

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670397

研究課題名(和文) 房室結節の発生機序解明による新規房室ブロック内服治療法の開発

研究課題名(英文) Up regulation of autophagy in Hsp60 mutant heart is an adaptive response to increased oxidative stress and causes cardiomyopathy

研究代表者

牧野 伸司 (Makino, Shinji)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：20306707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：熱ショックタンパク60に点変異を持つゼブラフィッシュ変異個体が成長後に突然死して、野生型個体と比較して寿命が短いことを発見した。原因遺伝子不明の拡張型心筋症家系において熱ショックタンパク60の異常をスクリーニングしたところ、点変異を持つ一家系を発見した。熱ショックタンパク60に点変異を持つゼブラフィッシュ個体に温度や低酸素のストレスを加えると房室ブロックを高頻度に発症して心不全になることを発見した。

研究成果の概要(英文)：This study is aimed to determine if hsp60 dysfunction leads to cardiomyopathy. We have developed a zebrafish mutant, nbl, which has a missense mutation in hsp60, leading to the loss of function. WT embryos showed higher survival rate (81%), compared to 65% in case of nbl homozygous mutant, when subjected to 33°C. Surprisingly, 92% of nbl mutants showed a pericardial edema. Also, nbl homozygous mutants showed the sudden death around 8 months post fertilization (mpf). In 8 mpf, nbl mutants showed dilated heart and high ROS expression. mRNA expression pattern of atg5, atg3 and gabarap were found to very high in nbl homozygous compared to WT. Further, analysis of genetically unrelated patients with familial DCM, who had no mutations in the known DCM-causing genes, identified an hsp60 mutation in one DCM family in which two of four mutation prone individuals died suddenly. Over expression of nbl type or DCM patient-type mutation in Hsp60 increases autophagosomes.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ゼブラフィッシュ変異体 拡張型心筋症 突然死

## 1. 研究開始当初の背景

進行性心臓伝導障害は、進行性の房室ブロック・脚ブロックという心電図所見を特徴とし、心臓刺激伝導系の線維変性によって突然死をきたす疾患である。進行性家族性心臓ブロックはレネグレ・レブ病とも呼ばれ、まれな疾患であるために遺伝学的手法を用いた病因は把握できていない。60歳男性の10年間の完全房室ブロック発症率は0.07%と比較的高率であるが、心筋症、サルコイドーシス、虚血以外の原因については調べずにペースメーカー挿入治療が行われている。ペースメーカーは機械本体の値段が150万円前後する。年月が経つと電池切れになり機械本体を交換しなくてはならない。新規と交換を合わせると日本では年間約6万件的ペースメーカーが挿入されている。そのために費やされる医療費は年間に900億円である。ペースメーカー本体以外に手術に要する賃金を加えると超大な税金が心臓伝導障害の治療に使われている。

## 2. 研究の目的

進行性家族性房室ブロックは、まれな疾患であるために正確な有病率や原因は不明である。これまでのところ刺激伝導系の修復や再生は不可能であると考えられている。我々はDNA点変異を誘発するアルキル化剤を用いたゼブラフィッシュ変異体スクリーニングから、ヘテロ変異の成獣でも房室ブロックを示す突然変異体 (*nbl*) を樹立した。ポジショナルクローニング法により、*nbl* 変異体は heart shock protein 60 (*hsp60*) 遺伝子に点変異があることを発見した。ホモ *nbl* 変異体では *hsp60* の loss of function により、房室結節に多数のアポトーシス細胞が観察された。本研究は、房室ブロックを示すゼブラフィッシュ変異体と房室伝導障害を示す家族性心筋症を用いて *hsp60* 機能不全による房室ブロック発症の機序解明を行い、完全房室ブロックに対する新たな薬物療法への道を開くことを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究代表者は、房室ブロックを示すゼブラフィッシュ *nbl* 変異体を樹立し、原因遺伝子 *hsp60* の変異部位同定を行った。小型魚類で発見された *hsp60* 変異が、どれくらいの比率でヒトの病態でも認められるかを調べる。完全房室ブロックに対する薬物治療が開発されていないのは、刺激伝導系の発生や分化の機構が明らかでないことに起因している。不均一な細胞で構成される刺激伝導系で分子間相互の関係、転写因子のカスケードを明らかとして、今まで見えなかった刺激伝導系の全貌を理解すること

