

令和元年6月10日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15184

研究課題名(和文)トロポニンT置換による拡張型心筋症治療法開発への挑戦

研究課題名(英文)Troponin T replacement can be a new therapy for dilated cardiomyopathy

研究代表者

南沢 享 (Minamisawa, Susumu)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：40257332

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)：本研究の最終目標は極めて予後不良な若年発症の拡張型心筋症(DCM)に対する根本的治療法を開発することにある。そこで「変異型トロポニンTは正常遺伝型トロポニンTの過剰発現によって置換し得る」との仮説を、若年発症型DCMモデルマウスを使って検証した。さらにDCMマウスの極めて初期段階での心筋の構造的・機能的異常を経時的に調べ、若年段階で進行性の病態形成に働くシグナル分子や調節機構の同定を目指した。K210-K1マウスは若年発症型DCMのモデルとして有用であり、心筋症の治療を開発してゆくための良いモデルとなる。本研究によって、DCMに対して、心臓移植に代わる治療法開発の基礎が提供出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はトロポニン複合体を筋膜を温存した心筋細胞・組織においても置換可能であるという仮説を、実際の拡張型心筋症モデルを用いて検証する点に学術的特色がある。その検証の結果、K210に由来する心筋細胞のカルシウム感受性低下を是正することが出来、心筋症の構造的・機能的異常を改善し得る可能性がある。また、若年型拡張型心筋症の極めて初期段階での異常を調べることによって、病態悪化に働くシグナル分子や調節機構を同定し、心臓移植に代わる新たな治療法の開発に繋がる。本研究は心臓移植が難しく、極めて予後不良である若年型拡張型心筋症への根本的治療法の開発につながり、臨床医学的にも意義深いと考える。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to develop a radical treatment for juvenile-onset dilated cardiomyopathy (DCM) with extremely poor prognosis. We hypothesized that "mutant troponin T can be replaced by overexpression of normal troponin T" and examined it using a juvenile onset DCM model mouse. We aimed to identify signaling molecules and regulatory mechanisms that act in progressive pathogenesis in children. In addition, structural and functional abnormalities of the myocardium in the very early stage of juvenile DCM mice were investigated. We found that the K210-K1 mouse is useful as a model for juvenile-onset DCM and is a good model for developing therapy for DCM. This study provided the fundamental basis for development of new DCM therapy.

研究分野：循環生理学

キーワード：心筋症 遺伝子治療 遺伝子異常 筋原線維 トロポニン 突然死 乳幼児 心不全

1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症 (**Dilated Cardiomyopathy: DCM**) は、心拡大と収縮不全を特徴とする心筋疾患であり、根本的な治療法がなく、心臓移植手術が必要になることが多い。特に若年に発症する **DCM** は致死性不整脈による突然死や急速に進む心不全のために、成人発症型に比して、さらに予後が不良とされる。本邦及び海外の研究では **18** 歳未満の **DCM** 患児の半数以上が 1 歳未満に発症をしている。小児における心臓移植は極めて限定されており、根本的な治療法の開発が望まれている。一方、**DCM** の病因に関する研究は、最新の遺伝学的手法によって飛躍的に進んでおり、約 **30%** の患者に筋原線維 (サルコメア) や細胞骨格を構成するタンパク質の遺伝子変異を認めることが報告されている。しかしながら、現時点では病因の解明が治療法の開発に未だ結びついていない。その要因のひとつに、実験的に検証可能な **DCM** モデル動物が利用できなかったことが挙げられる。

この問題点の解決に向けて、大槻、森本らはヒト **DCM** で発見されたトロポニン **T** アミノ酸変異 (**K210**) をもつノックインマウス (**K210-KI**) を作成した (**Du et al. Circ Res 2007**)。

K210-KI マウスはヒト若年型 **DCM** と同様の表現型を有し、**DCM** の発症機序に基づいた治療法を開発する研究の道が拓かれた。これまでにトロポニン **T** の生理的役割を調べた *in vitro* 実験系において、過剰のトロポニン複合体を筋膜除去筋線維 (スキンドファイバー) に加えると、内因性のトロポニン複合体と置換出来ることが報告されている (**Shiraishi et al. J Biochem 1992**)。しかし、「生きた心筋細胞において変異トロポニン **T** を正常トロポニン **T** に置換する」ことが出来るか否かは確かめられていなかった。

