

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02921

研究課題名（和文）心筋内炎症の鍵となる介在板分子は拡張型心筋症の予後を規定するか？

研究課題名（英文）A key intercalated disc molecule determines the prognosis of dilated cardiomyopathy

研究代表者

新谷 泰範（Shintani, Yasunori）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：20712243

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：拡張型心筋症(DCM)における炎症性DCM(DCMi)は予後が悪く、その背後にある分子メカニズムは不明である。本研究では、AIPIDに注目し、DCMiの病態生理の解明をこころみた。AIPIDを特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成し、C-del変異体がDCMiモデルマウスとなることを明らかにし、1細胞レベルの発現解析により、病態進展に関する候補遺伝子Xを抽出した。ストレス存在下の心筋細胞でおこる小胞輸送の変容をAIPIDが修飾すること、そしてAIPIDのノックアウトあるいはノックダウンが、遺伝性拡張型心筋症モデルの有効な治療法となることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、ストレス存在下の心筋細胞でおこる小胞輸送の変容をAIPIDが修飾すること、そしてAIPIDのノックアウトあるいはノックダウンが、遺伝性拡張型心筋症モデルの有効な治療法となることを明らかにすることができた。AIPIDはノックアウトマウスが正常に発生、発育し、生殖に問題がないこと、また発現が心臓、骨格筋に限局しており、有望な創薬標的と考えられ、今後の治療薬開発が大いに期待できる。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory dilated cardiomyopathy (DCMi) is associated with poor prognosis, and its underlying molecular mechanisms remain unclear. This study aimed to elucidate the pathophysiology of DCMi by focusing on AIPID. We generated transgenic mice that specifically express AIPID and identified that the C-del mutant serves as a model for DCMi. Single-cell RNA sequencing analysis revealed candidate gene X, which is implicated in the disease progression. We demonstrated that AIPID modulates vesicular transport alterations in cardiomyocytes under stress, and that knockout or knockdown of AIPID represents an effective therapeutic approach for a hereditary dilated cardiomyopathy model.

研究分野：循環器内科

キーワード：介在板 心筋内炎症

1. 研究開始当初の背景

心不全とメカノストレス、メカノセンサーとしての介在板

重症心不全に対する補助循環を用いた mechanical unloading によるリバーシリモデリングの概念は臨床的に確立しており、心不全の増悪因子としてメカノストレスの重要性は明らかである。近年メカノストレスを感知するセンサーが細胞間接着部位である介在板にも存在することが明らかとなり (*Nat Commun.* 2014;5:3932.)、また実際に多くの介在板タンパク質をコードする遺伝子変異が心不全の原因となることから、メカノセンサーとしての介在板の重要性が注目されている。

DCMi の心筋内炎症細胞浸潤に関わる基盤病態-メカノストレス-

DCM は左心室の拡張と収縮力の低下がみられる心筋疾患である。わが国で心移植が施行された症例の 66%の原因疾患が DCM であり、重症心不全の原因として最多である。DCM の中でも、心筋生検において持続的炎症細胞浸潤を認める症例は、炎症性 DCM (DCMi)として定義される。国立循環器病研究センター (NCVC) の報告では、DCM 患者 182 例のうち、CD3 陽性 Tリンパ球あるいは CD68 陽性マクロファージの浸潤から DCMi と診断された症例は、全体の 46%に及び、その長期予後は有意に不良であった (*Eur J Heart Fail.* 2017;19:490-498.)。半数もの DCM 症例に炎症細胞浸潤がみられることは、病態形成において共通の基盤があると予想される。

従来より DCMi の病因として、ウイルスあるいは自己免疫の関与が指摘されている。欧州心臓病学会のガイドラインでは、心筋生検サンプルを用いたウイルス検索が行われ、結果により抗ウイルス剤、免疫抑制剤の使用がされている。しかしながら、検出されるウイルスは人種、報告によりさまざまであり、また実際にウイルスが検出されても本当に病因なのか、bystander なのかは疑問が残る。すなわちリアルワールドの DCMi 症例には、ウイルス感染や自己免疫だけでは埋められないギャップが存在し、心筋内炎症細胞浸潤の基盤となる分子メカニズムの解明が望まれている。

一方で、重症心不全や劇症型心筋炎において、体外循環によるメカニカル unloading により、心筋内炎症細胞浸潤を抑えられることが、人種を越え、複数施設から示されている (*Nat Rev Cardiol.* 2020)。しかしながら、DCMi という病態において、メカノストレスがどのようなメカニズムで心筋内炎症細胞浸潤を惹起するのか、その解明は進んでいない。その理由として、ウイルス感染モデル以外の DCMi モデル動物がないことがあげられる。

