

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 16日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659414

研究課題名（和文）心筋疾患の病態形成基盤となるZ帯異常解明の新展開

研究課題名（英文）Molecular basis for cardiac muscle diseases caused by functional abnormalities of Z-disc

研究代表者

木村 彰方（KIMURA AKINORI）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：60161551

研究成果の概要（和文）：心筋症および不整脈の病因・病態形成におけるZ帯構成要素の機能関連に着目し、Z帯機能の構築と伝導機能維持の分子機序を解明するとともに、治療薬のシードともなる機能修飾低分子化合物を探索することを目的とした。主な研究成果は以下の通りである。Z帯構成要素であるZASPの変異は拡張型心筋症と不整脈をもたらすが、不整脈発症メカニズムとして、ZASP変異特異的に心筋Naチャンネル（SCN5A）の機能不全をもたらすことを明らかにした。また、T管やZ帯に分布するSLMAPの2つのミスセンス変異がBrugada症候群の原因となることを明らかにしたが、いずれの変異ともSCN5Aの細胞内輸送障害による機能不全を生じることを解明した。さらに、Brugada症候群患者にSCN3B変異を同定したが、この場合にもSCN5Aの細胞内輸送障害による機能不全を生じていた。一方、SCN5A、SCN3B、SLMAP、ZASP間の結合を検討したところ、SCN5AとSCN3Bは結合するが、SLMAPもZASPもSCN5Aとの直接の結合は認められず、マクロ複合体を構成することでSCN5A機能を制御すると考えられた。また、正常ないし変異SLMAPを導入したHEK細胞を用いて、SCN5Aの細胞内輸送障害機構を検討したところ、siRNAによってSLMAPの発現を抑制すると、変異の存在下でのみ細胞内輸送が是正された。一方、COP阻害剤、EDTA、熱処理などはSLMAP変異に起因する細胞内輸送障害を是正できなかった。これらとは別に、新規の心筋症原因遺伝子として多数のミオパラジン変異を同定し、その機能異常を解明した。さらに、M21トランスジェニックマウスではMYPT1のリン酸化が亢進していること、Rhoキナーゼ阻害剤の投与で病態が改善することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated functional role of Z-disc in the molecular pathogenesis of cardiomyopathy and arrhythmia to develop a novel strategy for the diseases via modifying the Z-disc function. It was deciphered that mutations in ZASP caused cardiomyopathy accompanied by ventricular arrhythmia via impairing the function of INa through affecting expression of cardiac sodium channel Nav1.5. In addition, we revealed that the mutations in SLMAP gene encoding for a Z-disc protein of unknown function. It was found that SLMAP mutations impaired INa function via inhibiting intracellular trafficking of Nav1.5. Moreover, we also revealed that a SCN3B mutation inhibited intracellular trafficking of Nav1.5 and affected INa function. These observations have indicated that the intracellular trafficking of Nav1.5 is in part controlled by Z-disc elements. On the other hand, we found that a heart-specific small subunit of myosin phosphatase, M21, localized at Z-disc and increased the phosphorylation of a large subunit of myosin phosphatase, M110, which resulted in increased calcium sensitivity of cardiac muscle contraction. Inhibition of binding between M21 and M110 suppressed the phosphorylation of M110. M21 also bound to a Rho-kinase and enhanced its kinase activity, suggesting that inhibition of rho-kinase would be useful in modulation of calcium sensitivity of cardiac muscle contraction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：人類遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：遺伝学、遺伝子、ゲノム、循環器・高血圧

