

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590293

研究課題名(和文) 新たな心筋保護因子としてのカルシウムセンサーNCS-1の役割とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Role of neuronal calcium sensor-1 as a cardioprotective factor and its possible mechanism.

研究代表者

西谷 友重(Nishitani, Tomoe)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：50393244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞のサバイバル/アポトーシス経路を理解することが心不全の予防に重要である。申請者らは、心臓に発現しているが機能不明であったCa²⁺センサーNCS-1の心筋におけるサバイバル作用について検討を行った。各種ストレスに対する抵抗性を野生型(WT)およびNCS-1欠損(KO)心筋で比較した結果、KO心筋は虚血、再灌流障害や代謝・酸化ストレスに対し脆弱であることがわかった。詳しい解析から、NCS-1を欠損すると酸化ストレスを解毒するミトコンドリア機能が低下し、ATP合成量やAktサバイバル経路の活性化が減少することにより、ストレスに対する抵抗性が低下することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Identifying molecular targets that regulate cardiomyocyte survival is of therapeutic importance for conquering heart failure. Neuronal Ca²⁺-sensor-1 (NCS-1) is an EF-hand Ca²⁺-binding protein, which is important for excitable cell functions. Our preliminary results suggest that NCS-1 is involved in stress tolerance in the heart, therefore we examined this hypothesis. We found that NCS-1 deficient (KO) mouse hearts were more susceptible to oxidative (H₂O₂) and metabolic stress, as well as ischemia-reperfusion injury. Cellular ATP levels, mitochondrial respiration rates (basal and maximal O₂ consumption, and proton leak), and activation of Akt survival pathways were significantly depressed in KO myocytes; especially with oxidative stress. These results suggest that NCS-1 plays an important role in mitochondrial detoxification system and hence regulates cardiac survival under stress.

研究分野：心臓の細胞生理

キーワード：Ca²⁺シグナル 心筋 サバイバル ミトコンドリア 酸化ストレス 虚血 再灌流

1. 研究開始当初の背景

(1) 心筋梗塞、心肥大と様々な要因によって引き起こされる心不全は、心筋細胞の細胞死が最終原因となる場合が多い。心筋細胞のサバイバル/アポトーシス経路を理解することが心不全の予防に重要であるが、その全容は未だ明らかでない。

(2) Neuronal Ca^{2+} Sensor-1 (NCS-1)は、神経や未成熟期の心臓に高発現する EF ハンド Ca^{2+} 結合タンパク質であり、これまでイオンチャネルやイノシトールリン酸化酵素 PI4K の制御を行うことにより、神経機能に重要な役割を担っていることが知られている。

(3) NCS-1 の心臓における機能は長らく不明であったが、遺伝子欠損 (KO) マウスの解析から、NCS-1 が幼少期の心臓の Ca^{2+} 動態および心筋拍動を調節する因子であることを見出した (*Circ. Res.* 2011)。

(4) 一方、この研究の中で、NCS-1 が**ストレス下の心筋細胞のサバイバルを促進させる働き**もある可能性を見出した。

2. 研究の目的

NCS-1 の心筋サバイバル因子としての機能を *in vitro* および *in vivo* 両方の系を用いて確認するとともに、新たな標的分子の同定を含めた詳細な分子機構を明らかにし、創薬などの治療法開発につなげることを目指すことを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 心筋細胞の培養：生後 1-2 日目の新生児マウスの心室筋よりトリプシン処理を行なってバラバラにした後、繊維芽細胞を取り除き、初代培養を行った。

(2) 細胞障害の指標：ヘキスト 33258 で核を染色し、核の凝集が有ればアポトーシスと見なす。LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Assay (Lifetechnologies, UK)：生細胞はカルセイン AM により細胞質が緑色に、死細胞は Ethidium homodimer-1 により核が赤く染まる。LDH release assay。