メカノストレスと心筋細胞発の炎症シグナルをむすぶ分子 AIPID の発見

Adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK)は、多彩な生物学的作用を有するリン酸化酵素である。申請者は、心筋組織において AMPK が細胞接着部位である介在板に局在していること、さらに心拍動によるメカノシグナル依存的に介在板への局在がコントロールされること、すなわち心臓において AMPK がメカノシグナルに関与していることを見出した (*EMBO reports*, 2021; 22(1):e50949.)。そこで生化学的に心臓介在板における AMPK の新規基質探索をおこない、機能未知の膜タンパク質 AIPID を同定した。心筋細胞で AIPID を過剰発現させ、圧ストレスをかけると、AIPID のリン酸化依存的に、IL-1 β , 6, CCL2, 3, IFN γ などのサイトカイン・ケモカインの顕著な発現上昇と STAT3 の活性化を認めた。作製した AIPID KO マウスは安静時には正常の心機能を呈したが、圧負荷心不全モデルに供すると、炎症細胞浸潤が抑制され、慢性期の心保護につながり、AIPID がメカノストレスと心筋内炎症をつなぐ鍵である、ことを見出した。

DCMi モデルマウスとしての AIPID 変異体トランスジェニック(TG)マウス

AIPID の生化学的解析の結果、AIPID の細胞外領域にあたる C 末端の deletion (C-del)が恒常活性型であることを明らかにした。そこで、AIPID C-del の transgenic (TG)マウスを作製したところ、生後 8 週齢で心筋組織内の有意な炎症細胞浸潤と、左室の拡大、収縮力の低下を認め、DCMi モデルマウスとなることを見出した。本マウスを用いることで、心筋細胞を起点に多種類の細胞間の遺伝子発現ネットワークにより形成される、DCMi の基盤病態を in vivo で解析することが可能となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「メカノストレスと心臓免疫シグナルをつなぐ膜タンパク質 AIPID の炎症惹起メカニズムを解明し、DCMi における AIPID の意義を明らかにすること」である。

3. 研究の方法

AIPID が心臓免疫シグナルを ON にするための分子基盤の探索

マウス AIPID は膜貫通部位を 1 つ持ち、N 末を細胞内、C 末を細胞外とする 2 型膜タンパク質である。AIPID はメカノストレス存在下で心筋細胞発の炎症シグナルを惹起する分子である。生化学的解析を進める中で、細胞外領域である C 末の欠損変異体(C-del)を発現させると、ミオシン ATPase である MYK-461 処理をして拍動停止した心筋細胞でも STAT3 のリン酸化がみられ、恒常活性化型の変異体であることを見出した。この変異体の発見により、メカノストレスと切り離して AIPID の下流の分子メカニズムを解析することが可能となる。すなわち、メカノストレスをかけることなく標的分子の探索実験が可能となり、サンプル間のばらつき、再現性の向上につながる。恒常的に活性化型となる C-del 型では、下流のシグナル伝達に必要な分子が相互作用していることが予想され、C-del 型を心筋細胞で発現するトランスジェニックマウスの心臓 lysate を出発材料とし、機能欠失型の変異体を発現する lysate を陰性コントロールとし、免疫沈降後、質量分析を組み合わせ、C-del 型に特異的に相互作用する分子の同定を試みる。

DCMi モデルマウス、ヒト DCMi サンプルの 1 細胞レベルの発現解析

心筋内炎症に關与する細胞種は多岐にわたる。単球、マクロファージ、リンパ球、肥満細胞、好中球、好酸球の他、心筋細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、ペリサイトもサイトカイン、ケモカインを放出し、心筋組織内のみならず、骨髄、脾臓から動員される免疫担当細胞も加えて、クロストークする(*Nat Cell Biol.* 2020;22:108-119)。これまで DCMi モデルとしてよく解析されてきたウイルス感染モデルや自己免疫モデルでは、免疫細胞に対する修飾が大きすぎ、背景で述べたように実臨床で感じる疑問を解決できるモデルではない可能性がある。今回、申請者が見出した AIPID C-del TG は心筋細胞発の炎症細胞シグナルによって引き起こされる DCMi モデルマウスであり、メカノストレスと心筋内炎症をつなぐモデルである。本計画ではこのマウスを用いて、心筋細胞の AIPID を起点とする多様な細胞種の相互作用連関を、1 細胞レベル発現解析により解き明かすことを目指す。