から薬物治療の道を開く。これらのメカニズムの解析と平行して、コネキシンプロモーターと Cre-lox システムを用いて、房室機能正常時は赤色蛍光を示し、房室伝導機能低下時には緑色蛍光の房室結節を示す小型魚類を用いた生体内可視化システムを構築して、将来の創薬に向けた基盤を作った。

ゼブラフィッシュ変異体を用いた房室ブロック解析、可視化システムの構築は、研究代表者と大学院生を中心に行った。

房室伝導機能の定量化は、SONY の motion vector を使って行った。Motion vector は、実体顕微鏡下での心臓拍動の各点での動きを詳細に解析できる機器であり、小型魚類の房室ブロック解析が非侵襲的に可能であった。

虚血や心筋症、サルコイドーシス以外が原因の房室ブロック患者の *hsp60* 変異を検索した。*nbl* 変異体の遺伝子変異部位のヒト房室ブロックでの解析、相互作用する分子の解明、房室結節細胞内情報伝達を小型魚類、マウス、ヒトを組み合わせることで、刺激伝導系の線維変性による房室ブロック発症の原因を調べた。病態解明と並行して、房室ブロック可視化モデルゼブラフィッシュ作成のための各種コネキシンのプロモーター解析もおこなった。*nbl* 変異体を掛け合わせ、房室ブロックの重症度を生体内で蛍光変化により可視化できる系を確立することを試みた。

## 4. 研究成果

我々はDNA点変異を誘発するアルキル化剤を用いたゼブラフィッシュ変異体スクリーニングから、ヘテロ変異の成獣でも房室ブロックを示す突然変異体を樹立した。*nbl* 変異体は、ENU による点変異であるため、胎生致死の *hsp60* ノックアウトマウスなどよりもヒトの病態に近似する表現型を示した。ポジショナルクローニング法により、*nbl* 変異体は heart shock protein 60 (*hsp60*) 遺伝子に点変異があることを発見した。ホモ *nbl* 変異体では *hsp60* の loss of function により、房室結節に多数の死細胞が観察され、細胞内では大量のミトファジーが観察された。

心臓が外部から可視化できるゼブラフィッシュと、蛍光蛋白を用いたトランスジェニック魚を組み合わせると、体外から房室伝導機能が定量的に評価可能となる。心臓の機能に応じて蛍光蛋白の色を変えるシステムを確立することにより、経済性の観点からも秀でた研究システムの構築を試みたが、定量性については疑問が残る結果となった。ゼブラフィッシュゲノムの結果より、ゼブラフィッシュとヒトの間は80%以上の遺伝子を共有していること、心筋サルコメアを構成する遺伝子では、95%以上の