2. 研究の目的

本研究の第 1 の目的は「**K210** 変異トロポニン **T** は正常遺伝型トロポニン **T** の過剰発現によって置換し得る」という作業仮説を、まず生きた心筋細胞や組織、さらには生体で検証することであった。さらに、出生直後から **K210-KI** マウスの心臓を詳細に観察し、若年型 **DCM** の発症機転を解明し、その治療法の開発につなげることを第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

I. K210-KI マウスにおける周産期心筋障害の解析

若年発症型の **DCM** は発見時既に重症化していることが多く、いつの時点で心機能が低下し、病態が進行するのかについては、ヒトでは様々な制約があり、よく理解されていない。K210-KI マウスは若年発症型の **DCM** と良く似た特徴を有し、ホモ型は生後 10 日目前後から死亡例が見られる。本マウスに関して、先行研究では生後 8 週目以降のデータが報告されているのみであった。そこで、野生型、ヘテロ K210-KI、ホモ K210-KI マウスに関して、まず出生直後、生後 3 日、生後 1 週間、生後 2 週間、生後 3 週間での心臓での以下の表現型を検討した。

- 1) 心臓重量及び心筋細胞配列、肥大、線維化等の組織学的検討を行った。
- 2) 新生仔期の心機能評価：生後 1 週間での心臓超音波検査を行った。
- 3) 網羅的遺伝子発現解析：8 週齢のマウスの網羅的遺伝子発現解析データから K210-KI で有意に増加・減少する分子が既に同定されているが、それ以前についてはデータがなかった。生直後及び生後 1 週間の早期に変化する分子について、網羅的遺伝子発現解析を行った。

II. ラット新生仔心筋細胞へのヒト正常型トロポニン **T** 置換実験

筋膜除去筋線維 (スキンドファイバー) で可能であったトロポニン **T** の置換が、生きた細胞でも可能であるかを、ヒト・トロポニン **T** の発現ベクターを作成し、ラット新生仔培養心筋細胞にリポフェクション法によって遺伝子導入した。ヒト・トロポニン **T** の遺伝子導入 48~72 時間後に Western-blot 法、免疫染色法などによって、ヒト・トロポニン **T** と内在性ラット・トロポニン **T** との関係を検討した。また、導入効率をさらに上げるために、ヒト正常型トロポニン **T** 発現のためのアデノウィルスベクターの作成を試みた。

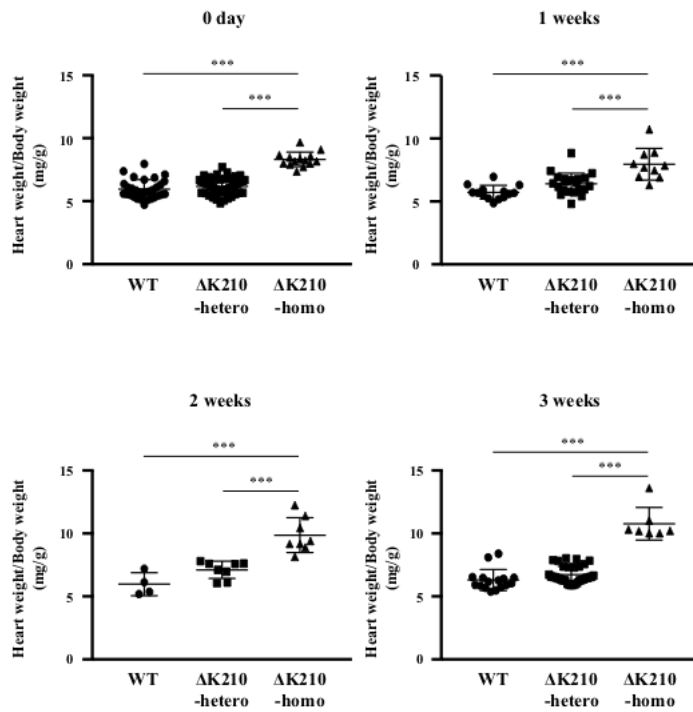
III. K210-KI マウス生体へのヒト正常型トロポニン **T** 置換実験 (成獣への導入)

