

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06182

研究課題名(和文) アルコールによる心筋障害におけるHippo経路の役割

研究課題名(英文) The role of Hippo-YAP pathway in alcohol-induced cardiac dysfunction

研究代表者

則竹 香菜子 (Noritake, Kanako)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：40758067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：過度の飲酒は、心筋を障害し心収縮能を低下させることが知られているが、その分子機序の詳細は未だ不明である。これまでに、エタノールによる心筋細胞障害に関わる新規分子機構として、Hippo-YAPシグナルが破綻することを明らかにした。本研究で、恒常的活性化型YAPの過剰発現やアクチン線維の脱重合阻害剤投与によってエタノールによる細胞死が抑制されたことから、エタノールによるアクチン細胞骨格の破綻とYAPの機能阻害がアルコールによる心筋細胞障害に関わる重要な因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Excessive alcohol consumption often causes compromised myocardial contractile function, although the precise mechanism remains unknown. We reported previously that when mouse atrium-derived HL-1 cardiomyocytes undergo apoptosis upon direct exposure to ethanol, the cellular cytoskeleton is severely disrupted and the anti-apoptotic transcriptional co-activator YAP is inactivated. The restoration of YAP activation rescues the cells from apoptosis: both the expression of constitutively active YAP and the stabilization of the actomyosin cytoskeleton prevent ethanol-induced cell death. Thus, a decrease in actin tension and YAP inactivation should be crucially involved in the cytotoxicity of ethanol on HL-1 cardiomyocytes.

研究分野：法医学

キーワード：エタノール 心筋細胞傷害 Hippo-YAP経路 細胞間接着

## 1. 研究開始当初の背景

過度の飲酒は、心筋を障害し心収縮能を低下させることが知られている。アルコールによる心筋障害の機序については、エタノールや代謝産物であるアセトアルデヒドが直接心筋を障害することが知られているが、その分子機序の詳細は未だ不明である。

心筋は、心筋細胞間を連結するギャップジャンクション、アドヘレンスジャンクション、デスモゾームの細胞間接着装置を介して細胞同士が機能的に同期され、収縮・弛緩が正常に行われている。我々はこれまでに、自発的収縮能を保持する HL-1 細胞 (マウス心房筋由来株化細胞) において、エタノールがアポトーシス様細胞死を誘導すること、細胞間接着を破綻し細胞間情報伝達を抑制すること、さらに、細胞骨格の変性を引き起こすことを明らかにしている。

近年、がん抑制シグナルとして同定された Hippo シグナルは、細胞間接触などの物理的環境を感知して、標的分子である転写共役因子 YAP の制御を介し細胞増殖や細胞死を制御する。心臓ではこの Hippo シグナルが恒常性維持において不可欠で、心筋梗塞後のマウス成体心筋に恒常活性化型 YAP を発現させると、心筋細胞の増殖が促進され心機能が改善する、などの報告がある (Lin, Z. *et al.*: *Circ. Res.*, 2014.)。我々は、エタノールによる心筋細胞障害機構に関わる新規分子機構として Hippo-YAP シグナルの関与について検討し、エタノールを曝露した HL-1 細胞では Hippo-YAP シグナルが破綻しており、YAP の核移行が障害されていることを明らかにした。

最近の研究から、YAP の制御には G タンパク質や Wnt、TGF $\beta$  などのシグナル分子、アクチン細胞骨格の動態や細胞内代謝状態など、Hippo シグナル非依存的な複数の経路が関与していることが報告されている。エタノールによる YAP の機能障害にこれらが関与している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、エタノールによる YAP 機能障害のメカニズムを解明し、心筋細胞障害における Hippo-YAP シグナルの役割について明らかにすることを目的とした。従来明らかとなっていなかったアルコールによる心筋障害の詳細な分子機序を解明することで、臨床医学上での治療法や法医学実務上での診断法の確立に貢献することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) エタノール曝露後のアクチン細胞骨格および YAP 細胞内局在の観察

