

機関番号：24303

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790703

研究課題名 (和文)：筋特異的発現遺伝子 MURC の心肥大・心不全における役割についての検討
 研究課題名 (英文)：A role of muscle-restricted coiled-coil protein (MURC) in cardiac hypertrophy and heart failure

研究代表者

小形 岳寛 (OGATA TAKEHIRO)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：10402877

研究成果の概要 (和文)：

圧負荷肥大心モデルの心肥大・心不全両期に MURC は発現増加し、ヒト心不全期でも肺高血圧に正比例して発現が上昇していた。MURC 過剰発現により心筋細胞肥大と ERK1/2 活性化が起こり、MURC ノックダウンで $\alpha 1$ アドレナリン受容体(A1AR)刺激での肥大反応は抑制、MEK 阻害薬でも MURC による心筋細胞肥大も抑制された。また MURC はカベオラ関連蛋白、A1AR、p-ERK と細胞膜上で結合していた。

研究成果の概要 (英文)：

MURC expression was increased in cardiac hypertrophy and failing hearts. When MURC was overexpressed in CMs, MURC induced ERK activation and cardiomyocyte (CM) hypertrophy. shRNA-mediated MURC knockdown impaired $\alpha 1$ adrenergic agonist-induced CM hypertrophy and ERK activation. MURC-induced increases in cell size were attenuated by a MEK inhibitor. Furthermore, MURC bound to cavin family proteins (cavin-1, -2), caveolin-3, $\alpha 1$ adrenergic receptor, and p-ERK in CMs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：筋特異的遺伝子、心肥大、心不全

1. 研究開始当初の背景

時として致命的な経過をたどる心肥大・心不全に対する、予防・治療法の開発は現在の循環器病学においても非常に重要である。体液性因子を起点とした心肥大、心不全に至る分子メカニズムの研究が盛んに行われ、それらをターゲットとする治療法が開発されてきたが、今でも心臓移植以外に治療法のない重症心不全患者が多数存在しているのが現

状である。そうした背景から我々は全く新しい分子を心筋組織から見つけ出し、その機能を解析することで新たな心肥大・心不全の分子メカニズムを発見出来るのではないかと考えた。

我々は、Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)法により成体のマウス心臓の遺伝子発現プロファイルを作成し、データベースを用いた検索にて筋細胞に特異的に発現して

いる候補遺伝子をいくつか選び、心臓、骨格筋、血管にのみ発現している筋細胞特異的遺伝子の同定・単離に成功した。アミノ酸配列解析から coiled coil モチーフを持つことが明らかになり、我々はこの筋特異的新規遺伝子を MURC (muscle-restricted coiled-coil protein) と命名した。

このMURCは心筋細胞に非常に特異的に発現しており、特に心筋細胞内のZ-line周囲に存在していることが明らかになった。アデノウイルスによる心筋細胞への過剰発現またはノックダウンモデルによる検討の結果、MURCは、RhoA/ROCKシグナル経路を活性化し、心筋でのANP発現と筋原線維の形成を促進し、さらに、心筋特異的発現トランスジェニックマウスでの長期的な過剰発現により、心筋線維化と刺激伝導系障害を伴う心機能低下を明らかにした(Ogata et al. Mol Cell Biol. 2008 May;28(10):3424-36)。これらの成果の過程で、若年期のトランスジェニックマウスで個々の心筋細胞の肥大が認められ、MURCタンパク発現亢進が心筋において肥大のシグナルとしても関与しているのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

前述の通り、トランスジェニックマウスを用いた上記の結果から、MURCは心筋細胞において肥大の促進などに関わっている可能性が高いと考え、以下の検討によりMURC遺伝子の心筋細胞での機能をさらに詳細に明らかにすることを目的とした。

- ① ラット培養心筋細胞を用いた心筋細胞肥大への関与とその分子機序の検討
- ② 心肥大・心不全の発症過程における遺伝子発現様式の検討

3. 研究の方法

まず、心肥大・心不全の心臓での MURC の mRNA 発現の変化について検討するため、Dahl 食塩感受性高血圧ラットの心肥大期、心不全期の心臓における MURC mRNA 発現を realtime RT-PCR で検討した。

