

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08105

研究課題名(和文)メカノシグナルによる心筋微小管の動的制御機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism in which mechanostress modulates cardiac microtubules dynamics

研究代表者

新谷 泰範 (SHINTANI, YASUNORI)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：20712243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞におけるAMPKの局在がメカノストレス依存的に制御されていること、CLIP-170のリン酸化を介して微小管のdynamics、さらには細胞の形態を制御することを明らかにした。AMPKによるCLIP-170のリン酸化部位に変異を加えた S311A TGマウスでは、有意な線維化と心収縮力の低下を認め、コントロールに比べ心機能の悪化を認めた。組織学的な検討でも心筋組織内に微小管の蓄積をみとめ、また電子顕微鏡による観察では介在板の構造異常が観察され、CLIP170のリン酸化の意義を確立した。これらの結果をまとめた原著論文をEMBO Reportsにて発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

介在板を発信源とするAMPKメカノシグナルによる心筋微小管の動的制御機構を明らかにし、その基質としてCLIPリン酸化が心疾患の病態形成に関わる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified an active form of AMP-activated protein kinase (AMPK) localized at the intercalated disks in the heart, a specific cell-cell junction present between cardiomyocytes. A contractile inhibitor, MYK-461, prevented the localization of AMPK at the intercalated disks, suggesting that the localization of AMPK is regulated by mechanical stress. MYK-461 increased the individual cell area of cardiomyocytes in CLIP-170 phosphorylation-dependent manner. Moreover, heart-specific CLIP-170 S311A transgenic mice demonstrated elongation of cardiomyocytes along with accumulated microtubules (MTs), leading to progressive decline in cardiac contraction. In conclusion, AMPK regulates the cell shape and aspect ratio of cardiomyocytes by modulating the turnover of MTs through homeostatic phosphorylation of CLIP-170 at the intercalated disks.

研究分野：循環器内科学

キーワード：AMPK 介在板 メカノストレス

1. 研究開始当初の背景

心臓において力学的刺激は一体どこで感知されているのか？

ー心臓でメカノバイオロジーを研究する必要性ー

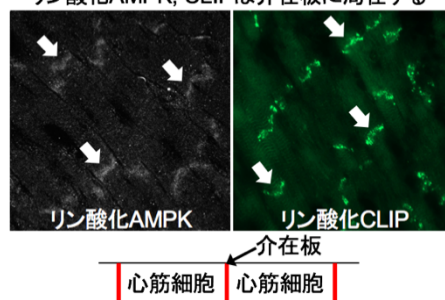
運動や出生後の体血圧の上昇にともなうメカニカルストレスの上昇は心臓の成長を促す。その逆に異所性心臓移植を用いた動物実験や、補助人工心臓を用いた unloading など力学的刺激の軽減により、心筋細胞の萎縮や細胞死が誘起されることが知られている。すなわち、メカニカルストレスは心臓の機能、臓器の正常な発達、恒常性維持に必須である。

高齢化人口の増加に伴い、社会を支える働き手となる若年者の突然死予防は世界的に喫緊の課題である。とくに心臓突然死の原因の多くをしめる不整脈源性右室心筋変性症 (ARVC) は、5000 人に 1 人の比較的高い罹患率を示し、30 才前後という好発年齢を考慮すると、その発症メカニズムの理解と突然死の予防は大きな問題となっている。ARVC における突然死の原因が介在板デスモゾーム構成分子の遺伝子異常に加え、運動負荷によるメカニカルストレスの上昇があげられていることは重要である。心臓のメカノストレスは均一ではなく、左室>右室、内膜側>外膜側など部位によって異なる。一方で ARVC の心筋変性は右室優位に、また心外膜側から進行することなど部位による違いが指摘されており、メカノシグナルが病態メカニズムに関与している可能性がある。これらの事実は介在板が心臓におけるメカノセンシングの重要な場の一つであることを強く示唆するが、そのセンシング、シグナルの分子メカニズムはほとんどわかっておらず、その解明の重要性は明らかである。