1. 研究開始当初の背景

心筋機能異常に起因する心筋症はしばしば不整脈を合併し、これに基づく突然死を来す。心筋症の原因は従来不明であったが、近年の遺伝学的解析により、サルコメア要素やZ帯構成要素の遺伝子異常が病因となることが明らかとなっている。一方、特に誘因なく突然死を来す不整脈についても、チャンネル分子の遺伝子異常が原因となることが判明している。また、最近ではチャンネル異常が心筋症の原因となることやZ帯構成要素異常が不整脈の原因となることが明らかにされるなど、心筋症と不整脈には原因論上のオーバーラップがある。すなわち、申請者らを含む国内外の研究者らによる病因変異の探索から、Z帯が心筋の収縮機能制御のみならず、刺激伝導機能においても重要な役割を果たすことが判明している。しかしながら、それぞれの病態発現において遺伝子異常が寄与する分子機序については不明な点が多い。

申請者らは、Z帯構成要素異常が心筋症や不整脈などの原因となることを世界に先駆けて解明したが、遺伝子変異に起因する疾患には一般に根治療法がなく、有効な治療・予防法も少ない。一方、申請者らは、ミオシン軽鎖のリン酸化と心筋収縮力を制御するM21がZ帯に局在すること、M21高発現マウスは心筋症に加えて伝導障害を来すこと、原因不明の不整脈患者にZ帯構成要素であるTCAPやSLMAPの変異が見出されることなど、従来は予想されなかったZ帯機能に関する新知見を集積している。そこで、Z帯異常がいかなる分子機序で心筋疾患の病態発現に至るのかを検討することで、Z帯機能解明の新展開をはるとともに、得られた知見に基づく治療戦略を開発出来ないかとの着想に至った。

2. 研究の目的

心筋症は心筋収縮制御異常による心不全を主徴とするが、しばしば不整脈による突然死を来す。心筋症の原因は不明であったが、遺伝子異常が病因となることが近年解明されている。ことに申請者らは、世界に先駆けてZ帯構成要素の種々の遺伝子異常が心筋収縮制御異常を通じて心筋症の病態形成に

至ることを解明した。また、Z帯要素異常が不整脈の病因となることを明らかにしたが、Z帯異常が伝導障害を来す分子機序は明らかでない。本研究では、申請者らのこれまでの知見から導かれるZ帯構成要素の機能連関に着目し、Z帯機能の構築と伝導機能維持の分子機序を解明するとともに、治療薬のシーズともなる機能修飾分子を探索する。

3. 研究の方法

本研究では、Z帯機能の解明とその修飾法の開発を目的とし、M21高発現マウスの心筋における遺伝子発現・タンパクリン酸化の解析と病態解析、正常・変異Z帯構成要素によるチャンネル機能変化の解析、Z帯構成要素の結合を修飾する分子の探索を行う。

4. 研究成果

M21高発現マウスの心筋における遺伝子発現・タンパクリン酸化の解析と病態解析

M21トランスジェニックマウスを複数系統樹立したが、高発現系統では心筋収縮のCa感受性亢進と肥大型心筋症様病態が観察されるのに対し、低発現系統ではそのような変化は認めなかった。そこで、高発現系統と低発現系統でマウス心筋における遺伝子発現をコントロールとともに網羅的に検討したところ、高発現系統のみで発現変化する遺伝子が39種、低発現系統のみで発現変化する遺伝子が5種、両者に共通して発現変化する遺伝子が39種あった。これらの遺伝子群を機能別にグループ化したところ、インスリンシグナル系および細胞接着系の遺伝子群の発現が共通して亢進していた。

正常・変異Z帯構成要素によるチャンネル機能変化の解析

Z帯構成要素であるZASPの変異が拡張型心筋症の原因となることが判明しているが、これらの変異のうち心筋に高発現するZASPアイソフォームに共通するドメインに存在する変異を有する患者は高頻度に不整脈を合併する。そこでZASP変異を導入したラット心筋細胞における電気生理学的な検討を行った結果、心筋Naチャンネル(Nav1.5)の機能低下を来すことが判明した。変異の有