次に、5 週齢の MURC 心臓特異的トランスジェニックマウス(Tg-MURC)を使い、心筋細胞肥大の程度を検討した。同時に新生児ラットより単離した心筋細胞にアデノウイルスを使って MURC を過剰発現させ細胞面積を比較すると同時に、心肥大、心不全マーカーの変化について mRNA 発現を realtime RT-PCR で検討した。

我々が MURC を報告した後に、他のグループから MURC がカベオラの構成タンパクの 1 つである cavin ファミリーに属している、という報告がなされ、MURC とカベオラとの関係が非常に注目されるようになっていく。cavin ファミリーはもう一つのカベオラ関連

タンパクである caveolin ファミリーと複合体を形成しカベオラの構造、機能を制御していると考えられているが、MURC が実際にカベオラに存在して何を行っているのかについては未だに謎である。そのため、我々は MURC が実際にカベオラに存在しているか検討するために心筋特異的にカベオラに存在している caveolin-3 のほか、他の cavin ファミリーとして同定されている PTRF, SDPR との結合を免疫沈降法と CoralHue Flu-chase Kit による蛍光シグナルによって、MURC とそれらのタンパク相互作用について検討した。

最後に、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体(A1AR)による心肥大反応と MURC との関連を明らかにするため、プラスミドをトランスフェクションさせた単離心筋細胞を使って A1AR 刺激からの ERK を介した心肥大反応と MURC との関連を、免疫沈降反応、免疫染色、ウェスタンブロットを用いて評価した。

4. 研究成果

臨床上遭遇する心肥大、心不全において、MURC が本当に変化しているか検討するため、ヒト患者の不全心筋を使ったマイクロアレイを実行した。結果は、我々が予想していた通り、ヒトの不全心筋内では MURC 発現が上昇していた。また、個々の患者で同時に測定された血行パラメータとの相関を検討したところ、心不全の程度の指標の一つである平均肺動脈血圧と MURC との間に非常に強い正相関が認められた($r = 0.812, p = 0.008$)。この結果は、ヒトが心不全に至る過程において、MURC が何らかの作用を持っていることを示している。すなわち、心不全の病態、治療に対する知見を深める意味において、心筋細胞における MURC の機能を明らかにすることは非常に重要テーマであると考えることが出来る。

心不全だけでなく、心肥大でも MURC の発現が変化していないかを評価するために、我々は Dahl 食塩感受性高血圧ラットを使い心肥大期、心不全期それぞれにおける MURC の mRNA 発現の変化を検討した。MURC は心肥大の時期からコントロールに比べ有意に発現が増加し、その増加は心不全期にかけて持続していた。この結果から、MURC は心不全だけでなく心肥大においても何かしらの役割を持っていることが示唆された。

以上のことから、次に我々は、MURC トランスジェニックマウスと心肥大の関係を調べることにした。我々は、すでに MURC のトランスジェニックマウスを作製、所有していたため、この心臓における心筋細胞サイズの変化を週齢ごとに検討した。MURC トランスジェニックマウスは正常に生まれるものの 10 週齢頃から完全房室ブロックや除脈性心房細動などを発症し心不全を来す。心筋組織

は不整脈を起こす時期に差し掛かると、線維化を伴い心筋サイズの大小不同が認められるようになり、さらに週齢を重ねるとコントロールに比べて有意に心筋細胞のサイズが縮小する(Ogata et al. *Mol Cell Biol.* 2008 May;28(10):3424-36)。しかしながら、これらの変化がまだ認められない5週齢前後の心筋組織を検討した結果、この週齢では線維化など認められず、心筋細胞サイズの有意な増大が確認された。以上のことから、MURCは心筋細胞の肥大に何らかの関わりを持っていることが示唆された。

