

令和 6 年 4 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16103

研究課題名（和文）膜トポロジー変化に着目した核膜病の分子機序解明と心臓・筋疾患の治療標的分子探索

研究課題名（英文）Investigation of molecular mechanisms in nuclear envelopathies focused on membrane topology changes and identification of therapeutic targets for cardiac and muscular diseases

研究代表者

四宮 春輝 (Shinomiya, Haruki)

大阪大学・キャンパスライフ健康支援・相談センター・助教

研究者番号：10908213

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、遺伝性心筋症家系から同定されたTMEM43 S358L変異を基に、患者と同一の変異を持つTMEM43-S358Lノックインラット（以下、KIラット）と患者由来のヒトiPSC心筋細胞を用いて、TMEM43変異蛋白の生化学的特性及び病態機序の解明を行った。KIラット及び患者細胞においては、特に小胞体ストレスを課した際にTMEM43蛋白の糖鎖修飾の付加や小胞体膜から核膜への局在変化が観察され、これらが心筋症の発症に関与している可能性が示唆された。また、KIラットの心臓組織の遺伝子発現解析から、TMEM43変異が不整脈を引き起こす原因の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、遺伝性心筋症を引き起こすTMEM43変異蛋白の特異的な生化学的变化及びこれが心筋症の発症機序にどのように関与しているかを明らかにした。特に、小胞体ストレス下での変異蛋白の糖鎖修飾付加と細胞内局在変化が心筋症発症に重要であることを明らかにした。これらの結果は、他の遺伝的心疾患における病態機序の解明にも応用可能な可能性があり、広範な心血管疾患の病態解明研究に影響を与えることが期待される。さらに、これらの知見は、心筋症の早期診断や新たな治療標的の開発に貢献し、遺伝的要因に基づく心疾患の理解を深め、将来的には個別化医療の実現に寄与することにもつながる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the biochemical characteristics and pathogenic mechanisms of the TMEM43 S358L mutation, identified in a familial cardiomyopathy lineage. Using TMEM43-S358L knock-in rats (hereafter referred to as KI rats) and human iPSC-derived cardiomyocytes from patients carrying the same mutation, we specifically observed changes in glycosylation and localization of the TMEM43 protein from the endoplasmic reticulum to the nuclear membrane only in cells expressing the mutant protein. These changes suggest a potential involvement in the onset of cardiomyopathy. Additionally, gene expression analysis of cardiac tissue from KI rats revealed aspects of how the TMEM43 mutation may cause arrhythmias.

研究分野：循環器内科学

キーワード：核膜病 不整脈原性心筋症 膜トポロジー

1. 研究開始当初の背景

若年突然死や重篤な心筋症をもたらす核膜病の病態機序は、核内膜裏打ち蛋白や核膜蛋白に関連した細胞骨格からのシグナル伝達障害、核内における DNA 損傷、クロマチン構造の異常などが指摘されているが、これらの病態が臓器特異的に発現される原因は未だ明らかではない。これに関連する具体的な分子機序の解明が必要である。

核膜病に関する研究は、心筋症や筋ジストロフィーを引き起こす重篤な遺伝的因子としての解明が進められているが、特に心筋症の遺伝的要因として知られる TMEM43 遺伝子変異の機能解析は十分に行われていない。

2. 研究の目的

TMEM43 変異蛋白の生化学的特性と病態への寄与を解析し、核膜変異が心筋細胞機能にどのように影響し、心筋症を引き起こすかの機序を詳細に明らかにする。

核膜病における共通病態機序を探索し、これらの知見をもとに治療法につながる分子標的の探索と特定を行う。これにより、特異的かつ根本的な治療法の開発に寄与することを目指す。

3. 研究の方法

遺伝性心筋症患者と同一の遺伝子変異を持つ遺伝子改変ラット (KI ラット) を用いた長期時系列解析を通じて、心筋の置換性線維化や重篤な不整脈の発生を詳細に観察し、病態形成における分子機序を解析する。

疾患特異的 iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、TMEM43 変異蛋白の N 型糖鎖修飾および核膜への局在変化を検証する。

TMEM43 の野生型と変異型アデノウイルスベクターを用いて、新生児ラット心筋細胞で TMEM43 蛋白の相互作用蛋白の同定を試みる。具体的には、免疫沈降法を用いて相互作用蛋白を抽出し、LC-MS/MS プロテオミクス解析で解析を行う。

疾患モデルラットを使用して、TMEM43 変異蛋白の核膜蓄積が遺伝子発現変化に与える影響を探索するため、部位特異的 RNA-seq 解析を行う。野生型と KI ラットの心臓の外層と内層から心筋組織を採取し、変異蛋白が心臓の部位特異的な遺伝子発現にどのような影響を与えるかについて検証する。

4. 研究成果

KI ラットを用いた詳細な生理的および分子生物学的解析により、TMEM43 変異蛋白が心筋細胞の機能に与える具体的な影響を確認した。KI ラットにおいて TMEM43 変異蛋白の膜トポロジー変化に伴う糖鎖修飾と異常な局在が観察された (図 1)。

