

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17419

研究課題名(和文)オートファジー/リソソーム系の活性解析による致死性心肥大の診断

研究課題名(英文) A diagnostic approach for lethal cardiac hypertrophy based on the analysis of autophagy-lysosomal pathway

研究代表者

垣本 由布 (KAKIMOTO, Yu)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：40734166

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)：心臓のリポフスチン(LF)については、LF量から年齢が推定できること、LF量は癌患者で増加するが心臓性突然死では変化しないことが明らかになった。また、心筋LF量に相関するLC3やp62の変化は認めず、LF量がオートファジー機能全般を反映しないことを明らかにした。リソソームのタンパク質分解酵素については、心筋のCTSBやCTSDが年齢と相関して増加するものの、p62、ATP synthase、 α -synucleinの増加は認めず、高齢でもリソソーム機能は対償的に維持されていると考えられた。また、致死性心肥大ではCTSDの減少を認めたが、前述の分解基質の蓄積は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋のLF定量は、通常の組織標本作成と並行して行える検査であるため、身元不明者の年齢推定に役立てられる。また、本研究では癌などの慢性疾患でのLF増加が示唆されたことから死因究明にも活用できると考えられる。

リソソームのタンパク質分解酵素については、CTSDの減少が心臓性突然死のリスクマーカーとなる可能性が示され、生理的心肥大と病的な心肥大の鑑別への活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that myocardial lipofuscin (LF) is useful for age estimation. The amount of LF is increased in cancer but unchanged in sudden cardiac death. LF accumulation is not correlated with the amount of LC3-II or p62, which indicates that LF is not a direct biomarker for autophagy dysfunction. The major proteasomes of lysosomes, CTSB and CTSD increased in aging, but the levels of p62, ATP synthase, and α -synuclein were unchanged. In sudden cardiac death with cardiac hypertrophy, CTSD was significantly decreased, but the levels of p62, ATP synthase, and α -synuclein were unchanged.

研究分野：法医学

キーワード：心臓性突然死 心肥大 オートファジー リソソーム リポフスチン カテプシン 年齢推定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 生理的心肥大と病的心肥大

ヒトの心筋細胞は生後ほとんど分化再生しないため、全身の成長に伴って心筋細胞が肥大することで、血液を末梢まで送り出すポンプ機能が維持されている。また継続的な運動トレーニングを行った場合などには、酸素供給能を増加させるために心肥大が生じることが知られている。このような生理的心肥大では、心機能は正常もしくは亢進している。

一方、高血圧症や大動脈弁狭窄症など、心臓が長期的に圧負荷にさらされる疾患では、心機能の低下を伴う病的心肥大を認める。病的心肥大の患者は突然死するリスクも高くなるため、法医解剖でも心肥大は重要な所見となる。

しかし、生理的心肥大と病的心肥大の組織学的な鑑別は容易ではない。心重量の増加、心筋細胞および核の肥大は共通する所見であり(図1) 若年者の突然死例では心筋の線維化も認められず、除外診断的に病的心肥大と判断されることが少なくない。そのため、生理的心肥大が病的心肥大へ移行する分子メカニズムの解明、生理的心肥大と病的心肥大を鑑別する分子マーカーの発見が望まれる。

