

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860570

研究課題名(和文) 心筋症の新たな重症化因子DHR57Cが関与する細胞内Ca²⁺制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of DHR57C for aggravation factor in cardiomyopathy

研究代表者

新井 しのぶ(Arai, Shinobu)

九州大学・学内共同利用施設等・研究員

研究者番号：30529970

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)：我々は心筋症の新たな重症化因子の特定を目指し、心不全患者の心筋組織内の遺伝子発現解析をマイクロアレイを用いて行い、左室収縮能(LVEF)と相関する遺伝子群を特定した。その結果、特に高い発現変動とLVEFとの高い相関を示した遺伝子は、DHR57Cという機能未知タンパク質であった。本研究は心筋細胞におけるDHR57Cの細胞内動態を解明し、心筋収縮の重症化との関連を明らかにすることを目的とし研究を行った結果、DHR57Cが筋組織の小胞体においてカルシウム調節に関与していること、またそれにより細胞形態維持に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：DHR57C is a molecule specifically expressed in heart and skeletal muscle, of which functions remain unclear. DHR57C decreases its mRNA expression in myocardium in accordance with LV systolic dysfunction. Therefore we aimed to characterize the biological role of DHR57C using C2C12. We generated cell lines with DHR57C knock and point mutations in NAD/NADH dehydrogenase core domain of DHR57C, YXXXK to Y191F and K195Q, in C2C12. We examined cellular morphology, calcium influx/release using fura2, and calpain activity. We found DHR57C transcription was increased when they were differentiated in C2C12 and showed localization in SR. DHR57C-KO and two mutant lines showed cellular hypertrophy, and extracellular calcium influx and ER calcium release were also increased significantly compared to control. DHR57C regulates intracellular Ca²⁺ homeostasis depending on NAD/NADH dehydrogenase activity, and functional loss of DHR57C causes abnormal Ca²⁺ increase and cellular hypertrophy.

研究分野：分子生物学

キーワード：DHR57C ER/SR calcium hypertrophy

1. 研究開始当初の背景

心不全はあらゆる心疾患の終末像でありその予後は極めて不良である。特に、拡張型心筋症はその発症機序も不明であり、種々の薬剤に治療抵抗性であることが知られている。近年、ジストロフィンやデスミンなどの細胞骨格蛋白の遺伝子改変マウスの解析により、これらが拡張型心筋症の原因遺伝子であるといわれているが、実際の拡張型心筋症患者においてこれらの遺伝子変異が認められる確率は極めて低い。よって新たな観点から心筋症の進展に関与する因子ならびに治療法の確立が求められる。

このような事態を踏まえ、心筋症発症および重症化に関与する因子を突き止める研究を2008年より開始した。まず、九州大学病院循環器内科入院中の心筋症患者36名から採取した心筋生検サンプルを用いて、遺伝子発現解析を行った。この結果、BNPやCTGFなどの既知の心不全の重症化度と相関する遺伝子の動態を捉えることができた(図1)。さらに網羅的解析の結果、DHRSC7Cという遺伝子がBNPやCTGF以上に、左室駆出率%(LVEF%)と相関していることが明らかとなった。図2は、BNPおよびDHRSC7Cの遺伝子発現の結果をLVEF%との相関関係とともに分散図にしたものである。BNPは $r=-0.57$ であるのに対し、DHRSC7Cは $r=0.71$ と相関が高く、またLVEF%が重症な人と軽度な人で最大約64倍も遺伝子発現に差が見られた。この結果から、DHRSC7CがBNPよりも心筋収縮の重症度を非常によく反映している可能性が示唆される。DHRSC7Cはアミノ酸配列より脱水素酵素活性を有すると予測されている。しかしながら心筋組織における機能のみならず、細胞内分子機能もほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

心筋収縮を細胞内分子レベルで説明する際、細胞内Ca²⁺のrelease/influx機構は欠かせない。Ca²⁺のrelease/influxの破綻は細胞肥大を誘発し、結果的に心筋収縮能の低下を引き起こす。我々は、Ca²⁺のrelease/influxに新規の機能未知タンパク質DHRSC7Cが関与することを突き止めた。DHRSC7C研究の発端は、我々が行った心筋症患者の心筋組織の遺伝子発現解析により、DHRSC7Cが心不全重症度と極めて高い負の相関を示したことから始まった。本研究はDHRSC7Cの心筋細胞肥大におけるCa²⁺のrelease/influxを分子細胞学的に解明することで、心不全重症化の分子メカニズムを臨床的にも説明できることを目的とする。

3. 研究の方法

DHRSC7CのKnock out C2C12 cell line (DDHRSC7C-KO)の作成: CRISPR/Cas9の手法を用いて作成した。CRISPR/Cas9によるDHRSC7Cゲノムのターゲット領域は2領域とした。