DNA 配列がヒトとの間で保存されていることより、小型魚類を用いて得られた房室機能の知見は、ヒトでも共通することが予想された。

さらに房室伝導不全を示すヒト拡張型心筋症家系で同様の変異が発見されたことから、hsp60 経路は房室結節と心臓自律神経をつなぐ心臓神経伝達機能調節の中心を担っていることが発見された。房室結節内でのストレス情報が、神経に伝わる機序は全く不明だったことが有効な治療法がないことの原因の一つだったと考えられた。本研究により解明される全く新しい完全房室ブロック発症機序は、房室ブロックに対する創薬のターゲットになり、長期的な成果として薬剤による内服治療を可能にすると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Fanhchaksai K, Okada F, Nagai N, Pothacharoen P, Kongtawelert P, Hatano S, **Makino S**, Nakamura T and Watanabe H, Host stromal versican is essential for cancer-associated fibroblast function to inhibit cancer growth. **International Journal of Cancer**, 13 Aug 2015. 査読有
  2. Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, Kusumoto D, Kuroda Y, Okata S, Suzuki T, Inohara T, Arimura T, **Makino S**, Kimura K, Kimura A, Furukawa T, Carrier L, Node K, Fukuda K. Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc*. 2014 Nov 11; 3(6):e001263. 査読有
  3. Egashira T, **Makino S**, Kunitomi A, Okada M, Maekawa Y, Fukuda K, Necessity for rule out coronary artery disease with the positive findings of 18F-FDG-PET in case of systemic sarcoidosis **Int J Cardiol**. 2014 Apr 1; 72(3):e401-2. 査読有
- [学会発表] (計 12 件)
1. **牧野伸司**, Proteoglycan is Essential for Developing Closed Circulatory System, 日本循環器学会、2015 年 4 月 23-26 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
  2. Nishant Mittal, **Shinji Makino**, Keiichi Fukuda. Versican secretion is required for vasculogenesis during embryoni development. Weinstein meeting on Cardiovascular Development. Weinstein cardiovascular meeting. 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日、ボストン(米国)
  3. Hirokazu Enomoto, **Shinji Makino**, Nishant Mittal, Akira Kudo, Keiichi Fukuda. Prolonged space flight induced alterations in the structure of Medaka cardiac muscle fibers and gene expression. アメリカ心臓病学会、2015 年 11 月 7-10 日、オーランド(米国)
  4. Nishant Mittal, Keiichi Fukuda, **Shinji Makino**. Versican is essential for closed cardiovascular system. 日本循環器学会、2016 年 3 月 18-20 日、仙台国際会議場(宮城県仙台市)
  5. **牧野伸司**, 3 次元構造をもった臓器・器官の再生医療を目指す、日本再生医療学会、2015 年 3 月 19-21 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
  6. S Hatano, **S Makino**, N Mittal, T Nakamura, and H Watanabe. Loss of Versican in Vascular Smooth Muscle Cells Causes Arterial Hypotension and Cardiac Hypertrophy. European Society of Cardiology(ESC) Congress. 2014 年 8 月 31 日-9 月 3 日、Barcelona, Spain.
  7. Hirokazu Enomoto, **Shinji Makino**, Keiichi Fukuda. Up Regulation of Autophagy in Hsp60 Mutant Heart is an Adaptive Response to Increased Oxidative Stress and Causes Cardiomyopathy. American Heart Association. 2014 年 11 月 15 日-19 日、Chicago, USA.
  8. 小田真由美、福田恵一、**牧野伸司**、成熟細胞の細胞特異的遺伝子 gene body 領域における能動的 DNA 脱メチル化分子機構の関与、日本エピジェネティック研究会、2014 年 5 月 25 日 - 27 日、東京大学(東京都文京区)
  9. 小田真由美、福田恵一、**牧野伸司**、細胞種特異的遺伝子 gene body 領域における DNA 脱メチル化と転写マシナリーの長期的な相互作用、高遠シンポジウム、2014 年 8 月 28 日 - 29 日、高遠さくらホテル(長野県伊那市)
  10. 幡野その子、**牧野伸司**、ミッター ニシヤント、中邨智之、木全弘治、渡辺秀人、The role of Versican in adult cardiovascular system、第 46 回日本結合組織学会学術大会&第 61 回マトリックス研究会大会合同学術大会、2014 年 6 月 5 日 - 7 日、ウインクあいち(愛知県名古屋市)
  11. 小田真由美、福田恵一、**牧野伸司**、Long-term interaction of gene body DNA hypomethylation and transcriptional activity of cell type-specific gene regulation in the development、日本分子生物学会、2014 年 11 月 25 日 - 27 日、パシフィコ横浜

(神奈川県横浜市)

12. 小田真由美、福田恵一、牧野伸司、細胞種特異的遺伝子 gene body 領域における DNA 低メチル化と転写マシナリーの長期的相互作用の可能性、日本再生医療学会、2015 年 3 月 19 日 - 21 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[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]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

牧野 伸司 (MAKINO SHINJI)  
慶應義塾大学・医学部・特任准教授  
研究者番号：20306707

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし