

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670407

研究課題名(和文) 老化に伴う循環器疾患におけるCavinファミリーの作用機構の解明

研究課題名(英文) The role of Cavin family proteins in cardiovascular disease

研究代表者

上山 知己 (Ueyama, Tomomi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：80379388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：PTRF/Cavin-1ノックアウトマウスの心筋細胞ではwild-type (WT)マウスの心筋細胞と比べ、カベオラの数の有意な減少を認めた。また、PTRF/Cavin-1ノックアウトマウスの心臓ではWTマウスと比べ心筋細胞の肥大と線維化の増加と収縮能の低下を認めた。MURCノックアウトマウスでは、 $\beta$ 1受容体刺激薬誘発性心肥大や低酸素誘発性肺高血圧の減弱を認めたが、腹部動脈瘤では悪化を認めた。以上の結果から、PTRF/Cavin-1が心機能を調節していることと、MURCが心肥大、肺高血圧、腹部大動脈瘤の進展に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：PTRF/Cavin-1 deficiency in mice causes loss of caveolae in cardiomyocytes, impaired cardiac function accompanying cardiomyocyte hypertrophy and interstitial fibrosis. MURC deficiency in mice attenuates cardiac hypertrophy induced by  $\beta$ 1-adrenergic receptor stimulation and pulmonary hypertension induced by hypoxia. MURC deficiency, on the other hand, exacerbated abdominal aortic aneurysm (AAA) in mice. These results reveals that PTRF/Cavin-1 regulates cardiac function, and that MURC is involved in the development of cardiac hypertrophy, pulmonary hypertension, and AAA.

研究分野：医歯薬学

キーワード：カベオラ Cavin family

### 1. 研究開始当初の背景

(1) わが国の高齢化は世界でも例を見ない速さで進んでおり、今後も高齢化率の上昇傾向は続く予想されている(内閣府平成28年版高齢社会白書)。それゆえ、高齢者の健康寿命をどのようにして延ばすかが重要な課題となっている。高齢者では、心疾患や脳血管疾患に代表される循環器疾患の罹患率が高く、循環器疾患の予防や治療によって健康寿命を延ばすことができると考えられる。健康寿命の延伸のためにはまず老化と循環器疾患の関わりとその機序についての明らかにする必要があると考える。

(2) 老化のメカニズムの一つとして酸化ストレスがあげられるが、その作用機構にCavinファミリータンパク質の一つであるPTRF/Cavin-1が重要であることが分かってきた(Volonte et al. JBC. 2011)。我々は、Cavinファミリー蛋白質で筋細胞特異的に発現しているMURCを単離・同定した(Ogata et al. Mol Cell Biol. 2008)。そして、MURCがCavinファミリー蛋白質のPTRF/Cavin-1やSDPR/Cavin-2と複合体を形成することを見出している。しかし、PTRF/Cavin-1やMURCが心不全や動脈硬化性疾患などの老化に伴う循環器疾患にどのように関わっているのか明らかではない。

### 2. 研究の目的

本研究では、心不全、肺高血圧症、腹部大動脈瘤発症におけるCavinファミリータンパク質の役割を検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) PTRF/Cavin-1<sup>-/-</sup>マウスとwild-type(WT)マウスの心筋細胞におけるカベオラ数を比較検討する。また、PTRF/Cavin-1<sup>-/-</sup>マウスとWTマウスで心電図検査を行い、心電図波形を比較検討する。さらにPTRF/Cavin-1<sup>-/-</sup>マウスの心機能をWTマウスと比較検討する。

(2) MURCを心筋細胞に過剰発現させたトランスジェニック(MURC-Tg)マウスを用いてBGP-15あるいはHsp70の心機能障害に対する効果を検討する。

(3) MURCのcoiled-coil domainを欠失させたMURC/Cavin-4の変異体( $\Delta$ CC)を用い、coiled-coil domainの機能を培養心筋細胞と $\Delta$ CCを心臓に発現させたトランスジェニック( $\Delta$ CC-Tg)マウスを用いて検討する。

(4)  $\alpha$ 1受容体刺激薬(フェニレフリン)誘発性心肥大におけるMURCの役割をMURC<sup>-/-</sup>マウスを用いて検討する。

(5) 低酸素誘発性肺高血圧症におけるMURCの役割をMURC<sup>-/-</sup>マウスを用いて検討する。また、血管平滑筋細胞のMURCを欠損させた

conditional knockout (cKO)マウスでも同様の検討を行う。

(6) 塩化カルシウムをマウスの腹部大動脈に塗布することによって生じる大動脈瘤、あるいはapolipoprotein E欠損マウスにangiotensinを投与することによって生じる腹部動脈瘤のモデルにおいてMURCの役割をMURC<sup>-/-</sup>マウスを用いて検討する。