AIPID は DCM マウスモデルの予後を規定するか？ 病態マウスモデルを用いた検討

申請者は AIPID ノックアウト(KO)マウス、AIPID WT の TG マウスをすでに樹立している。両系統と DCM モデルマウスの交配により、「AIPID は DCM モデルマウスの disease course を変えるのか？」という疑問に答える。異なる病因の DCM モデルマウスとして、LaminA/C (LMNA) H222P ノックインマウスとトロポニン T (TNNT2) delK210 (Ba1b/c 系統) ノックインマウスを使用する。LMNA 変異は、我が国において比較的多く、家族性 DCM 患者の約 10%にみられる頻度の高い原因遺伝子である。また他の遺伝子変異に比べると予後が悪いことが知られている。両モデルともフェノタイプの再現性がよく、顕著な左室収縮不全と心不全による死亡がみられる(*Hum Mol Genet.* 2005;14:155-169, *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53:760-7)。図 2 で示した重症 DCM 患者の中には LMNA, TNNT2 変異例が含まれ、両変異例とともに AIPID の発現上昇を認めており、ノックインマウスにおいても AIPID 発現は上昇していることが予想される。本研究では、AIPID KO マウスあるいは TG マウスとの交配により、心筋内炎症、心機能、生命予後に与える影響を評価し、AIPID の DCMi の病態形成における役割、創薬標的としての可能性を検証する。

4. 研究成果

まず標的分子 AIPID が心筋内炎症を惹起する分子メカニズムの解明のため、標的 AIPID の全長(WT)、恒常活性化型 C 末欠損変異体(C-del)、さらに機能欠失変異体(S37A)の 3 種を心筋で特

異的に発現するトランスジェニックマウスを作成した。C-del は心筋内への炎症細胞浸潤と右室壁を中心に心外膜側に石灰化がみられるヒト慢性心筋炎様の組織所見を呈し、DCMi のモデルマウスと考えられた。これらの TG マウスを用いて、AIPID の炎症シグナルに特異的な結合分子の探索を試み、これまでに複数の小胞輸送に関する分子群との interaction を明らかにした。さらに遺伝性拡張型心筋症モデルの心臓から密勾配遠心法により、細胞内分画に分離する複数のタンパク質の存在比が病態で変容すること、そして AIPID ノックアウトマウスによりその変容が一部改善することを質量分析解析により明らかにした。

また当研究室で作成した DCMi モデルマウスの 1 細胞レベルの発現解析を実施した。データの質も良好で、マウス心臓で報告されている細胞群のクラスタリングに成功した。DCMi モデルとなる C-del TG マウスでは心筋細胞で TCA 回路、ミトコンドリア呼吸、Unfolded protein response (UPR) の gene ontology に属する遺伝子群の発現変動が有意に認められた。課題終了後も継続して機能解析を進める予定。

また不整脈源性心筋症、遺伝性拡張型心筋症モデルマウスと AIPID ノックアウトマウスの交配をすすめたところ、意外な事実が明らかとなった。遺伝性拡張型心筋症モデルでは、AIPID ノックアウトにより心収縮能の有意な改善、心筋内炎症の減少、生存曲線の延長を認め、AIPID が病態修飾因子であると同時に有望な治療標的となることを明らかにした。逆に不整脈源性心筋症モデルでは AIPID ノックアウトにより生存率が悪化することがわかり、二つのモデルが病態形成の面から大きく異なる疾患であることが理解できた。

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 1件）

1. 著者名 Kato Masaru, Sano Ryoya, Yoshida Narumi, Iwafuji Masatoshi, Nishiyama Yoshito, Oka Sayuki, Shinzawa-Itoh Kyoko, Nishida Yuya, Shintani Yasunori, Yagi Ichizo	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of Interfacial Interactions on Electrocatalytic Activity of Cytochrome <i>c</i> Oxidase in Biomimetic Lipid Membranes on Gold Electrodes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 9165 ~ 9170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcllett.2c01765	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 Miyashita Y, Tsukamoto O, Matsuoka K, Kamikubo K, Kuramoto Y, Ying Fu H, Tsubota T, Hasuie H, Takayama T, Ito H, Hitsumoto T, Okamoto C, Kioka H, Oya R, Shinomiya H, Hakui H, Shintani Y, Kato H, Kitakaze M, Sakata Y, Asano Y, Takashima S.	4. 巻 35
2. 論文標題 The CR9 element is a novel mechanical load responsive enhancer that regulates natriuretic peptide genes expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202002111RR	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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 心疾患及びラミノパチーの予防及び / 又は治療剤	発明者 新谷泰範、高橋佑典、矢澤一生	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-136279	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	渡邊 琢也 (Watanabe Takuya) (20627509)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医長 (84404)	

6. 研究組織（つづき）

	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	大郷 恵子 (Keiko Ogo) (30601827)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医長 (84404)	
研究分担者	白井 学 (Manabu Shirai) (70294121)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・オープンイノベーションセンター・室長 (84404)	
研究分担者	山崎 悟 (Satoru Yamazaki) (70348796)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	
研究分担者	高橋 佑典 (Yusuke Takahashi) (70880912)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員 (84404)	

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