心臓における微小管 dynamics の重要性

これまで心臓における微小管は、細胞骨格の 1 因子という静的なイメージでとらえられてきた。しかし、心不全モデルマウスの心臓において微小管が増加しており、微小管重合阻害剤 colchicine 投与により心不全病態が改善されることが報告された (Circulation, 2014; 129: 1742-1750)。逆に、安定化微小管を増加させる作用を持つ抗がん剤 paclitaxel は、副作用として心機能の低下を引き起こす (Circulation, 2004; 109: 3122-3131)。さらに最近、ヒト心不全症例で微小管が安定化し蓄積していること、さらにこれが収縮力低下の一因となることが報告され (Science, 2016; 352: 6284)、心臓における微小管の重要性が注目されている。しかしながら、心臓における微小管の dynamics や安定化微小管量の制御がどのようになされているかはまったく不明であった。申請者らは、以前遊走細胞において伸長/退縮/崩壊をくり返す微小管の動的不安定性が、AMPK による微小管プラス端結合タンパク質 CLIP のリン酸化により制御されることを報告した (Nat Cell Biol 2010)。さらに非遊走細胞である心筋細胞、心臓における局在を検討したところ、成熟期マウスの正常心筋組織においてリン酸化 AMPK、CLIP が介在板に局在することを初めて見出した (図 1)。また介在板における AMPK の局在がメカノシグナルにより制御されるという予備データをえて、本研究計画の提案に至った。

図1 正常マウスの心筋組織免疫染色
リン酸化AMPK, CLIPは介在板に局在する



2. 研究の目的

申請者が新たに同定した介在板を発信源とする AMPK メカノシグナルによる心筋微小管の動的制御機構の解明と、CLIP リン酸化の制御による治療応用の可能性を検証する。

①介在板におけるメカノシグナルを介した AMPK-CLIP による微小管の動的制御機構の解明

- ②微細ガラスピペットを用いた細胞間張力と微小管 dynamics の相関解析
- ③in vivo での AMPK-CLIP リン酸化の病態形成における役割の検証
- ④介在板における AMPK の新規基質分子の探索

3. 研究の方法

①介在板におけるメカノシグナルを介した AMPK-CLIP による微小管の動的制御機構の解明

本研究では心筋細胞にて微小管をリアルタイムに観察すること、また拍動停止剤を用いて心収縮をとめることによりメカノストレスに修飾をくわえ、微小管の dynamics に与える影響を検討する。またそれとともに AMPK 局在の変化についても検討する。

②微細ガラスピペットを用いた細胞間張力と微小管 dynamics の相関解析

通常の進展刺激装置では細胞底面にかかる張力と細胞間にかかる張力を分離することが困難である。そこで大阪大学大学院基礎工学部 出口真次教授と松井翼助教との共同研究によりこの問題に取り組む。申請者はすでに細胞膜の AMPK 活性をモニターする FRET プローブ PM-ABCAR を発現する TG ラットをゲノム編集により作成している。この TG ラット心臓より成熟心筋細胞を単離、浮遊した状態で細胞接着が保たれた paired cells を選択し、介在板をはさむ 2 点を微細ガラスピペットで進展させることを計画している。このシステムにより細胞間接着部位にのみ負荷される張力をコントロールし、AMPK 活性との関連を検討する。

③in vivo での AMPK-CLIP リン酸化修飾の病態形成における役割の検証

CLIP-170 S311A (リン酸化されない変異体、dominant negative として働く) の cDNA を loxP ではさんだコンストラクトを、タモキシフェン誘導下で心筋特異的に変異エストロゲンレセプターを発現するトランスジェニックマウス (merCremer) のバックグラウンドに導入し作成した。これにより成獣マウスにおいて、介在板における CLIP リン酸化の調節 (阻害あるいは増幅) を心臓特異的、時期特異的に行うことが可能となる。心毒性を呈することが知られているドキソルビシン負荷による心不全モデルにおいて発現誘導し、介在板における AMPK-CLIP シグナルを修飾することの効果、エコー、MRI による心機能、心電図、ジャンクション分子の免疫組織染色および電子顕微鏡観察により解析する。

