

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04508

研究課題名（和文）心筋細胞の張力伝達ネットワークによる機械受容機構解明と心不全治療への展開

研究課題名（英文）Mechanoreceptive elucidation by the tension transmission network of cardiomyocytes and its application to the treatment of heart failure

研究代表者

花島 章（Hanashima, Akira）

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：70572981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：心筋細胞は高血圧などの機械的ストレスに適応できるが、その根底にあるメカニズムは依然として不明である。本研究では、筋弾性蛋白質コネクチンおよび核膜Nesprin-1に結合する新規蛋白質を解析した。本蛋白質のKOマウス心筋では、コネクチン発現の亢進と心筋細胞の肥大が見られた。KO心筋細胞では、筋小胞体におけるCa²⁺ハンドリングが増強され、ミトコンドリアにおける予備呼吸能を喪失していた。本蛋白質は圧力過負荷による心不全時に核膜に局在し、KOマウスは中程度の圧力過負荷でも心不全を発症した。従って本蛋白質は機械的ストレスから心筋細胞を保護す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

心臓は高血圧などの力学的環境変化に対して心筋細胞の肥大を介したポンプ機能調節によって適応するが、長期的にはこの適応機構も破綻して心不全に至る。現代社会において心不全は悪性新生物に次ぐ死因であり、心筋細胞の生体情報感知から肥大分子応答、心不全進行過程の解明が喫緊の課題である。特に筋弾性蛋白質コネクチンなどの心筋細胞内張力伝達ネットワークの変異は、様々な心疾患の主要な原因となっている。本研究によって、張力伝達ネットワークに結合する新規蛋白質の機能が明らかとなり、心筋細胞を機械的負荷から保護する役割が示唆されたことは、心疾患の病態の緩和を目指す新しい治療法開発につながる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：Cardiac myocytes can adapt to mechanical stresses such as hypertension, but the underlying mechanisms remain unclear. In this study, we analysed a novel protein that binds to the myoelastic protein connectin and nuclear membrane nesprin-1. KO mouse myocardium showed increased connectin expression and cardiomyocyte hypertrophy; KO cardiomyocytes showed enhanced Ca²⁺ handling in the sarcoplasmic reticulum and loss of mitochondrial spare respiratory capacity. The protein localized to the nuclear membrane during pressure overload-induced heart failure, and KO mice developed heart failure even under moderate pressure overload. Thus, the protein was suggested to protect cardiomyocytes against mechanical stress.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：コネクチン 心筋細胞 メカニカルストレス 心不全

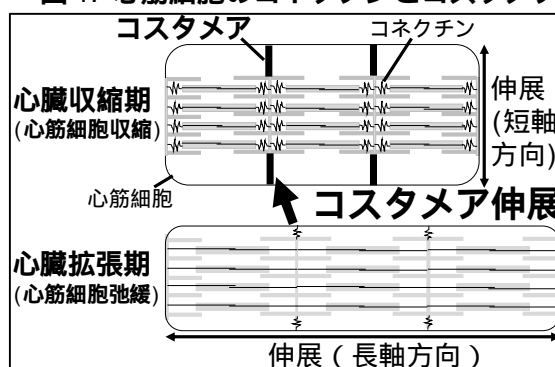
1. 研究開始当初の背景

心臓は高血圧などの力学的環境変化に対して心筋細胞の肥大を介したポンプ機能調節によって適応するが、長期的にはこの適応機構も破綻して心不全に至る。現代社会において心不全は悪性新生物に次ぐ死因であり、心筋細胞の生体情報感知から肥大分子応答、そしてそのシステム破綻による心不全進行プロセスの解明が喫緊の課題である。近年になり心筋細胞膜に局在するイオンチャンネルがメカノセンサーとして報告され、その分子基盤が次第に明らかになってきた。一方で直接張力を伝達・受容している心筋細胞内の構造的ネットワークも力学的情報感知における役割を担っていると考えられるが、技術的な問題もあり解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、心筋細胞が受動的に伸展される際に長軸方向の張力を受容する筋弾性蛋白質コネクチンと、細胞膜とサルコメアを短軸方向に繋ぎ収縮時張力を受容するコストメアに注目して心臓の力学的情報感知システムの解明に取り組む(図1)。心筋細胞内で張力伝達を担うこれらの構造的ネットワークは心臓メカノセンサー機能を果たす分子実体の最有力候補と考えられるが、巨大な分子量(コネクチンは生体内最大300万以上)などが課題となり解明が進んでいない。本研究では、この問題に新しい分子生物学的手法と生体医工学的手法を駆使して挑戦し、新規心不全治療法開発に重要な知見を資することを目的とした。