HL-1 細胞にエタノールを曝露後、細胞を固定・膜透過処理を行った。

YAP の細胞内局在は、anti-YAP 抗体を用いた免疫染色を行い、核を DAPI で染色し蛍光顕微鏡 (Leica, DMi8) 下で観察した。

アクチン細胞骨格の構造は、Phalloidin-Tetramethylrhodamine B (Sigma-Aldrich) によりアクチン線維を標識し、共焦点顕微鏡 (Eclipse Ti, Nikon) 下で観察した。

### (2) YAP の標的遺伝子 CTGF の mRNA・タンパク質発現量の解析

エタノールを HL-1 細胞に経時的に曝露し、タンパク質発現量をウェスタンブロット法で、mRNA 発現量をリアルタイム PCR にて解析した。

### (3) エタノールによる心筋細胞死に対する YAP の影響の評価

293T 細胞に、野生型 YAP (pQCXIH-Myc-YAP)、恒常的活性型 YAP (pQCXIH-Myc-YAP-5SA) を発現するレトロウイルスベクタープラスミドを Retrovirus Packaging Kit Eco (Takara Bio) を用いてトランスフェクションし、組換えウイルス溶液を作製した。ウイルス溶液をポリプレックス法により HL-1 細胞に感染させ、感染 24 時間後にエタノールを曝露し、アポトーシス関連分子である Caspase-3 の活性化をウェスタンブロット法で評価した。

### (4) エタノールによる心筋細胞死に対するアクチン細胞骨格動態の影響の評価

アクチンの重合阻害剤 cytochalasin D およびアクチン線維の脱重合阻害剤 jasplakinolide を HL-1 細胞に投与し、エタノール曝露後 Caspase-3 の活性化をウェスタンブロット法で評価した。

## 4. 研究成果

(1) エタノールを曝露した HL-1 細胞ではアクチン線維の構造が破綻している様子が観察された (図 1)。

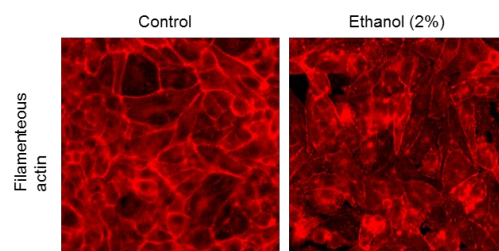


図1. エタノールによるアクチン細胞骨格の状態変化

(2) これまでに、エタノールを曝露した HL-1 細胞では、Hippo シグナルが抑制され、標的分子である転写共役因子 YAP が低リン酸化状態となることを示している。本来低リン酸化 YAP は核へ移行し細胞増殖・抗アポトーシス関連遺伝子の転写を促進するはずだが、実際には YAP の核移行が障害されている様子が観察された (図 2A; コントロール細胞で細胞密度の高い部分では YAP が細胞全体に局在し (白矢印)、細胞密度の低い部

分では核に局在している（黄矢印）。エタノール曝露細胞では細胞密度が低いにも関わらず YAP の核局在が顕著ではない。

また YAP の核移行不全に伴い、YAP の標的遺伝子である細胞増殖・生存に重要な CTGF の mRNA 及びタンパク質発現量がエタノール曝露後時間依存的に減少することを確認した（図 2B,C）。

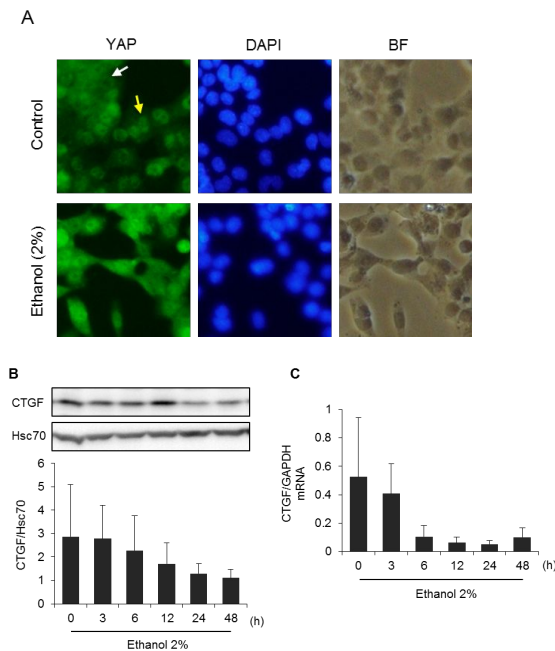


図2. エタノールによるYAPの機能阻害

(3) エタノールによる細胞死に対する YAP の影響を調べるため、HL-1 細胞に野生型 YAP(WT-YAP)、恒常的活性型 YAP(CA-YAP) を発現させた結果、恒常的活性型 YAP を発現させた細胞では、エタノールによる caspase-3 の活性化が抑制すなわちアポトーシスが抑制された（図 3）。

