

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15850

研究課題名(和文) 核酸導入によるアセチルコリンエステラーゼの抗心不全作用の増強と病態制御への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the cell protective mechanism of acetylcholinesterase variants in cardiomyocyte and approach to therapy for myocardial infarction

研究代表者

戸高 寛 (Todaka, Hiroshi)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：80769662

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)：アセチルコリンエステラーゼ(Acetylcholinesterase, AChE)は、神経伝達物質アセチルコリンを分解する酵素として広く知られているが、近年、神経伝達に関与しない組織や細胞でも発現していることが発見され、その機能の再考が求められている。本研究において、AChEのスプライシングバリエーションのひとつであるAChE-Rの心臓における発現、および虚血ストレスに応じた発現増加が見出された。さらに、遺伝子導入によるAChE-R過剰発現は、虚血ストレスによる細胞死を抑制することが明らかとなった。以上の結果より、心臓AChE-Rは虚血ストレスに対して細胞保護作用を有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

現代の虚血性心不全の治療においては、心筋保護療法の重要性が認識されつつある。本研究より心臓AChE-Rが虚血ストレス刺激に対して細胞保護に作用することが見出された。さらに心筋細胞へのAChE-Rの遺伝子導入は、細胞保護作用の増強を促した。以上の結果より、AChE-Rの遺伝子導入は虚血性心不全の病態改善および予後改善が期待され、虚血性心不全への新規治療法開発の足掛かりになると想定される。

研究成果の概要(英文)：Acetylcholinesterase (AChE), an enzyme acting on rapid acetylcholine hydrolysis, expresses in the central and peripheral nervous system. Recently, it is reported that the expression of alternative splicing variants of AChE is elevated by multiple stress in the non-neural cell and are involved in the cell protection. However, the function of AChE variants in cardiomyocyte under ischemic stress remained unclear. In the present study, we found that the expression of readthrough-AChE (AChE-R) variant was increased in cardiomyocyte under ischemic stress. Furthermore, overexpression of AChE-R in the cardiomyocyte suppressed cell death under ischemic stress through the repression of apoptosis related-proteins levels. These results suggest that AChE-R may have a role to play in the cardioprotection under ischemic stress.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：AChE AChE-R 細胞保護作用 虚血ストレス 心筋細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現代の高齢化社会において、死因第二位とされる虚血性心不全の治療法開発および予防対策は、循環器領域の基礎・臨床研究における重要課題の一つである。虚血性心不全においては、虚血領域およびその周辺部の心筋細胞がアポトーシス、ネクローシス、および炎症反応により大量に失われ、これによる心臓ポンプ機能の低下が予後不良因子の一つに挙げられている。従って、虚血障害の軽減と細胞死の抑制が残存心筋細胞数の増加と予後改善に繋がると考えられる。

アセチルコリンエステラーゼ (Acetylcholinesterase, AChE) は、神経伝達物質であるアセチルコリンを速やかに分解してコリン作動性神経系における神経伝達を制御する。主に神経細胞や骨格筋細胞において発現していることは広く知られているが、近年、アセチルコリンに晒されない組織や細胞においても AChE が強く発現していることが発見された。これらの神経伝達に関わらない AChE は、タンパク質間相互作用により、細胞分化やアポトーシス、さらには炎症などの多くの生命現象に関与することが明らかとなり、現在、AChE の機能の見直しが行われている。研究代表者は、虚血性心不全モデルマウスの心筋組織において AChE の発現が増加すること、および、その AChE の発現増加は、アセチルコリン分解活性の高い Synaptic-AChE (AChE-S) ではなく、アセチルコリン分解活性の低い Readthrough-AChE (AChE-R) によるものを見出した。AChE-R は、グルコース取り込みや ATP 合成の促進作用、抗アポトーシス作用、および抗炎症作用を有することが報告されている。従って、虚血性心不全において発現増加する AChE-R は、虚血誘導性のストレス刺激によるアポトーシスや炎症反応から心筋細胞を保護している可能性が示唆された。これにより、虚血性心不全における心臓 AChE-R の重要性、および病態改善作用の分子機序解明の必要性を強く感じ、本研究課題の着想に至った。