この結果を裏付けるため、次に我々はラット新生児単離心筋細胞にアデノウイルスを使ってMURCを過剰発現させ、心筋細胞肥大について検討を行った。MURCの過剰発現により心筋細胞のサイズは有意に増大し、肥大マーカーと呼ばれるBNP、 β MHC、 α SkA mRNAの有意な上昇も同時に認められた。このことから、MURCは心筋細胞の肥大に重要な役割を果たしていることが示唆された。

ここまでの結果で、MURCと心筋細胞肥大との間に強い関係が存在することは明らかであったが、そのメカニズムについては謎のままであった。そんな中、BastianiらがMURCがcavinファミリーと呼ばれるタンパク群と相同性をもつということが報告された(Bastiani M et al. *J Cell Biol.* 2009 Jun;185(7):1259-73)。Cavinファミリータンパクは、カベオラと呼ばれる陥入構造を構成するタンパクの一部であり、MURCはそのカベオラ周囲に認められた。カベオラは細胞膜上に存在する直径50-100nm大のフラスコ状の陥入構造で、種々の受容体を局在させ情報伝達の起点となったり、エンドサイトーシスや脂質輸送に関わったりと、細胞の活動に非常に重要な構造物とされている。BatianiらがMURCとカベオラの関係性を明らかにしたことから、我々は、MURCと心筋肥大の関係を、カベオラを介して明らかにしようと考えた。

Cavinファミリータンパクはもう一つのカベオラ構成タンパクとして知られているcaveolinファミリーとともにカベオラで複合体を形成していると考えられている。そのため、我々はまず、MURCが他のcavin、caveolinファミリータンパクと複合体を形成しているのかを検討した。免疫沈降法とCoralHue Flu-chase Kitによる蛍光シグナルを使った蛋白相互作用を検討する実験手法で検討を行ったところ、MURCは心筋特異的に発現しているcaveolin-3のほか、cavin-1/PTRF、cavin-2/SDPRと多重複合体を形成していることが明らかとなった。Caveolin-3やcavin-1はカベオラのみ存在していると言われており、この結果から、MURCは他のcavinファミリーと同様にcavin-caveolin複合体を作り心筋細胞のカベオラに存在していることが

明らかになった。

カベオラは種々の受容体を局在させていると言われていたが、その中にはアドレナリン受容体が含まれている。ノックアウトマウスなどの検討から、アドレナリン受容体の中でも心肥大の起点となっているのは α 1アドレナリン受容体(A1AR)と報告されている(Milano CA, et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 Oct;91(21):10109-13)。FugitaらがA1ARとcaveolin-3がカベオラ上で相互に結合している心肥大に関与しているとの報告を行っているが、この報告を含め現在の報告はcaveolin-3が減少すると心肥大が促進されるというものである(Fujita T et al. *Cardiovasc Res.* 2001 Sep;51(4):709-16)。同じカベオラに存在するにも関わらずcaveolin-3の表現型はMURCの表現型と全く反対であり、複合体を形成しつつもそれぞれ異なった作用を持っていることが示唆された。以上のことから、A1ARを介した心肥大とMURCとの関係を示し、そのメカニズムを明らかにすることを最終目標とした。

単離心筋細胞に蛍光標識したMURC、A1ARプラスミドをトランスフェクションしそれらが膜上で共局在していると同時にcaveolin-3とA1ARも共局在していることを確かめた。さらに、免疫沈降法とCoralHue Flu-chase Kitによる蛍光シグナルを使ったMURCとA1ARの蛋白相互作用を検討でも共に結合していることが明らかとなり、A1ARはカベオラで、caveolin-3だけでなくMURCとも結合していることが明らかとなった。