DHRSC7C NAD/NADH dehydrogenase 活性ドメインの point mutation 過剰発現、およびWT型のDHRSC7C過剰発現のC2C12 Cell line (Y191F, K195Q)を作成(図1)。図1に示すCatalytic core domainであるYXXXKのY(チロシン)およびK(リジン)をF(フェニルアラニン)およびQ(グルタミン)にそれぞれsite direct mutagenesisの手法によって変換した。

```

1  MGLMAVLMPLPLLLGISGLLFYQEAASRLWSKSAVQNKVVVITDAISGLG
51  KECARVFHAGGARLVLCGKNWEGLESYATLTSVADPSTFTPKLVLLDL
101  SDISCVQDVAKVLDVCGCVDLINNASVKVKGPAHKISLELDKKIMDAN
151  YFGPITLTKVLLPNMISRRTGQIVLVNNIQAKFGIPFRTAY AAS KHAVMG
201  FFDCLRAEVEEYDVVSVTVSPIFIRSYRASPEQRNWTESICKFFCRKLAY
251  GVHPVEVAEEVMRTVRRKKQEVFMANVPVKA AVFIRTFPEFFFAVACG
301  VKEKLVNPEEG
    
```

Gray zone: NAD/NADH dependent dehydrogenase
Red: catalytic core domain, YXXXK

図1. DHRSC7C アミノ酸配列

NCBI (NM_001013013)

下線は NAD/NADH dehydrogenase 活性領域。

赤字は Catalytic core domain

、 で作成した DHRSC7C-KO, DHRSC7C-Y191F および DHRSC7C-K195Q Cell line の表現型および細胞内カルシウムおよびERカルシウムの測定をFura-2によるカルシウム蛍光標識によって解析した。

細胞表現型解析: 、 のCell lineで細胞の肥大化が観察された。肥大化の原因としてカルシウム依存型プロテアーゼであるCalpainの関与を、Calpain activity assay kitを用いて解析した。

DHRSC7C KOマウスの解析: DHRSC7Cが筋組織の小胞体カルシウム調節に関与することから、心不全モデルにおける心機能解析および筋力の解析を行った。

4. 研究成果

Leuらによる2012年の研究において、DHRSC7Cが筋小胞体に特異的に局在するタンパク質であることが報告された。我々の実験においても、DHRSC7Cは筋組織(骨格筋および心筋)に特異的に発現し、とくに小胞体に局在することが確認できた(図2)。またDHRSC7Cの発現は筋芽細胞ではほぼ発現しておらず、myotubeへの分化誘導後に発現が活性化された(図2)。このことから、DHRSC7Cが筋組織の特に筋小胞体で特異的に機能する分子であると推定された。

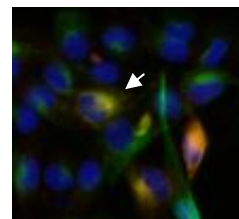
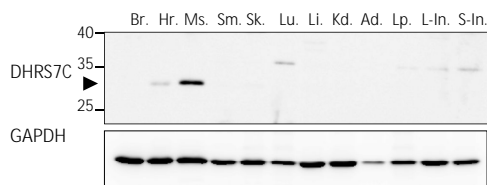


図2: DHRSC7C(AIxa-555;red), SERCA1/2/3 (Alexa-433;green), Nuclei (DAPI, blue)

DHRS7C に flag tag を付けた DHRS7C-flag を C2C12 細胞に強制発現させた免疫染色。黄色に観察される部分は、DHRS7C と SERCA1/2/3 が共局在している（矢印）。

A



B

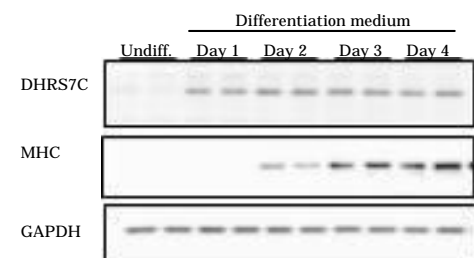


図 3 . DHRS7C のたんぱく質発現パターン
A: C57BL/6J の組織におけるたんぱく質発現。Br: Brain, Hr: Heart, Ms: Muscle, Sm: Stomach, Sk: Skin, Lu: Lung, Li: Liver, Kd: Kidney, Ad: Adrenal, Lp: Lipid, L-in: Large intestine, S-in: Sort intestine, Muscle と Heart でのみ特異的に発現している。
B: C2C12 細胞の分化誘導の経時変化と DHRS7C の発現。Differentiation medium に培地を好感してから 1 日目で DHRS7C の発現が誘導された。