(3) ミトコンドリアの機能解析：細胞外フラックスアナライザーを用いて酸素消費速度を測定し、様々な呼吸阻害剤添加により、基礎呼吸・ATP 代謝回転・プロトンリーク・最大呼吸量を評価した。それぞれタンパク量で割り付けた。

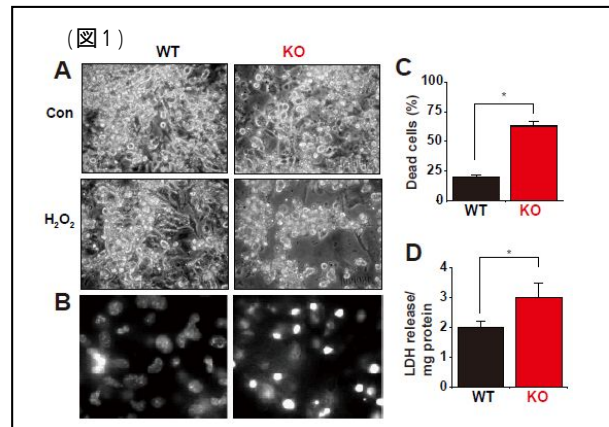
(4) ミトコンドリア膜電位の測定：100nM TMRE (tetramethylrhodamine, ethyl ester) を培養心筋細胞に 37°C, 20 分導入した後、3 回洗浄。

H_2O_2 を加えて 1 分ごとに 30 分間、蛍光測定 (Excitation 546nm: Emission 575nm)。

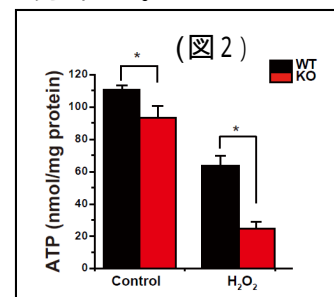
(5) 虚血 再灌流実験：生後 6 週齢の WT および KO マウスを 1-1.5% イソフルラン麻酔下で心臓を取り出し、ランゲンドルフ灌流システムに装着した。Modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer で 15 分灌流して安定化させた後、30 分虚血、30 分再灌流し、厚さ 2mm の切片にしたのち、TTC (triphenyltetrazolium chloride) で染色して梗塞部位を求めた。

4. 研究成果

(1) NCS-1 の KO マウス由来の培養心筋細胞を用いて、様々なストレスに対する抵抗性を、野生型 (WT) と比較した。その結果、酸化ストレス (H_2O_2 , 100 μ M, 1h) により、細胞障害の指標、すなわち形態的 (A) 核の断片化 (B) また LDH の放出 (D) において、KO が脆弱であることがわかった。また、グルコース除去などに対しても KO は弱かった (データ示さず)。