CLIP-170 S311D 変異体 (恒常活性化型) を誘導発現するマウスも作成し、ドキソルビシン負荷による心不全モデルマウスに発現誘導し、治療効果が得られるか検証する。

④介在板における AMPK の新規基質分子の探索

マウス心臓から生化学的に介在板分画を単離し、AMPK のリン酸化配列を認識する抗体で免疫沈降したのち、質量分析にて分子の同定をこころみる。陰性対照はフォスファターゼ処理後、免疫沈降したサンプルをもちいることにより、偽陽性の排除を行う。

4. 研究成果

①介在板におけるメカノシグナルを介した AMPK-CLIP による微小管の動的制御機構の解明

ラット生直後の心臓から単離した初代心筋細胞培養において、収縮阻害剤である MYK461 (ミオシン ATPase 阻害剤) を投与すると、収縮が停止し、wash out により可逆的に収縮を再開することができる。培養心筋細胞においても、AMPK の局在は細胞間接着部位にみとめられるが、心筋細胞で MYK461 処理を

おこなうと AMPK の接着部位への局在が消失し、MYK-461 の wash out により局在が復活し、AMPK の細胞内局在がメカノストレスで制御されていることを明らかにした (図 2)。我々は、介在板での AMPK の基質とし CLIP-170 を同定し、GFP ラベルした CLIP-170 を用いたリアルタイム観察を続けて行った。心筋細胞で MYK461 処理をおこなうと心筋細胞

で MYK461 処理をおこなうと微小管のプラス端マーカである CLIP170 のコメット長が延長し、微小管ダイナミクスの低下、これが心筋細胞の長径の増大につながることを明らかにした。

②微細ガラスピペットを用いた細胞間張力と微小管 dynamics の相関解析

細胞間接着部位の AMPK 活性を生体でモニターするため、細胞膜に局在する PM-ABCAR を発現する TG ラット心臓より成熟心筋細胞を単離し、浮遊した状態で細胞接着が保たれた paired cells を選別し、ガラスピペットで進展刺激を加える実験系の構築を目指したが、細胞のダメージが大きく再現性のよい実験系の確立が困難であった。しかし、心筋細胞に収縮停止剤をくわえることによりメカノストレスを変化させ、微小管の dynamics との関連を示すことができた。

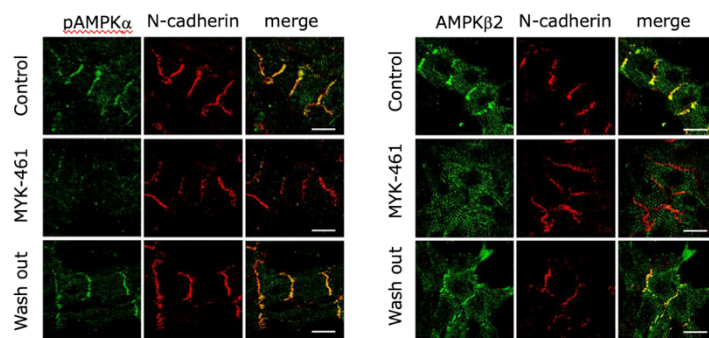
③in vivo での AMPK-CLIP リン酸化修飾の病態形成における役割の検証

細胞間接着部位の AMPK の基質として同定した CLIP-170 の病態生理学的意義について TG マウスを用いて検討した。AMPK による CLIP-170 のリン酸化部位に変異を加えた S311A TG マウスにおいて、有意な線維化と心収縮力の低下を認め、さらにドキソルビシン負荷心不全モデルに供したところ、コントロールに比べさらなる心機能の悪化を認めた (図 3)。組織学的な検討でも心筋組織内に微小管の蓄積をみとめ、また電子顕微鏡による観察では介在板の構造異常が観察された。リン酸化を模倣する S311D TG マウスでは、S311A とは対照的に有意な変化を認めず、CLIP170 のリン酸化の意義を確立した。これらの結果をまとめた原著論文を EMBO Reports にて発表した。