無によらず ZASP と Nav1.5 との直接結合は観察されないことから、ZASP や Nav1.5 は大きな複合体を形成するものと考えられた。

一方、Z 帯や I 帯に分布する機能未知の SLMAP について、不正脈患者における変異を検索したところ、Brugada 症候群患者集団に 2 種類のミスセンス変異 (V269I, E710A) を見出した。ついで、H9c2 細胞、HEK293 細胞を用いた検討で、変異 SLMAP は Nav1.5 の細胞内輸送を障害することが判明した。さらに、電気生理学的に Nav1.5 機能の低下を確認した。また、変異の有無によらず SLMAP と Nav1.5 には直接の結合は観察されなかったことから、SLMAP は Nav1.5 複合体の細胞内輸送に関わると考えられた。この細胞内輸送障害は、温度変化や小胞体機能阻害剤などでは解消できなかったが、SLMAP の発現抑制によって解除可能であった。

Z 帯構成要素の結合を修飾する分子の探索

M21 は MYPT2 遺伝子の選択的スプライシングによって生成されるため、MYPT2 (M130) と同一の配列を有する。また、平滑筋型 M20 も同様に MYPT2 の選択的スプライシングで生成される。これらの M130 および M20 はいずれも心筋で発現するため、M21 の心筋細胞内分布は、抗体を用いての検討することが出来なかった。しかしながら、M21 トランスジェニックマウスでは His-tag を付加した M21 遺伝子を導入しており、His-tag を検出することで M21 の局在が検討である。そこで、His-tag 抗体を用いた組織染色を行ったところ、M21 は Z 帯に局在していた。一方、M21 と MYPT1 (M110) および MYPT2 (M130) との結合を生化学的に検討し、M21 は M110 の 853Thr を含む約 20 アミノ酸で構成されるドメインに結合することが判明した。また、この結合は 852Ser に特異的に依存したが、852Ser および 853Thr のリン酸化による結合性の変化はなかった。これらのことは、低分子 (ペプチド) を用いた競合阻害によって M21 による収縮制御が可能となることを示唆した。

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 6 件) すべて査読有

- 1) Kimura A. Contribution of genetic factors to the pathogenesis of dilated cardiomyopathy: the cause of dilated cardiomyopathy: genetic or acquired? (genetic-side). *Circ J*. 2011; 75(7): 1756-1765.
- 2) Arimura T, Ishikawa T, Nunoda S, Kawai S, Kimura A. Dilated

cardiomyopathy-associated BAG3 mutations impair the Z-disc assembly and enhance the sensitivity to apoptosis in cardiomyocytes. *Hum Mutat*. 2011; 32(12): 1481-1491.

- 3) Purevjav E, Arimura T, Augustin S, Huby A-C, Takagi K, Nunoda S, Kearney DL, Taylor MD, Terasaki F, Bos JM, Ommen SR, Shibata H, Takahashi M, Itoh-Satoh M, McKenna W, Murphy RT, Labeit S, Yamanaka Y, Machida N, Park JE, Alexander PMA, Weintraub RG, Kitaura Y, Ackerman MJ, Kimura A, Towbin JA. Molecular basis for clinical heterogeneity in inherited cardiomyopathies due to myopalladin mutations. *Hum Mol Genet*. 2012; 21(9): 2039-2053.
- 4) Xi Y, Ai T, De Lange E, Li Z, Wu G, Brunelli L, Kyle WB, Cheng J, Ackerman MJ, Kimura A, Weiss JN, Qu Z, Kim JJ, Faulkner G, Vatta M. Loss-of-function of hNav1.5 by ZASP1-D117N associated with intraventricular conduction disturbances in left ventricular noncompaction. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012; 5(5): 1017-1026.
- 5) Ishikawa T, Sato A, Marcou CA, Tester DJ, Ackerman MJ, Crotti L, Schwartz PJ, On YK, Park JE, Nakamura K, Hiraoka M, Nakazawa K, Sakurada H, Arimura T, Makita N, Kimura A. A novel disease gene for Brugada syndrome: sarcolemmal membrane-associated protein gene mutations impair intracellular trafficking of hNav1.5. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012; 5(6): 1098-1107.
- 6) Crocini C, Arimura T, Reischmann S, Eder A, Braren I, Hansen A, Eschenhagen T, Kimura A, Carrier L. Impact of ANKRD1 mutations associated with hypertrophic cardiomyopathy on contraction parameters of engineered heart tissue. *Basic Res Cardiol*. In Press (doi: 10.1007/s00395-013-0349-x)