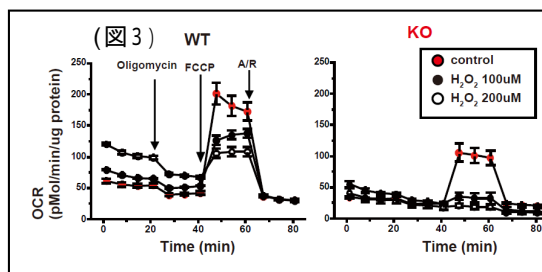


(2) 一方、細胞内 ATP レベルを比較したところ、KO マウス心筋において、基底状態および H_2O_2 添加時で、顕著に低下していることを見出した。

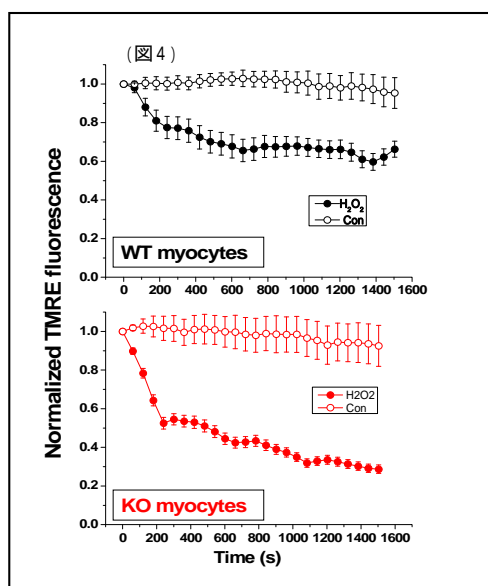


(3) 以上の結果のメカニズムを解明するため、細胞外フラックスアナライザーを用いて酸化ストレス前後におけるミトコンドリアの機能を解析した。その結果、基底状態においてミトコンドリア呼吸量が KO 群で顕著に減少しており、また H_2O_2 添加により更に低下することがわかった。様々な阻害剤添加により、

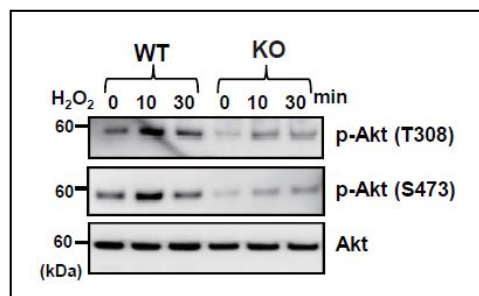
ATP 合成量、最大呼吸量、プロトンリークなどを測定した結果、これら全てにおいて、KO 心筋で低下していることがわかった。



(4) H₂O₂ 障害の際、活性酸素種の増加やミトコンドリア内への Ca²⁺流入がおり、その結果、ミトコンドリアの膜電位の焼失が生じることが知られている。そこで、これらを WT と KO 心筋で較べると、KO 心筋でよりミトコンドリアの膜電位の焼失起こりやすいことがわかった。

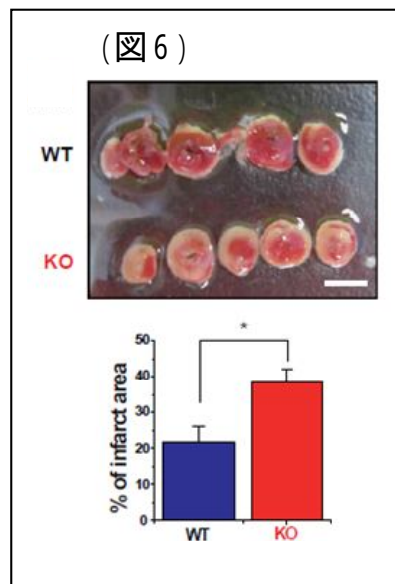


(5) また、主なサバイバル経路のひとつである Akt の活性化が KO 心筋で顕著に低下していることを見出した。



(6) さらにこのような KO マウスのストレスに対する脆弱性は、心筋虚血—再灌流モデルでも認められた。WT および KO マウスより心臓を取り出し、30 分虚血、30 分再灌流を行ったところ、KO 心筋の方が梗

塞部位 (図 6 で白い部分) が多かった。



(7) 考察

以上の結果より、NCS-1 を欠損すると様々なストレスに対し、抵抗性が低くなることがわかった。そのメカニズムとして、ミトコンドリアをはじめとする呼吸量が低下しており、H₂O₂ 添加時では、それを中和する働きのあるプロトンリーク活性が上昇しきれず H₂O₂ が除去できないこと、それによりミトコンドリアの膜電位が低下し、アポトーシスが起こりやすくなっていること、さらにおそらく Ca²⁺ 依存性の経路により主なサバイバル因子である Akt の活性化が起きにくくなり、全体としてストレスに対する抵抗性が低くなっていることが示唆された。

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 8 件)