成獣におけるトロポニン **T** 置換の効果を見るため、心臓選択的なトロポニン **T** (又は複合体) トランスジェニックマウスを作成し、K210-KI マウスと掛け合わせた。そ正常トロポニン **T** 遺伝子過剰発現 + K210-KI マウスの心臓の表現型の評価を試みた。

4. 研究成果

I. K210-KI マウスにおける周産期心筋障害の解析

K210-KI マウス (ヘテロ型、ホモ型) と野生型マウスにおいて、出生直後、生後 1 週、生後 2 週、生後 3 週の心重量体重比を調べた結果、ホモ型 K210-KI マウスは生直後から心重量が増加していることが判明した。一方、ヘテロ型 K210-KI マウスの心重量は生後 3 週時においても野生型マウスとの差を認めなかった (図)。



HE染色等の心室組織学的検討では、ホモ型 K210-KI マウスの心室筋は生後 1 週目で明らかに肥厚していたが、間質の線維化は認めなかった。しかし、生後 3 週目には CTGF mRNA の増加傾向と明らかな間質の線維化を認めた。心室での遺伝子発現を調べたところ、ANF などの mRNA 発現量は生直後では変化がなかったが、生後 1 週目から有意に増加していた。これは生後 1 週での心エコー検査の結果、ホモ型 K210-KI マウスでは既に有意に心拡大があり、心収縮能が低下していたことを反映する結果と考えられた。すなわち、生直後から生後 1 週間の早期に、心筋症が急速に悪化すると考えられ、この間に変化がみられる分子について、網羅的遺伝子発現解析によって検討した。その結果、ガンのシ

グナル経路、接着因子群、代謝系遺伝子群、自律神経系遺伝子群に大きな変化が認められ、RT-PCR 法にて確認した。以上の結果から、ホモ型 K210-KI マウスは新生児 DCM の良いモデル動物になると考えられた。

II. ラット新生仔心筋細胞へのヒト正常型トロポニン T 置換実験

ヒト・トロポニン T の発現ベクターを作成し、まず、HEK293 細胞にリポフェクション法によって遺伝子導入し 48~72 時間後に免疫染色法によって、ヒト・トロポニン T が導入されることを確認した。しかし、導入効率が 20%以下と低いとため、さらに導入効率を上げるために、ヒト正常型トロポニン T 発現のためのアデノウィルスベクターを作成した。研究期間内にベクターコンストラクトが完成し、現在、増幅中である。

III. K210-KI マウス生体へのヒト正常型トロポニン T 置換実験 (成獣への導入)

心筋に特異的遺伝子発現をする alphaMHC プロモーターを使い、野生型トロポニン T の過剰発現マウスを作成した。この野生型トロポニン T の過剰発現マウスは、心機能の変化など正常型に比して有意な変化を認めなかった。現在、この過剰発現マウスを K210-KI マウスと交配し、心筋症の発症に関する影響を観察中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

Kobirumaki-Shimozawa F, Oyama K, Shimozawa T, Mizuno A, Ohki T, Terui T, Minamisawa S, Ishiwata S, Fukuda N. Nano-imaging of the beating mouse heart *in vivo*: importance of sarcomere dynamics, as opposed to sarcomere length *per se*, in the regulation of cardiac function. *J Gen Physiol*, 査読あり, 147(1):53-62, 2016.

doi: 10.1085/jgp.201511484.

Shimura D, Kusakari Y, Sasano T, Nakashima Y, Nakai G, Jiao Q, Jin M, Yokota T, Ishikawa Y, Nakano A, Goda N, Minamisawa S. Heterozygous deletion of Sarcolipin maintains normal cardiac function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 査読あり, 1310(1):H92-H103, 2016.

doi: 10.1152/ajpheart.00411.2015.

Fujimoto Y, Urashima T, Shimura D, Ito R, Kawachi S, Kajimura I, Akaike T, Kusakari Y, Fujiwara M, Ogawa K, Goda N, Ida H, Minamisawa S. Low cardiac output leads hepatic fibrosis in right heart failure model rats. *PLoS One*, 査読あり, 11(2):e0148666, 2016.

doi: 10.1371/journal.pone.0148666.

- Onda A, Kono H, Jiao Q, Akimoto T, Miyamoto T, Sawada Y, Suzuki K, Kusakari Y, Minamisawa S, Fukubayashi T. New mouse model of skeletal muscle atrophy using spiral wire immobilization. *Muscle Nerve*, 査読あり, 54(4):788-91, 2016.
doi: 10.1002/mus.25202.
- Shimura D, Nakano A, Minamisawa S. Sarcolipin in atrium-specific gene targeting. *Cardiovasc Regen Med*, 査読あり, 2016; 3: e1297. doi: 10.14800/crm.1297.
- Ito K, Hongo K, Date T, Ikegami M, Hano H, Owada M, Morimoto S, Kashiwagi Y, Katoh D, Yoshino T, Yoshii A, Kimura H, Nagoshi T, Kajimura I, Kusakari Y, Akaike T, Minamisawa S, Ogawa K, Minai K, Ogawa T, Kawai M, Yajima J, Matsuo S, Yamane T, Taniguchi I, Morimoto S, Yoshimura M. Tissue Thrombin is Associated with the Pathogenesis of Dilated Cardiomyopathy. *Int J Cardiol*, 査読あり, 228:821-827, 2017.
doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.176.
- Kusakari Y, Urashima T, Shimura D, Amemiya E, Miyasaka G, Yokota S, Fujimoto Y, Akaike T, Inoue T, Minamisawa S. Impairment of Excitation-Contraction coupling in right ventricular hypertrophied muscle with fibrosis induced by pulmonary artery banding. *PLoS One*, 査読あり, 12(1): e0169564, 2017.
doi: 10.1371/journal.pone.0169564.
- Akaike T, Du N, Lu G, Minamisawa S, Wang Y, Ruan H. A sarcoplasmic reticulum localized Protein phosphatase regulates phospholamban phosphorylation and promotes ischemia reperfusion injury in the heart. *J Am Coll Cardiol Basic Trans Science*, 査読あり, 2(2):160–80, 2017.
doi: 10.1016/j.jacbts.2016.12.002
- Ohira T, Higashibata A, Seki M, Kurata Y, Kimura Y, Hirano H, Kusakari Y, Minamisawa S, Kudo T, Takahashi S, Ohira Y, Furukawa S. The effects of heat stress on morphological properties and intracellular signaling of denervated and intact soleus muscles in rats. *Physiol Rep*, 査読あり, 5(15). pii: e13350, 2017.
doi: 10.14814/phy2.13350.
- Iuchi H, Sakamoto M, Matsutani D, Suzuki H, Kayama Y, Takeda N, Minamisawa S, Utsunomiya K. Time-dependent effects of ipragliflozin on behaviour and energy homeostasis in normal and type 2 diabetic rats: continuous glucose telemetry analysis. *Sci Rep*, 査読あり, 7(1):11906, 2017.
doi: 10.1038/s41598-017-12106-y.
- Rose BA, Yokota T, Chintalgattu V, Ren S, Iruela-Arispe L, Khakoo AY, Minamisawa S, Wang Y. Cardiac myocyte p38 α kinase regulates angiogenesis via myocyte-endothelial cell cross-talk during stress-induced remodeling in heart. *J Biol Chem*, 査読あり, 292(31):12787-12800, 2017. doi: 10.1074/jbc.M117.784553.
- Steiger D, Yokota T, Li J, Ren S, Minamisawa S, Wang Y. The serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1 α protects the heart against pressure overload-induced heart failure. *J Biol Chem*, 査読あり, 293(25):9652-9661, 2018.
doi: 10.1074/jbc.RA118.003448
- Tanihata J, Nagata T, Ito N, Saito T, Nakamura A, Minamisawa S, Aoki Y, Ruegg UT, Takeda S. Truncated dystrophin ameliorates the dystrophic phenotype of mdx mice by reducing sarcolipin-mediated SERCA inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読あり, 505(1): 51-59,

2018.

doi: 10.1016/j.bbrc.2018.09.039.

Nakai G, Shimura D, Uesugi K, Kajimura I, Jiao Q, Kusakari Y, Soga T, Goda N, Minamisawa S (correspondence). Pyruvate dehydrogenase activation precedes the down-regulation of fatty acid oxidation in monocrotaline-induced myocardial toxicity in mice. *Heart Vessels*, 査読あり, 34(3):545-555, 2018.

doi: 10.1007/s00380-018-1293-3.

〔学会発表〕(計 15 件)

Kuga K, Kusakari Y, Akaike T, Minamisawa S. FGF23 promote cardiac fibrosis by activating FGFR1 in presence of TGF- β stimulation. 第33回国際心臓研究学会日本部会(ISHR2016). 2016

久我和寛, 草刈洋一郎, 南沢享. FGF23 による TGF- β を介した心臓線維化促進効果. 心血管膜輸送研究会 2016 「心血管膜輸送分子の構造・機能・病態の統合的研究戦略」 2016

碓井文雄, 山田祐揮, 草刈洋一郎, 南沢 享. 心筋過伸展による線維化関連因子発現変化. 第94回日本生理学会大会. 2017

Usui F, Yamada Y, Kusakari Y, Minamisawa S. Diastolic overstretch of isolated rat papillary muscle reduced force development and increased gene expression of fibrosis-related factors. 第134回成医会総会. 2017

碓井文雄, 草刈洋一郎, 南沢 享. 乳頭筋過伸展による線維化関連因子の発現変化とミトコンドリア内部の崩壊. 筋生理の集い. 2017

谷端 淳, 永田哲也, 伊藤尚基, 齊藤 崇, 中村昭則, 南沢 享, 青木吉嗣, 武田伸一. 筋ジストロフィー病態における細胞内Ca²⁺動態の解明と新たな治療法の開発. 第5回骨格筋生物学研究会. 2017

谷端 淳, 永田哲也, 伊藤尚基, 齊藤 崇, 中村昭則, 南沢 享, 青木吉嗣, 武田伸一. 筋ジストロフィー病態における細胞内Ca²⁺動態の解明と新たな治療法の開発. 日本筋学会第3回学術集会. 2017

南沢 享, 谷端 淳, 藤本義隆, 赤池 徹, 草刈洋一郎, 森本幸生. 幼児期発症拡張型心筋症モデルとしてのトロポニンTアミノ酸変異(Δ K210)ノックインマウス. 第3回日本筋学会学術集会. 2017

Tanihata J, Nagata T, Ito N, Saito T, Nakamura A, Minamisawa S, Aoki Y, Takeda S. Cytosolic Ca²⁺ dynamics through the SR is associated with pathology of muscular dystrophy. 第3回Neo Vitamin D Workshop学術集会. 2017

Tanihata J, Fujimoto Y, Akaike T, Kusakari Y, Morimoto S, Minamisawa S. Troponin T Amino Acid Mutation (Δ K 210) Knock-in Mice as an Infant-onset Dilated Cardiomyopathy Model. The 8th TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease. 2017

谷端 淳, 永田哲也, 青木吉嗣, 南沢 享, 武田伸一. 筋ジストロフィー病態における細胞内 Ca²⁺ 動態の解明と新規治療法の開発. 第247回生理学東京談話会. 2017

草刈洋一郎, 碓井文雄, 南沢 享. 乳頭筋過伸展による線維化関連因子の発現変化. 第247回東京談話会. 2017

南沢 享. トロポニンTアミノ酸変異(Δ K210)ノックインマウスは幼児期発症拡張型心筋症モデルとなり得る. 第65回日本心臓病学会学術集会. 2017

J.Tanihata, N. Nishioka, T. Inoue, K. Bando, S. Minamisawa. Urine Connectin/Titin Is Increased in Patients After Heart Surgery with Cardiopulmonary Bypass. *Experimental Biology* 2018

Nishioka N, Kusakari Y, Tanihata J, Minamisawa S. Acute Diastolic Overstretch Causes Abrupt Inner Mitochondrial Collapsing of Isolated Rat Papillary Muscle. *AHA Scientific Sessions* 2018

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：http://sminamis.m38.coreserver.jp/Jikei_Cell_Physiology/Welcome.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：赤池 徹

ローマ字氏名：**Akaike Toru**

所属研究機関名：東京慈恵会医科大学

部局名：細胞生理学講座

職名：講師

研究者番号（8桁）：**20647101**

(2)研究協力者

研究協力者氏名：久我 和寛

ローマ字氏名：

研究協力者氏名：藤本 義隆

ローマ字氏名：

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。