### 2. 研究の目的

現代の虚血性心疾患の治療においては、ACEI や ARB あるいはβ遮断薬などの外来性の化学物質による治療法より、虚血ストレスによる細胞死から心筋細胞を保護する心筋保護療法が重要視されつつある。虚血性心疾患発症後の心臓リモデリングや機能低下は不可避な生命現象であり、標的選択性の高い薬物で個々の生理活性を強制的に制御する治療法では、その反動的副作用の可能性を完全には否定しがたい。これに対し、本研究では内在性因子である AChE-R の心筋保護システムに介入することで虚血性心疾患病態の制御と低下心機能の再建を目指す。

そこで本研究では、虚血性心不全において発現上昇する心臓 AChE-R が、虚血誘導性のストレス刺激や炎症反応による細胞死から心臓細胞を保護する分子機構を解明すること、および核酸導入による AChE-R 過剰発現系の構築を行い、虚血性心不全の病態改善および予後改善を狙うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 心筋細胞における AChE-R の細胞死抑制効果を定性評価する。

心筋細胞に虚血ストレス刺激を加えると、AChE-R の発現が増加することを見出している。そこで、心筋細胞の AChE-R の細胞死抑制効果を検証することを目的として、心筋細胞における

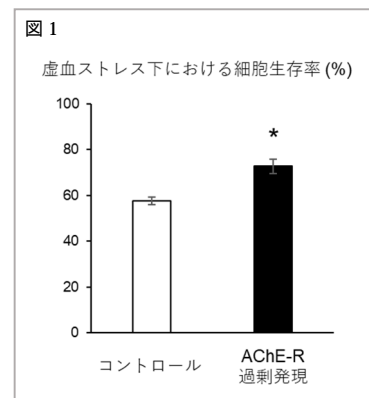
AChE-R 過剰発現系の構築を行い、虚血ストレスに対する影響を生化学的に評価する。

(2) 核酸導入技術を用いて心臓特異的 AChE-R 発現増強マウスを作製し、虚血性心不全モデルの病態および予後への影響を生理学的、および組織学的、生化学的に評価する。

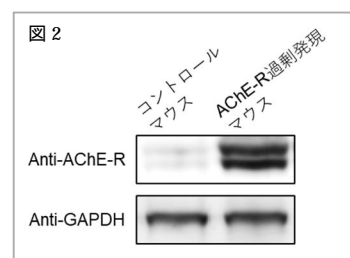
虚血性心不全における AChE-R の発現増強による病態改善効果を検証するために、心臓特異的 AChE-R 発現増強マウスを作製する。さらに、外科的手術により虚血性心不全を誘導し、病態への影響を生理学的、および組織学的、生化学的に評価する。

#### 4. 研究成果

(1) 培養心筋細胞株に AChE-R 過剰発現ベクターを導入後に、疑似虚血刺激として低酸素誘導剤である塩化コバルトを添加し、細胞生存率を WST-1 assay により測定した。その結果、疑似虚血条件下において AChE-R を過剰発現させた心筋細胞は、コントロールに比べ細胞の生存率が高くなることが明らかになった(図1)。さらに、AChE-R 過剰発現細胞では、細胞死制御因子である cleaved-caspase および Bax/Bcl2 の発現を測定した。その結果、コントロールに比べ AChE-R 過剰発現細胞において両因子ともに発現が低下することが明らかになった。以上の結果より、虚血ストレスにおいて AChE-R は細胞保護因子として作用することが見出された。これにより、虚血性心不全において AChE-R の発現増強が新規治療法開発の足掛かりになると示唆された。



(2) 心臓特異的に AChE-R を過剰発現させるために、心臓特異的に発現する MCK プロモーターに AChE-R 遺伝子を組み込んだトランスジーンを作製し、マイクロインジェクション法によりトランスジーンをマウス受精卵に導入した。得られたマウスを用いて PCR 法および western blot 法によりトランスジーンを導入および発現確認を行った。その結果、1 系統においてトランスジーンを導入および心臓特異的に AChE-R 過剰発現するマウスの確立に成功した(図2)。作出した心臓特異的 AChE-R 過剰発現マウスは、コントロールマウスと比較して外見的特徴や生存率に顕著な変化は観察されなかった。この結果より、正常心臓における AChE-R の過剰発現は副次的な影響を与えないことが示唆された。



