

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11730

研究課題名(和文)新規に見出された心肥大関連タンパク質群の機能解析と治療標的への応用

研究課題名(英文)Studies on upregulated or downregulated genes depending on cardiac hypertrophy

研究代表者

前西 修(MAENISHI, Osamu)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：20298946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧自然発症ラット(SHR)および脳卒中易発性高血圧自然発症ラット(SHRSP)は、正常血圧ラット(WKY)と比較して異なる心肥大状態を呈する。これらのラットの左室壁における網羅的な遺伝子発現解析を行い、心肥大に依存して発現が増減する遺伝子群を見出した。これらの遺伝子群の中から、実際にタンパク質レベルで心肥大に依存するものを選び出した。選出されたタンパク質は、これまでに心肥大に関与することが報告されていたが、既知のメカニズムでは説明できないことがわかっている。相互作用するタンパク質を解析した結果、エネルギー産生に関与するタンパク質が相互作用することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心肥大は高血圧性疾患の大部分を占めており、心不全、脳血管障害、腎障害などを引き起こす原因にもなり得る。更にこれらの疾患は運動機能の低下を引き起こすことで筋力の低下のみならず、身体の恒常性の維持にまで問題が生じ、生活の質や健康寿命に大きな影響を与えることとなる。したがって、効果的な治療を行うことが必要となってくる。しかしながら、治療において降圧薬を使用しても改善がみられず、心肥大が増悪する例も多く存在する。この問題に対し、心筋において心肥大に関与するタンパク質を明らかにし、直接的な標的とすることで心肥大の抑制による高血圧の増悪抑制を目指すことは、治療の可能性が広がることになる。

研究成果の概要(英文)：Spontaneously hypertensive rats (SHR) and stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) show different cardiac hypertrophy compared to normotensive rats, Wistar-Kyoto rats (WKY). Comprehensive gene expression analysis for left ventricular between WKY, SHR, and SHRSP clarified the upregulated or downregulated genes depending on cardiac hypertrophy. Furthermore, the gene which shows cardiac hypertrophy dependency at protein expression level was selected. The selected protein was known to be involved in cardiac hypertrophy. However, the known mechanism for the protein was not able to explain the relationship with cardiac hypertrophy. New interaction protein was identified by immunoprecipitation using the antibody against the selected protein and clarified the possibility of involvement in energy production.

研究分野：実験病理学

キーワード：心肥大

## 1. 研究開始当初の背景

日本における高血圧性疾患の患者数は1,000万人以上にも達し、年間の医療費は1兆円以上にも上る。中でも心肥大は高血圧性疾患の大部分を占めており、心不全、脳血管障害、腎障害などを引き起こす原因にもなり得る。これらの治療に対して降圧薬を使用しても改善がみられず、心肥大が増悪する例も多く存在する。この問題に対し、心筋を標的とした心肥大の抑制による高血圧の増悪抑制を目指すことを考えた。我々はこれまでに血圧以外にも心肥大の病態進行に関与する因子が存在することを明らかにしている。これらの結果を踏まえて、未だ詳細には明らかにされていない心肥大関連タンパク質が存在すると考えた。

## 2. 研究の目的

正常血圧ラット(WKY)、高血圧自然発症ラット(SHR)及び脳卒中易発性高血圧自然発症ラット(SHRSP)は異なる心肥大状態を呈する。これらのラットの左室壁における遺伝子発現解析を行うことにより心肥大に依存して発現が増減する遺伝子を選び出してその機能解析し、心肥大の発症機構を明らかにすることで心肥大に対して直接的に作用する新たな治療薬の開発につなげていく。

## 3. 研究の方法

### (1) WKY、SHR、SHRSP より採取した左室壁に対するマイクロアレイによる遺伝子発現解析

12週齢のWKY、SHR、SHRSP(各群n=3)より採取した左室壁よりRNAを回収し、RNA6000 nano assay(Agilent)によりRNA integrity number(RIN)値を測定することで、マイクロアレイ解析を行える品質であることを確認した(RIN値>7.5)。その後、Clariom S rat(Affymetrix社)を用いて各群間で発現差(fold change  $\geq 1.5$   $\leq -1.5$ ,  $p < 0.05$ )がみられるものを選出した。更にこれらの遺伝子に対して遺伝子解析ソフト Ingenuity Pathway Analysis(IPA)を用いてベン図を作成して3群間で差のあるものを選出した後、心肥大に依存して増減する遺伝子群を特定した。