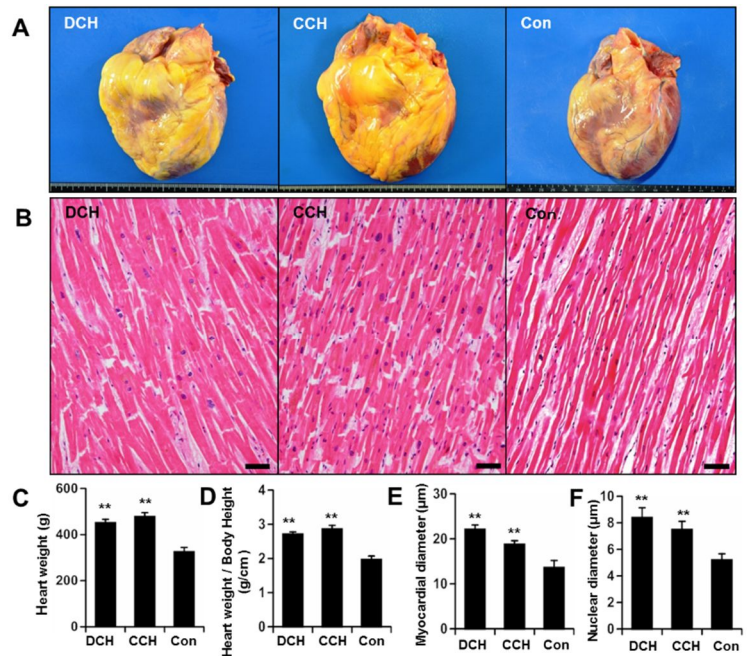


図1

(2) 致死性心肥大における miR-221 の増加

我々はこれまでに、心不全のない心肥大症例(対償性心肥大、CCH)と、心疾患で死亡した心肥大症例(非対償性心肥大、DCH)の心臓組織を用い、マイクロRNAシーケンシングとリアルタイムPCRによる定量解析を行った。その結果、DCHではCCHに比べてmiR-221が有意に増加していることが判明した(図2)。

培養細胞や動物を使った研究では、miR-221がp27/CDK2/mTOR経路を介してオートファジーを阻害し、心肥大と心不全を惹起することが示されている。我々が確認した致死性心肥大患者におけるmiR221の増加は、オートファジーの阻害がヒトにおいても重篤な心不全を引き起こす可能性を示唆している。

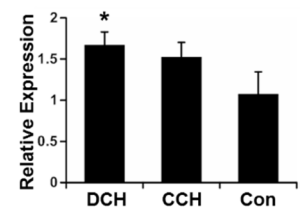


図2

(3) オートファジー/リソソーム系と病的心肥大

オートファジー/リソソーム系(ALP)は、細胞内の不要なタンパク質や劣化した細胞内小器官を分解し、新たなタンパク質合成に必要なアミノ酸を生成する細胞内浄化機構である。ALPは、細胞の恒常性を保つために不可欠であり、加齢や様々な疾患によって活性が低下することが知られている。同じく細胞浄化機構である、ユビキチン/プロテアソーム系が分解できない凝集タンパク質や、劣化ミトコンドリアを分解するため、細胞寿命が長く多数のミトコンドリアを含む心臓において、細胞内環境の維持に大きな役割を果たすと考えられる。

培養細胞の実験では、ALPの阻害が心筋肥大を誘発することが確認されている。一方、心肥大を惹起する高血圧モデル動物では、ALPの変化については統一見解が得られておらず、圧負荷の大きさや罹患期間によってALP活性が変化すると考えられている。また、ヒトの病的心肥大組織については、ALPの検討はまだ十分に行われていない。

2. 研究の目的

(1) ヒト高血圧性心肥大組織の解析

これまでヒトの病的心肥大組織としては、肥大型心筋症(HCM)患者の組織が用いられることが多かった。HCM患者の多くは家族歴を有し、臨床検査によって生前に診断されやすいため、遺伝的背景や分子メカニズムについて研究が進んでいる。しかし、HCMで同定された細胞骨格タンパク質などの変異は、一般的な高血圧性心肥大に共通するものではない。高血圧症はHCMよりもはるかに高い罹患率を示す疾患であり、その重症度および致死性について分子学的に評価する社会的意義は大きい。本研究では、高血圧性心肥大患者の組織を用い、ALPの活性と心臓性突然死のリスクに相関がみられるかを検討する。

(2) 心臓ALPの加齢性変化

ALPの細胞浄化機能は、加齢とともに低下することが知られている。しかし、ヒトの心臓組織を用いた体系だった定量解析は行われていない。そこで本研究では、多年代の健常な心臓組織を