(2) 虚血性心不全における AChE-R の機能を探るために、心臓特異的 AChE-R 過剰発現マウスに左冠動脈結紮による急性心筋梗塞を発症させ、生存率および細胞死制御因子の発現を測定した。その結果、予想とは異なりコントロールと AChE-R 過剰発現マウスの生存率および細胞死制御因子の発現に顕著な差は観察されなかった。この原因として、本モデルにおいて生じる急激な低酸素・低栄養刺激により細胞の壊死が生じたため、AChE-R の細胞保護作用が十分に発揮できなかったと考えられる。現在、心筋梗塞の条件の再検討、および虚血再灌流障害などの他の心不全モデルを含めて検討中である。加えて、心臓特異的 AChE-R 過剰発現マウスの複数系統の確立を行い、同実験を実施する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakane T, Ido A, Higuchi T, Todaka H, Morisawa K, Nagamine T, Fukunaga K, Sakamoto S, Murao K, Sugiyama Y.	4. 巻 512
2. 論文標題 Candidate plasticity gene 16 mediates suppression of insulin gene expression in rat insulinoma INS-1 cells under glucotoxic conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 189-195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.03.036.	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 Ichikawa A, Yamasaki F, Ueda M, Todaka H, Miyao E, Yoshinaga Y, Yamanaka S, Matsumura Y, Sato T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Relationship Between the Fall in Blood Pressure in the Standing Position and Diaphragmatic Muscle Thickness: Proof of Concept Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Press Monit	6. 最初と最後の頁 284-288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MBP.0000000000000403.	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 Higuchi T, Morisawa K, Todaka H, Lai S, Chi E, Matsukawa K, Sugiyama Y, Sakamoto S.	4. 巻 503
2. 論文標題 A negative feedback loop between nuclear factor 90 (NF90) and an anti-oncogenic microRNA, miR-7.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1819-1824
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.07.119.	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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroshi Todaka, Mikihiro Arikawa, Tatsuya Noguchi, Atsushi Ichikawa, Takayuki Sato
2. 発表標題 Donepezil, a drug for Alzheimer's disease, promotes muscle differentiation during the process of regeneration
3. 学会等名 the 126th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists・the 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Todaka H , Arikawa M , Noguchi T , Ichikawa A , Sato T
2. 発表標題 Donepezil, anti-Alzheimer drug, enhances myogenesis in C2C12 myoblasts
3. 学会等名 10th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本修士、山口輝、樋口琢磨、森澤啓子、Sylvia Lai、戸高寛、藤田浩志、池恩夔、杉山康憲、松川和嗣、津田雅之
2. 発表標題 骨格筋の分化・成熟化における細胞融合促進因子の新たな発現制御機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本修士、山口輝、森澤啓子、樋口琢磨、戸高寛、Sylvia Lai、池恩夔、藤田浩志、杉山康憲、松川和嗣、津田雅之
2. 発表標題 骨格筋の細胞融合及び成熟化におけるRNA結合タンパク質の役割の解明
3. 学会等名 日本筋学会 第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中根 達人、井戸 彩詠、樋口 琢磨、戸高 寛、坂本 修士、村尾 孝児、杉山 康憲
2. 発表標題 糖毒性状態の膵臓 細胞においてCPG16はJDP2を介してインスリン発現を抑制する
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国支部会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 楓、中根 達人、飯田 悟史、戸高 寛、樋口 琢磨、坂本 修士、村尾 孝児、杉山 康憲
2. 発表標題 神経関連因子Bri3は膵臓 細胞におけるアポトーシスを促進する
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国支部会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Todaka, Mikihiro Arikawa, Tatsuya Noguchi, Atsushi Ichikawa, Takayuki Sato
2. 発表標題 Acetylcholinesterase inhibitor accelerates muscle differentiation in C2C12 myoblasts
3. 学会等名 9th FAOPS CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸高寛, 有川幹彦, 野口達哉, 市川厚, 佐藤隆幸
2. 発表標題 コリンエステラーゼ阻害剤を用いた筋再生機構の解明
3. 学会等名 第70回日本生理学会中四国地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中根達人, 井戸彩詠, 樋口琢磨, 戸高寛, 坂本修士, 村尾孝児, 杉山康憲
2. 発表標題 膵臓 細胞におけるCPG16-JDP2を介した新規インスリン発現抑制機構の解明
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 樋口琢磨, 戸高寛, 森澤啓子, Sylvia Lai, 池恩嬭, 杉山康憲, 坂本修士
2. 発表標題 Nuclear Factor 90(NF90)の発現はmiR-7を介したフィードバックループにより制御される
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018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

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