### (2) WKY、SHR、SHRSP の左室壁における TWEAKR の発現解析

6,12,20週齢の雄性のWKY、SHR、SHRSPより左室壁を回収し、protease inhibitor cocktail および phosphatase inhibitor cocktail を含む RIPA buffer によりタンパク質を抽出した。遠心分離により得られた上清を15%ゲルを用いて電気泳動で分離した後、ウェスタンブロットに供し、TWEAKR抗体、TWEAK抗体およびGAPDH抗体を用いて発現解析を行った。

### (3) TWEAKR との新規相互作用タンパク質の解析

SHRSPの左室壁に対して Pierce<sup>TM</sup> Co-Immunoprecipitation Kit (Thermo Fisher) を用いて抗 TWEAKR 抗体による免疫沈降を行った。TWEAKR 相互作用タンパク質を5-20%ゲルを

用いた電気泳動にて分離した後、銀染色を行った。目的のバンドを切り出して脱色した後、トリプシンにて消化処理を行い、質量分析にかけて相互作用タンパク質の同定を行った。更に得られた結果をウェスタンブロットにより確認した。

#### (4) 新規タンパク質の細胞局在解析

SHRSP の左室壁ホモジネートに対して細胞分画を行い、細胞質画分(細胞膜を含む)、ミトコンドリア画分および核画分(未破碎細胞を含む)に分け、ウェスタンブロット解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) マイクロアレイによる左室壁における発現遺伝子の解析結果から、WKY においては SHR 及び SHRSP に対してそれぞれ 378 個と 628 個の発現が増加した遺伝子と、373 個と 579 個の発現が減少した遺伝子が確認された。SHR では SHRSP に対して 378 個の発現が増加した遺伝子と 398 個の発現が減少した遺伝子が確認された。更にこれらの遺伝子に対してベン図を作成して解析した結果、WKY、SHR 及び SHRSP の 3 群間

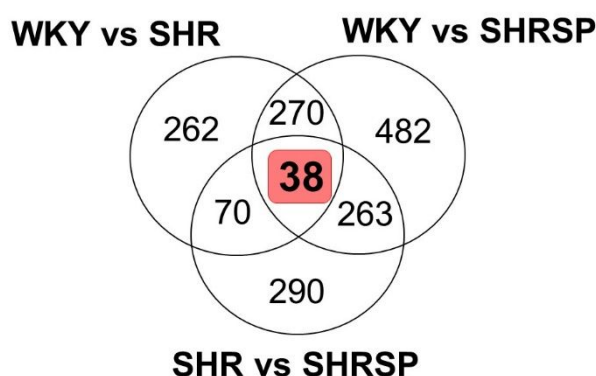


図1. WKY、SHR及びSHRSPの左室壁における遺伝子発現解析

で共通して発現差がみられた遺伝子は 38 個であった(図1)。これらの遺伝子のうち、心肥大依存的に発現増加がみられた遺伝子が 13 個、発現減少がみられた遺伝子は 9 個であった。このうち既に心肥大との関連が示されているが、その作用機序が元来のものでは説明がつかない tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis(TWEAK) 受容体(TWEAKR)に焦点を当てて解析を行った。TWEAKR は、マイクロアレイ解析では心肥大依存的に増加しており、3 群間比較において Fold change は、WKY vs SHR では 1.79 ( $p = 0.034$ )、WKY vs SHRSP は 5.01 ( $p = 0.003$ )、SHR vs SHRSP は 2.80 ( $p = 0.007$ )であった。

(2) マイクロアレイでの TWEAKR に対する 3 群間での発現差がタンパク質レベルでもみられるかウェスタンブロットで確認を行った。6 週齢及び 12 週齢においては、心肥大に依存して TWEAKR の発現量が増加し、すべてのラット間において有意な差がみられた(図2)。20 週齢では、WKY と SHR 間では有意な発現差はみられず、12 週齢の SHR で増加していた TWEAKR の発現が正常レベルに戻っていることが明らかとなった。しかしながら、両ラットと SHRSP との間には有意な発現差がみられた。これは 20 週齢 SHR では既に心肥大に進展(心重量/体重の増加)がみられなくなっていることが関係しているものと考えられた(表1)。すなわち、TWEAKR の発現は心肥大の進展に依存して発現が増加することが示唆された。TWEAKR のリガンドである TWEAK には、mTWEAK(膜型)と sTWEAK(可溶型)の 2 タイプ存在するが、両者の発現は週齢やラットの種類に関わらず、発現量に有意な差はみられなかった。また、TWEAK - TWEAKR シグナルの下流を調べた結果も TWEAKR 発現量に依存した活性化は SHR 及び SHRSP