用いて、加齢による ALP の活性変化を評価する。ALP の活性と年齢の相関が数式化できれば、身元不明者の剖検時に年齢推定の一助となる。

(3) 臨床医学への知見の還元

現在の健康診断では、無症候性の心肥大は“経過観察”とされるのみで、具体的な心不全発症予防策がとられることはない。しかし、ALP 関連分子を心臓死のリスクマーカーとして血液検査で検出できるようになれば、高リスク患者に早期に治療介入して ALP の活性化を目指す治療戦略が立てられる。

3. 研究の方法

オートファジーには、マクロオートファジー・ミクロオートファジー・シャペロン介在オートファジーの3系統が存在するが、最終的には全てリソソームの消化酵素で分解される。そのため本研究では、リソソーム機能に関わる分子を中心に解析を行った。

(1) リポフスチンの定量

リポフスチン (LF) は、細胞内で分解されなかった酸化物がリソソーム内に凝集したものであり、加齢や変性疾患で増加することが広く知られている。しかし、不均一な凝集体であるため特定の抗体を持たず、法医診断的活用を目的とした定量解析には検討の余地があった。

本研究では、未染標本を蛍光顕微鏡で撮影し、LF の自家蛍光量を画像解析ソフトで一括定量した。さらに、統計解析を行い年齢との相関と心臓死への関与を検討した。

(2) ALP クリアランスの評価

オートファジーの選択的器質である LC3 と p62、リソソームの主要なタンパク質分解酵素であるカテプシン B、D、L (CTSB/D/L)、その標的分子である ATP synthase subunit α (ATPSC)、 α -synuclein (ASNC) に注目した。心臓凍結組織のウェスタンブロット、FFPE 組織の免疫染色、血清の ELISA により各タンパク質を定量し、年齢との相関と心臓死への関与を検討した。

4. 研究成果

(1) 加齢に伴う心臓 LF の蓄積

20~97 才、76 例を検討した。外因死 35 例では、心筋の LF 沈着率は年齢と強い相関を示し、高齢者では個人差が大きかった (図 3)。一方、年齢を調整した比較では、BMI、BNP 濃度、心重量、死因、LC3、p62 との有意な相関は認めなかった。ただし、癌患者では LF 高度沈着例を一部認めた (図 4)。また、加齢に伴う LF 蓄積に相関するような LC3-II や P62 の増加は認めなかった。(図 5) 心筋の LF 定量は、通常の組織学検査と並行して行うことができ、身元不明者の年齢推定に有用である。一方、虚血性心不全を含めた心臓性突然死の診断マーカーとしては価値がなかった。LF の産生機序としては、ALP 全般の機能不全よりも、劣化ミトコンドリアを選択的に分解するマイトファジーの機能低下に起因する可ところが大きいと考えられた。