### 4. 研究成果

(1) PTRF/Cavin-1<sup>-/-</sup>マウスの心筋細胞ではWTマウスの心筋細胞と比べ、カベオラ数の有意な減少を認めた(図1)。

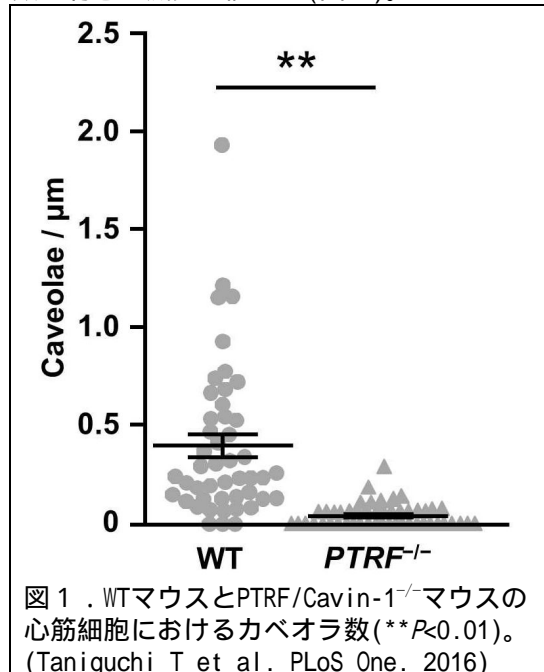


図1. WTマウスとPTRF/Cavin-1<sup>-/-</sup>マウスの心筋細胞におけるカベオラ数(\*\*P<0.01)。(Taniguchi T et al. PLoS One. 2016)

PTRF/Cavin-1<sup>-/-</sup>マウスではWTマウスと比べ心電図の肢誘導で低電位とQRSの延長を認めた。PTRF/Cavin-1<sup>-/-</sup>マウスの心臓ではWTマウスと比べ心筋細胞の肥大と線維化の増加を認めた。PTRF/Cavin-1<sup>-/-</sup>マウスの心臓では収縮能は低下していた。

(2) MURCを心筋細胞に過剰発現させたトランスジェニック(MURC-Tg)マウスは心機能障害を呈するが、BGP-15を投与するとMURC-Tgマウスの心房組織においてインスリン様増殖因子1受容体(IGF1R)のリン酸化は亢進し、心機能低下は抑制された。Hsp70ではMURC-Tgマウスの心機能障害に対する抑制効果を認めなかった。

(3) 心筋細胞においてMURCは細胞膜に局在するが、 $\Delta$ CCは細胞膜ではなく細胞質に存在し、coiled-coil domainはMURC/Cavin-4が細胞膜に局在するために必須であると考えられた。 $\Delta$ CC-Tgマウスの心臓では野生型(NTg)マウスと比べ、Caveolin-3蛋白の減少とERKの活性化を認めた。 $\Delta$ CC-TgマウスではNTgマウスと比べ心室腔は拡大し、心肥大および間質の線維化を伴う心機能低下を認

めた(図2)。

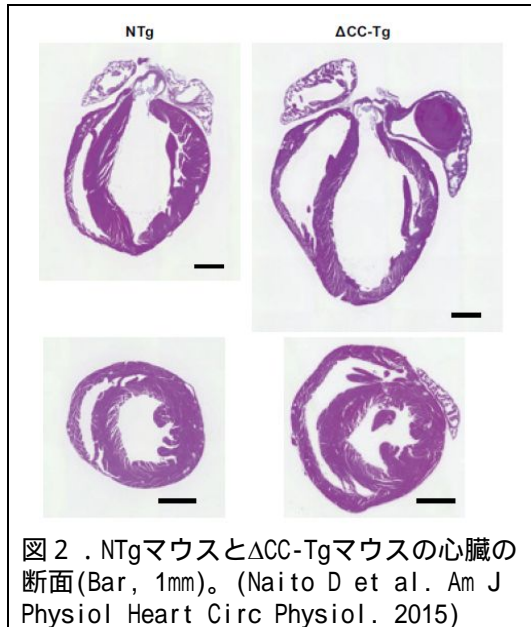


図2 . NTgマウスとΔCC-Tgマウスの心臓の断面(Bar, 1mm)。 (Naito D et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2015)

(4) WTマウスとMURC<sup>-/-</sup>マウスにフェニレフリンを投与したところ、MURC<sup>-/-</sup>マウスではWTマウスに比べフェニレフリン刺激によるERKの活性化が抑制された。MURC<sup>-/-</sup>マウスではフェニレフリンによる心肥大は抑制された。

(5) MURC<sup>-/-</sup>マウスではWTマウスと比べ低酸素暴露による右室収縮期圧上昇が抑制されたことから、低酸素誘発性肺高血圧がMURC欠損により抑制されたと考えられた(図3)。

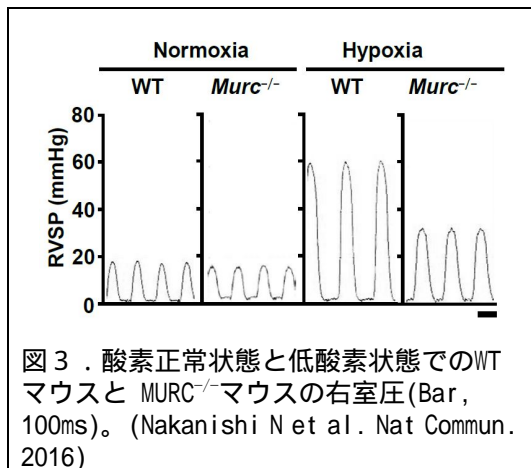


図3 . 酸素正常状態と低酸素状態でのWTマウスとMURC<sup>-/-</sup>マウスの右室圧(Bar, 100ms)。 (Nakanishi N et al. Nat Commun. 2016)

cKOマウスでも同様に低酸素暴露による肺動脈圧の上昇が抑制された。MURCは肺動脈血管平滑筋細胞において、Caveolin-1と結合することで、Rho/ROCKシグナルの上流にあるG13とCaveolin-1との結合力を弱め、G13とp115RhoGEFの結合を促しRho/ROCKシグナルを促進していると考えられた。

(6) 塩化カルシウムを腹部大動脈に塗布することによって生じる大動脈瘤モデルにおいてMURC<sup>-/-</sup>マウスではWTマウスと比べ大動脈径の増大を認めた(図4)。apolipoprotein E KOマウスに angiotensin

を投与して腹部動脈瘤を誘発するモデルにおいて、MURCを欠損させると腹部大動脈径が増大した。

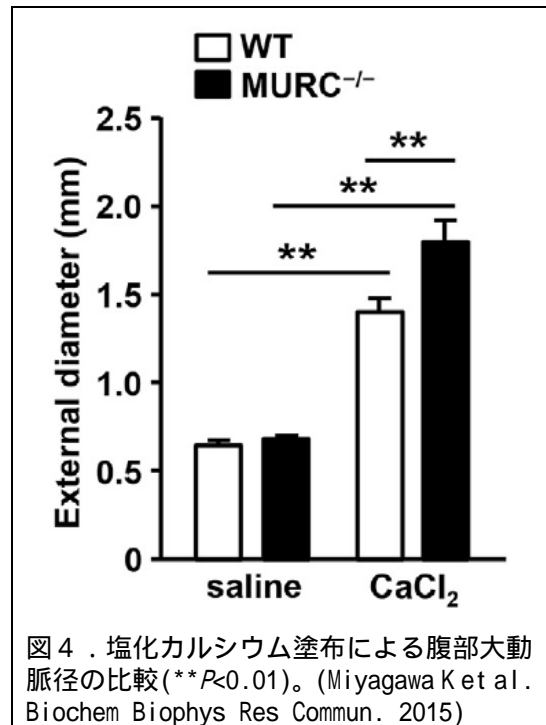


図4 . 塩化カルシウム塗布による腹部大動脈径の比較(\*\*P<0.01)。 (Miyagawa K et al. Biochem Biophys Res Commun. 2015)

(7) 以上の結果から、PTRF/Cavin-1が心機能維持に必要であることが明らかになった。また、MURCは心肥大や心不全、肺高血圧の発症に関与していることが明らかになった。腹部大動脈瘤においてはMURCが大動脈径の増大に対して抑制的に作用してい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7件)

- Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Hayashi YK, Taniguchi T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Matoba S, Ikeda K, Yamada H, Oh H, Ueyama T. MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by  $\alpha$ 1-adrenergic receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111: 3811-3816.
- Sapra G, Tham YK, Cemerlang N, Matsumoto A, Kiriazis H, Bernardo BC, Henstridge DC, Ooi JY, Pretorius L, Boey EJ, Lim L, Sadoshima J, Meikle PJ, Mellet NA, Woodcock EA, Marasco S, Ueyama T, Du XJ, Febbraio MA, McMullen JR. The small molecule BGP-15 protects against heart failure and atrial fibrillation in mice. Nat Commun. 2014; 5: 5705.
- Naito D, Ogata T, Hamaoka T, Nakanishi N, Miyagawa K, Maruyama N, Kasahara T, Taniguchi T, Nishi M, Matoba S, Ueyama T.

The coiled-coil domain of MURC/Cavin-4 is involved in membrane trafficking of caveolin-3 in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015; 309: H2127-3216.

4. Bernardo BC, Saprà G, Patterson NL, Cemerlang N, Kiriazis H, Ueyama T, Febbraio MA, McMullen JR. Long-Term Overexpression of Hsp70 Does Not Protect against Cardiac Dysfunction and Adverse Remodeling in a MURC Transgenic Mouse Model with Chronic Heart Failure and Atrial Fibrillation. *PLoS One.* 2015; 10: e0145173.
5. Nakanishi N, Ogata T, Naito D, Miyagawa K, Taniguchi T, Hamaoka T, Maruyama N, Kasahara T, Nishi M, Matoba S, Ueyama T. MURC deficiency in smooth muscle attenuates pulmonary hypertension. *Nat Commun.* 2016; 7: 12417.
6. Taniguchi T, Maruyama N, Ogata T, Kasahara T, Nakanishi N, Miyagawa K, Naito D, Hamaoka T, Nishi M, Matoba S, Ueyama T. PTRF/Cavin-1 Deficiency Causes Cardiac Dysfunction Accompanied by Cardiomyocyte Hypertrophy and Cardiac Fibrosis. *PLoS One.* 2016; 11: e0162513.
7. Miyagawa K, Ogata T, Ueyama T, Kasahara T, Nakanishi N, Naito D, Taniguchi T, Hamaoka T, Maruyama N, Nishi M, Kimura T, Yamada H, Aoki H, Matoba S. Loss of MURC/Cavin-4 induces JNK and MMP-9 activity enhancement in vascular smooth muscle cells and exacerbates abdominal aortic aneurysm. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 487: 587-593.

〔学会発表〕(計9件)

1. Nakanishi N, Ogata T, Maruyama N, Miyagawa K, Hamaoka T, Ueyama T. MURC/Cavin-4 deficiency alleviates pulmonary arterial hypertension. The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014 Apr. Kyoto, Japan.
2. Nakanishi N, Ogata T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Kasahara T, Ueyama T. Smooth muscle-specific deletion of MURC/Cavin-4 alleviates pulmonary arterial hypertension. American Heart Association Scientific Session 2014. 2014 Nov. Chicago, USA.
3. Kasahara T, Ogata T, Maruyama N, Taniguchi T, Hamaoka T, Miyagawa K, Nakanishi N, Ueyama T. PTRF/Cavin-1 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy with ERK1/2 hyperactivation and caveolin-3 reduction. American Heart Association Scientific Session 2014. 2014 Nov. Chicago, USA.
4. Maruyama N, Ogata T, Nakanishi N, Hamaoka T, Miyagawa K, Kasahara T, Ueyama T. SDPR/Cavin-2 modulates Akt

signaling involved in regulation of hypertrophy and apoptosis in cardiomyocytes. American Heart Association Scientific Session 2014. 2014 Nov. Chicago, USA.

5. Hamaoka T, Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Miyagawa K, Maruyama N, Kasahara T, Shirayama T, Ueyama T. MURC/Cavin-4 regulates cardiac function through modulation of caveolin-3 function in  $\beta$ -adrenergic receptor signaling. American Heart Association Scientific Session 2014. 2014 Nov. Chicago, USA.
6. Miyagawa K, Ogata T, Nakanishi N, Hamaoka T, Maruyama N, Kasahara T, Ueyama T. MURC/cavin-4 aggravates abdominal aortic aneurysm with JNK overactivation in vascular smooth muscle cells. American Heart Association Scientific Session 2014. 2014 Nov. Chicago, USA.
7. Nakanishi N, Ogata T, Hamaoka T, Maruyama N, Kasahara T, Nishi M, Ueyama T. MURC/Cavin-4 Deficiency in Smooth Muscle Attenuates Pulmonary Hypertension. American Heart Association Scientific Session 2015. 2015 Nov. Orlando, USA.
8. Hamaoka T, Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Miyagawa K, Maruyama N, Kasahara T, Nishi M, Shirayama T, Ueyama T. MURC/Cavin-4 Regulates Cardiac Function via  $\beta$ -adrenergic Receptor Signaling. American Heart Association Scientific Session 2015. 2015 Nov. Orlando, USA.
9. Nishi M, Ogata T, Naito D, Hamaoka T, Nakanishi N, Miyagawa K, Maruyama N, Kasahara T, Ueyama T. MURC/Cavin-4 Requires the Coiled-coil Domain for Membrane Trafficking of Caveolin-3 in Cardiomyocytes. American Heart Association Scientific Session 2015. 2015 Nov. Orlando, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上山 知己 (TOMOMI UEYAMA)

京都府立医科大学・医学研究科・客員講師  
研究者番号：80379388