明されていない。ユビキチン化による標的タンパク質の翻訳後修飾は、タンパク質の機能調節や分解において重要な役割を担う(Nat Med.2014;20:1242-53.)。HECW2はNEDD4ファミリーに属するHECT型ユビキチン転移酵素である。近年、HECT型ユビキチン転移酵素と心疾患との関連が報告されているが、心臓におけるHECW2の機能についての報告はない。病的心肥大発症におけるHECW2の研究を行うことで、新たな病的心肥大の機序やHECW2の機能解明につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：As the population ages, the number of heart failure patients is increasing, creating a worldwide problem known as the heart failure pandemic. Pathological cardiac hypertrophy is a major cause of heart failure, but its mechanism is not fully understood. Recently, many studies have reported the association between HECT-type ubiquitin E3 ligase and cardiac diseases. HECW2 is a HECT-type ubiquitin E3 ligase belonging to the NEDD4 family, but the relationship between HECW and the cardiac hypertrophy and heart failure has not been fully investigated. In this study, we investigate the role of HECW2 in the development of cardiac hypertrophy using cardiomyocytes. Furthermore, we generate cardiac-specific HECW-overexpressing transgenic mice and examine cardiac tissue, protein, and survival in heart failure model induced by Thoracic transverse aortic constriction.

研究分野：循環器

キーワード：HECW2 心肥大 ユビキチン E3リガーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化に伴い心不全患者が増加し、心不全パンデミックと呼ばれ世界的な問題となっている。病的な心肥大は、心不全の大きな原因である。既存の治療薬では病的な心肥大を十分に抑制できておらず、新たな治療薬の開発が待たれる。ユビキチン化は、タンパク質の機能調節と分解に重要な役割を果たす翻訳後修飾である (Nat Med.2014;20:1242-53.)。HECT 型ユビキチン転移酵素は、標的蛋白質と結合しユビキチンを直接付加するため、ユビキチン化の重要な調節因子である (Transl Res.2019;205:64-76.)。我々は HECT 型ユビキチン転移酵素 ITCH が Wnt シグナルを制御することで病的な心肥大を抑制すると報告した (Hypertension.2020;76:1868-1878.)。しかしながら心臓における HECT 型ユビキチン転移酵素の機能や心疾患との関連については未解明な点が多い。

我々は、マウスの心臓において、HECT 型ユビキチン転移酵素の遺伝子スクリーニングを行い、HECW2 が心臓に高発現していることや大動脈縮窄術 (TAC) による圧負荷モデルマウスの心臓において HECW2 の発現が有意に低下していることを発見した。HECW2 は、神経細胞の増殖、移動、分化に重要な役割を果たし (Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10:398-409.)。HECW2 の遺伝子変異は、発達遅滞、筋緊張低下などと関連すると報告された (J Med Genet. 2017;54:84-86.)。また HECW2 は PI3K/Akt シグナルの正の制御因子として機能し腎臓や腸管の発達にも極めて重要であると報告された (Oncotarget. 2016;7:31440-53. and Cell Signal.2015;27:578-86.)。しかしながら、HECW2 の標的蛋白質の同定や付加されるユビキチン鎖など詳細な検討はなされていない。

これまでに心臓における HECW2 の機能についての報告はない。病的な心肥大発症における HECW2 の研究を行うことで、新たな病的な心肥大の機序や HECW2 の機能解明につながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、病的な心肥大発症における HECW2 の機能を解明することである。これまで、心臓において HECW2 の機能を検討した報告は皆無である。また、HECW2 の標的蛋白質やユビキチン付加の特徴などはほとんど検討がなされておらず、本研究で検証を行う。

