

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10565

研究課題名(和文) 致死性心肥大におけるT管リモデリングとカルシウム制御異常

研究課題名(英文) T-tubule remodeling and calcium handling dysfunction in fatal cardiac hypertrophy

研究代表者

垣本 由布 (Kakimoto, Yu)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：40734166

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)：高血圧性心不全および虚血性心不全による突然死を対象に、ヒト心臓組織のプロテオーム解析を行った。突然死群では、MYH7、MYL3、ACTC1といった細胞骨格タンパク質が増加していた。また、心肥大群では、ACTC1は突然死群と同程度増加していたものの、MYH7とMYL3のmRNA増加は中程度にとどまっていた。生理的心肥大から致死性心肥大に至る過程で、細胞骨格タンパク質が段階的に増加することが明らかになった。さらに、免疫染色ではMYH7が突然死例の内縦走筋で増加していた。ヒト心臓壁は内・中・外の3層構造から成り、筋層ごとのタンパク質発現プロファイルの変化が突然死のリスクとなる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中高年では肥満や高血圧症に対して代償性に心肥大が生じることが多い。従来、心肥大が突然死のリスクとなることは知られていたが、心不全症状のない心肥大例において、突然死のリスクを正確に予測することは難しかった。

心肥大剖検例を対象とした本研究では、生理的心肥大群に比べて突然死群でMYH7とMYL3が増加していることが明らかとなり、心臓生検や血液検査においてこれらのタンパク質が突然死リスクマーカーとなる可能性が示された。将来的には、心肥大患者のなかでも突然死リスクの高い患者を識別することで、突然死の発症を予防することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cardiac tissues were sampled at autopsy. Sudden cardiac death (SCD) group consisted of ischemic heart failure and hypertensive heart failure. We performed histological examination, shotgun proteomic analysis, quantitative polymerase chain reaction analysis, and immunohistochemical analysis.

The proteomic profile revealed many sarcomere proteins were increased in SCD cases. Especially, the protein and mRNA levels of MYH7 and MYL3 were significantly increased in the SCD cases. Moreover, the level of MYH7 was significantly increased in the inner myocardial layer compared with the middle and outer layers in the heart.

This is the first report of cardiac proteomic analysis in SCD with hypertensive and ischemic heart failure. The stepwise upregulation of sarcomere proteins can increase the risk for SCD in acquired cardiac hypertrophy before the cardiac fibrosis prominently progresses.

研究分野：法医学

キーワード：突然死 心肥大 プロテオーム解析 異方性 MYH7

1. 研究開始当初の背景

(1) 生理的心肥大と致死性心肥大

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一つ一つの心筋細胞が肥大して心臓のポンプ機能を維持している。成長や運動に応じて生じる心肥大は生理的心肥大と呼ばれる。一方、肥満や高血圧症など、心臓が長期的に圧負荷や虚血にさらされる疾患では、心機能の低下を伴う病的な心肥大を認める。病的な心肥大の患者は突然死するリスクも高くなるため、法医解剖においても心肥大は重要な所見となる。

しかし、病的な心肥大のなかでも、生前に慢性的な心不全症状がなく突然死する致死性心肥大と生理的心肥大の鑑別は容易ではない。心重量の増加、心筋細胞と核の肥大は共通する組織所見であり、他の死因が否定されて除外診断的に致死性心肥大と判断されることが少なくない。本研究では、生理的心肥大が致死性心肥大へ移行する分子的な増悪メカニズムの解明を目指す。

(2) カルシウム制御異常と不整脈

心筋細胞が規則正しく収縮するためには、

細胞膜の電氣的興奮に伴い Ca^{2+} チャネル(LTCC)が開口し、細胞内に少量の Ca^{2+} が流入する。

流入した Ca^{2+} が引き金となり、直近の小胞体上のリアノジン受容体(RyR)から大量の Ca^{2+} が放出される。

細胞内の Ca^{2+} が急上昇することで心筋が収縮する。

筋収縮後、細胞内の Ca^{2+} は Ca^{2+} -ATPase(SERCA2a)を介する小胞体への再取り込みと、 Na^{+} - Ca^{2+} 交換体(NCX)を介する細胞外への排出によって低濃度に戻り心筋は弛緩する(図1)。

