

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670392

研究課題名(和文)心筋の構造リモデリングを直接鋭敏に反映する新たなバイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Functional Analysis of Muscle Specific NAD/NADH Dehydrogenase, and Establishment as a Biomarker for Cardiac Dysfunction.

研究代表者

砂川 賢二 (Sunagawa, Kenji)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50163043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心筋の構造的な変化に重要な役割を果たすことが示唆される機能未知分子DHR7Cについて、新たな心不全診断マーカーとしての確立を目指すことを最終目標とし、DHR7Cの機能解明ならびにELISA構築を進めてきた。

本研究により、DHR7Cが細胞内の小胞体に局在しcalcium homeostasisの制御分子として機能すること、低酸素応答(HIF)による発現制御を受けることを明らかにした。DHR7CのELISA構築は最適な抗体の条件を確立し、プロトコルの作成も完了した。現在は血液の前処理の条件検討を進めており、今後は健康人および患者の血液サンプルの解析を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：DHR7C (Dehydrogenase/Reductase (SDR Family) Member 7C) is a novel unknown molecule expressed specifically in heart and skeletal muscle. We found DHR7c correlates strongly with left ventricular (LV) function from . We herein aimed to investigate the role of DHR7C in the development of heart failure and to establish as a diagnostic marker of LV dysfunction. We found that DHR7C is a major regulator of cellular calcium homeostasis, locating in sarcoplasmic reticulum. Moreover, we also found the expression of DHR7C is regulated by hypoxia inducible factor (HIF-1). We established a suitable condition of antibodies and protocol for ELISA. We found further determination of serum pretreatment condition is necessary in order to obtain higher sensitivity and to reduce background. We are working for measuring the level of DHR7C in serum from healthy volunteer and heart failure patients.

研究分野：循環器内科学

キーワード：カルシウム 筋肥大 心肥大

### 1. 研究開始当初の背景

心不全は、すべての心疾患の終末像であり、その予後は不良である。またその臨床像は、薬物療法のみで日常生活に何ら支障がないほどの軽症から、直ちに心移植が必要と思われるものまで極めて多様である。しかしながら病態の進行の予測は困難であり、早期発見早期治療が望まれている。現存する心不全のバイオマーカーとして広く使われている BNP または NTproBNP は、患者血液にて測定できる心不全マーカーとしてその診断と治療に広く臨床でも使用されている。しかし、腎不全患者、心房細動患者、収縮性心膜炎などでは正確には反映されず、また代償機構が働いている心筋症早期では、正常範囲となることも臨床上好く知られた事実である。従って、心筋症の早期発見につながる精度の高い新たな心不全診断マーカーの確立が急務である。

### 2. 研究の目的

心不全は増加の一途をたどっており、心筋症の早期発見早期治療が重要である。そのため、本研究では、より心筋の構造的な変化を鋭敏に捉えることができる新たな心不全診断マーカーの確立を目指す。申請者らは多様な重症度を有する患者心筋からマイクロアレイによりその左室拡大、収縮低下に伴って極めて鋭敏に変動する因子である DHR7C を同定した。本研究の目的は、①ELISA による血中 DHR7C の定量方法の確立ならびに②その発現制御機構の解明を行うことである。そのために、健常者ならびに心不全患者におけるサンプルを収集し、新規心不全診断マーカーを確立し、圧負荷、容量負荷の動物モデルを用いてその発現制御メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### ① ELISA 構築

DHR7C による新たな心不全・心筋症診断マーカーを確立するために、サンドイッチ法 ELISA による DHR7C の定量方法の確立のための実験を行った。

#### ② ELISA を用いた血中 DHR7C の測定

心不全患者および健常者の血液中 DHR7C の測定を行い、詳細な臨床データとあわせた解析を行っている。

#### ③ C2C12 細胞を用いた機能解明

C2C12 を用いて、DHR7C の NAD/NADH 脱水素酵素としての機能を解析した。

#### ④ DHR7C の発現制御機構の解明

DHR7C のゲノム領域のプロモーター解析を行い、どのようなシグナルによって遺伝子発現を制御されているのかを調べた。

### 4. 研究成果

#### ① ELISA 構築

##### ①-1 抗体条件の確立

まず DHR7C たんぱく質認識をするポリクローナル抗体の作成を行った。抗原はマウス DHR7C を大腸菌 BL21 に強制発現し、DHR7C のたんぱく質を精製した。その抗原を用いて DHR7C のポリクローナル抗体を作成した。