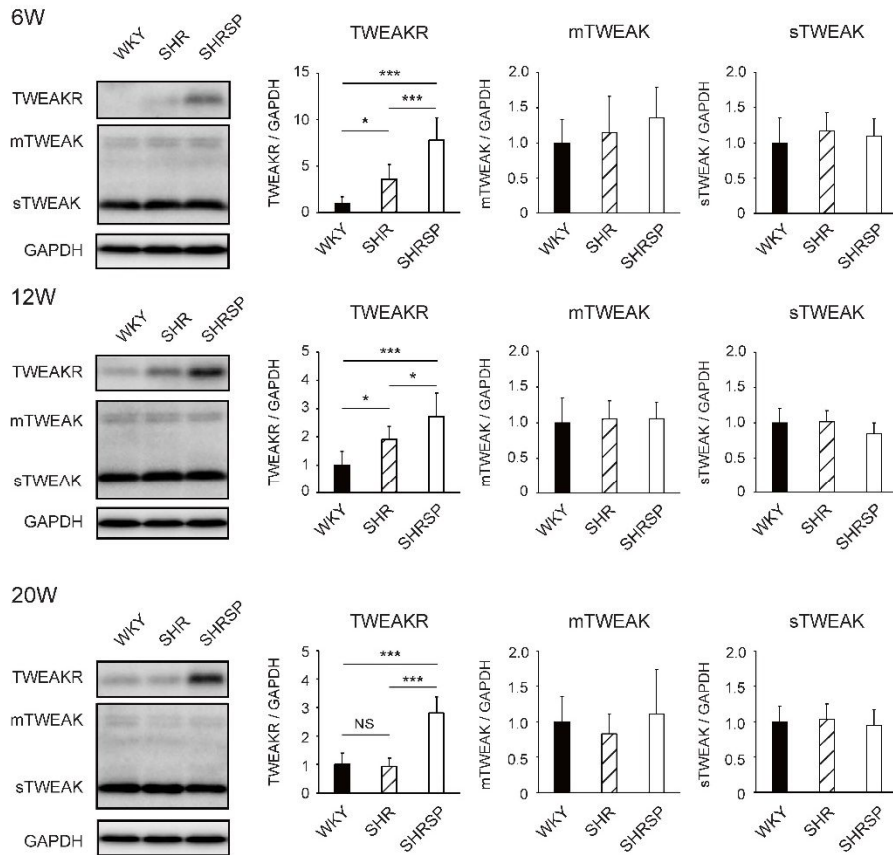


図2. 正常血圧ラット(WKY)、高血圧自然発症ラット(SHR)及び脳卒中易発性高血圧自然発症ラット(SHRSP)の左室壁におけるTWEAKR及びTWEAKの発現量

表 1. Wistar-Kyoto rats (WKY), spontaneously hypertensive rats (SHR), and stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) における血圧、体重、心重量、心重量/体重の比較 (Exp. Physiol. 102.11 (2017) pp 1435–1447 より改変)

6W	WKY	SHR C	SHR B2	SHRSP
Blood pressure (mmHg)	121.4 ± 1.3	139.4 ± 2.8***	139.8 ± 1.8***	160.3 ± 1.7***, †††, †††
Body weight (g)	195.4 ± 2.9	176.3 ± 3.1***	172.4 ± 2.7***	155.0 ± 2.9***, †††, ††
Heart weight (g)	0.784 ± 0.010	0.762 ± 0.012	0.748 ± 0.012	0.670 ± 0.019***, †††, ††
Heart / body weight ratio (mg/g)	4.019 ± 0.069	4.329 ± 0.066**	4.340 ± 0.061**	4.308 ± 0.059*
12W	WKY	SHR C	SHR B2	SHRSP
Blood pressure (mmHg)	148.1 ± 1.0	171.5 ± 4.1***	186.6 ± 3.4***, ††	235.6 ± 1.3***, †††, †††
Body weight (g)	373.6 ± 4.3	341.4 ± 3.2***	317.4 ± 4.1***, ††	270.9 ± 4.7***, †††, †††
Heart weight (g)	1.257 ± 0.020	1.230 ± 0.017	1.220 ± 0.015	1.165 ± 0.026**
Heart / body weight ratio (mg/g)	3.364 ± 0.044	3.606 ± 0.055*	3.813 ± 0.051**	4.299 ± 0.051***, ††, ††
20W	WKY	SHR C	SHR B2	SHRSP
Blood pressure (mmHg)	153.5 ± 3.2	172.4 ± 1.4***	209.4 ± 2.0***, †††	270.0 ± 3.1***, †††, †††
Body weight (g)	427.3 ± 7.5	423.5 ± 3.4	391.1 ± 4.2*, ††	349.5 ± 4.6**, ††, ††
Heart weight (g)	1.424 ± 0.027	1.443 ± 0.027	1.481 ± 0.020	1.519 ± 0.019
Heart / body weight ratio (mg/g)	3.333 ± 0.042	3.410 ± 0.087	3.790 ± 0.071***, ††	4.354 ± 0.089***, †††, †††