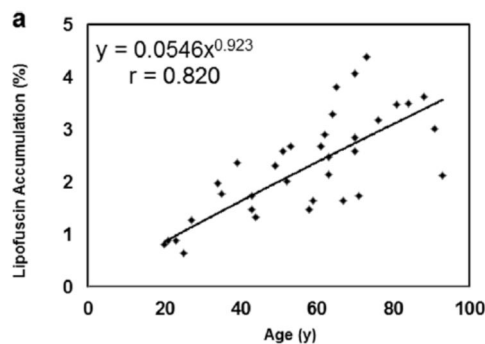


図 3

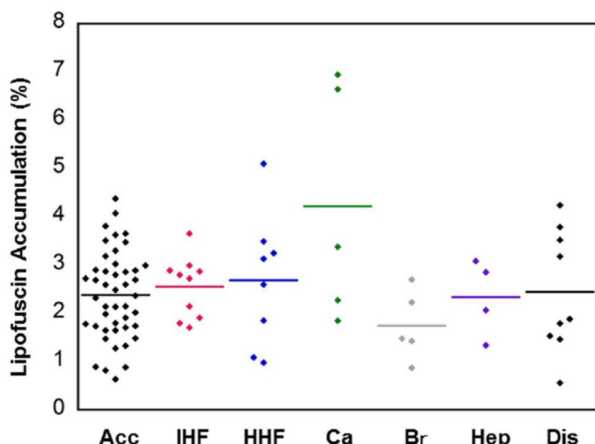


図 4

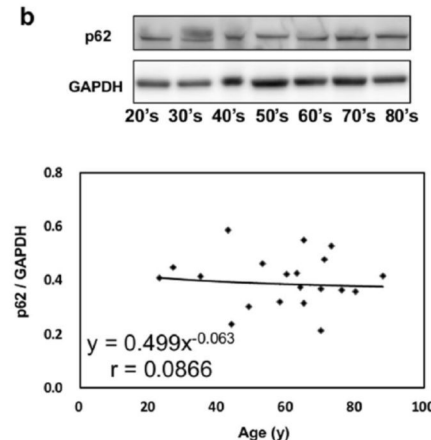
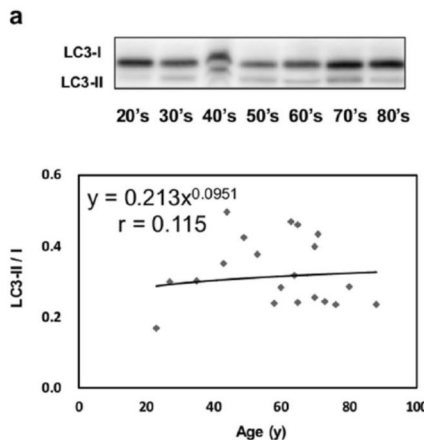


図 5

(2) DCHにおけるCTSDの減少

心疾患のない17例の心臓組織では、年齢と相関してCTSBとCTSDの増加を認めましたが、CTSL、ATPSC、ASNC、p62の変化は認めなかった(図6)。これは、加齢に伴うタンパク質クリアランスの需要の増加が、CTSBとCTSDの増加により対償されているものと考えられた。

年齢調整後の比較では、CTSDがDCHで著明に減少するが、ATPSCとASNCの増加は認めなかった(図7)。

また、血中のCTSD濃度もDCHで減少しており、CTSDが心臓組織から逸脱しているのではなく、発現自体が低下していることが確かめられた(図8)。以上から、心臓におけるCTSDの発現の低下は、p62、ATPSC、ASNC以外の分解基質を経由して、心臓性突然死に寄与する可能性が示された。