しかし、この Ca^{2+} 制御機構に異常が生じ、心筋内の Ca^{2+} 濃度の変動が維持できなくなると、心臓の収縮力が低下したり不整脈が起こるようになる。

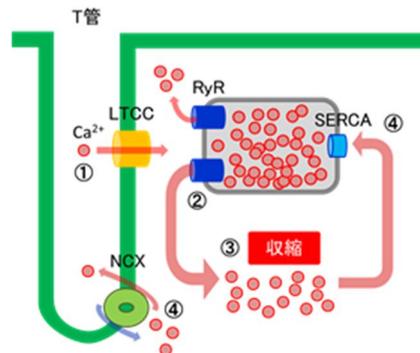


図1 心筋収縮とカルシウム制御

(3) T管リモデリングと致死性心肥大

心筋細胞のT管は、細胞膜上に規則正しく配列した陥凹であり、同部にはLTCCが高密度に存在する。慢性心不全の研究では、このT管の構築が乱れることで、LTCCとRyRのカップリングができなくなり、細胞内の Ca^{2+} 濃度変動に異常が生じて不整脈が惹起されることが報告されている。したがって、慢性的な心不全症状がなく突然死した致死性心肥大においても、T管リモデリングに伴い Ca^{2+} 制御ができなくなり致死性不整脈が発生した可能性がある。

2. 研究の目的

(1) “一般的な”致死性心肥大の解析

これまで致死性心肥大の研究では、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。そのため研究も進んでおり、遺伝的な細胞骨格タンパク質の異常などが明らかになっている。しかし、これらのタンパク質異常はHCM以外の致死性心肥大に必ずしも共通するものではない。また、HCMのような特定疾患は、突然死するリスクが広く知られており、死因究明のために解剖が必要となることは少ない。

一方、冠状動脈硬化症や高血圧症はHCMよりもはるかに高い罹患率を示す疾患でありながら、自覚症状があらわれにくく、生前に診断や治療がされていないことも多い。そのため、その突然死の発症率は明らかになっておらず、突然死するリスクについての社会的な認識も低い。本研究では、冠状動脈硬化症や高血圧症に伴う“一般的な”致死性心肥大を解析することで、社会のなかに潜在的に存在する突然死予備軍の診断マーカーの発見を目指す。

(2) 生理的心肥大から致死性心肥大への進行

心臓が肥大する過程では、心機能が代償的に維持されている生理的心肥大から、致死性不整脈が発生する致死性心肥大へと段階的に進んでいくものと想定される。しかし、生前に慢性的な心不全症状を呈さない致死性心肥大の場合、現時点では臨床的にその突然死を予測することは困難であり、生前の臨床検体を用いたアプローチは行えない。また、長期的な冠状動脈硬化症や高血圧症により突然死をきたす致死性心肥大の動物モデルも確立されていない。

本研究では、実際に突然死した致死性心肥大の症例と、心臓死以外の原因で死亡した生理的心肥大の症例を比較することで、生理的心肥大から致死性肥大への進行過程で変化する分子マーカーを明らかにする。

(3) 致死性心肥大におけるT管リモデリングとカルシウム制御の評価

これまでのT管リモデリングと Ca^{2+} 制御の研究では、慢性心不全患者の組織やモデル動物の心筋細胞が用いられてきた。その研究の首座は慢性的な心収縮能の低下にあり、不整脈の発生は副産物的な知見であることが多かった。