A1ARのagonistであるフェニレフリンによる心筋細胞肥大はMURCをshRNAを使い事前に発現を抑制しておくことで有意に抑制され、BNPの上昇も同様に抑制された。フェニレフリンによる心筋肥大のメカニズムにはERKのリン酸化を介する経路が知られている。事前の検討で心筋サイズの増大が認められる6週齢のMURCトランスジェニックマウスの心臓組織やMURCを過剰発現させた単離心筋細胞でのERK1/2の活性は有意に上昇していることを突き止めていたため、フェニレフリンによるERK1/2の活性化をMURCが制御しているのではないかと考えた。前述と同様に、shRNAを使ったMURC発現抑制をおこなったところ、予想通り、フェニレフリンによる心筋細胞内でのERK1/2のリン酸化は抑制された。

MURCとERK1/2との関係をさらに強固に証明するため、ERK1/2のリン酸化を抑えるMEK阻害薬の一つU0126を使ってMURC過剰発現によって引き起こされるERK1/2の活性が抑制出来るか検討した。U0126投与により、MURCによるERK1/2のリン酸化は濃度依存性に抑制され、それに伴い心筋細胞サイズの縮小、BNP mRNA発現の減少が認められた。

以上の結果より、AIARによって引き起こされる心筋細胞の肥大には、MURCがERK1/2をリン酸化することが重要であることが示された。

ここまででMURCの機能の一つにERK1/2のリン酸化があるということを確認したが、MURCがカベオラにあるということからこのERKのリン酸化が本当にカベオラにあるMURCによって引き起こされているかどうかを検討することとした。FLAG標識したMURCを心筋細胞にアデノウイルスを使って発現させ、ERKのリン酸化抗体とMURCを認識する抗体を用いて局在を確認したところ、どちらも膜上に発現を認め、さらに共局在していることを確認できた。さらに、免疫沈降法でもMURCとERK1が結合していることが明らかになり、MURCはERKの足場タンパクとしてカベオラに存在し、カベオラにてERKをリン酸化を制御している可能性が示唆された。

今回の研究で、我々の単離・同定した筋特異的発現タンパクMURCが、心筋細胞肥大のプロセスに非常に重要な役割を果たしていることを、明らかにすることが出来た。循環器分野の治療において、心肥大、それに引き続く心不全をコントロールすることは現在も大きな課題となっている。今後もMURCの機能の解析を進め、新しい治療法の開発の一助になればと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Isodono K, Takahashi T, Imoto H, Nakanishi N, Ogata T, Asada S, Adachi A, Ueyama T, Oh H, Matsubara H. PARM-1 is an endoplasmic reticulum molecule involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. *PLoS One*. 5(3):e9746,(2010). 査読有り
- ② Ogata T, Ueyama T, Isodono K, Tagawa M, Takehara N, Kawashima T, Harada K, Takahashi T, Shioi T, Matsubara H, Oh H. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. *Mol Cell Biol*. 28(10):3424-36, (2008). 査読有り
- ③ Tagawa M, Ueyama T, Ogata T, Takehara N, Nakajima N, Isodono K, Asada S, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 295(2):C490-8, (2008). 査読有り

[学会発表] (計3件)

- ① Taniguchi T, Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Miyagawa K, Amano K, Isodono K, Imoto H, Tagawa M, Takehara N, Asada S, Adachi A, Morimoto M, Takahashi T, Oh H, Ueyama T, Matsubara H. MURC, Muscle-restricted coiled-coil protein, regulates caveolae morphology and induces hypertrophy in cardiomyocytes. AHA Scientific Sessions (Nov 17, 2010, Chicago IL, USA)
- ② 中西直彦, 小形岳寛, 上山知己, 宮川浩太郎, 内藤大督, 谷口琢也, 松原弘明. Cavin familyとしてのMURCの役割およびMURCの心筋疾患に及ぼす影響とメカニズムの検討. 第33回日本高血圧学会総会 (Oct 15, 2010, 福岡, 日本)
- ③ Naito D, Ogata T, Amano K, Taniguchi T, Isodono K, Imoto H, Adachi A, Takahashi T, Ueyama T, Matsubara H. MURC induces cardiomyocyte hypertrophy through the extracellular signal-regulated kinase pathway. International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism (Jan 1, 2010, Nara, Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小形 岳寛 (OGATA TAKEHIRO)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医
研究者番号：10402877

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：