##### ①-2. ELISA 構築

ELISA サンドイッチ法のプロトコル構築のために、①-1 で作成した DHR7C の抗体と市販の DHR7C ペプチド抗体 (sigma HPA029558, abcam ab116345) を用いてサンドイッチ法の最適条件プロトコルを作成した。DHR7C ELISA の構成は下記のとおりである。

- ・ 96well プレート : NUNC 442404 Nunc-immuno plate F96 maxisorp
- ・ 捕捉用抗体 : DHR7C ポリクローナル抗体
- ・ 洗浄 : 0.05% Tween20 in PBS
- ・ ブロッキング : 1% BSA in PBS
- ・ 1 次抗体 : abcam116345
- ・ 2 次抗体 : CST HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体
- ・ 基質 : Tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate system for ELISA
- ・ 反応停止液 : 1 N HCl

上記の ELISA によって、緩衝液中の DHR7C たんぱく質は検出できるが、血中に含まれる DHR7C が大変微量であることと、DHR7C の抗体反応が血中では特異性が非常に低くなるため、現在血液の前処理の条件検討を進めている。

②ELISA を用いた血中 DHR7C の測定は、血液の前処理の条件検討が終了次第、採取している健常人および患者の血液サンプルの解析を今後進めていく予定である。

#### ③ DHR7C 機能解明

DHR7C は筋小胞体に局在する (図 1)。DHR7C は NAD/NADH デヒドロゲナーゼ活性ドメインを有する酵素であり、NADH と結合することが *in vitro* 実験で示されている (Biochem. J. (2012) )。しかし、小胞体において DHR7C が関与する小胞体の Calcium 制御における NAD/NADH デヒドロゲナーゼ活性の意義、および細胞における DHR7C の機能は十分に知られていない。

我々は、DHR7C の NAD/NADH デヒドロゲナーゼの catalytic core motif である YXXXK を point mutation (Y191F, K195Q) した DHR7C 過剰発現細胞を C2C12 細胞をもちいて、Ca 制御および細胞における NAD/NADH デヒドロゲナーゼ活性の役割を解析した。

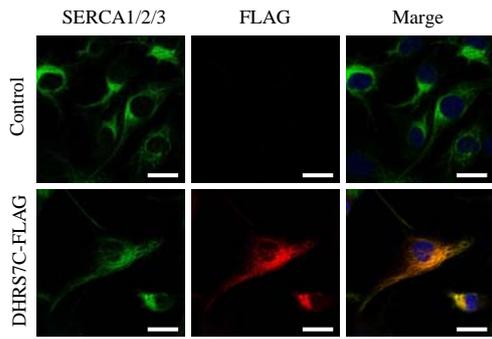


図 1. DHR57C の小胞体局在 (C2C12 細胞)  
DHR57C に FLAG タグをつけ C2C12 に強制発現  
させ、その局在を調べた。

その結果、Wild type の DHR57C の C2C12 細胞は Control と比較し細胞の形態に変化はなかったが、Y191F and K195Q mutants で顕著な細胞肥大が観察された。図 2 には mutation 型において観察される Myotube の肥大化を示す (図 2)。

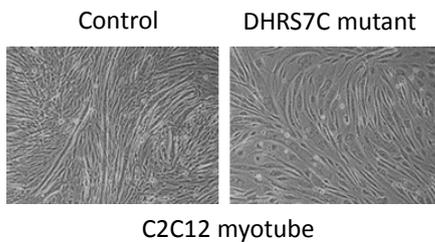


図 2. 細胞の肥大化

細胞が肥大する原因として、DHR57C が筋小胞体に存在することから、細胞質内のカルシウム制御機構の破たんが推測できた。そこで、Fura-2 を用いた細胞内 resting point のカルシウム測定をイオノマイシンを用いた測定法により解析したところ、mutation 型で細胞質内のカルシウム濃度の上昇が認められた (図 3)。

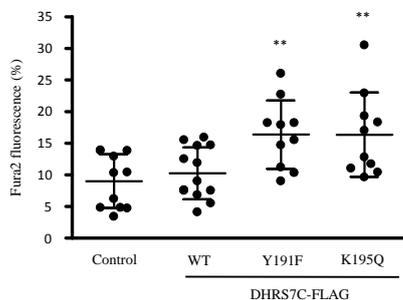


図 3. 細胞内 Ca<sup>2+</sup>測定

次に、細胞内のカルシウム濃度上昇の原因として Point mutation 型による SR のカルシウムストアへの影響を、タブシガルギンを用いた SR Calcium release の誘導実験で調べた。その結果、図 4 に示すように Point mutation