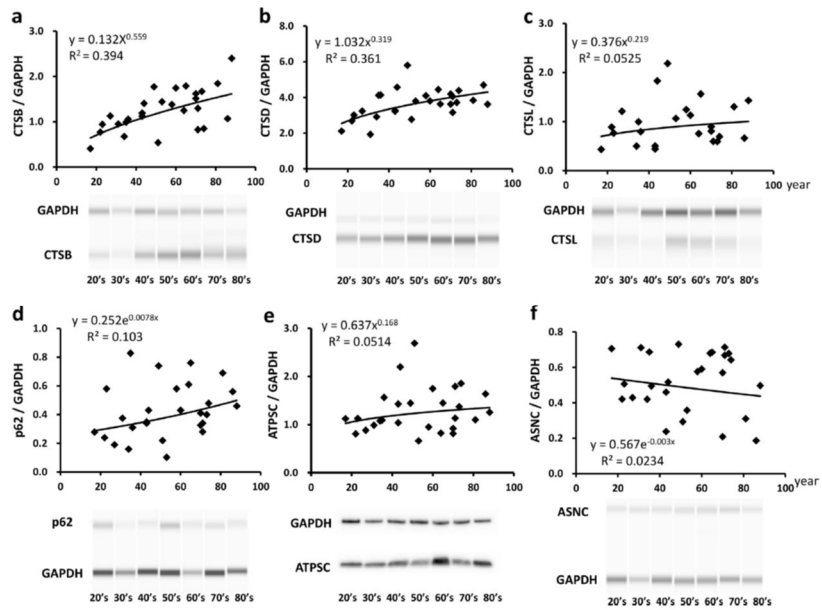


図6

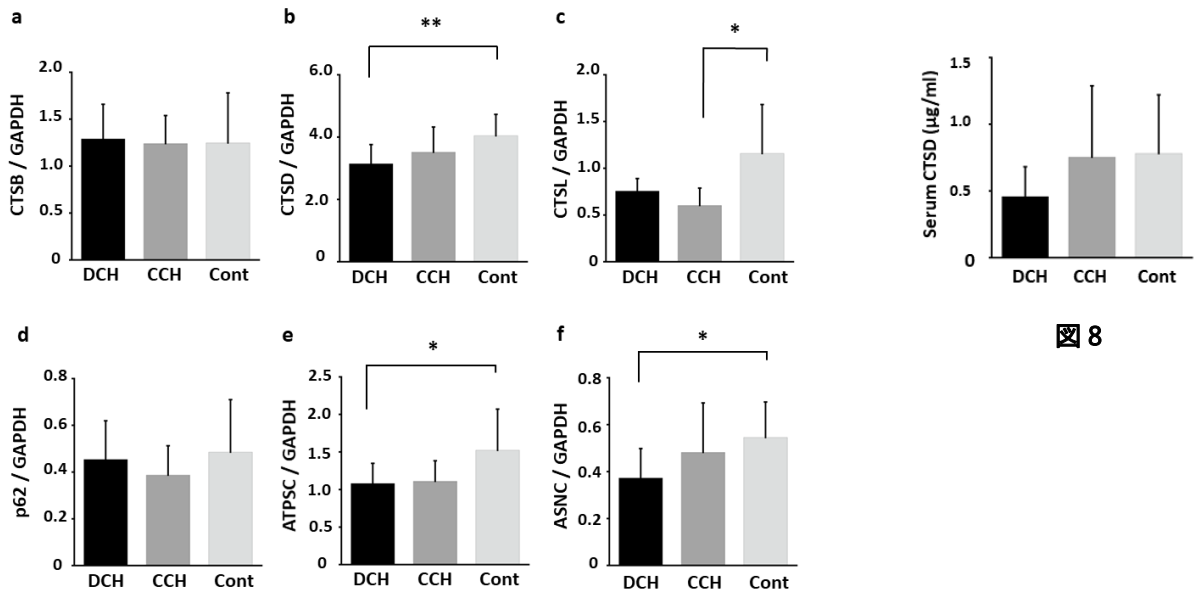


図8

図7

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 3件）

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 1. 著者名 Kakimoto Y, Tanaka M, Hayashi H, Yokoyama K, Osawa M. | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 Overexpression of miR-221 in sudden death with cardiac hypertrophy patients | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Heliyon | 6. 最初と最後の頁 e00639 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2018. e00639 | 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 Kakimoto Y, Okada C, Kawabe N, Sasaki A, Tsukamoto H, Nagao R, Osawa M. | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Myocardial lipofuscin accumulation in ageing and sudden cardiac death | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 3304 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-40250-0 | 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 Kakimoto Y, Sasaki A, Niioka M, Kawabe N, Osawa M. | 4. 巻 15(3) |
| 2. 論文標題 Myocardial cathepsin D is downregulated in sudden cardiac death. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One | 6. 最初と最後の頁 e0230375 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0230375. eCollection 2020. | 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 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Kakimoto Y, Kakiuchi Y, Ochiai E, Osawa M |
| 2. 発表標題 Overexpression of MiR-221 as an Indicator of Sudden Death with Cardiac Hypertrophy |
| 3. 学会等名 24th Congress of the International Academy of Legal Medicine（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-----------------------------------------------|
| 1. 発表者名 垣本由布、田中政之、林英樹、横山圭子、大澤資樹 |
| 2. 発表標題 生理的心肥大および病的肥大におけるマクロRNAの発現プロファイリング |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 垣本由布、岡田千沙、河邊昇、長尾涼子、大澤資樹 |
| 2. 発表標題 加齢に伴う心筋リポフスチン沈着とオートファジー機能 |
| 3. 学会等名 第108回日本病理学総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------------------------|
| 1. 発表者名 垣本 由布, 長尾 涼子, 落合 恵理子, 瀬戸 良久、大澤 資樹 |
| 2. 発表標題 心筋リポフスチン沈着の法医診断的活用 |
| 3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会 |
| 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|