

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15014

研究課題名（和文）再酸素化に即時応答する翻訳制御モデルの解明とその生理学的意義

研究課題名（英文）Functional analysis of a novel protein upregulated drastically in cardiomyocytes in response to ischemia reperfusion

研究代表者

佐々木 隼人（Sasaki, Hayato）

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：20768048

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：申請者は虚血再灌流後の心臓および再酸素化後の心筋芽細胞株においてタンパク発現が劇的に増大している新規遺伝子を見出していた。本研究ではマウスの各種臓器に虚血再灌流処置を施し、本現象が心臓特異的であることを明らかにした。標的遺伝子のノックアウトマウスを作出して虚血再灌流実験を行い、その生理学的意義を検証したところ、標的タンパクは心機能の低下（不整脈等）を抑制して、虚血再灌流時の心臓を保護していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再灌流障害は出血やショック、虚血性心疾患、心血管の外科的手術、臓器移植などで認められる、臨床上、重大な合併症である。再酸素化により細胞障害が誘起される一方、障害に対する保護作用も同時に亢進している。この保護作用はコンディショニングという現象で実証され、様々な作用機序が提唱されている。現在までに、それら保護作用を間欠的虚血処置や薬剤などで活性化して再灌流障害の予防や治療に臨床応用する研究が盛んに行われている。本研究成果はそれら保護作用の一つを説明するものであり、コンディショニング研究の一助となる。

研究成果の概要（英文）：I previously reported a novel protein SSKH1, which is drastically upregulated in cardiomyocytes in response to ischemia reperfusion or reoxygenation after hypoxia. In this study, various organs in mice were subjected to ischemia reperfusion injury, and in consequence, the dramatic upregulation of SSKH1 was found to be unique to hearts. Sskh1 deficiency reduced myocardial infarct size after ex vivo or in vivo ischemia/reperfusion injury. However, the mortality rate after ischemia reperfusion injury was significantly higher in Sskh1 knockout mice compared with wild-type mice. Pulmonary congestion during reperfusion, resulting from low cardiac output, was more frequently observed in Sskh1 knockout mice. These results suggest that SSKH1 does not protect cardiomyocyte injury but it protects cardiac electrophysiological activity.

研究分野：実験動物学

キーワード：虚血再灌流 再酸素化 心筋細胞 心臓 コンディショニング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再灌流障害は虚血状態に陥った組織に血流(酸素)が再開すること(再酸素化)がトリガーとなって生じる障害であり、出血やショック、虚血性心疾患、心血管の外科的手術、臓器移植などで認められるため、臨床上、重大な合併症である。障害の原因は血流の再開により生じる Ca^{2+} の過負荷や活性酸素種の異常産生であると考えられている一方で、障害に対する保護作用も再酸素化によって同時に亢進していることが明らかになってきた。この保護作用は“コンディショニング”という現象で実証され、様々な作用機序が提唱されている。現在までに、それらの保護作用を間欠的虚血処置や薬剤などで活性化して再灌流障害の予防や治療に臨床応用する研究が盛んに行われている状況であった。

2. 研究の目的

申請者は虚血再灌流後の心臓および再酸素化後の心筋芽細胞株においてタンパク発現が劇的に増大している新規遺伝子を見出した。本遺伝子の mRNA は常酸素または低酸素下では一定量存在するものの、再酸素化直後に劇的に減少しており、翻訳が抑制状態から再酸素化の刺激により抑制が解除され、翻訳が一斉に開始されるという翻訳制御モデルが考えられた。再酸素化に即時応答して劇的に発現が増大する動態から本タンパクは再灌流障害において何らかの生理学的意義を持っていると予想されるが、一切不明であった。本研究ではノックアウトマウスを用いて標的タンパクの生理学的意義を明らかにし、ノックアウト心筋芽細胞株を用いて作用機序を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

まず、虚血再灌流後の標的タンパクの発現増大が心臓特異的な現象か否かを検証するため、マウスの脳、肝臓、胃、脾臓、小腸を標的に動脈クレンメを用いて虚血再灌流処置を施し、免疫組織染色により虚血再灌流前後の標的タンパクの発現解析を行なった。次に、CRISPR 法により標的遺伝子のノックアウトマウスを作出し、心臓の虚血再灌流障害を野生型マウスと比較した。心臓の虚血再灌流は、ランゲンドルフ灌流心を用いた *ex vivo* の方法およびハンギング・ウェイト(重り吊り下げ)法を用いた *in vivo* の方法で行った。ハンギング・ウェイト法は心臓の左冠動脈の下に縫合糸を通し、糸の両端にそれぞれ1グラムの重りを付けて吊り下げ、重りの荷重により左冠動脈を閉塞し、左心を虚血させる方法である。重りの解除により再灌流を行う。いずれの方法も虚血を30分間、再灌流を2時間施し、TTC染色により梗塞領域を評価した。*in vivo* の方法ではエバンスブルー染色により虚血領域を定量し、虚血領域における梗塞領域の大きさも評価した。なお、*in vivo* の方法では再灌流2時間終了前に自発呼吸が開始された個体は死亡とした。有意差検定は、梗塞領域には t 検定、死亡率には Fisher の正確検定を用いた。作用機序を検証するため、CRISPR 法により心筋芽細胞株 H9c2 からノックアウト株を樹立し、フローサイトメトリーを用いて再酸素化後におけるアポトーシスと酸化ストレスを評価し、コントロール株と比較した。また、再酸素化により規定された翻訳制御機構を解明するため、標的遺伝子の翻訳領域をレポーター遺伝子に置き換えた発現プラスミド(非翻訳領域は標的遺伝子のまま)を作成し、これを H9c2 に導入して再酸素化前後にレポーターアッセイを行った。