型で有意な SR ストアカルシウム上昇が確認できた。

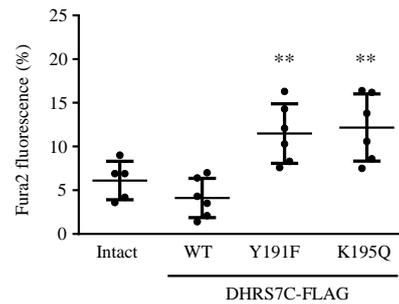


図 3. SR Ca<sup>2+</sup>測定

さらに、CRISPR/Cas9 system を利用して C2C12 細胞における DHR57C KO 細胞を作成した。KO 細胞においても同様の結果が得られた (図 4)。

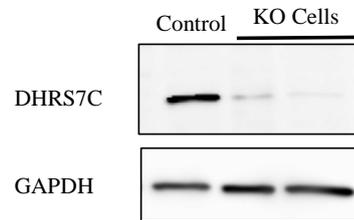


図 4. CRISPR/Cas9 system による DHR57C KO 細胞の構築

すなわち DHR57C は NAD/NADH 加水分解酵素として細胞内カルシウム制御にきわめて重要な働きを有することが明らかとなった。  
(論文投稿中)

### ③DHR57C の発現制御機構の解明

DHR57C の発現制御機構として、C2C12 細胞を用いた発現解析実験を行った。DHR57C のゲノム領域の解析により、5' プロモーター領域に HIF1 の結合部位を有することが確認できた。そこで、Hif 1 との関連性を調べるために、Hif1 の分解タンパクである PHD の阻害剤である塩化コバルトを用いて、DHR57C の遺伝子発現の変化を調べた。その結果、DHR57C は低酸素応答 (HIF) で発現が優位に抑制されることが明らかとなった (図 4)。

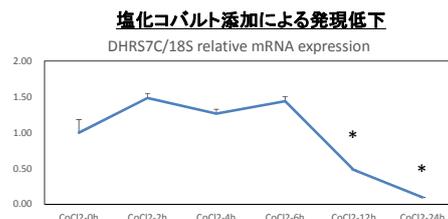


図 4. CoCl<sub>2</sub> による HIF 活性化と DHR57C の発現抑制

Hif1 の活性化は遺伝子発現を誘導することが多く報告されており、抑制的に発現制御する遺伝子については報告が少ない。現在、この結果をもとに、DHRS7C と Hif1 の制御機構の関係について詳細に解析を進めている。

#### 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 2 件)

1. Ikeda M, Ide T, Fujino T, Arai S, Saku K, Tyynismaa H, Yamasaki T, Yamada K, Kang D, Suomalainen A, Sunagawa K. Overexpression of TFAM or Twinkle increases mtDNA copy number and facilitates cardioprotection associated with limited mitochondrial oxidative stress. PLOS One 10 e0119687, 2015

2. Arai S, Ikeda M, Ide T, Hirano K, Matsuo Y, and Sunagawa K. Muscle specific NAD/NADH dehydrogenase, DHRS7C, maintains intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cellular morphology (投稿中)

[学会発表] (計 2 件)

1. 井手友美 ベッドサイドとラボで学んだ心筋症. 東京心臓病理フォーラム (特別招待講演) 2013年8月10日 東京

2. Arai, S., Ide, T., Ikeda, M., Hirano, K., Matsuo, Y., Sunagawa, S. (2014) DHRS7C NAD/NADH dehydrogenase catalytic core domain is essential for cellular calcium homeostasis and cell morphology. 2014 第31回国際心臓研究学会 (ISHR) (査読有)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

砂川 賢二 (SUNAGAWA, Kenji)  
医学研究院循環器内科学教授  
研究者番号 : 50163043

##### (2) 研究分担者

新井 しのぶ (ARAI, Shinobu)  
九州大学病院学術研究員  
研究者番号 : 30529970

井手 友美 (IDE, Tomomi)  
医学研究院循環器内科学講師  
研究者番号 : 90380625

##### (3) 連携研究者

なし