

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790734

研究課題名(和文)PIK3C3の心筋症および心不全に対する発症抑制機構の解析

研究課題名(英文)The roles of class III PI3K in cardiomyocytes

研究代表者

木村 洋貴(Kimura, Hirotaka)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：30382899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：筋特異的 PIK3C3 欠損マウスは顕著な心肥大を呈し突然死した。心収縮機能の低下を認め、心室性不整脈を認めた。心筋中のホスファチジルイノシトール 3-リン酸(PI3P)量は低下した。PIK3C3 は生体内でも PI3P を生成する酵素であることが示された。PIK3C3 欠損心筋細胞にオートファゴソームの蓄積を認めた。Vps34欠損単離心筋細胞は肥大し、タンパク質の蓄積を認め、ポリユビキチン化タンパク質が異所性に沈着していた。早期エンドソームで輸送され分解されるタンパク質も含まれ、PIK3C3 はポリユビキチン化タンパク質の小胞輸送に関わることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We generated cardiomyocyte-specific Pik3c3 knockout (Pik3c3 KO) mice. Pik3c3 KO mice spontaneously developed severe cardiac hypertrophy, dysfunction of contractility, ventricular arrhythmias and sudden death. In Pik3c3 KO hearts, levels of phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) were reduced. Electronmicroscopic analysis demonstrated that autophagosome was accumulated. Isolated cardiomyocytes were hypertrophic and protein aggregates were deposited in myocardium in the absence of Pik3c3 while proteasome function was normal. This aggregate included proteins degraded via vesicular trafficking, suggesting that Pik3c3 might regulate transport of polyubiquitinated proteins in vesicular trafficking. Similar protein deposition was detected in human cardiac specimen from cases with a heart disease. These findings imply that PIK3C3 deficiency might cause cardiac hypertrophy and heart failure in human.

研究分野：脂質生化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 循環器内科学

キーワード：PIK3C3 心肥大 心不全 心筋症 ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

(1) 心疾患の疫学：日本人の死因の第2位は心臓疾患である。ことに心筋症は致死性不整脈や心不全の原疾患であり、心筋症発症の病態解明や治療法の発明は国民衛生の向上に大きく寄与すると考えられる。

(2) ホスホイノシタイド (PIs) と心疾患について：PIs 代謝に關与するキナーゼ19種、ホスファターゼ29種によりホスファチジルイノシトールの3位、4位および5位のイノシトール環水酸基がリン酸化される結果、8種類のPIsが細胞内に生成される。生成されたPIsはタンパク質の局在や活性を制御することで、細胞増殖、アポトーシス、小胞輸送などを司っている。クラスI phosphoinositide 3-kinase (PI3K) は、ホスファチジルイノシトール 4,5-ニリン酸 [PI(4,5)P₂] をリン酸化し、ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 [PI(3,4,5)P₃] を生成する。PI(3,4,5)P₃ は Akt/PKB を直接活性化し、下流の GSK-3b あるいは mTor のシグナルを介して心筋細胞の肥大を惹起し心肥大をもたらす (PI3K-Akt シグナル経路) (Chinmay M et al. *Nat Med* 13,324-331,2007) (図1参照)。

一方、クラスIII PI3K (PIK3C3) はホスファチジルイノシトールの3位水酸基をリン酸化し、ホスファチジルイノシトール3リン酸 (PI3P) を生成する。酵母やショウジョウバエでの研究から PI3P はオートファジー誘導に必要であると報告されている。

(3) オートファジーと心筋症、心不全：オートファジーは細胞内のオルガネラや特定のタンパク質を分解する機構であり、飢餓時のエネルギー基質の供給のみならず細胞自体の新陳代謝を担う。最近の研究によると、心筋特異的 Atg5 (オートファジー必須分子の1種) 欠損マウスは、心不全を来すことが報告されている (Nakai A et al. *Nat Med* 13,619-624,2007)。また、ヒト心臓組織を用いた解析によれば、肥大型心筋症 (HCM) から心不全を伴う拡張型心筋症 (DCM) への移行期には、変性したミトコンドリアや筋線維が心筋細胞内に蓄積しており (Fidzianska et al. *J Electron Microscopy* 59,181-183,2010)、これと符号して、心不全への移行や心組織のリモデリングにはオートファジーの量的あるいは質的異常が關与することが示唆され

ている (Zhao V et al. *J Biol Chem* 19, 8509-14,2010)。

(4) PI3P 生成酵素 PIK3C3：PI3P を生成するクラスIII PI3K (PIK3C3) は、酵母からヒトに至るまで幅広い生物種に保存されている。PI3P はオートファジー誘導に必要のみならず、栄養シグナル伝達、エンドソームでの小胞輸送や受容体のリサイクリングに關与する多機能性リン脂質であることが酵母での遺伝学的解析から報告されているが、哺乳動物での生理的機能は未だよく理解されていない。

研究代表者が注目した事象がある。それは、心筋特異的 Atg5 欠損マウスは、大動脈結紮術により圧負荷を加えて初めて DCM 様病態を経て心不全を發症することである (Nakai A et al. *Nat Med* 13,619-624,2007)。通常、ヒトの特発性心筋症や心不全の發症には必ずしも圧負荷を必要としない。この現象の1つの説明として研究代表者は、オートファジーのみに關与する遺伝子が欠損する場合よりも、多機能性分子が欠損しオートファジー以外にも複数の生理機能が阻害される場合の方が重度の心不全を来すのではないかと、いう仮説を立てた。具体的には、オートファジーに加えて栄養シグナル伝達や小胞輸送に關与する PI3P がこれに該当する分子の1候補と考え (図1)、筋細胞特異的に PIK3C3 を欠損するマウスを作製した。

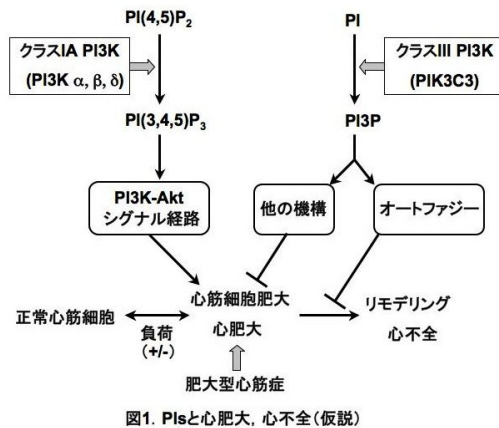


図1. PIsと心肥大、心不全(仮説)

2. 研究の目的

この研究では、PI3P および PIK3C3 のいかなる機能が心筋症や心不全に保護的に作用するのかを明らかにする。筋特異的 PIK3C3 欠損マウス由来の心筋組織あるいは心筋様細胞に分化する細胞株を用いて詳細な細胞生物学的解析を行い、心筋細胞肥大化の機序、

心臓でのオートファジー制御や心筋エネルギー代謝への PIK3C3 の関与を明らかにする。心不全発症に圧負荷が必要な筋特異的 Atg5 欠損マウスと比較し、PIK3C3 のオートファジー以外の生理機能を明確にする。具体例として、PIK3C3 遺伝子欠損が早期エンドソームでの小胞輸送や受容体リサイクリングにどのように影響するかを解析し、これらの機構の異常が心肥大や心不全にいかに関与するかに注目して PI3P および PIK3C3 の機能を解析する。さらに心筋症や心不全症例のヒト心筋組織での PIK3C3 遺伝子発現を検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス個体での解析

PIK3C3 遺伝子欠損による心肥大、心不全の各過程での組織学的検討

PIK3C3^{flox/flox} マウスと筋特異的に Cre リコンビナーゼを発現する mck-Cre マウスとを交配し、筋特異的 PIK3C3 欠損マウスを作製した。同様に Atg5^{flox/flox} マウスに mck-Cre マウスを交配し、筋特異的 Atg5 欠損マウスを作製した。経時的に両者の心臓を組織学的(H&E 染色, Elastica-Masson 染色, 脂肪染色など)に解析し比較した。線維化を含めた心組織リモデリングにも注目した。更に電子顕微鏡でオートファゴソームやオルガネラを含む細胞内構造の変化を観察した。また、心組織をコラゲナーゼおよびプロテアーゼで処理し単離した心筋細胞の大きさを解析した。

心臓超音波検査 (UCG) および植え込み式マウス心電図 (テレメトリー)

筋特異的 PIK3C3 欠損マウスの UCG を行い、左室壁厚、左室拡張期径、左室収縮期径、駆出率などを経時的に測定し心機能や心肥大、心不全への移行経過を観察し、筋特異的 Atg5 欠損マウスと比較した。

植え込み型心電図

電気生理学的な解析として、植え込み型心電図 (テレメトリー) を行い心室性不整脈、伝導障害、QT 延長を検出した。

心筋中の PI3P 量の測定

³²P を経静脈的に投与後に心筋から脂質を抽出し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で心筋中の PI3P 量を定量した。

EEA1-FYVE-EGFP トランスジェニックマウスとの交配

EEA1 (Early endosome antigen 1) の FYVE ドメインは PI3P に高い親和性がある。EEA1-FYVE ドメインと GFP の融合タンパク質を発現する EEA1-FYVE-EGFP トランスジェニックマウスと PIK3C3 欠損マウスを交配した。その遺伝子改変マウスの心筋組織を蛍光顕微鏡で観察し、PI3P の細胞内レベルと局在における PIK3C3 の寄与を解析した。

(2) 細胞生物学的解析

PI3P 動態の解析

PIK3C3^{flox/flox} マウスの胎児線維芽細胞 (MEF) に Cre 発現アデノウイルスを感染させ PIK3C3 欠損を導き、PIK3C3 欠損下の PI3P 量を HPLC で測定した。

オートファジー誘導における PIK3C3 の役割

LC3-GFP トランスジェニックマウスと PIK3C3^{flox/flox} マウスを交配し、LC3 可視化筋特異的 PIK3C3 欠損マウスを作製し、オートファジーマーカーとして LC3 の凝集を蛍光顕微鏡で観察した。同時に、心筋組織から細胞溶解液を調製し LC3 修飾やオートファジー基質と言われている p62 をウエスタンブロット法で検出した。Atg5 欠損心筋と PIK3C3 欠損心筋とを比較し、さらに電子顕微鏡像の知見と合わせて考察し、哺乳動物でのオートファジーにおける PI3P の作用点を検討した。

心筋エネルギー代謝およびタンパク質合成シグナルにおける PIK3C3 の役割

PIP₃ で活性化される Akt/PKB、富栄養状態で活性化されオートファジーを抑制的に制御する mTor、ATP 低下で活性化される AMPK はいずれも栄養シグナル伝達を担う一方で心肥大にも関与する。心筋組織を用いて PIK3C3 欠損によるこれらの分子や関連分子のシグナル伝達の変化についてウエスタンブロット法で解析した。

PIK3C3 欠損心筋での蛍光標識グルコースアナログを経静脈的に投与し、摘出心筋の蛍光度を測定することにより取り込み能の解析を行った。

タンパク質分解における PIK3C3 の役割
PIK3C3 は PI3P を生成することによりオートファジーに關与する。近年の報告では、オートファジーはオルガネラを分解する機構である他に、ユビキチン化タンパク質の選択的分解も司っていると言われている。心筋組織ライセートを用いてポリユビキチン化タンパク質の蓄積についてウエスタンブロット法で解析し、Atg5 欠損心筋と PIK3C3 欠損心筋とを比較した。更に、心筋からプロテアソーム画分を調製し、*in vitro* でプロテアソーム活性を測定した。

小胞輸送における機能の解析

PI3P は小胞輸送に関わる早期エンドソームに豊富に存在すると言われている。マウス胎児癌由来の細胞株で心筋様細胞に分化させることができる P19.CL6 細胞株を用いて検討した。この分化型 P19.CL6 細胞株に PIK3C3 が発現していることを確認し、PIK3C3 発現を RNA 干渉で抑制し、免疫染色を用いて早期エンドソームにおけるタンパク質の局在変化を蛍光顕微鏡で観察した。小胞輸送阻害によって蓄積するタンパク質をウエスタンブロット法で検出し、PIK3C3 の小胞輸送での役割を総合的に検討した。

エンドサイトーシスにおける PIK3C3 の役割

P19.CL6 細胞株の PIK3C3 遺伝子発現を RNA 干渉で抑制し、蛍光標識したビーズを培地に添加してエンドサイトーシスを評価した。

受容体リサイクリングの解析

細胞膜上の膜タンパク質はエンドサイトーシスされた後に早期エンドソーム上でタンパク質分解を担うリソソームへ輸送されるものと細胞膜へリサイクリングされるものに選別される。増殖因子受容体 (EGFR) は受容体のリサイクリングが最も解析されている分子の 1 つであり、この受容体の増加は栄養シグナル伝達に影響し細胞肥大に關与することが予想される。また、アンギオテンシン 1 受容体 (AT1) は心筋の肥大やリモデリングなどに深く關与している。PIK3C3 欠損によりこれらの受容体がいかなる局在を示すのかを検討した。心筋組織から膜画分を調製し、ウエスタンブロット法で EGFR および

AT1 を検出した。P19.CL6 細胞株の PIK3C3 遺伝子発現を RNA 干渉で抑制し、PIK3C3 欠損下の細胞を免疫染色して EGFR や AT1 の局在を検討した。同時に、ウエスタンブロット法で EGFR および AT1 の蓄積を検討した。

(3) ヒト心筋症、心不全検体の解析

心肥大症例および正常心筋の組織切片 (市販品) を購入した。これらの組織を免疫染色し検討した。

4. 研究成果

筋特異的 PIK3C3 欠損マウスは生後徐々に心肥大、心収縮機能の低下、心室性不整脈および心伝導障害を自然発症し突然死した。心筋組織中の PI3P 量を HPLC で検討したところ、PIK3C3 欠損心筋では PI3P 量は低下傾向を示した。EEA1-FYVE-EGFP トランスジェニックマウスと PIK3C3 欠損マウスとを交配した遺伝子改変マウスの心筋組織では、PI3P の細胞内局在を示す EGFP の輝点は減少していた。MEF に Cre 発現アデノウイルスを感染させ PIK3C3 を導き、PI3P 量を測定したところ、PI3P 量は低下した。以上から、PIK3C3 は生体内でも PI3P を生成する主たる酵素であると考えられた。

既知の知見の通り Atg5 欠損心筋では LC3 や p62 の蓄積が認められ、PIK3C3 欠損心筋でも LC3 および p62 の蓄積を認めた。LC3-GFP トランスジェニックマウスと PIK3C3 欠損マウスとの交配による遺伝子改変マウスの心筋の解析では、環状の GFP 蛍光を認めた。電子顕微鏡での観察では、心筋細胞に二重膜で包まれた構造物が認められたためオートファゴソームが蓄積していると考えられた。

PIK3C3 欠損心筋細胞を単離し観察すると、PIK3C3 欠損心筋細胞は肥大していた。心筋中のタンパク質を定量すると、PIK3C3 欠損心筋で蓄積が認められた。mTor, 4EBP1, S6 のタンパク質合成シグナルの促進は認められなかった。PIK3C3 欠損心筋から抽出したプロテアソームの *In vitro* での活性は抑制されず、ポリユビキチン鎖修飾を受けたタンパク質が蓄積していた。これには、小胞輸送を介したタンパク質輸送に關与すると考えられているポリユビキチンタンパク質が含まれており、哺乳動物の PIK3C3 はポリユビキチン化タンパク質の小胞輸送に關与することが

示唆された。

P19.CL6 細胞株の PIK3C3 遺伝子発現を RNA 干渉で抑制すると、早期エンドソームに局在する EEA1 が減少した。早期エンドソームには PI3P が豊富に存在し、EEA1 は自身が有する FYVE ドメインを介して PI3P に特異的に結合することにより早期エンドソームに局在できると考えられている。PIK3C3 は早期エンドソーム上の PI3P を生成することによって、早期エンドソームへの分子の局在を制御する機能があることが示唆された。

蛍光標識を用いたエンドサイトーシスの検討では、コントロールの P19.CL6 細胞株と RNA 干渉により PIK3C3 発現を抑制した細胞株との間に差異は認められなかった。近年、PI3P を生成するアイソザイムの Class II PI3K 群がエンドサイトーシスに関与していると報告されている。Class III PI3K である PIK3C3 は早期エンドソームで、Class II PI3K はエンドサイトーシスで機能するという役割分担があることも想定された。

心筋組織から総膜画分を調製し、ウエスタンブロット法で EGFR および AT1 を検出した結果、PIK3C3 欠損心筋で蓄積が認められた。P19.CL6 細胞株の PIK3C3 遺伝子発現を RNA 干渉で抑制し、総膜画分を抽出したところ、EGFR や AT1 の蓄積を認めた。さらに PIK3C3 欠損下の細胞を免疫染色したところ、EGFR は早期エンドソームマーカー分子と共局在し蓄積していた。細胞膜表面の分子をビオチン化し抽出したところ、RNA 干渉で PIK3C3 発現抑制された細胞では、表出する EGFR や AT1 は減少していた。このことから、PIK3C3 は受容体膜タンパク質のリサイクリングに関与することが示唆された。

ヒト心筋組織の免疫染色による検討では、特定の心疾患群の心筋組織に PIK3C3 欠損マウスの所見と同様のユビキチン化タンパク質蓄積が観察されたことから、PIK3C3 はヒトの心疾患の発症に関与することが示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

1) 「心筋でのホスホイノシタイド代謝酵素の機能解析」 木村洋貴, 江口賢史, 久場敬司, 小藤智史, 高須賀俊輔, 中村亮太郎, 浅沼研, 鮎川友紀, 佐々木純子, 山崎正和, 佐々木雄彦. 第 2 回生体情報研究シンポジウム. 2013 年 6 月 14 日. 群馬大学生体情報研究所.

2) 「心筋でのホスホイノシタイド代謝酵素 Vps34 の機能解析」 木村洋貴, 江口賢史, 久場敬司, 今井由美子, 小藤智史, 高須賀俊輔, 浅沼研, 伊藤玲悦, 中村亮太郎, 鮎川友紀, 佐々木純子, 山崎正和, 佐々木雄彦. 第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 4 日. 神戸国際展示場.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 洋貴 (Kimura Hirotaka)

秋田大学 医学系研究科 非常勤講師

研究者番号: 30382899

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：