本研究では、慢性的な心不全症状がなく突然死した致死性心肥大に標的を絞り、心不全の発症に先行して、T管リモデリングと Ca^{2+} 制御異常が致死性不整脈の発生に寄与しているかを検討する。研究検体として、突然死したヒトの剖検組織を用いることで、モデル動物では再現できない

い致死性不整脈の発生機序の解明が期待できる。

3. 研究の方法

- (1) 解剖学的心肥大の定義付け：心肥大は心臓性突然死の危険因子であることが臨床的に知られているが、解剖学的に明確な心肥大重量は確立されていない。そこで、2017年から2019年の東京都監察医務院の解剖症例のうち、確定診断がついた3,534症例(男性2,454例、女性1,080例、0-101才)のデータを用い、現代日本人における心肥大重量の定義付けを行った。
- (2) Ca²⁺制御タンパク質のウェスタンブロット：上記心重量閾値をもとに、致死性心肥大4例・生理的心肥大5例・健常例4例を選択し、心臓組織からタンパク質を抽出してCa²⁺制御に関わる主要タンパク質のウェスタンブロットングを行った。
- (3) 心臓細胞膜成分のプロテオーム解析：致死性心肥大のなかでも冠状動脈硬化のない高血圧性心不全4例と生理的心肥大3例の心臓組織から細胞膜成分を抽出し、電気移動を行い分子量ごとに5分画に分けた後、タンパク質の定量質量分析を行った。
- (4) 心臓バルク組織のプロテオーム解析：高血圧性心不全3例・生理的心肥大3例・健常3例から、細胞膜成分を分離することなく、心臓左室壁の心筋層から抽出した総タンパク質を用いて定量質量分析を行った。
- (5) 心筋層分離プロテオーム解析：ホルマリン固定標本を用いて、顕微鏡下で各心筋層から心筋を分離採取し、タンパク質質量分析が行えるか検討した。

4. 研究成果

(1) 現代日本人における心肥大重量

対照群では、20才までは年齢と直線的に相関した心重量の増加を認めた。成人での平均心重量は、男性385g、女性320gであった。ROC曲線解析では、男性は407g(オッズ比4.18)、女性は327g(オッズ比2.64)をカットオフとして循環器疾患による死亡率が上昇することが明らかになった(図2)。また、ロジスティック回帰分析では、心重量は体格指標であるBMIよりも有意に心臓性突然死に寄与することが示された。

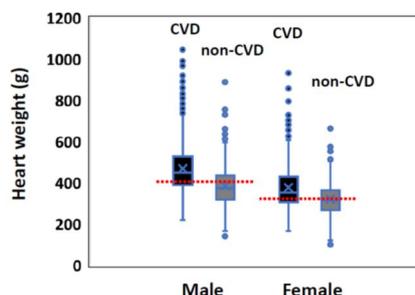


図2 心重量と循環器死亡

(2) Ca²⁺制御タンパク質

ウェスタンブロットングでは、細胞膜のLTCCは心肥大例で増加しているものの、生理的心肥大と致死性心肥大で有意な差はなかった。また、小胞体膜のRyR2やPLNについては、安定したバンド検出が行えなかった。一方、これらのタンパク質をリン酸化するCaMKIIについては、心肥大症例でpCaMKIIが増加していた。CaMKIIによる自己リン酸化およびCa制御タンパク質のリン酸化が、生理的心肥大から致死性心肥大への移行に寄与する可能性が示された。

(3) 細胞膜タンパク質

細胞膜分画の質量分析では、合計で1,545タンパク質が同定され、コンタミと思われるケラチン由来のタンパク質を除いた1,524タンパク質について群間比較を行った。2群間で発現量が1.5倍以上有意に異なったタンパク質は47種あったが、細胞膜よりも細胞質に由来するタンパク質の方が多く、また全体的に発現量は低かった。さらに、この47タンパク質には、当初想定していたイオンチャンネルに直接関連するタンパク質は含まれなかった。細胞膜タンパク質は細胞質タンパク質に比べて微量であるため、細胞膜分画に細胞質成分が混入すると大きな影響を受ける。今回の結果は、質量分析前の細胞膜成分の抽出効率が低かったためと考えられた。