図1. 心筋細胞のコネクチンとコストメア



3. 研究の方法

筋弾性蛋白質コネクチンに結合する新規蛋白質の探索を酵母2ハイブリッド法で実施し、新規蛋白質を得て、ノックアウトマウスを作製した。ノックアウトマウスと野生型マウスに横行大動脈狭窄術で圧力過負荷を誘発し、心エコー、心電図、テレメトリー、X線位相差CTを用いて心臓の構造と機能を評価した。また単離したK0心臓について、組織化学、電子顕微鏡、免疫蛍光顕微鏡解析を行った。改変バキュロウイルスシステムを用いて、タグ付きタンパク質を発現させた。また、遺伝子をRNAiでサイレンシングし、心筋細胞への影響を検討した。さらに結合分子を酵母2ハイブリッド法で評価し、プルダウンアッセイで結合ドメインを同定した。そして、心筋細胞のミトコンドリアの機能とCa²⁺動態を評価した。

4. 研究成果

コネクチン結合蛋白質を酵母2ハイブリッド法で探索し、プルダウン実験で結合を確認することで新規結合蛋白質を同定した。次に、本蛋白質に結合する蛋白質を酵母2ハイブリッド法で探索し、プルダウン法実験で確認することで、Nesprin-1と結合することを同定した。qPCRおよびN末端とC末端抗体を使用したウェスタンブロットで、本蛋白質は心臓で高度に発現し、肺および腎臓で中程度に発現していることを示した。成体マウスの心臓では少なくとも3つの本蛋白質のスプライシングアイソフォームが発現していた。胎児の心臓では、成体で見られる全長アイソフォームに加えて、いくつかのより小さなアイソフォームがウェスタンブロットで検出された。免疫蛍光顕微鏡観察により、本蛋白質がマウス17日胚の心筋細胞のZ線、核膜、ミトコンドリアに局在し、成体マウスの心筋細胞では主にコストメアに局在していることが明らかとなった。次にGFP融合アイソフォームとmCherry融合-アクチニンを、改変バキュロウイルス発現系を使用してマウス胎児心筋細胞に共導入した。アイソフォーム1はミトコンドリアとサルコメアZ線に局在し、アイソフォーム2はNesprin-1と同様に核膜および細胞膜に局在し、アイソフォーム3はサルコメアZ線に局在して-アクチニンの局在を乱すことが観察された。さらに、新生児ラット心筋細胞への共導入と長期培養後、アイソフォーム1はZ線および糸状仮足様構造に、アイソフォーム2はZ線、M線、核膜、細胞質に移動し、アイソフォーム3はZ線と接着斑様構造に局在することを明らかにした。次に、マウス胎児心筋細胞にGFPを融合させた本蛋白質のmiRNAとmCherry融合-アクチニンを共導入したが、心筋細胞の形態やサルコメア構造は変化しなかった。新生児ラット心筋細胞にもsiRNAを導入し長期培養したが、サルコメア構造には影響が見られなかった。しかしノックダウン後、コネクチン、ミオシン重鎖、-アクチニン2などのサルコメアタンパク質の発現が増加した。これらの結果、本蛋白質が心筋細胞のコスタメア、サルコメア、核膜、およびミトコンドリアに局在し、各アイソフォームが遺伝子発現の変化を通じて心筋細胞の調節において異なる役割を担っていることが示唆された。

続いて心臓における本蛋白質の役割を明らかにするために、K0マウスを作製した。X線CT解

析の結果、K0 マウスの外観や骨格構造に異常は認められなかった。ヘテロ接合マウス交雑の近交系の遺伝子型比はおよそ WT : HT : K0 = 1 : 2.4 : 1.2 であり、K0 対立遺伝子を持つ出生がより多くなる傾向があった。X 線位相差 CT で、K0 マウスは正常な心臓構造が観察された。さらに心臓切片のマッソントリクローム染色では、心筋密度、コラーゲン線維、筋線維、核に有意差は見られなかった。また心エコー検査およびテレメトリー検査による心臓機能-LVD、心拍数、ECG 波形を解析したが異常は見られなかった。従って K0 マウスの心臓は正常な構造と機能を有していることが示唆された。

続いて K0 心筋における分子変化を明らかにするために、発現変動遺伝子を RNA-seq で網羅的に同定した。KEGG パスウェイ解析の結果、細胞接着と PI3K-Akt シグナル伝達経路に關する遺伝子が変動していた。GO エンリッチメント解析の結果、血管新生、心筋形成、VEGF 刺激細胞反応、細胞外マトリックスや細胞質などが変動していた。そして細胞接着経路を構成する遺伝子群の qPCR 分析により、K0 心室ではコスタメアに局在するインテグリンの発現が減少している一方、PI3K-Akt シグナル伝達経路関連遺伝子、およびミオシン調節遺伝子の発現が増加していた。さらに、PI3K-Akt シグナル伝達経路構成分子のリン酸化をウエスタンブロットで解析した結果、K0 心筋における PTEN リン酸化の減少が明らかになった。従って、本蛋白質がコスタメアで PI3K-Akt シグナル伝達経路を介して心筋細胞の調節に關与している可能性が示唆された。

次に、コスタメア、サルコメア、核膜の局在と発現を含む K0 心筋細胞の構造変化を解析した。免疫蛍光顕微鏡観察により、コスタメアの filamin、サルコメアのコネクチン、核膜の Nesprin-1 の局在は変化していなかった。サルコメア構造タンパク質の発現を qPCR で解析した結果、K0 心筋では MYH6、ACTN2、および TCAP の発現は変化していないが、コネクチンの発現は 2 倍以上増加していた。さらに SDS-アガロースゲル電気泳動により、コネクチン N2B アイソフォームが WT と同様に K0 心筋で主に発現していたが、ミオシン重鎖あたりのコネクチンの量は約 1.2 倍増加していた。また K0 心筋細胞では断面積が広がっていた。従って、本蛋白質のノックアウトによりコネクチンの発現と心筋細胞のサイズが増加することが示唆された。

続いて単離心筋細胞の収縮、Ca²⁺ 動態、および関連分子を調べた結果、0.5、1、2、4 Hz の周波数での刺激による収縮に有意差は見られなかった。しかし、K0 心筋細胞では Ca²⁺ 増加率は約 1.6 倍高く、Ca²⁺増加がピークに達するまでの時間は同様であり、Ca²⁺含有量が半分減少する速度は速く、筋小胞体内の Ca²⁺ 貯蔵量は 2.3 倍高かった。また qPCR により K0 心筋では Ca²⁺を細胞外に輸送する NCX1 が 1.8 倍高く、筋小胞体から Ca²⁺を放出する RyR2 が 1.2 倍高く、Ca²⁺を筋小胞体に回収する SERCA2a が 1.5 倍高く、SERCA2a 活性を調節する PLN は 1.5 倍高かった。さらにウエスタンブロットにより K0 心筋では SERCA2a と PLN の発現、および PLN のリン酸化が増強されていた。従って K0 心筋細胞は、SERCA2a の増加および抑制解除により、Ca²⁺ハンドリングが増強されていることが示唆された。

次に K0 心筋のミトコンドリアについて解析した。免疫組織化学および電子顕微鏡により、K0 心筋におけるミトコンドリアの凝集および融合が観察された。qPCR およびウエスタンブロットの結果、ミトコンドリアマーカー蛋白質である COXIV の発現は変化していなかった。そこで、K0 心筋細胞を単離し、基礎呼吸、オリゴマイシンによる ATP 合成抑制、FCCP によるプロトン回路・電子流促進、rotenone/antimycin A によるプロトン回路抑制時のミトコンドリア酸素消費量 (OCR) を計測しミトコンドリア代謝を評価した。その結果、K0 心筋細胞は、常に ATP を大量に要求するストレス性の代謝表現型だった。ミトコンドリアの基礎呼吸と ATP 生産速度は、それぞれ約 2 倍と 3 倍高かったが、最大呼吸能は変わらず、予備呼吸能が低かった。従って、本蛋白質はミトコンドリアの整列と融合を調節し、心筋細胞のエネルギー代謝を最適化することによって、ストレス状態から心臓を保護する可能性が示唆された。

上記のように K0 心臓は、ミトコンドリア酸素需要が高く予備呼吸能が低いこと、心筋細胞肥大による基礎代謝の増加、および Ca²⁺ハンドリングの増強により、虚血に対して脆弱である可能性が考えられた。そこで心臓に対する虚血と圧力過負荷の影響を分析するために、K0 マウスに重度および中等度の横行大動脈狭窄手術を行った。その結果、ほとんどの K0 マウスは、重度の狭窄手術後、数時間から数日以内に死亡し、死亡直前の心電図検査では、致死性不整脈の突然の発症が見られた。逆に、野生型マウスは重度の狭窄手術後 6 か月で心不全を発症し、マッソントリクローム染色で重度の心筋線維症が観察され、免疫蛍光染色で本蛋白質が心筋細胞の核膜に局在していることが観察された。また、野生型マウスは中程度の狭窄手術から 6 か月後正常だったが、K0 マウスは心エコー検査とマッソントリクローム染色で心機能の劇的な悪化と重度の線維症が認められ、左心室心筋細胞の異常な核形態と粗面小胞体の欠如が電子顕微鏡で観察された。従って K0 心臓は虚血に対して非常に脆弱であり、致死性不整脈発生により突然死することが明らかとなった。本蛋白質は機械的ストレスにตอบสนองして心筋細胞の核膜に局在し、心筋細胞の修復能力を維持し、心不全の発症を防ぐことが示唆された。本研究成果を基に更なる研究が進むことで、高血圧などの力学的過負荷による心不全発症を防止する新しい治療法開発への応用が期待される。

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 花島章, 木元弥咲, 氏原嘉洋, 大平桃子, 臼居優, 橋本謙, 毛利聡
2. 発表標題 メカニカルストレスによる心臓突然死と心不全発症を防ぐ新規蛋白質
3. 学会等名 第61回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学生理学1教室HP https://physiology1kawasaki.wixsite.com/website-2 Researchmap (花島章) https://researchmap.jp/hanashima

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
研究分担者	毛利 聡 (Mohri Satoshi) (00294413)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究分担者	橋本 謙 (Hashimoto Ken) (80341080)	川崎医科大学・医学部・准教授 (35303)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	氏原 嘉洋 (Ujihara Yoshihiro) (80610021)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (13903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関