DHRS7C KO Cell line の作成 : CRISPR-Cas9 system によって C2C12 細胞の DHRS7C のゲノム領域を一部欠損させ、KO 細胞を作成した。この細胞は Control C2C12 細胞と比較し、細胞の肥大化が観察された。また、その表現型と関連して細胞質内および ER 内カルシウムストアが顕著に増加していた。このことは、DHRS7C mutation cell line (Y191F, K195Q) においても同様の結果が得られたことから、DHRS7C の機能不全によって、ER におけるカルシウム調節機構が破綻し、細胞質内のカルシウム増加、さらにそれによって二次的に細胞の肥大が表現型として観察されたと推測された。

DHRS7C-KO および DHRS7C mutant cell line の細胞肥大は、Calcium dependent protease である Calpain の活性化が原因であった。（論文投稿中により、詳細な結果は後日掲載予定）

DHRS7C KO マウスの解析
DHRS7C の全身 KO を作成し、筋組織のある心臓および骨格筋において、発現が KO されていることを確認した（図 3）。

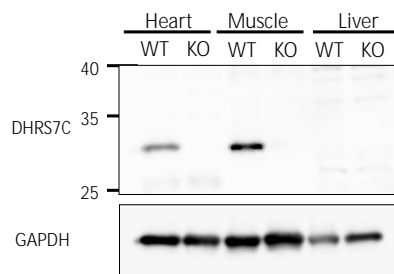


図 4 . DHRS7C KO マウスの作成

図 3 に示すように、DHRS7C は心臓および骨格筋に特異的に発現しており、ゲノムノックアウトによってその発現がたんぱく質レベルで DHRS7C が KO されたマウスの作成に成功した。

-1: DHRS7C KO マウスの解析は現在も進行中である。現在までの解析より、DHRS7C の KO によってマウスの筋力（握力）の低下傾向であった（図 5）。

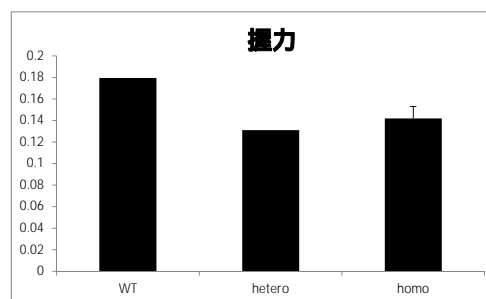


図 5 . DHRS7C-KO による骨格筋力（握力）への影響。WT と比較し、ヘテロおよびホモの DHRS7C-KO マウスでは握力が低下傾向であった。

-2. 心不全モデル作成における DHRS7 - TG の影響

DHRS7C の心臓における機能の重要性を解析するために、DHRS7C の過剰発現マウスを作成した。ヒトにおいては心不全心筋において DHRS7C の発現は顕著に低下する。このことは他のグループにおいても報告されている (Lu B, et, al. Eur J Heart Failure 14: 5-13, 2012.)。よって、DHRS7C の過剰発現マウスを作成することで、心不全モデルマウスの心機能悪化の重症化を抑制できるのではないかという仮説のもと解析を行った。現在までに、心臓圧負荷モデルでは DHRS7C 過剰発現による心不全の抑制は観察できていない。研究が遅延しているため、現在他の心不全モデルで解析を進行中である。

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 1 件)

Shinobu Arai, Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Yuka Matsuo, Takeo Fujino, Katsuya Hirano, Kenji Sunagawa, Hiroyuki Tsutsui.

Functional loss of DHRS7C induces intracellular Ca²⁺ overload and myotube enlargement in C2C12 cells via calpain activation. (2016) AJP cel physiology. In press.

〔学会発表〕(計2件)

Shinobu Arai, Tomomi Ide, Masataka Ikeda, Katsuya Hirano, Yuka Matsuo, Kenji Sunagawa. 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) トラベルグラント受賞

Shinobu Arai, Masataka Ikeda, Katsuya Hirano, Yuka Matsuo, Takeo Fujino, Kenji Sunagawa, Tomomi Ide. DHRS7C NAD/NADH dehydrogenase catalytic core domain is essential for cellular calcium homeostasis. (2015) 第38回日本分子生物学会年会.

Shinobu Arai, Masataka Ikeda, Katsuya Hirano, Yuka Matsuo, Takeo Fujino, Kenji Sunagawa, Tomomi Ide. Muscle specific NAD/NADH dehydrogenase, DHRS7C, maintains intracellular Ca²⁺ homeostasis and cellular morphology. (2015) 第32回国際心臓研究学会 (ISHR)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 しのぶ (Arai Shinobu)

九州大学・ARO 次世代医療センター・学術研究院

研究者番号 : 30529970