[学会発表] (計 13 件)

- 1) Arimura T, Ishikawa T, Kimura A. Dilated cardiomyopathy-associated BAG3 mutations impair the sarcomere assembly and increase the sensitivity to apoptosis. The 14th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium, Seoul, Korea, October 28,

- 2011.
- 2) Ishikawa T, Arimura T, Kimura A. Role of sarcolemmal membrane-associated protein (SLMAP) gene in Brugada syndrome. The 14th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium, Seoul, Korea, October 28, 2011.
 - 3) 木村彰方. 心筋症の遺伝子異常と分子病態. 第73回東京心臓の会, 2011年6月11日, 東京.
 - 4) Arimura T, Kimura A. Heart-specific Small Subunit of Myosin Light Chain Phosphatase Activates Rho-associated Kinase and Regulates Phosphorylation of Myosin Phosphatase Target Subunit 1. 第75回日本循環器学会学術集会, 2011年8月3日, 横浜.
 - 5) 有村卓朗, 石川泰輔, 布田伸一, 河合祥雄, 木村彰方. BAG3変異は心筋細胞のZ帯整合性異常とアポトーシス感受性増強を介して拡張型心筋症を引き起こす. 第56回日本人類遺伝学会, 2011年11月10日, 幕張.
 - 6) 木村彰方. 心筋症: 遺伝子異常からみた分子病態. 第20回小児心筋疾患学会ランチョンセミナー, 2011年11月19日, 東京.
 - 7) Arimura T, Kimura A. Novel molecular mechanisms of idiopathic cardiomyopathy. 第28回国際心臓研究学会日本部会シンポジウム, 2011年12月3日, 東京.
 - 8) Kimura A. Cardiomyopathy as a disease of abnormalities in sensing for stretch and metabolic stress in cardiac sarcomere. 4th Sensing Biology Symposium. Tokyo. Jan. 30, 2012.
 - 9) Arimura T, Bonne G, Kimura A: Impact of testosterone on progression of dilated cardiomyopathy in a Lmna-mutation knock-in mouse model. The 9th Japanese-French Symposium for “Muscular Dystrophy”, September 8, 2012, Tokyo, Japan.
 - 10) Ishikawa T, Sato A, Arimura T, Sakurada H, Makita N, Kimura A: A novel mechanism of Brugada syndrome: Mutation of sarcolemmal membrane-associated protein (SLMAP) gene impaired hNav1.5 function. The 76th Annual Meeting of the Japanese Circulation Society, March 16, 2012, Fukuoka, Japan.
 - 11) Arimura T, Ishikawa T, Nunoda S, Kawai S, Kimura A: Dilated

- cardiomyopathy-associated BAG3 mutations impair the Z-disc assembly and enhance sensitivity to apoptosis in cardiomyocytes. The 76th Annual Meeting of the Japanese Circulation Society, March 17, 2012, Fukuoka,
- 12) 有村卓朗, 石川泰輔, 木村彰方: 肥大型心筋症および拡張型心筋症におけるタイチンA/M帯変異の意義. 第57回日本人類遺伝学会, 2012年10月26日, 東京.
 - 13) 石川泰輔, 佐藤光希, 有村卓朗, 蒔田直昌, 木村彰方: プルガダ症候群患者に見出されたSLMAP変異とその機能解析. 第57回日本人類遺伝学会, 2012年10月26日, 東京.

〔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://www.tmd.ac.jp/mri/mri-mpath/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 彰方 (KIMURA AKINORI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号: 60161551