疾患 iPS 細胞由来心筋細胞での実験から、TMEM43 変異蛋白の糖鎖修飾 (図 2) と核膜への異常な蓄積 (図 3) が認められた。これらの変化は心筋症の発症機序において重要な因子であることを示唆された。

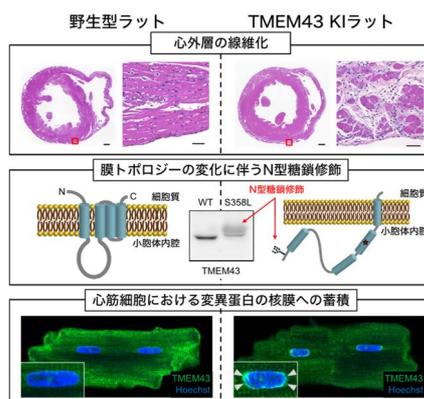


図1. 疾患モデル動物を用いた心臓組織の解析



図2. 患者由来iPS心筋細胞を用いたTMEM43蛋白の糖鎖修飾付加の検証

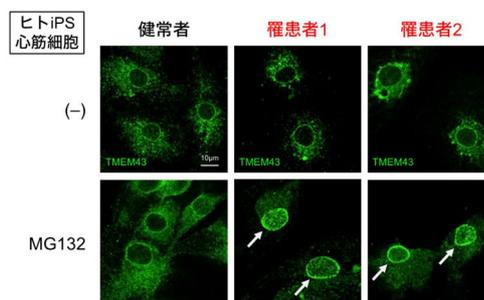


図3. 患者由来iPS心筋細胞を用いたTMEM43蛋白の局在変化の検証

新生児心筋細胞を用いた野生型と変異型のTMEM43の相互作用蛋白探索において、野生型のTMEM43蛋白には結合するにも関わらず、変異型のTMEM43蛋白には結合しない小胞体膜蛋白を同定した。(図4)

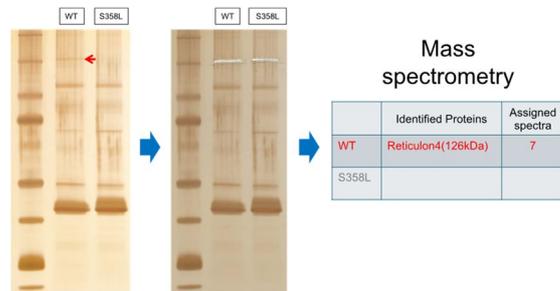


図4. TMEM43相互作用蛋白の同定

まだ明らかな心臓線維化の表現型が出ていない6ヶ月齢のラットを用いて、心臓の外層と内層からそれぞれ心筋組織を採取し解析を行なった。TMEM43-S358Lノックインラットの心筋では、野生型ラットと比較して心臓の内層外層間のイオンチャネルやトランスポーターに関連する遺伝子群の発現差が減少しており、これらの遺伝子発現差の減少がノックインラットの催不整脈性に関連している可能性が示唆された(図5)

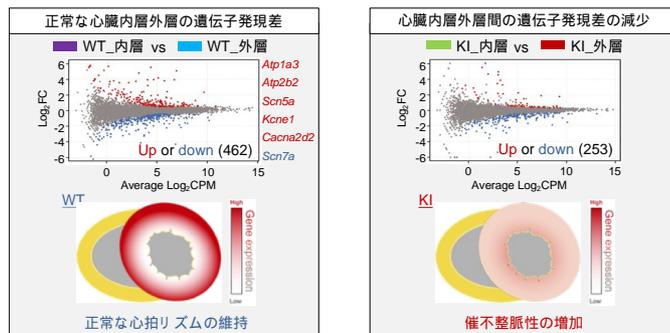


図5. TMEM43 KIラットにおける心臓内層外層間の遺伝子発現差の減少

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto H, Miyashita Y, Minamiguchi H, Hosomichi K, Yoshida S, Kioka H, Shinomiya H, Nagata H, Onoue K, Kawasaki M, Kuramoto Y, Nomura A, Toma Y, Watanabe T, Yamada T, Ishihara Y, Nagata M, Kato H, Hakui H, Saito Y, Asano Y, Sakata Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Human leukocyte antigen-DQ risk heterodimeric haplotypes of left ventricular dysfunction in cardiac sarcoidosis: an autoimmune view of its role.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-46915-1.	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Haruki Shinomiya
2. 発表標題 Inherited cardiomyopathy as a nuclear envelopathy: a novel molecular mechanism caused by a mutation in nuclear envelope protein TMEM43
3. 学会等名 The 17th Oriental Congress of Cardiology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 四宮春輝
2. 発表標題 膜トポロジー変化を伴う核膜蛋白 TMEM43 S358L による心筋症の新規病態機序
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会
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
---------	---------