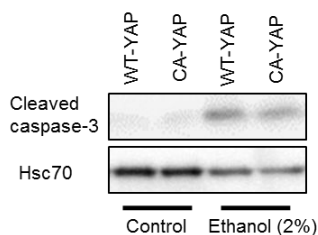


図3. エタノールによる心筋細胞死におけるYAPの役割

(4) YAP はアクチン細胞骨格の張力に応じて Hippo シグナル非依存的に制御されていることが知られており、アクチン線維の脱重合を介してアクチン細胞骨格の張力が減少すると YAP の核移行が抑制され転写が不活性化状態となることが知られている。そこで、エタノールによるアクチン細胞骨格の破綻

と細胞死との関係性を調べるため、アクチン線維の脱重合阻害剤 jasplakinolide を投与しアクチン細胞骨格の再構築を促した結果、エタノールによるアポトーシスが有意に抑制された（図 4）。逆に、cytochalasin D 投与によってアクチン重合を阻害すると、エタノールによるアポトーシスが増悪した。

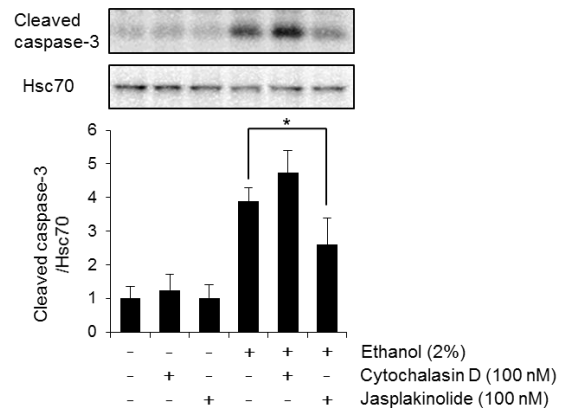


図4. エタノールによる細胞死に対するアクチン細胞骨格状態変化の影響

これらの結果から、エタノールによるアクチン細胞骨格の構造破綻と YAP の機能阻害がアルコールによる心筋細胞障害に関わる重要な因子であることが示唆された。

エタノールによる心筋細胞障害に関わる新規のシグナル経路として、細胞内外の物理的刺激に应答し、細胞増殖や細胞死を制御する Hippo-YAP シグナルが関与することを見出した。今回、YAP の活性化を促すことで、エタノールによる細胞死が抑制されることが確認できた。今後は Hippo-YAP 経路による心筋再生の可能性も検討する。

### 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 2 件)

1. 則竹香菜子, 秋利彦, 上村公一 (2015) アルコールによる心筋障害とオートファジーの役割 月刊「細胞」47(14): 44-47 査読なし
2. Kanako Noritake, Toshihiko Aki, Takeshi Funakoshi, Kana Unuma, Koichi Uemura (2015) Direct Exposure to Ethanol Disrupts Junctional Cell-Cell Contact and Hippo-YAP Signaling in HL-1 Murine Atrial Cardiomyocytes. *PLoS One*.28;10(8):e0136952. 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0136952.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 則竹香菜子, 秋利彦, 上村公一. HL-1

心筋細胞においてエタノールは細胞間接着・細胞骨格を破綻し、Hippo 経路の機能を障害する. 第 88 回日本生化学会. 2015 年 12 月, 神戸

2. 則竹香菜子, 秋 利彦, 上村公一. アルコールの毒性と心筋細胞障害. 第 49 回日本アルコール・薬物医学会. シンポジウム 5 「アルコール代謝と生体への影響」 2015 年 10 月, 神戸

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/med/legm/legm-J.htm>

1

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

則竹 香菜子 ( NORITAKE, Kanako )

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号： 4 0 7 5 8 0 6 7