また、質量分析では、 α -Tubulin由来タンパク質が致死性心肥大で2-3倍増加しており、微小管重合化とT細管の配列異常の可能性が示された。しかし、ウェスタンブロットでは、発現量に群間差はなかった。また、ホルマリン固定組織と凍結組織を用いた染色では、Tubulinの変動やT細管の構築を確認することができなかった。以上から、TubulinやT細管の分析は、死後変化の影響を受けやすく、死亡直後に検体採取が行えない法医解剖検体では分析が困難であると考えられた。

(4) 心臓組織タンパク質

バルク組織の質量分析では、合計で1,551タンパク質を同定した。主成分分析では、高血圧性心不全群が他の2群と異なるタンパク質発現プロファイルを呈した(図3a)。群間差を認めた140タンパク質のうち、とくにMYH7、MYH9、MYH11、MYOM3、MYL3、ACTC1といった細胞骨格タンパク質が高血圧性心不全群で健常群の5-32倍と著増していた(図3b)。遺伝子オントロジー解析では、高血圧性心不全群において、心筋収縮や細胞間接着、プロテアソームに関わる遺伝子発現に変化を認めた。

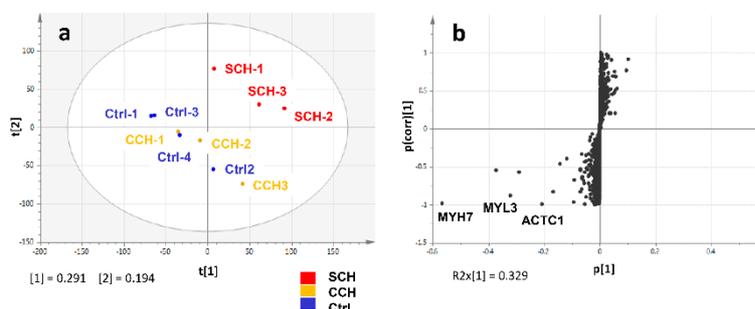


図3 心臓組織のプロテオーム解析

さらに、虚血性心不全例などを加え、致死性心肥大 10 例、生理的心肥大 10 例、健常 10 例について qPCR を行った (図 4)。致死性心肥大では、MYH7、MYL3、ACTC1 が健常群の 2-3 倍有意に増加していた。一方、生理的心肥大では、MYH7 と MYL3 の mRNA 増加は中程度にとどまっていた。以上から、生理的心肥大から致死性心肥大に至る過程で、細胞骨格タンパク質が段階的に増加することが明らかになった。また、組織学所見としては、致死性心肥大と生理的心肥大群間に心筋肥大や線維化の差はなかったことから、組織学変化が表出する前段階で、細胞骨格タンパク質の密度が増加することが突然死の誘因となると考えられた。さらに、タンパク質と mRNA レベルでの検出量に差があったことから、ユビキチン プロテアソーム系などのタンパク質分解能の差が突然死の素因となっている可能性が示唆された。

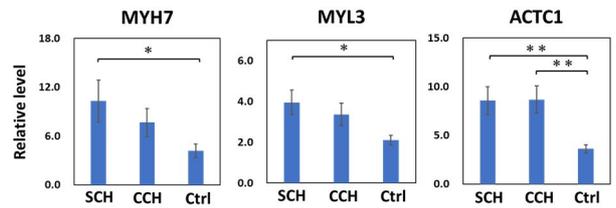


図 4 心筋細胞骨格タンパク質の増加

また、MYH7 の免疫染色では、健常心臓では中輪状筋で内・外縦走筋よりも高発現だった一方、致死性心肥大では内縦走筋で高発現していた (図 5)。ヒトの心臓壁は、内縦走筋・中輪状筋・外縦走筋から成り、この 3 層構造が心臓の異方的収縮能に寄与している。スペックル・トラッキングエコー等の臨床画像診断では、心臓の長軸方向の収縮能低下が心肥大患者の心不全を早期から予想することが知られている。したがって、今回明らかとなった内縦走筋での MYH7 増加が心臓の長軸方向の収縮能低下を招き、突然死の発症に寄与した可能性がある。また、MYH7 に限らず、心筋 3 層のタンパク質プロファイルの変化が突然死のリスクとなる可能性が示唆された。

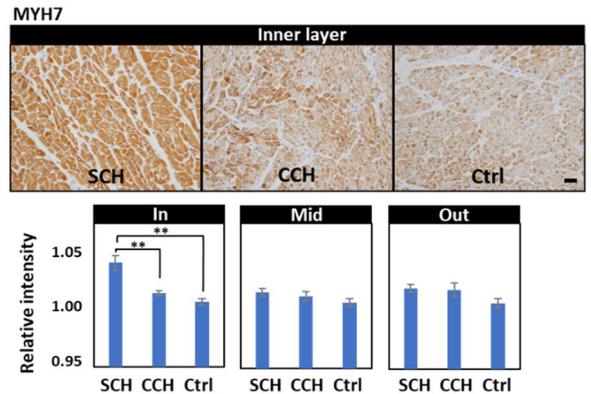


図 5 心筋 3 層における MYH7 発現

(5) 心筋層分離プロテオーム解析

内縦走筋・中輪状筋・外縦走筋を肉眼的に分離採取することは難しいため、レーザーマイクロダイセクションを用いて顕微鏡下でのサンプリングを行った (図 6)。ホルマリン固定し薄切した組織切片の染色法として、ヘマトキシリン染色、ヘマトキシリン&エオジン染色、トリイズンブルー染色を用い、顕微鏡下での筋束の識別性と質量分析でのペプチド検出への影響を比較した。3 染色とも同定ペプチドプロファイルに大きな差はなかったものの、組織識別性と同定ペプチド数はトリイズンブルー染色が最も優れていた。また、5 μm 厚切片で 10 cm² の組織が採取できれば、質量分析で定量解析が行えることが確認された。

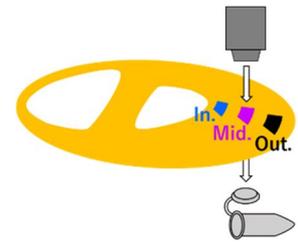


図 6 心筋 3 層のマイクロダイセクション

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kakimoto Y, Asakura K, Osawa M	4. 巻 48
2. 論文標題 Cutoff value for hypertrophic heart weight in the Japanese population.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leg Med (Tokyo).	6. 最初と最後の頁 101831
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2020.101831	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, Ueda A, Ito M, Tanaka M, Kubota T, Isozaki S, Osawa M	4. 巻 137
2. 論文標題 Proteomic profiling of sudden cardiac death with acquired cardiac hypertrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 1453 ~ 1461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00414-023-03038-6	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5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 垣本 由布
2. 発表標題 心臓性突然死への法医学的アプローチ
3. 学会等名 第106次日本法医学会学術全国集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 垣本由布、朝倉久美子、上田篤、大澤資樹
2. 発表標題 現代日本人における心肥大重量の検討
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 垣本 由布
2. 発表標題 心不全パンデミック時代の突然死～法医学にできること～
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 垣本由布、朝倉久美子、大澤資樹
2. 発表標題 現代日本人における心肥大とは何グラム以上か
3. 学会等名 第110回日本病理学総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 垣本 由布、伊藤 誠敏、上田 篤、磯崎 翔太郎、大澤 資樹
2. 発表標題 中高年の心臓性突然死におけるサルコメアタンパク質の発現増加
3. 学会等名 第107次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2023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
---------	---------