4. 研究成果

本研究で対象とする現象が心臓特異的な現象か否かを検証するため、心臓以外で再灌流障害が問題となる脳、肝臓、胃、脾臓、小腸の各臓器を標的にマウスで虚血再灌流実験を行なったところ、いずれの臓器でも虚血再灌流の前後で標的タンパクの顕著な発現変動は認められず、本現象が心臓特異的であることが示された。標的遺伝子のノックアウトマウスと野生型マウスの心臓に対して虚血再灌流実験を行い、その生理学的意義を検証したところ、*ex vivo* および *in vivo* の実験結果は一致して、ノックアウトマウスの梗塞領域は対照群の野生型マウスと比較して小さかった(図1)。一方、ノックアウトマウスは再灌流完了までに肺に血液が鬱滞して酸素濃度が低下する様子が野生型マウスより多く観察され、死亡する割合が有意に高かった(野生型: 13匹中2匹死亡 = 15.4%、ノックアウト: 12匹中9匹死亡 = 75.0%、 $p < 0.01$)。ノックアウトマウスが野生型マウスより死亡率が高い一方で梗塞領域が小さかったのは、再灌流完了までに生存したノックアウトマウスの心臓で左心不全が生じて拍出量が低下し、十分に再灌流障害が誘起されなかった可能性が考えられる。すなわち、標的タンパクは虚血再灌流により生じる心機能の低下(不整脈等)を抑制していることが示唆された。心筋芽細胞株 H9c2 の再酸素化後のアポトーシスおよび酸化ストレスの割合は作出したノックアウト株と野生型株で違いはなかった。この結果は標的タンパクが心筋傷害に対して保護的に働いているのではなく、電気生理学的に心機能を保護していることを支持する。また、再酸素化により規定された翻訳制御機構を解明するため、標的遺伝子の翻訳領域をレポーター遺伝子に置き換えた発現プラスミド(非翻訳領域は標的遺伝子のまま)を作成し、これを H9c2 に導入して再酸素化前後にレポーターアッセイを行ったが、標的遺伝子の発現様式を再現することは出来なかった。翻訳を制御する領域が非翻訳領域だけでなくコーディング領域にも存在する可能性が考えられる。

今後、虚血再灌流時の心電図測定やパッチクランプ法による再酸素化後の心筋細胞の活動電位測定等の更なる研究により、標的タンパクによる心臓保護作用の機序が明らかになり、ひい

ては心臓の再灌流障害の予防法や治療法の開発に繋がることが期待される。

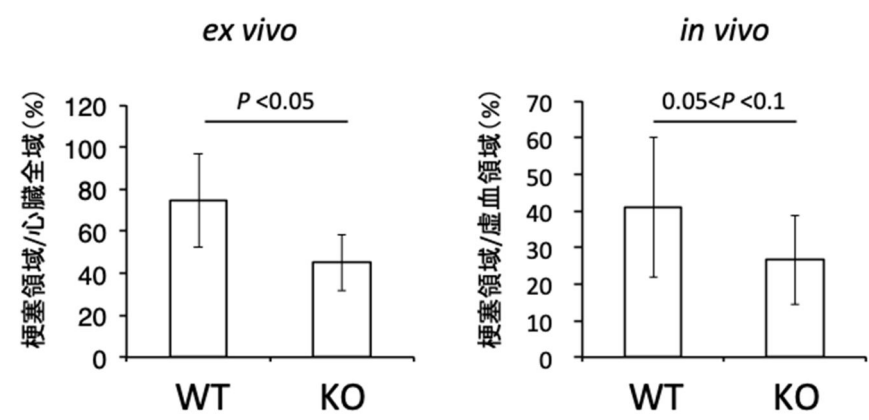


図 1. 虚血再灌流障害による心臓梗塞領域の比較

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 佐々木隼人, 安田純平, 小山貴弘, 高橋悠記, 高橋英機, 岡田宗善, 山脇英之, 佐々木宣哉
2 . 発表標題 虚血再灌流後の心筋細胞で発現が増大する新規タンパクの機能解析
3 . 学会等名 第66回日本実験動物学会
4 . 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----