

肥大型心筋症における筋原線維形成の分子機構

千葉大学大学院 融合科学研究科 ナノバイオロジーコース
高野 和儀

1. 目的

心筋の収縮を担う装置は横紋筋特有の構造で筋原線維と呼ばれており、心筋細胞内に満たされている。このため、収縮負荷による代償性の心肥大には筋原線維形成が必須であり、筋原線維形成機構の異常は生理的な心肥大を破綻させると考えられる。実際に、肥大型心筋症や拡張型心筋症の原因遺伝子の原因として、筋原線維の構成タンパク質であるアクチンやミオシン、トロポミオシン、タイチン、トロポニン、nebulin⁽¹⁾など、筋原線維を構成するタンパク質の異常が原因となる例が多数報告されている。これらの遺伝子変異が、細胞レベルでの収縮力低下を招き、心臓が拡張した可能性が考えられるが、その発症機構は詳しく解明されていない。

一方、私はこれまでに、骨格筋において筋肥大を誘導するIGF-1が、タンパク質合成を促進するのに加え、そのシグナルの下流で活性化されるAktを介して、筋原線維の構成タンパク質nebulinのリン酸化とN-WASPとの結合を調節することにより、筋原線維形成に関与することを明らかにしている⁽²⁾。筋原線維の形成は、心筋や骨格筋に共通の必須メカニズムであることから、心筋細胞においても骨格筋と同様に、収縮負荷などの外的要因がシグナルとなって心筋の筋原線維を調節する機構が存在すると考えられた。そこで本研究では、代償性の心肥大において筋原線維の形成機構に至るシグナルの解明を目的とした。

2. 方法

(マウス大動脈狭窄術)

生後10週齢のC57BL/6マウスをイソフルランにより麻酔を施し、麻酔下および人工呼吸器の制御下において第2-3肋間を正中線より左右に切開することにより、開創器により広げた約7mm四方の術野を確保した。上行大動脈を露出させた後に、7-0ナイロン糸を用いて上行大動脈を27G針の上から結び、素早く27G糸を引き抜くことにより大動脈内径を27Gに揃えて心臓への圧負荷を誘導した。縫合により閉胸後、麻酔を解除し自発呼吸を確認した後に人工呼吸器を外した。これらのマウスは術後4週間飼育したのちに解析に用いた。動物実験は本学動物実験実施規定に基づき実施した。

(心筋特異的N-WASPコンディショナルノックアウトマウスの作製)

N-WASPのターゲットベクターはC57BL/6マウスゲノムDNAよりPCR法を用いてクローニングし、イントロン2-3およびイントロン3-4にLoxP-Neo^rとLoxPをそれぞれ組込むことにより構築した。エレクトロポレーション法によりN-WASPターゲットベクターを129系統マウス由来ES細胞に導入し、G418を用いて相同組換えが起こったES細胞を選別した。相同組換えES細胞はC57BL/6の8細胞期胚と凝集させ、凝集キメラ胚盤胞期胚を仮親の子宮にインジェクションすることにより、相同組換えES細胞とC57BL/6からなるキメラマウスを作製した。

3. 結果 研究成果

心筋ではnebulinは存在せず、nebulinファミリータンパク質であるnebulinが存在する⁽¹⁾。そこで、まず心筋においてアンジオテンシン-IIなどの肥大のシグナル依存的にN-WASPがnebulinが結合するかを検討した (Fig. 1A)。N-WASPの特異的抗体による免疫沈降を行ったところ、成長期の心筋細胞の増殖に関わるIGF-1⁽³⁾による刺激ではnebulinと共沈せず、アンジオテンシン-II刺激によりN-WASPとnebulinが共沈した。したがって、成体マウスにおいて心筋肥大に関わるシグナリングにより、N-WASPはnebulinと結合することが示された。次に、骨格筋と同様のシグナリングに関わる可能性を検討するため、アンジオテンシン-IIによりGSK-3の活性化状態を検出した (Fig. 1B)。その結果、アンジオテンシン-II刺激によりGSK-3がリン酸化されて不活性化状態となっていたことから、骨格筋と同様にAktの活性化状態がN-WASPとnebulinの結合状態を制御

する可能性が示された。一方、心筋の肥大は圧負荷によって顕著に誘導される。そこで、成体マウスにおいて大動脈狭窄術を行い、圧負荷を誘導した際のN-WASPとnebuletteとの結合を検出した (Fig. 1C)。その結果、大動脈狭窄術によりN-WASPとnebuletteとの結合が誘導された。さらに、私はこれまでに両者の結合によりアクチン重合が促進されること、および筋原線維Z線からアクチン重合が引き起こされることを突き止めていることから、以上をまとめると、心肥大のシグナリングの下流ではN-WASPがnebuletteと結合し、アクチン重合を引き起こす事により筋原線維形成を促している可能性が示唆された。

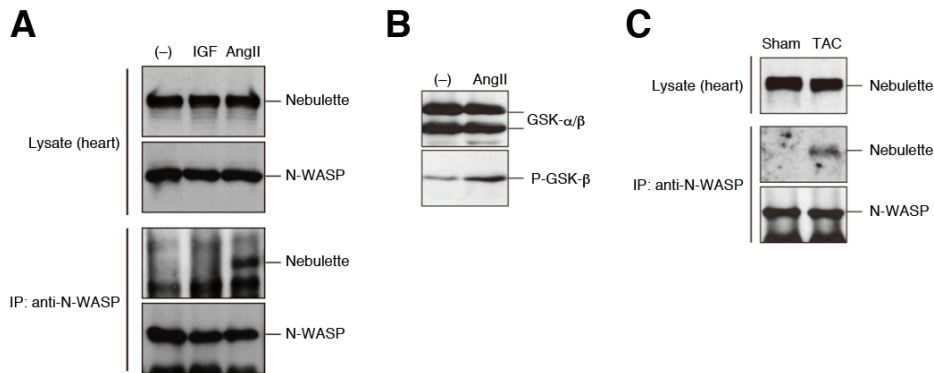


Fig. 1 心筋肥大シグナルによるN-WASPとnebuletteの結合の制御

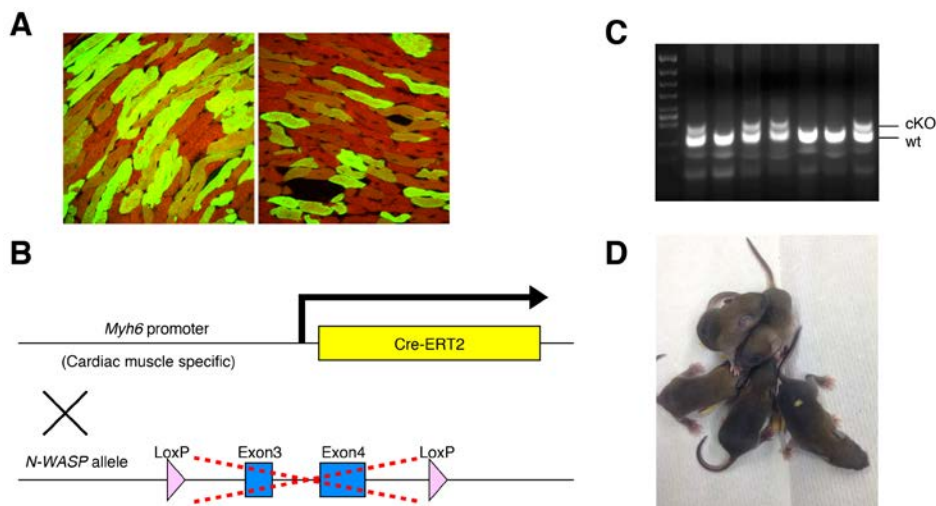


Fig. 2 心筋特異的誘導性N-WASPコンディショナルノックアウトマウスの作製

次に、N-WASPの心筋における生理的役割を明らかにするため、AAV-DJ/8による心筋への遺伝子導入を試みた (Fig. 2A)。試験的にAAV-DJ/8による心筋へのEGFP遺伝子の導入を試みたが、導入効率はインジェクション手技に大きく依存しており、観察部位によっては導入効率の差が顕著であった。効率的なAAVの導入法も報告されていたため⁽⁴⁾、その方法に倣ったが本研究においては遺伝子導入効率が低かった。したがって、将来的に心臓の生理機能測定実験を考えている場合において、本遺伝子導入系は不向きであると考えられた。そこで、私は Fig. 2Bの計画に基づき、N-WASPの心筋特異的ノックアウトマウスの作出を行った。これまでに相同組換えES細胞は4系統得られており (Fig. 2C)、2系統のES細胞に由来するキメラマウスを得ることが出来た (Fig. 2D)。今後はこれらのマウスについて心筋特異的にCreERT2を発現するマウスと交配するとともに、ターゲット遺伝子座をホモ接合型として、大動脈狭窄術による心筋肥大の誘導実験に用いる。さらに、ROSA26遺伝子座におけるノックインにより心筋特異的に蛍光タグを付加したアクチンやN-WASP変異体の発現を誘導し、心筋肥大における筋原線維の様子を可視化することを目指す。一方、私たちが発見したRas-ERKシグナリング抑制因子DA-Rafをノックアウトすることにより、生後28日以内に致死となった (5. 発表論文)。このマウスの死因を解析したところ、心尖部の肥大が認められた。したがって、心筋におけるRas-ERKシグナリングの亢進によっても筋原線維形成がもたらされる可能性が考えられた。

4. 考察 まとめ

本研究では、IGF-1やアンジオテンシン-IIにおいてN-WASPとnebuletteの結合の制御に異なる結果が得られた。双方とも心筋初代培養系においてGSK-3を抑制するAktの活性化を促すことが知られているが、IGF-1は生後の成長期における心筋細胞の増殖に関与するため⁽³⁾、成熟した心筋細胞における肥大においては、IGF-1シグナルが入り難い可能性が考えられる。実際に、生後の成長過程における心臓サイズの決定にはIGF-1シグナルを介した一過的な細胞増殖が関わっていることが報告されており⁽⁵⁾、心筋細胞の増殖は生後の限られた時期に限局することから^(5,6)、心臓においてはIGF-1が極めて短期間のみ働く機構が存在すると考えられる。一方で、恒常的活性変異体GSK-3 β (S9A)のノックインにより圧負荷による心筋の壊死が抑制されること⁽⁷⁾や、心筋特異的Akt1 KOマウスが過剰な運動による心筋肥大に必要であること⁽⁸⁾が報告されている。同様に、本研究においても肥大のシグナルでGSK-3 β のリン酸化が引き起こされた (Fig. 1B)。したがって、Aktシグナルは圧負荷に対する適応のために筋原線維形成を促すと仮定するのは妥当であり、筋原線維形成が圧負荷に対する心筋の保護作用をもたらす収縮力を付与する点で納得できる。今後は収縮負荷に対する適応としてAktシグナルが調節されて心筋保護のための筋原線維形成を制御する分子機構について、さらに解析を進めるつもりである。

また、成長や運動により引き起こされる心臓の拡張には心筋細胞の長軸方向への筋原線維の追加が主に論じられている⁽⁹⁾。したがって、成長における心筋細胞の増殖を伴った心筋細胞の長軸方向への肥大に対して、肥大型心筋症につながるような圧負荷により起こる心筋細胞の短軸方向へ筋原線維の追加を介した心筋肥大とはそのシグナル制御が異なっていると考えられる⁽⁴⁾。また、アンジオテンシン-IIと大動脈結紮において共通してN-WASPとnebuletteとの結合が誘導されたことから、心筋肥大において短軸方向への筋原線維の追加にはN-WASPによるアクチン重合活性が必要であると考えられる。この仮説は本研究により作出した誘導性コンディショナルノックアウトマウスの解析により実証することができるだろう。さらに、DA-Raf KOマウスにおいては肺胞形成不全も認められたため (5. 発表論文)、低酸素状態によって心筋の筋原線維形成が引き起こされる要因が考えられる。したがって、血管や腎臓、肺など多臓器による影響を受ける心臓のリモデリングにおいて、今後は筋原線維形成を主体として分類する必要がある。

自明のことであるが、心筋細胞のかたちの変化として説明される心筋肥大は、個々の心筋細胞内に存在する筋原線維の配向方法で捉えられるだろう。しかしながら、心筋においてすでに40年も前から論じられてきたこの現象は未だに分子機構の解明に至っていない⁽⁹⁾。私は骨格筋においてこの視点から筋肥大の分子機構を明らかにしており⁽²⁾、本研究の発展がその分子機構の解明につながり、新たな心筋症の治療法のための基礎を築けるものと信じている。

本稿を終えるにあたり、本研究をご支援頂きましたアステラス病態代謝研究会に深く感謝を申し上げます。

5. 発表論文

Watanabe-Takano, H., Takano, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2014) 111(22): E2291-300.

6. 参考文献

- (1) Ottenheijm, CA. et al., *Hum. Mol. Genet.* (2009) 18, 2359-2369.
- (2) Takano, K. et al., *Science* (2010) 330, 1536-1540.
- (3) Xin, M. et al., *Sci. Signal.* (2011) 4, ra70.
- (4) Kho, C. et al., *Nature* (2011) 477, 601-605.
- (5) Naqvi, N. et al., *Cell* (2014) 157, 795-807.
- (6) van Berlo, JH. et al., *Nature* (2014) 509, 337-341.
- (7) Matsuda, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2008) 105, 20900-20905.
- (8) DeBosch, B. et al., *Circulation* (2006) 113, 2097-2104.
- (9) Grossman, W. and Paulus, WJ. *J. Clin. Invest.* (2013) 123, 3701-3703.