3. 研究の方法

本研究は心臓における HECW2 の機能を、*in vitro* および *in vivo* の実験系で検証する。

1) 心筋細胞における HECW2 の役割を *in vitro* で検証する。

新生仔ラット心筋細胞や H9C2 細胞を培養する。心筋細胞に対して Angiotensin II、ET-1 などで心肥大刺激を行い、HECW2 の発現が変化するか検討する。次に HECW2 をプラスミドベクターや siRNA を用いて、過剰発現やノックダウンを行った上で、心肥大刺激を行い心筋細胞肥大に与える影響を検討する。これまで HECW2 の基質については p73 (K63 ユビキチン化による安定化) が報告されているのみで (Biochem Biophys Res Commun. 2003;308:106-13.)。ほとんど検討されていない。HECW2 は WW ドメインを含んでおり、PPXY や PY モチーフを構造にもつ蛋白質が標的となりうる。そこで心筋細胞に HECW2 を過剰発現したサンプルで TR-TUBE 法で基質のユビキチン化を検出し、その後ユビキチン化基質のみを抽出し質量分析を行う。HECW2 の標的蛋白質を同定し、これらの相互作用が病的な心肥大に与える影響を詳細に検討する。また標的蛋白質に付加されるユビキチン鎖の種類についても Lys48 や Lys63 を中心に特異的抗体を用いて検証する。

2) 心筋特異的 HECW2 過剰発現マウスが心肥大・心機能に与える影響を検討する。

我々は、14 週齢雄マウスから各臓器の mRNA を抽出し、NEDD4 ファミリーの発現量をリアルタイム PCR で調べた。HECW2 は心臓での発現量が他の臓器 (脳を除く) に比べて多かった。次に TAC 手術後の HECW2 の変化を検討したところ、mRNA レベルでは HECW2 は有意に低下した。次に、HECW2 の蛋白質発現が TAC 後に変化するかウェスタンブロット法で検討する。また、免疫染色を行い HECW2 の発現する細胞を同定する。HECW2 が TAC によって減少し機能低下を来すことで病的な心肥大に至ると考えた。そこで、心筋特異的 HECW2 過剰発現マウスを作成する。心筋特異的 HECW2 過剰発現マウスと野生型マウスに TAC や Angiotensin II 投与による左室圧負荷心不全モデルを作成し、HECW2 が心機能に与える影響を検討する。また、心筋特異的過剰発現マウスの心臓と野生型マウスの心臓の蛋白質発現を比較することで標的蛋白質の同定を目指す。更には生存率を比較検討する。また、HECW2 ノックアウトマウスは 2 週間以内に死亡することが分かっており (Oncotarget.2016;7:31440-53.)。タモキシフェン誘導型 HECW2 コンディショナルノックアウトマウスを作成し、同様の検討を行う。

4. 研究成果

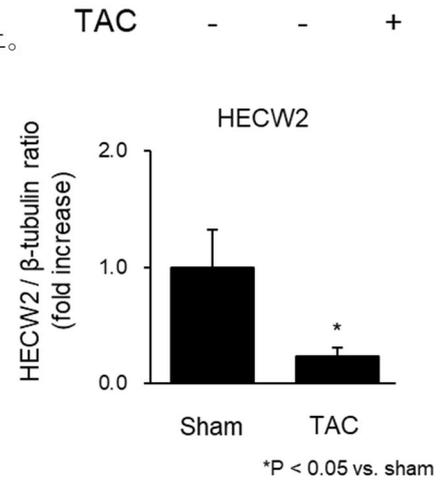
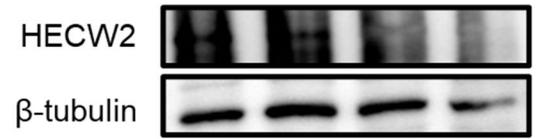
in vitro において、H9C2 細胞で Angiotensin II 刺激を行ったところ、24 時間後でコントロールに比べて mRNA レベルで HECW2 の有意な上昇を確認した。蛋白レベルでは HECW2 の発現量に有意な変化は認めなかった。

H9C2 細胞に HECW2 プラスミドベクターを用いて過剰発現を行ったところ、定常状態で、AKT シグナルの活性化を確認した。心筋細胞においても Akt シグナルを制御している可能性が示唆された。

HECW2 の基質については免疫沈降法により検討を行っているが同定できていない。

野生型マウスに TAC 手術（4 週間）を行った心筋蛋白でウエスタンブロット法により HECW2 を評価したところ、蛋白レベルでも sham 群に比べて有意に低下していることがわかった。（図）

心筋特異的 HECW2 過剰発現マウスについては vitro で使用したベクターを用いて動物実験施設に作成依頼中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------