- (1) Kuramoto K, Osumi T et al, 9人中4番目. Deficiency of a lipid droplet protein, perilipin 5, suppresses myocardial lipid accumulation, thereby preventing type 1 diabetes-induced heart malfunction. **Mol. Cell. Biol.**, 34:2721-31,2014. 査読有。
- (2) Shimada-Shimizu N, Hisamitsu T, Nakamura TY, Hirayama N, Wakabayashi S. Na⁺/H⁺ exchanger 1 is regulated via its lipid-interacting domain, which functions as a molecular switch: a pharmacological approach using indolocarbazole compounds. **Mol. Pharmacol.**, 85:18-28, 2014. 査読有。 DOI: 10.1124/mol.113.089268

- (3) Shimada-Shimizu N, Hisamitsu T, Nakamura TY, Wakabayashi S. Evidence that Na⁺/H⁺ exchanger 1 is an ATP-binding protein. **FEBS J.**, 280:1430-42, 2013. 査読有。
- (4) Wakabayashi S, Hisamitsu T, Nakamura TY. Regulation of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger in health and disease. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, 61:68-76, 2013. 査読有。
DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.02.007.
- (5) Nakamura TY, Wakabayashi S. Role of neuronal calcium sensor-1 in the cardiovascular system. **Trends Cardiovasc. Med.**, 22:12-17, 2012. 査読有。 DOI: 10.1016/j.tcm.2012.06.004
- (6) Nakamura TY, Wakabayashi S. Diverse functions of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in excitable cells. **Trends in Cell & Molecular Biology**, 7:99-110, 2012. 査読有。
- (7) Kuramoto K, Okamura T, Osumi T. et al. 18人中4番目。Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects the heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation. **J. Biol. Chem.**, 287:23852-63, 2012. 査読有。 DOI: 10.1074/jbc.M111.328708
- (8) Hisamitsu T, Nakamura TY, Wakabayashi S. Na⁺/H⁺ exchanger 1 directly binds to calcineurin and activates downstream NFAT signaling, leading to cardiomyocyte hypertrophy. **Mol. Cell. Biol.**, 32:3265-80, 2012. 査読有。 DOI: 10.1128/MCB.00145-12

[学会発表](計 28件)

中村-西谷友重。Regulation of energy metabolism by intracellular Ca²⁺ signals. 第92回日本生理学会大会(神戸国際会議場), 2015年3月

中尾 周。Role of neuronal Ca²⁺ sensor-1 in learning and memory in mice. 第92回日本生理学会大会(神戸国際会議場), 2015年3月

Nakamura TY. Cardioprotective Role of Neuronal Ca²⁺-Sensor -1 during Stress. Biophysical Society 59th Annual Meeting (Baltimore/USA), 2015年2月

Morganstein J. Infant Sudden Death: Novel Mutations Responsible for Impaired Nav1.5 Channel Function. Biophysical Society 59th Annual Meeting (Baltimore/USA), 2015年2月

中村(西谷)友重。Ca²⁺シグナル調節因子による新規肥満制御経路の解析。第107回近畿生理談話会(兵庫医療大学), 2014年11月

中尾 周。マウス心筋細胞における核内カルシウム動態の生理的役割:細胞内カルシウム動態との関連について。第87回日本生化学会大会(国立京都国際会館), 2014年10月

中村(西谷)友重。マウスの空間学習・記憶におけるカルシウムセンサーNCS-1の役割。第87回日本生化学会大会(国立京都国際会館), 2014年10月

若林繁夫。Na⁺/H⁺交換輸送体のスフィンゴ脂質による活性化。第87回日本生化学会大会(国立京都国際会館), 2014年10月

中村(西谷)友重。ストレス下の心筋におけるサバイバル機構:Ca²⁺センサーNCS-1の役割。第5回Molecular Cardiovascular Conference II(神戸ベイシェラトンホテル&タワーズ), 2014年9月

若林繁夫。ATP結合蛋白質としてのNa⁺/H⁺交換輸送体NHE1:脂質結合ドメインを介する活性制御。第91回日本生理学会大会(鹿児島大学), 2014年3月

中村-西谷友重。心筋細胞における核内および細胞質内Ca²⁺制御とその生理的意義:NCS-1の役割について。第91回日本生理学会大会(鹿児島大学), 2014年3月