平均 ± SE. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. age-matched WKY, †, ‡, ††, †††  $p < 0.05$ , ††††  $p < 0.01$ , †††††  $p < 0.001$  vs. age-matched SHR C, †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$ , †††  $p < 0.001$  vs. age-matched SHR B2.

において確認されなかった(data not shown)。従って、本研究で得られた結果は TWEAKR が関与する心肥大において TWEAK - TWEAKR シグナルでは説明できないとする従来の報告と一致しているものと考えられる。

(3) TWEAKR に対する新規の相互作用タンパク質を明らかにするために、TWEAKR 抗体を用いた免疫沈降を行った(図3)。得られたタンパク質に対して質量分析装置により同定を行ったところ、その一つは、ATP 合成酵素(F-ATPase)の $\alpha$ サブユニットであることが判明した(図3矢印)。

更にウェスタンブロットにより相互作用タンパク質を確認したところ、 $\alpha$ サブユニットだけでなく、Fo ドメイン(膜ドメイン)のサブユニットである b も検出された。これは、TWEAKR が $\alpha$ サブユニットのみに結合しているのではなく、ATP 合成酵素複合体に結合していることを示唆している。一方、リガンドである TWEAK は検出されなかった(data not shown)。これは心肥大進展において、TWEAK-TWEAKR 相互作用は重要でないことを示唆しているものと考えられた。

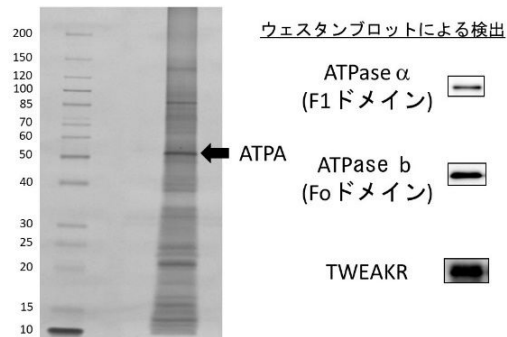


図3. TWEAKR抗体による免疫沈降

(4) SHRSP より得られた左室壁を細胞分画したところ、主にミトコンドリア画分及び細胞質画分に TWEAKR が検出された(図4)。ミトコンドリアはすべての画分に検出された。ミトコンドリアは核との分離が困難であることが知られているが、TWEAKR 結合型の ATP 合成酵素は核と密接な関係にあるミトコンドリアには、局在が少ないことが明らかとなった。細胞質画分における TWEAKR は

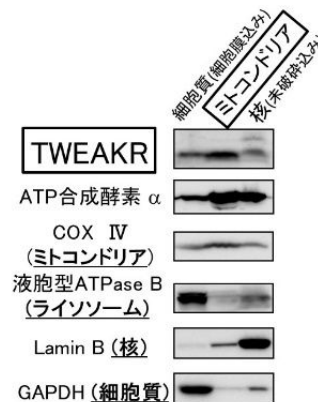


図4. TWEAKRのミトコンドリア局在

現段階ではミトコンドリア局在であるのか、細胞膜局在であるのかは断定できない、しかしながら、TWEAKR 結合型 ATP 合成酵素は、ミトコンドリア画分に見出されていることから、複合体としてミトコンドリア内膜に局在している可能性を示唆している。