④介在板における AMPK の新規基質分子の探索

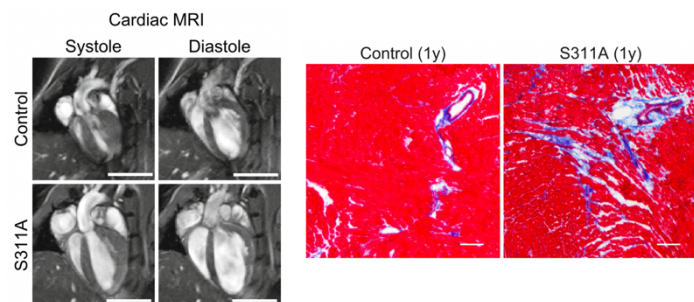
介在板における AMPK の基質の探索をおこない、新規基質 X を同定し、CRISPR-Cas9 法によりノックアウトマウスを作成した。ノックアウトマウスは、圧負荷心不全モデルに供すると WT コントロールに比較して、有意な心機能の低下をみとめた。X の機能解析は、引き続き基盤研究にて進めていく。

図 2 メカニカルストレスのAMPKの局在への関与



AMPKの局在は心筋の拍動によるメカニカルストレスに制御される

図 3 CLIP-170 S311A TGマウスは、有意な線維化と心収縮力の低下を呈し、病態形成への関与が示唆された



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kioka Hidetaka, Kato Hisakazu, Fujita Takeshi, Asano Yoshihiro, Shintani Yasunori, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Imamura Hiromi, Kogo Mikihiro, Kitakaze Masafumi, Sakata Yasushi, Takashima Seiji	4. 巻 34
2. 論文標題 In vivo real time ATP imaging in zebrafish hearts reveals G0s2 induces ischemic tolerance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 2041 ~ 2054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901686R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagao Takemasa, Shintani Yasunori, Hayashi Takaharu, Kioka Hidetaka, Kato Hisakazu, Nishida Yuya, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Yashirogi Shohei, Yazawa Issei, Asano Yoshihiro, Shinzawa Itoh Kyoko, Imamura Hiromi, Suzuki Takeo, Suzuki Tsutomu, Goto Yu ichi, Takashima Seiji	4. 巻 34
2. 論文標題 Higd1a improves respiratory function in the models of mitochondrial disorder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1859 ~ 1871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201800389R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saba Rie, Kitajima Keiko, Rainbow Lucille, Engert Silvia, Uemura Mami, Ishida Hidekazu, Kokkinopoulos Ioannis, Shintani Yasunori, Miyagawa Shigeru, Kanai Yoshiakira, Kanai-Azuma Masami, Koopman Peter, Meno Chikara, Kenny John, Lickert Heiko, Saga Yumiko, Suzuki Ken, Sawa Yoshiki, Yashiro Kenta	4. 巻 9
2. 論文標題 Endocardium differentiation through Sox17 expression in endocardium precursor cells regulates heart development in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48321-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kamikubo Kenta, Kato Hisakazu, Kioka Hidetaka, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Nishida Yuya, Asano Yoshihiro, Imamura Hiromi, Kawahara Hiroyuki, Shintani Yasunori, Takashima Seiji	4. 巻 294
2. 論文標題 A molecular triage process mediated by RING finger protein 126 and BCL2-associated athanogene 6 regulates degradation of G0/G1 switch gene 2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14562 ~ 14573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.008544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	塚本 蔵 (TSUKAMOTO OSAMU) (80589151)	大阪大学・生命機能研究科・准教授 (14401)	

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
---------	---------