中尾 周。心筋細胞の核内カルシウム濃度調節におけるカルシウムセンサーNCS-1の機能とその局在。第91回日本生理学会大会(鹿児島大学), 2014年3月

中尾 周。心筋細胞の核内Ca²⁺濃度調節におけるカルシウムセンサーNCS-1の役割。第106回近畿生理学談話会(奈良県立医科大学), 2013年11月

中村(西谷)友重。新たな肥満制御因子としてのCa²⁺センサーNCS-1の役割。第86回日本生化学会大会(パシフィコ横浜), 2013年9月

中尾 周。心筋の核内カルシウムシグナル制御におけるカルシウムセンサーNCS-1の役割。第86回日本生化学会大会(パシフィコ横浜), 2013年9月

若林繁夫。Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1)の活性調節は脂質結合ドメインの分子スイッチ機構で起こる:制御に選択的な薬剤を用いた解析。第86回日本生化学会大会(パシフィコ横浜), 2013年9月

西谷友重(特別講演)。幼少期の心機能を制御する新しいCa²⁺調節タンパク質の発見と分子機構。第16回日本小児心血管分子医

学研究会（国立オリンピック記念青少年総合センター）、2013年7月

Nakamura-Nishitani TY, Neuronal Ca²⁺ sensor-1 promotes cardiomyocyte survival under stress. ISHR XXI World Congress (San Diego Convention Center/USA), 2013年7月

稲垣薫克。慢性低酸素により生じる右心室肥大におけるNCS-1の働き。第90回日本生理学会大会（タワーホール船堀）、2013年3月

中尾 周。新たな蛍光カルシウムプローブGECOを用いたマウス心筋細胞の核内カルシウム動態の解析。第90回日本生理学会大会（タワーホール船堀）、2013年3月

21. 西谷(中村)友重。心筋細胞の生死を決める新たな調節因子としてのカルシウムセンサーNCS-1の役割。第90回日本生理学会大会（タワーホール船堀）、2013年3月

23. Shimada-Shimizu N, Evidence that Na⁺/H⁺ exchanger 1 is an ATP-binding protein: a possible mechanism for ATP requirement of transport activity. Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology (名古屋大学・豊田講堂), 2013年1月

24. 西谷友重。幼少期の心機能調節ジョイントリサーチプロジェクト第4回ミーティング（国立循環器病研究センター）2013年1月

25. 中村(西谷)友重。新たな心筋保護因子としてのNeuronal calcium sensor-1の役割と分子機構。第85回日本生化学会大会（福岡国際会議場）2012年12月

26. Nakamura-Nishitani TY. Protection of Cardiomyocytes from Stress-Induced Cytotoxicity by Neuronal Ca²⁺-Sensor-1. American Heart Association Scientific Session (Los Angeles Convention Center), 2012年11月

27. 久光 隆。Na⁺/H⁺交換輸送体NHE1とカルシニューリンとの直接結合を介する新しい心肥大シグナル増強経路。第105回近畿生理学談話会（関西医科大学）、2012年9月

28. 西谷友重。心筋 繊維芽細胞両方による心筋保護効果とNCS-1の役割。第14回応用薬理シンポジウム（ベルクラシック甲府）、2012年9月

〔図書〕(計 2件)

1. 西谷(中村)友重、若林繁夫。幼少期の心機能を制御する新しいCa²⁺調節タンパク

質の発見とその分子機構。日本小児循環器学会雑誌, 30:224-231, 2014.

2. 西谷(中村)友重、若林繁夫。子どもの心臓収縮と心肥大を調節する新しい制御蛋白質 NCS-1。循環器病研究の進歩(通巻52号), Vol. XXXIII/No.1(2012.11):46-55, 2012.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/molecular_physiology/nishitani.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西谷 友重 (NISHITANI TOMOE)

国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：50393244