本研究では、TWEAKR の新規の相互作用が明らかとなったことに加え、TWEAKR が心筋におけるエネルギー産生に関与している可能性を示唆している。この結果は、TWEAKR が関与する心肥大の機構をミトコンドリアの機能異常という側面から明らかにできる可能性がある。現在、この TWEAKR 結合型 ATP 合成酵素がどのような機能を示し、心肥大にどのような影響を与えているのか詳細な検討を行っている。更に、TWEAKR は身体の正常組織において発現が制限されていることから、治療標的としての有効性も期待できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Haratani K, Yonesaka K, Takamura S, Maenishi O, Kato R, Takegawa N, Kawakami H, Tanaka K, Hayashi H, Takeda M, Maeda N, Kagari T, Hirotsu K, Tsurutani J, Nishio K, Doi K, Miyazawa M, Nakagawa K.	4. 巻 130(1)
2. 論文標題 U3-1402 sensitizes HER3-expressing tumors to PD-1 blockade by immune activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Invest .	6. 最初と最後の頁 374-388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI126598.	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 Inoue Takao, Hagiyama Man, Maenishi Osamu, Kimura Masatomo, Mizuguchi Nobuyuki, Mine Yoshihiro, Kimura Ryuichiro, Chikugo Takaaki, Itoh Tatsuki, Satou Takao, Ito Akihiko	4. 巻 237
2. 論文標題 Ectopic TWEAKR expression in type I fiber of stroke-prone spontaneously hypertensive rats is related to slow muscle-specific hypotrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 116919 ~ 116919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2019.116919	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 Kimura Masatomo, Enomoto Akifumi, Maenishi Osamu, Chikugo Takaaki, Sugita Takashi	4. 巻 69
2. 論文標題 A fungal ball within a maxillary sinus with dental root canal filler and rare fungal propagules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 360-365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12790	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 Takegawa Naoki, Tsurutani Junji, Kawakami Hisato, Yonesaka Kimio, Kato Ryoji, Haratani Koji, Hayashi Hidetoshi, Takeda Masayuki, Nonagase Yoshikane, Maenishi Osamu, Nakagawa Kazuhiko	4. 巻 145
2. 論文標題 [fam ] trastuzumab deruxtecan, antitumor activity is dependent on HER2 expression level rather than on HER2 amplification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 3414 ~ 3424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32408	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 Kawai Shigeru, Okuda Takeshi, Fukui Ayano, Sanada Yasuhiro, Yoshikawa Keisuke, Morikawa Miyuki, Kuwahara Motoi, Maenishi Osamu, Morita Yasuyoshi, Izumoto Shuichi, Kato Amami, Matsumura Itaru, Kusunoki Susumu	4. 巻 58
2. 論文標題 Intravascular Lymphoma Presenting as a Cavernous Sinus Tumor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2085 ~ 2089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.1828-18	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 Kashiwagi Nobuo, Hyodo Tomoko, Ishi Kazunari, Maenishi Osamu, Enoki Eisuke, Chikugo Takaaki, Masakatsu Tsurusaki, Yagyu Yukinobu, Kitano Mutsukazu, Tomiyama Noriyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 Spontaneously infarcted parotid tumours: MRI findings	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dentomaxillofacial Radiology	6. 最初と最後の頁 20180382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1259/dmfr.20180382	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 井上敬夫、金澤佑治、水口信行、峯 嘉宏、前西 修、木村雅友、萩山 満、米重あづさ、和田昭裕、筑後孝章、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦
2. 発表標題 脳卒中発症ラットSHRSPは廃用性萎縮からの回復時に筋線維の損傷がみられない
3. 学会等名 第7回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上敬夫、金澤佑治、水口信行、峯 嘉宏、前西 修、木村雅友、萩山 満、米重あづさ、和田昭裕、筑後孝章、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦
2. 発表標題 SHRSPでは廃用性筋萎縮からの回復が遅延する
3. 学会等名 第57回 高血圧関連疾患モデル学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 敬夫、萩山 満、前西 修、木村 雅友、水口 信行、峯 嘉宏、筑後 孝章、伊藤 龍生、佐藤 隆夫、伊藤 彰彦
2. 発表標題 発育低下のみられる骨格筋におけるTNF関連受容体の発現異常
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上敬夫、前西修、木村雅友、萩山満、水口信行、峯嘉宏、筑後孝章、伊藤龍生、佐藤隆夫、伊藤彰彦
2. 発表標題 遅筋特異的発育異常におけるMuRF1の発現上昇と上流因子の解析
3. 学会等名 第5回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takao Inoue, Man Hagiyama, Osamu Maenishi, Masatomo Kimura, Nobuyuki Mizuguchi, Yoshihiro Mine, Ryuichiro Kimura, Takaaki Chikugo, Tatsuki Itoh, Takao Satou, Akihiko Ito
2. 発表標題 ECTOPIC TWEAKR EXPRESSION IN TYPE I FIBER OF STROKE-PRONE SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS IS RELATED TO SLOW MUSCLE-SPECIFIC HYPOTROPHY THROUGH MURF1 OVEREXPRESSION
3. 学会等名 International Society of Hypertension Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究分担者	井上 敬夫  (INOUE Takao)  (00441006)	近畿大学・医学部・助教   (34419)	

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